



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ:
ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ
(BONE MARROW-ON-A-CHIP)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΟΝΥΣΙΑΣ ΚΕΦΑΛΛΗΝΟΥ

Διπλωματούχου Φυσικού ΕΚΠΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΤΣΕΡΕΠΗ

Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΑΘΗΝΑ, Σεπτέμβριος 2023



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ:
ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ
(BONE MARROW-ON-A-CHIP)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΟΝΥΣΙΑΣ ΚΕΦΑΛΛΗΝΟΥ

Διπλωματούχου Φυσικού ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ
ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. ΙΩΑΝΝΑ ΖΕΡΓΙΩΤΗ, Καθηγήτρια
ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ
2. ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΤΣΕΡΕΠΗ, Ερευνήτρια
Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
(Επιβλέπουσα)
3. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΟΓΓΟΛΙΔΗΣ,
Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΙΩΑΝΝΑ ΖΕΡΓΙΩΤΗ, Καθηγήτρια ΕΜΠ
2. ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΤΣΕΡΕΠΗ, Ερευνήτρια Α'
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» (Επιβλέπουσα)
3. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΟΓΓΟΛΙΔΗΣ, Ερευνητής Α'
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
4. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Τ. ΜΠΟΥΜΠΙΑΣ, Καθηγητής
Παθολογίας – Ρευματολογίας ΕΚΠΑ,
Διευθυντής Δ' Παθολογικής Κλινικής ΠΓΝ
«Αττικόν»
5. ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΓΕΩΡΓΑΚΙΔΑΣ,
Καθηγητής ΕΜΠ
6. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΚΚΟΡΗΣ, Αναπληρωτής
Καθηγητής ΕΜΠ
7. ΓΙΑΝΝΗΣ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ,
Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, Σεπτέμβριος 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει δικαιωματικά στην επιβλέπουσά μου, Δρ. Αγγελική Τσερέπη, Ερευνήτρια Α' του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (I.N.N.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξη της καθ'όλη τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας. Η ολοκλήρωσή της δε θα ήταν δυνατή χωρίς τη συνδρομή της, τόσο σε επιστημονικό επίπεδο με την ουσιαστική και αφαιρετική σκέψη της, όσο και σε ανθρώπινο, με την ενθάρρυνσή της στις αντικειμενικές δυσκολίες που προέκυψαν τα χρόνια αυτά, εντός και εκτός εργαστηρίου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Δρ. Ευάγγελο Γογγολίδη, Ερευνητή Α' του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για τις καίριες επιστημονικές συμβουλές του, την πολύπλευρη στήριξη του, και το ειλικρινές ενδιαφέρον του σε οτιδήποτε τον χρειάστηκα. Και ασφαλώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ιωάννα Ζεργιώτη, Καθηγήτρια της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών (Σ.Ε.Μ.Φ.Ε.) του Ε.Μ.Π., για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω Υποψήφια Διδάκτορα της Σχολής. Δε θα μπορούσα βέβαια να μην αναφερθώ στον Δρ. Δημήτριο Τ. Μπούμπα, Καθηγητή Παθολογίας – Ρευματολογίας Ε.Κ.Π.Α. και Διευθυντή Δ' Παθολογικής Κλινικής Π.Γ.Ν. «Αττικών», τον οποίο ευγνωμονώ γιατί στην αρχή της διαδρομής μου ως Υποψήφια Διδάκτορα, πήρε την πρωτοβουλία να αναλάβει την οικονομική στήριξή μου, αποτελώντας κινητήριο δύναμη στην ομαλή συνέχιση του έργου μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη Δρ. Μαρία Γρηγορίου, από την ομάδα του Καθηγητή Δημήτριου Τ. Μπούμπα στο Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Επιστημών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.) για τον επαγγελματισμό, τη συνεργασία και τη ζωτικής σημασίας συνδρομή της σε όλο το βιολογικό τμήμα της διδακτορικής μου έρευνας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Βασίλειο Κωνσταντούδη, Ερευνητή Α' του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την ανάλυση εικόνων μικροσκοπίας, το Δρ. Γιώργο Κόκκορη, Αναπληρωτή Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π. για τις υπολογιστικές προσομοιώσεις, και το Δρ. Ιωάννη Ράπτη, Ερευνητή Α' του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για τις μετρήσεις φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS). Ακόμη, ευχαριστώ τη Δρ. Ευαγγελία Ξενογιαννοπούλου από το εργαστήριο του Ερευνητή Α' Αθανάσιου Δημουλά, για την εκτέλεση των μετρήσεων και αναλύσεων XPS, και βέβαια, τη Δρ. Παναγιώτα Πέτρου, του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας, Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και σχόλια. Τέλος, ένα εγκάρδιο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της «ομάδας πλάσματος» για τη βοήθεια, τη συναδελφικότητα και τη διαθεσιμότητά τους, ονομαστικά, τον Παναγιώτη και τον... Παναγιώτη, το Δημήτρη, το Δήμο, και βέβαια, την Αθηνά.

Σε προσωπικό επίπεδο, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Χάρη και τη Μαριάννα, τους δύο ανθρώπους που πραγματικά με έζησαν και με στήριξαν όσο κανείς άλλος στην πορεία μου αυτή, στις πιο ευχάριστες, αλλά και στις πιο δύσκολες στιγμές της. Σε αυτούς αφιερώνω τη διατριβή αυτή.

Η διατριβή αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», που υλοποιείται από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.), καθώς και μέσω του ευρωπαϊκού προγράμματος με τίτλο «LUPUSCARE: Precision care in Systemic autoimmunity: an integrated multi-tissue/level approach for Systemic LUPUS Erythematosus (SLE)», υλοποιούμενου από το Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (organs-on-chips/OoCs) έχουν αναδειχθεί τις τελευταίες δεκαετίες από το γόνιμο συγκερασμό της μικρορευστονικής τεχνολογίας με την κυτταρική βιολογία, αποτελώντας την επιτομή των βιομιμητικών συστημάτων. Αποτελούν αξιόπιστα προκλινικά μοντέλα, δίνοντας απάντηση στις σύγχρονες προκλήσεις στον τομέα της βιοϊατρικής και της βιολογικής έρευνας, που σήμερα περιορίζονται σε συμβατικές στατικές κυτταροκαλλιέργειες και σε πειράματα σε ζώα. Ο μυελός των οστών, λόγω του ζωτικού ρόλου του στον ανθρώπινο οργανισμό με το μηχανισμό της αιμοποίησης, αποτελεί βασικό όργανο μελέτης. Έτσι, η ανάπτυξη μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip/BMoC) αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της βιολογίας του ίδιου του οργάνου, τη χαρτογράφηση σχετιζόμενων ασθενειών, όπως το πολλαπλό μυέλωμα και η λευχαιμία, και τέλος, για τον έλεγχο απόκρισης των κυττάρων του σε φάρμακα, ακτινοβολία και χημειοθεραπείες. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στην ανάπτυξη μιας μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα για την αμιγώς *in vitro* και απουσία ικριωμάτων δημιουργία και συντήρηση της ανθρώπινης περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής του μυελού. Αρχικά, αναπτύσσονται όλα τα στάδια κατασκευής της μικροδιάταξης, από το σχεδιασμό μέχρι και τη σφράγιση της, που οδήγησαν σε επιτυχή και επαναλήψιμη ολοκλήρωση της μικροδιάταξης. Αυτή αποτελείται από δύο κυλινδρικούς μικροθαλάμους πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS), ένα για την τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό και ένα για την καλλιέργεια κυττάρων, τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω παρεμβαλλόμενης πορώδους μεμβράνης, με την όλη διάταξη να σφραγίζεται με γυαλί. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίησή της ήταν λιθογραφία μαλακής ύλης (τεχνική αντιγραφής μήτρας – replica molding) και επιφανειακή τροποποίηση με χρήση τεχνολογίας πλάσματος. Προτάθηκε πρωτόκολλο επιτυχούς και επαναλήψιμης κατασκευής πορώδους μεμβράνης PDMS, στηριζόμενο σε δύο βασικούς πυλώνες, τη χημική επιφανειακή τροποποίηση και την ενίσχυση της μηχανικής της αντοχής. Για λόγους απλούστευσης και επιτάχυνσης της παραγωγικής διαδικασίας μικροδιατάξεων, μελετήθηκε και επιλέχθηκε τελικά η ενσωμάτωση εμπορικής μεμβράνης πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET).

Στοχεύοντας στην επίτευξη μακροπρόθεσμης καλλιέργειας κυττάρων στη μικροδιάταξη, προτάθηκε μονοβηματική, απλή μέθοδος επιφανειακής τροποποίησης μικροδιατάξεων βασισμένων σε PDMS πριν την επίστρωση κολλαγόνου, προς αντιμετώπιση της εγγενούς υδροφοβικότητας του υλικού. Πρόκειται για την προκατεργασία με πλάσμα αέρα, ένα βήμα ήδη ενσωματωμένο στην κατασκευαστική διαδικασία της μικροδιάταξης στο στάδιο της σφράγισης. Δοκιμή καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) σε μικροθαλάμους κατεργασμένους με την προτεινόμενη μέθοδο, εγχείρημα ελάχιστα δοκιμασμένο στην ερευνητική κοινότητα, ανέδειξε ενισχυμένη κυτταρική ανάπτυξη και πλήρη επιφανειακή κάλυψη την 5^η ημέρα, τη μεγαλύτερη στη βιβλιογραφία. Τα παραπάνω συντελούν στην καταλληλότητα της μεθόδου προκατεργασίας με πλάσμα για την ακινητοποίηση κολλαγόνου σε βασισμένες σε PDMS μικροδιατάξεις, με σκοπό τη μακροπρόθεσμη καλλιέργεια MSCs.

Για τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας της μικροδιάταξης υπό ροή (ενεργή τροφοδοσία), μελετήθηκε το φαινόμενο και τα αίτια δημιουργίας φουσαλίδων σε χαμηλές και υψηλές ροές, και διερευνώνται βελτιωτικές ενέργειες για τον περιορισμό του, αλλά και την εξαφάνισή του με την ενσωμάτωση εμπορικής παγίδας. Συνολικά αποδεικνύεται ότι η δημιουργία φουσαλίδων είναι συνυφασμένη με τη λειτουργία ενός μικρορευστονικού συστήματος υπό ροή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, και συγκεκριμένα, με την ίδια τη διάταξη, το υλικό, τα εξαρτήματα και τη συνδεσμολογία της, αλλά και τις βαθμίδες θερμοκρασίας/πίεσης μεταξύ τροφοδοσίας και μικροδιάταξης.

Για το λόγο αυτό, προτείνεται τελικά μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με ενσωματωμένη εμπορική μεμβράνη PET. Προς επιβεβαίωση της επιλογής μεμβράνης PET, σε σύγκρισή της με την κατασκευασμένη PDMS, αυτή εμφάνισε μεγαλύτερη ομοιομορφία ανάπτυξης MSCs. Με ενσωμάτωση της μεμβράνης PET

λοιπόν, συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι μικροδιατάξεις υπό ροή και παθητικής τροφοδοσίας, όπου αποδείχθηκε ταχύτερη αλλά ανομοιογενής ανάπτυξη MSCs στην πρώτη, και περισσότερο ομαλή και ομοιόμορφη στη δεύτερη. Λόγω του προβλήματος εισόδου φυσαλίδων στη μικροδιάταξη υπό ροή, επιλέχθηκε εκείνη της παθητικής τροφοδοσίας για την εξασφάλιση ομοιόμορφου υποστηρικτικού στρωματικού ιστού πριν την εισαγωγή HSCs. Έτσι, συγκαλλιέργεια των MSCs με αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs), αμιγώς *in vitro* και απουσία ικριωμάτων για 3 ημέρες, απέδειξε την ικανότητα της μικροδιάταξης να συντηρήσει και να πολλαπλασιάσει τα HSCs, στην κατεύθυνση της δημιουργίας ενός αιμοποιητικού οργανοειδούς μυελού των οστών.

Τέλος, παρουσιάζονται αποτελέσματα σχεδιασμού μικροδιάταξης με ενσωματωμένους τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας, για την παράλληλη διεξαγωγή 3 ταυτόχρονων καλλιέργειών υπό ροή, ως μέρος μελλοντικών επεκτάσεων της διατριβής. Η γεωμετρία των μικροθαλάμων τροφοδοσίας διερευνήθηκε τόσο αναλυτικά όσο και υπολογιστικά, ώστε να εξασφαλίζεται πλήρωση και ισότιμη λειτουργία και των τριών μικροθαλάμων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιο-μικρορρευστονική (/Μικρορρευστονική τεχνολογία με εφαρμογές στη βιολογία και την ιατρική)

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Μικρορρευστονικές διατάξεις, Μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (organs-on-chips/OoCs), Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip/BMoC), Λιθογραφία μαλακής ύλης, Τεχνολογία πλάσματος, Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchymal stem cells/MSCs), Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (hematopoietic stem cells/HSCs)

ABSTRACT

Organs-on-chips (OoCs) is a rising field that has emerged in the last decades at the crossroads of microfluidic technology and cell biology, managing to become the epitome of biomimetic systems. They are reliable preclinical models, responding to modern challenges in the field of biomedicine and biological research, which are nowadays limited to conventional static cell cultures and animal testing. The bone marrow, due to its vital role in the human body with the process of hematopoiesis, is a key study organ. Thus, the development of bone marrow-on-a-chip (BMoC) is important for understanding the biology of the organ itself, mapping related diseases, such as multiple myeloma and leukemia, and finally, for identifying cells' response to drugs, radiation and chemotherapy. In this context, the present PhD thesis aims to develop a bone marrow-on-a-chip device for the purely *in vitro* and scaffold-free generation and maintenance of the human bone marrow perivascular hematopoietic niche.

First, all stages of the device construction have been developed, from the design to its sealing, which led to a successful and repeatable completion of the device. It consists of two cylindrical poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchambers, one for medium perfusion and one for cell culture, which communicate with each other through an intervening porous membrane, while the whole assembly is sealed with glass. The primary methods used for its construction were soft lithography (replica molding) and surface treatment using plasma technology. Also, a successful and reproducible PDMS membrane fabrication protocol was proposed, relying on two main aspects, i.e. chemical surface passivation, and mechanical strength enhancement. In order to simplify and speed up the device manufacturing process, the incorporation of a commercial polyethylene terephthalate (PET) polyester membrane was finally chosen.

Aiming to achieve long-term cell culture on the BMoC device, a one-step, simple method of surface modification of the PDMS-based microdevices prior to collagen coating was suggested, in order to address the inherent hydrophobicity of the material. This is air plasma pre-treatment, a step already built into the device manufacturing process at the bonding stage. Testing of mesenchymal stem cells (MSCs) culture in microchambers treated with the proposed method, a task little examined in the research community, revealed enhanced cell growth and complete surface coverage on the 5th day, the longest in the existing literature. The abovementioned contribute to the suitability of the plasma pre-treatment method for the immobilization of collagen in PDMS-based microdevices, for the purpose of long-term culture of MSCs. In order to optimize the operation of the microdevice under flow (active perfusion), the phenomenon and causes of bubble formation at low and high flows were studied, and improvement actions were investigated to limit it, but also to eliminate it by incorporating a commercial bubble trap. Overall, bubble formation is shown to be intrinsic to the operation of a microfluidic system under flow for long periods of time, and in particular, to the device assembly itself, meaning the device material, its components and wiring, but also, to the temperature/pressure gradients between the feed and the device.

For this reason, a passively perfused BMoC device is finally proposed. The device is embedded with the commercial PET membrane, which showed greater uniformity of MSCs growth when compared with the PDMS membrane. Further, the BMoC devices under flow and passively perfused were compared, both with the PET membrane incorporated, where a faster and uneven growth of MSCs was demonstrated in the former, and a smoother and more uniform in the latter. Due to bubble formation in microdevices under flow, passive perfusion of the BMoC was chosen to ensure a uniformly organized supportive stromal tissue before the HSCs introduction. Thus, co-culture of MSCs with hematopoietic stem cells (HSCs) in the passively perfused BMoC, purely *in vitro* and scaffold-freely for 3 days, demonstrated the

ability of the device to maintain and proliferate HSCs, towards the generation of a hematopoietic bone marrow organoid.

Finally, design results of a microdevice with three integrated cell culture microchambers are presented, for the parallel conduct of three simultaneous experiments, as part of future plans of the thesis. The geometry of the perfusion microchambers is investigated both analytically and computationally, in order to ensure the filling and equal operation of all three microchambers.

SUBJECT AREA:

Bio-microfluidics (/Microfluidic technology with applications in biology and medicine)

KEYWORDS:

Microfluidic devices (microdevices); Organs-on-chips (OoCs); Bone marrow-on-a-chip (BMoC); Soft lithography; Plasma technology; Mesenchymal stem cells (MSCs); Hematopoietic stem cells (HSCs)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Η ΜΙΚΡΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ	1
1.1 Μικρορρευστονικές διατάξεις	1
1.2 Σύγχρονες προκλήσεις στον τομέα της υγείας.....	4
1.3 Μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα ως η επιτομή βιομημητικών συστημάτων	5
1.3.1 Υλικά κατασκευής ΟοCs	8
1.3.2 Μέθοδοι κατασκευής ΟοCs.....	11
1.3.2.1 Λιθογραφία μαλακής ύλης.....	11
1.3.2.2 Εν θερμώ σφράγιση (hot embossing)	20
1.3.2.3 Μορφοποίηση με έγχυση σε καλούπι (injection molding)	20
1.3.2.4 Τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing)	22
1.3.3 Κατηγοριοποίηση και παραδείγματα μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα	23
1.3.3.1 Μικροδιατάξεις ενός οργάνου σε ψηφίδα (single-organ systems).....	25
1.3.3.2 Μικροδιατάξεις πολλών οργάνων σε ψηφίδα (multi-organ systems)	30
1.3.4 Εταιρίες κατασκευής μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα.....	32
1.4 Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow on-a-chip).....	34
1.4.1 Μυελός των οστών – φυσιολογία και δομή του.....	35
1.4.2 Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (ΣΕΛ)	38
1.4.3 Σύγχρονες εξελίξεις στην κατασκευή μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα	40
1.5 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής.....	50
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ, ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	53
2.1 Κατασκευή μικρορρευστονικών διατάξεων	53
2.1.1 Ευθυγραμμιστής μασκών Karl-Suss	53
2.1.2 Υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (Computerized Numerical Control – CNC Micromachining).....	54
2.1.3 Αντιδραστήρες πλάσματος.....	54
2.1.4 Λοιπά όργανα για την κατασκευή των μικρορρευστονικών διατάξεων	58
2.2 Χαρακτηρισμός και αξιολόγηση υποστρωμάτων και μικρορρευστονικών διατάξεων.....	59
2.2.1 Οπτικό μικροσκόπιο.....	59
2.2.2 Μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (Scanning Electron Microscopy - SEM).....	60
2.2.3 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy - XPS)	61
2.2.4 Οπτικό προφιλόμετρο Profilm3D®.....	63
2.2.5 Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής	64

2.3 Λειτουργία μικρορευστονικών διατάξεων υπό ροή	65
2.4 Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων.....	70
2.4.1 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (UC-MSCs & BM-MSCs).....	70
2.4.2 Απομόνωση και καλλιέργεια αιμοποιητικών προγονικών βλαστοκυττάρων (HSPCs)	71
2.5 Χαρακτηρισμός ανάπτυξης κυττάρων.....	72
2.5.1 Μικροσκοπία φθορισμού – Οπτική μικροσκοπία	72
2.5.2 Συνεστιακό μικροσκόπιο.....	73
2.5.3 Άλλα χρησιμοποιηθέντα όργανα για την καλλιέργεια κυττάρων.....	74
2.6 Πρωτόκολλα καλλιέργειας MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα.....	75
2.6.1 Πρωτόκολλο καλλιέργειας MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών υπό ροή.....	75
2.6.2 Πρωτόκολλο καλλιέργειας MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας	76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ (BONE MARROW-ON-A-CHIP).....

3.1 Αρχιτεκτονική της μικροδιάταξης μυελού των οστών.....	78
3.2 Σχεδιασμός και κατασκευή των εικμαγίων των μικροθαλάμων της μικροδιάταξης.....	81
3.3 Κατασκευή μικροθαλάμων πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης)	87
3.4 Κατασκευή πορώδους μεμβράνης πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης)	88
3.4.1 Σχεδιασμός εικμαγίων της πορώδους μεμβράνης	90
3.4.2 Κατασκευή εικμαγίων πορώδους μεμβράνης	91
3.4.2.1 Μεταφορά μάσκας διαφάνειας σε γυαλί quartz	91
3.4.2.2 Κατασκευή και αξιολόγηση εικμαγίων μεμβράνης με χρήση λιθογραφίας φωτοευαίσθητου SU-8	93
3.4.2.3 Κατασκευή και αξιολόγηση εικμαγίων πυριτίου (Si) για τη μεμβράνη.....	96
3.4.2.4 Παράσκευή πορώδους μεμβράνης PDMS	103
3.4.2.4.1 Συνδυασμοί σχετικής χημικής αδρανοποίησης εικμαγίου και φορέα της μεμβράνης... 103	
3.4.2.4.2 Επαναληψιμότητα κατασκευής πορώδους μεμβράνης	112
3.5 Άμεση κατασκευή πορώδους μεμβράνης με εγχάραξη με laser (laser ablation).....	114
3.6 Εμπορική πορώδης μεμβράνη πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET).....	116
3.7 Υλοποίηση της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα	117
3.8 Χαρακτηρισμός της μικροδιάταξης μυελού των οστών	120
3.9 Ενσωμάτωση εξαρτημάτων στη μικροδιάταξη μυελού των οστών	121
3.9.1 Συσκευή συγκράτησης (chip holder) πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA).....	121
3.9.2 Κατασκευή προσαρμογών μικροκαναλιών εισόδου-εξόδου με χρήση τριδιάστατης εκτύπωσης (3D printing).....	122
3.10 Συμπεράσματα.....	123

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΩΝ ΘΑΛΑΜΩΝ ΠΟΛΥ(ΔΙΜΕΘΥΛΟΣΙΛΟΞΑΝΗΣ) ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΕΡΑ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....125

4.1 Εισαγωγή.....	125
4.2 Πειραματικό μέρος	128
4.2.1 Υλικά.....	128
4.2.2 Επιφανειακή τροποποίηση	128
4.2.3 Χαρακτηρισμός επιφανειών και λεπτών στρωμάτων.....	132
4.2.3.1 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)	132
4.2.3.2 Μελέτη κλιματιστικής γήρανσης PDMS.....	133
4.2.3.3 Μέτρηση γωνιών επαφής.....	135
4.2.3.4 Φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός.....	135
4.2.4 Επιφανειακή τροποποίηση με κολλαγόνο τύπου I.....	135
4.2.5 Καλλιέργεια και χαρακτηρισμός MSCs εντός μικροθαλάμων	136
4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	136
4.3.1 Ανάλυση φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)	136
4.3.2 Κλιματιστική γήρανση PDMS.....	143
4.3.3 Ακίνητοποίηση κολλαγόνου σε κατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS	145
4.3.4 Τρόποι ενεργοποίησης μικροθαλάμων με πλάσμα αέρα	147
4.3.5 Μονιμοποίηση της επιφανειακής υδροφιλικότητας εσωτερικού μικροθαλάμων.....	149
4.3.6 Πάχος κολλαγόνου	151
4.3.7 Προσοκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων στο εσωτερικό μικροθαλάμων.....	152
4.4 Συμπεράσματα.....	156

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΥΠΟ ΡΟΗ158

5.1 Δημιουργία φυσαλίδων σε μικρορρευστονικά συστήματα υπό ροή (ενεργή τροφοδοσία): Βιβλιογραφική ανασκόπηση	158
5.1.1 Αίτια δημιουργίας φυσαλίδων	158
5.1.2 Τρόποι πρόληψης δημιουργίας φυσαλίδων	162
5.2 Πειραματικό μέρος	172
5.2.1 Μελέτη δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθαλάμους υπό ροή	172
5.2.1.1 Πειραματικές διατάξεις και συνθήκες.....	172
5.2.1.2 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	176
5.2.1.3 Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε μικροθαλάμους.....	181
5.2.2 Αντιμετώπιση δημιουργίας φυσαλίδων σε μικρορρευστονικά συστήματα υπό υψηλότερες ροές..	184
5.2.2.1 Βελτιωτικές ενέργειες για τον περιορισμό των φυσαλίδων και συνδυαστική ενσωμάτωση εμπορικής παγίδας	185
5.2.2.2 Εξάερωση θρεπτικού υλικού στα συστήματα απουσία και παρουσία εμπορικής παγίδας....	194

5.2.2.3 Ερμηνεία δυσλειτουργίας παγίδας.....	198
5.2.3 Σύγκριση με εμπορική μικροδιάταξη (υψηλότερες ροές).....	202
5.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις.....	206

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗΣ_ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟΥΣ ΤΡΕΙΣ ΜΙΚΡΟΘΑΛΑΜΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ..... 209

6.1 Αρχικά προταθείσα γεωμετρία μικροδιάταξης τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας.....	209
6.1.1 Σχεδιασμός και κατασκευή εικαγείων των θαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας της μικροδιάταξης.....	209
6.1.2 Αξιολόγηση λειτουργίας της μικροδιάταξης.....	211
6.2 Αναλυτικά σχεδιασμένη γεωμετρία μικροδιάταξης τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας βάσει κανόνων πτώσης πίεσης.....	212
6.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις.....	217

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ.....218

7.1 Μικροθάλαμοι καλλιέργειας ως πρώιμη πλατφόρμα μελέτης.....	218
7.1.1 Χρώση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε μικροθαλάμους καλλιέργειας.....	218
7.1.2 Πιλοτική καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων μυελού των οστών ενηλίκων.....	223
7.1.2.1 Καλλιέργεια υγιών δοτών και ασθενών (Συστηματικού Ερυθρηματώδους Λύκου) μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.....	223
7.1.2.2 Σύγκριση υγιών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων μυελού των οστών ενηλίκων με του ομφαλίου λώρου.....	226
7.2 Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας.....	228
7.2.1 Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα παθητικής τροφοδοσίας.....	228
7.2.2 Έλεγχος βιο-συμβατότητας μεμβράνης πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET).....	230
7.2.3 Συγκριτική μελέτη καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε μεμβράνες τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) και πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS) στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας.....	232
7.2.4 Συγκριτική μελέτη καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητική τροφοδοσία.....	239
7.2.5.1 Χρησιμοποιηθείσα διάταξη και συνδεσμολογία για τη μικροδιάταξη υπό ροή.....	239
7.3 Συγκαλλιέργεια MSCs και HSPCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας ..	249
7.4 Συμπεράσματα.....	253

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ..... 255

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι..... 260

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ..... 274

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ..... 279

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. 1. Α) Φωτογραφία του μικροσυστήματος αέριας χρωματογραφίας, όπως περιγράφηκε από τους Terry et al. [4]. Η συσκευή αποτελείται από μια σπειροειδή τριχοειδή στήλη μήκους 1.5 m, με την είσοδο να απεικονίζεται πάνω δεξιά και την έξοδο δεξιά για δείγμα αερίου. Η ροή μέσα στη συσκευή ελέγχεται με μια βαλβίδα, που εμφανίζεται πάνω αριστερά, πριν το τριχοειδές πηνίο, ενώ ο ανιχνευτής εντοπίζεται στα δεξιά της συσκευής. Β) Σχηματική αναπαράσταση που απεικονίζει όλα τα εξαρτήματα χειρισμού υγρών που βρίσκονται σε ένα δισκίο πυριτίου. Ανατύπωση από αναφορά [4]. 2

Σχήμα 1. 2. Διαφορετικά μοντέλα στη σύγχρονη βιοϊατρική και έρευνα, απεικονιζόμενα ως προς τη δυνατότητα ελέγχου και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, έναντι της συνάφειας και της πολυπλοκότητας. Οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (organs-on-chips/OoCs) συνδυάζουν τη μεγαλύτερη αξιοπιστία *in vitro* απόδοσης του μικροπεριβάλλοντος του οργάνου, με τη συνάφεια στον ανθρώπινο οργανισμό, σε σχέση με τις υπάρχουσες συμβατικές *in vitro* 2D και 3D καλλιέργειες και τα περιβάλλοντα σε ζώα..... 6

Σχήμα 1. 3. Διπλής λειτουργίας παρακολούθησης μικροδιατάξη νεφρού σε ψηφίδα (kidney-on-a-chip) για την *in situ* ανίχνευση νεφροτοξικότητας. Τόσο η παρουσία του ενζύμου γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση (Gamma-Glutamyl-Transpeptidase/GGT) στη μεμβράνη των κυττάρων 786-O του εγγύς εσπειραμένου σωληνάριου του νεφρού, όσο και η απελευθέρωσή του στην εκροή του OoC, αξιολογούνται με την ανίχνευση φθορισμού των δεσμευμένων και των ανοσοσυγκολλημένων συζευγμένων με αντίσωμα anti-GGT νανοσωματιδίων, αντίσωμα. Στην περίπτωση απουσίας νεφροτοξικότητας, τα αντισώματα δεσμεύονται από τα 786-O, δίνοντας μικρό σήμα φθορισμού, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, απελευθερώνονται και συγκολλώνται δίνοντας ενισχυμένο σήμα. Αυτές οι δύο λειτουργίες, ανοσοσύλληψης και ανοσοσυγκόλλησης νανοσωματιδίων, παρακολουθούνται και ανιχνεύονται *in situ* μέσω μικροσκοπίου φθορισμού, προσαρμωμένου σε smartphone. Αναπροσαρμογή από την αναφορά [56]. 8

Σχήμα 1. 4. Σχηματική απεικόνιση των δύο ειδών φωτολιθογραφίας, αναλόγως του αν το φωτοευαίσθητο είναι αρνητικού ή θετικού τόνου. Μετά την επιστροφή λεπτού υμενίου του φωτοευαίσθητου και την έκθεση του σε ακτινοβολία UV μέσω της φωτολιθογραφικής μάσκας, κατά την εμφάνιση σε διαλύτη, παραμένουν είτε οι εκτεθειμένες είτε οι ανέκθετες στην ακτινοβολία περιοχές, αν το φωτοευαίσθητο είναι αρνητικού ή θετικού τόνου, αντίστοιχα [112]. 13

Σχήμα 1. 5. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής του άνω επιπέδου PDMS της μικροδιατάξης πνεύμονα σε ψηφίδα με λιθογραφία μαλακής ύλης, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα μικροκανάλια φωτοευαίσθητου SU-8 που προέκυψαν με φωτολιθογραφία αρνητικού τόνου [114]. 14

Σχήμα 1. 6. Σχηματική απόδοση της διαδικασίας παρασκευής της ελαστομερικής σφραγίδας PDMS (Sylgard 184) από φωτολιθογραφικά κατασκευασμένη μήτρα, στα πλαίσια της λιθογραφίας μαλακής ύλης [98]. 15

Σχήμα 1. 7. α) Διαδικασία παραγωγής με την τεχνική εκτύπωσης μικροεπαφών (μCP) ταινιών φιμπρονεκτίνης πάνω σε γυαλί επιστρωμένο με PDMS, για την ελεγχόμενη καλλιέργεια καρδιακών μυοκυττάρων, κατ' αναλογία της *in vivo* ανισοτροπίας της αρχιτεκτονικής του μυοκαρδίου [121]. β) Ενσωμάτωση του επιπέδου με τις ταινίες καρδιακού μυϊκού ιστού (muscular thin films/MTFs), κατασκευασμένες με μCP, στη μικροδιατάξη καρδιάς σε ψηφίδα. Το επίπεδο MTF καλύπτεται από πάνω από διαφανές πολυ(ανθρακικό εστέρα) (polycarbonate), συγκρατούμενο στη θέση του με τρεις βίδες, και από κάτω στηρίζεται σε κυλινδρικό αλουμίνιο, με κατάλληλη εσοχή για να το συγκρατεί [120]. 16

Σχήμα 1. 8. α) Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής του θερμοσκληρυνόμενου OSTEMER με την τεχνική REM, χρησιμοποιώντας σφραγίδα PDMS ως μήτρα. Χρήση REM με το πλαστικό OSTEMER για την κατασκευή μικροδιατάξης ανθρώπινου κυτταρικού φραγμού του πλακούντα. β) Σχηματικό (αριστερά) και εικόνα SEM (δεξιά) της μικροδιατάξης που αποδίδει τη διεπιφάνεια μεταξύ του επιθηλίου του πλακούντα και του ενδοθηλίου των αγγείων (HUVEC) [99]. γ) Σχέδιο της γεωμετρίας της μικροδιατάξης ήπατος σε ψηφίδα, κατασκευασμένη από PDMS με τεχνική REM. Αποτελείται από το μικροθάλαμο καλλιέργειας

ηπατοκυττάρων, φράγμα με μικροδομές που προσομοιώνει τη διεπιφάνεια ενδοθηλίου-επιθηλίου, και κανάλι ροής για την απόδοση της κυκλοφορίας αίματος. Το πλάτος του μικροθαλάμου καλλιέργειας είναι 37 μm, γεγονός που επιτρέπει την ευθυγράμμιση των ηπατοκυττάρων σε δύο γραμμές. d) Εικόνα SEM της μικροδιάταξης [125]...... 18

Σχήμα 1. 9. a) Σχηματική απόδοση των σταδίων κατασκευής μιας μικροδιάταξης, που περιλαμβάνουν φωτολιθογραφία αρνητικού τόνου για την κατασκευή της μήτρας, τεχνική αντιγραφής μήτρας (REM) για την κατασκευή του επιπέδου PDMS με τις επιθυμητές δομές, και τέλος τη συγκόλληση του PDMS με το γυαλί. b) Σχηματική απεικόνιση των ενεργών ομάδων σιλανόλης (-Si-OH) στην επιφάνεια PDMS και γυαλιού κατά την αμοιβαία έκθεσή τους σε πλάσμα οξυγόνου και μετέπειτα σύναψη δεσμών σιλοξάνης (Si-O-Si) κατά τη σύμμορφη μεταξύ τους επαφή, που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συγκόλλησή τους. 19

Σχήμα 1. 10. a) Πλατφόρμα πολυστυρενίου (PS) υψηλής απόδοσης για την 3D *in vitro* απόδοση λεμφικού αγγείου σε μικροπεριβάλλον όγκου, με χρήση μορφοποίησης με έγχυση σε καλούπι. (i) Εικόνα της πλατφόρμας αποτελούμενης από 28 φρεάτια, (ii) Διατομή ενός φρεατίου που απεικονίζει την κατανομή των καναλιών, με ένα κεντρικό κανάλι για την καλλιέργεια κυττάρων, και δύο περιφερειακά που χρησιμεύουν ως δεξαμενές θρεπτικού υλικού [136]. (b) Σχηματική αναπαράσταση (αριστερά) και εικόνες (δεξιά) μικροδιατάξεων όγκου σε ψηφίδα, παρασκευασμένων από συμπολυμερές κυκλικής ολεφίνης (COC) με την τεχνική μορφοποίησης με έγχυση σε καλούπι [140]. 21

Σχήμα 1. 11. Σχέδιο της 3D μικροδιάταξης νευρικού συστήματος, κατασκευασμένου με 3D εκτύπωση μικροεξώθησης με ένα-προς-ένα αντιστοιχία των κυττάρων του νευρικού συστήματος μέσα στους εκτυπωμένους μικροθαλάμους, και συγκεκριμένα, των νευρώνων περιφερειακού νευρικού συστήματος (peripheral nervous system/PNS) στο θάλαμο 1, των κυττάρων Schwann στον θάλαμο 2, και των τερματικών κυτταρικών συνδέσεων στο θάλαμο 3. Εικόνες του κυκλικού πλέγματος με τα 3D εκτυπωμένα μικροκανάλια σιλικόνης προς καθοδήγηση νευραξονικών κυττάρων και της 3D υποστηρικτικής δομής που διαχωρίζει τη μικροδιάταξη σε 3 θαλάμους [147]. (b) Μικροδιάταξη ήπατος διπλής ροής (αγγειακής και χοληφόρου), κατασκευασμένη με 3D εκτύπωση [148]. 23

Σχήμα 1. 12. Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης των μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα (OoCs), εικινώντας το 2010 με την εργασία των Huh et al. [113], που εισήγαγαν τη μικροδιάταξη πνεύμονα σε ψηφίδα (lung-on-a-chip). 24

Σχήμα 1. 13. a) Βιολογικά εμπνευσμένος σχεδιασμός της μικροδιάταξης “αναπνεόντος” πνεύμονα σε ψηφίδα (lung-on-a-chip), αποτελούμενος από διαμερισματοποιημένα μικροκανάλια PDMS για να διαμορφώσει το κυψελιδικό-τριχοειδές φράγμα σε μια λεπτή, πορώδη, και εύκαμπτη μεμβράνη PDMS επικαλυμμένη με πρωτεΐνη ECM. Η μικροδιάταξη προσομοιώνει τις φυσιολογικές αναπνευστικές κινήσεις των πνευμονικών κυψελίδων εφαρμόζοντας κενό στους πλευρικούς θαλάμους, προκαλώντας έτσι μηχανικό τέντωμα της μεμβράνης PDMS. Μακροσκοπική εικόνα της μικροδιάταξης πνεύμονα σε ψηφίδα, προβεβλημένη από πάνω [113]. b) Ανεπτυγμένη άποψη της μικροδιάταξης ήπατος σε ψηφίδα (liver-on-a-chip). Το ανώτερο και κατώτερο μικροκανάλι είναι κατασκευασμένα από PDMS και διαχωρίζονται από μια μεμβράνη PE. Τέσσερα είδη κυττάρων καλλιεργούνται στρώμα-προς-στρώμα εκατέρωθεν της μεμβράνης PE. Ένθετο της φωτογραφίας της μικροδιάταξης ήπατος σε ψηφίδα [163]. 27

Σχήμα 1. 14. a) Φωτογραφία (αριστερά) και σχηματική αναπαράσταση (δεξιά) μικροδιάταξης νεφρού σε ψηφίδα (kidney-on-a-chip), αποτελούμενης από μικροκανάλια που αναπαράγουν το ουροποιητικό και το τριχοειδές διαμέρισμα του νεφρικού σπειράματος, διαχωριζόμενα από λεπτή εύκαμπτη μεμβράνη PDMS που λειτουργεί ως σπειραματική μεμβράνη βάσης (glomerular basement membrane/GBM). Κυκλική μηχανική καταπόνηση εφαρμοζόμενη στα κύτταρα της μεμβράνης επιτυγχάνεται με την εφαρμογή κενού στους πλευρικούς θαλάμους [165]. b) Ανεπτυγμένη άποψη της μικροδιάταξης καρδιάς σε ψηφίδα (heart-on-a-chip). Στο κεντρικό μικροκανάλι καλλιεργούνται καρδιομυοκύτταρα σε μήτρα γέλης, και η μεμβράνη PDMS παραμορφώνεται ασκώντας πίεση στο κάτω μικροκανάλι. Λόγω παρουσίας ανοιγμάτων μεταξύ των μικροκολώνων, η συμπίεση μεταφράζεται σε μονοαξονικές παραμορφώσεις που εφαρμόζονται στα κύτταρα. Ένθετο φωτογραφίας της μικροδιάταξης καρδιάς σε ψηφίδα [169]. c) Μικροδιάταξη αιματοεγκεφαλικού

φραγμού σε ψηφίδα (blood-brain barrier-on-a-chip). Φωτογραφία (αριστερά), σχηματική απεικόνιση (κέντρο) και μικρογραφίες ανοσοφθορισμού (δεξιά) της μικροδιάταξης. Εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργούνται στο αγγειακό μικροκανάλι και μία μίξη αστροκυττάρων και περικυττάρων στο παρεγγυματικό μικροκανάλι. Επάνω και κάτω δεξιά, εικόνες διατομής και πλάγιας άποψης των φθορισμένων κυττάρων (περικύτταρα με χρώση κίτρινη F-ακτίνης, αστροκύτταρα με χρώση λευκή GFAP, και ενδοθηλιακά κύτταρα με χρώση μπλε ZO-1) [174]..... 29

Σχήμα 1. 15. a) Σχηματικό διάγραμμα μίας επαναδιαμορφώσιμης μικροδιάταξης πολλών οργάνων σε ψηφίδα (multi-organ systems), που τέσσερα, επτά ή δέκα διαφορετικά μοντέλα οργάνων, με δυνατότητα μεταξύ τους αλληλεπίδρασης μέσω μικροκαναλιών (αριστερά). Εικόνα της πολυεπίπεδης συσκευής, όπου διακρίνονται όλες οι συνδέσεις για την παροχή θρεπτικών υλικών και τα κανάλια αέρα για την ενεργοποίηση των ενσωματωμένων μικροαντλιών (δεξιά) [180]. b) Ανεπτυγμένη άποψη της μικροδιάταξης πολλών οργάνων, όπου φαίνονται τα συνιστώσα επίπεδα της, και συγκεκριμένα, το επίπεδο καλλιέργειας κυττάρων ήπατος (1), καρδιάς με τις συστοιχίες μικροηλεκτροδίων ((2) και (4), αντίστοιχα), καρδίνου του αιδοίου (3), και καρδίνου του μαστού (5), καθώς και το επίπεδο με τις ενσωματωμένες δομές ανάγνωσης και το επίπεδο με τις θύρες πρόσβασης (αριστερά). Εικόνα της μικροδιάταξης, διαρρεόμενη με πράσινη βαφή προς καλύτερη οπτικοποίηση [181] (δεξιά)..... 32

Σχήμα 1. 16. Σχηματική απόδοση της ανατομίας ενός μακρού οστού, που διαχωρίζεται στο δοκιδωτό οστό (trabecular bone), όπου εντοπίζεται ο ερυθρός μυελός των οστών (red bone marrow), και στο συμπαγές οστό, τοποθεσία του κίτρινου ή ωχρού μυελού των οστών (yellow bone marrow) [183]. 35

Σχήμα 1. 17. a) Διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (hematopoietic stem cells/HSCs). Τα μακροπρόθεσμα HSCs (long-term HSCs/LT-HSCs) είναι ικανά για αυτο-ανανέωση και διαφοροποίηση προς βραχυπρόθεσμα HSCs (short-term HSCs/ST-HSCs), και πολυδύναμα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (hematopoietic stem and progenitor cells/HSPCs) ή απλά πολυδύναμους προγόνους (multi-potent progenitors/MPPs). Τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε oligοδύναμα προγονικά κύτταρα προς τη μυελοειδή και λεμφοειδή γενεαλογία. Με τη σειρά τους, οι μυελοειδείς και λεμφοειδείς πρόγονοι διαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα με περιορισμένη δυνατότητα διαφοροποίησης, που μπορούν να εξελιχθούν σε ώριμα κύτταρα, αν και τα τελικά στάδια ωρίμανσης συχνά συμβαίνουν εκτός του μυελού των οστών [215]. b) Η αιμοποιητική περιοχή στο εσωτερικό του δοκιδωτού/σπογγώδους μυελού των οστών αποτελείται από δύο βασικές περιοχές, την ενδοστεϊκή (endosteal niche) και την περιαγγειακή περιοχή (perivascular niche), η ενορχηστρωμένη δράση των οποίων είναι απαραίτητη για την υποστήριξη της αιμοποίησης [216]..... 38

Σχήμα 1. 18. Κλινική ετερογένεια του Συστηματικού Ερυθρηματώδους Λύιου (ΣΕΛ). Η πολύπλοκη φύση της αυτοάνοσης νόσου εκδηλώνεται από το πλήθος των διαφορετικών συστημάτων οργάνων που μπορούν να προσβληθούν [220]. 40

Σχήμα 1. 19. a) Μικροδιάταξη ενδοστεϊκής περιοχής μυελού των οστών για τη μελέτη της μεταστατικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων μαστού στο οστό. Σχηματική αναπαράσταση της μικροδιάταξης, όπου διακρίνονται οι διαστάσεις των μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας (αριστερά), και φωτογραφία της μικροδιάταξης περιέχοντας υδρογέλη και χρωματισμένα υγρά στα πλευρικά κανάλια (κόκκινο) και το κεντρικό κανάλι (μπλε) (δεξιά). Όλες οι κλίμακες είναι σε μm [229]. b) Μικροδιάταξη περιαγγειακής περιοχής μυελού των οστών για τη μελέτη καρδίνου του μαστού. Σχηματική απόδοση των σταδίων δημιουργίας της περιαγγειακής περιοχής στη μικροδιάταξη. Σε ένθετο φωτογραφία της μικροδιάταξης [230]..... 42

Σχήμα 1. 20. a) Υβριδικό *in vivo/in vitro* μοντέλο κατασκευής μυελού των οστών. Διαδικασία παραγωγής της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα, κατά την οποία ο κατασκευασμένος μυελός των οστών (engineered bone marrow/eBM) σχηματίζεται *in vivo* σε μικροθάλαμο PDMS, εμφυτευμένο υποδόρια σε ποντίκι, και στη συνέχεια συντηρείται *in vitro* στη μικροδιάταξη. Σε ένθετα φωτογραφίες του eBM (ροζ ιστός 8 εβδομάδων) πριν την εισαγωγή του στη μικροδιάταξη, και της ίδιας της μικροδιάταξης με ενσωματωμένο τον eBM. Οι κλίμακες είναι στα 2 mm [155]. b) Εμπορική μικροδιάταξη 3D-KITChip, ενσωματωμένη σε βιοαντιδραστήρα για την προσομοίωση της ανθρώπινης αιμοποιητικής περιοχής. Εικόνα της

συναρμολογημένης μικροδιάταξης (αριστερά). Ανεπτυγμένη άποψη του 3D-KITChip, και συγκεκριμένα, 1 = βίδες, 2 = άνω καπάκι, 3 = καλυπτρίδα μικροσκοπίου, 4 = εξωτερική φλάντζα, 5 = 3 D -KITchip, 6 = εσωτερική φλάντζα, 7 = βιοαντιδραστήρας, 8 = σύνδεσμοι Luer-Lock (κέντρο). Σε ένθετο σχηματική απεικόνιση της συστοιχίας 625 μικροκυκλωτήτων του 3 D -KITchip, με σημειωμένες τις διαστάσεις των κυκλωτήτων [233]. c) Πρώτη κατασκευασμένη μικροδιάταξη μυελού των οστών για την μακροπρόθεσμη *in vitro* διατήρηση της αιμοποίησης (4 εβδομάδες). Σχηματική απόδοση της μικροδιάταξης (αριστερά), όπου διακρίνεται η καλλιέργεια του οργανοειδούς στον ένα μικροθάλαμο, η χρήση του δεύτερου ως δεξαμενή τροφοδοσίας και η ενσωμάτωση περισταλτικής αντλίας on-chip. Ρεαλιστική εικόνα της μικροδιάταξης μυελού των οστών [234]..... 44

Σχήμα 1. 21. a) Μικροδιάταξη περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής. Σχηματική απεικόνιση ανθρώπινου οστού, με ένθετη μικρογραφία που εστιάζει στην περιαγγειακή αιμοποιητική περιοχή (αριστερά). Εγκάρσια τομή της μικροδιάταξης την ημέρα 0, όπου διακρίνονται μεμονωμένα διασκορπισμένα HSPCs και BMSCs σε γέλη στο άνω μικροκανάλι, και μια ατελή αγγειακή επένδυση στο κάτω μικροκανάλι. Εντός δύο εβδομάδων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύσσονται, επενδύοντας τα τοιχώματα του κάτω μικροκαναλιού, ενώ τα HSPCs διαφοροποιούνται σε πολλές κυτταρικές σειρές (μέση). Εικόνα ανοσοφθορισμού κατακόρυφης διατομής της μικροδιάταξης, όπου διακρίνονται ερυθροειδή (ροζ), μεγακαρουκύτταρα (κίτρινο) και ουδετερόφιλα (μπλε) (δεξιά) [237]. b) Εμπορική μικροδιάταξη Emulate Chip S-1™ για τη δημιουργία και διατήρηση *in vitro* της ενδοστεϊκής αιμοποιητικής περιοχής ποντικού. Ρεαλιστική εικόνα του Emulate Chip S-1™ (αριστερά) και σχηματική απεικόνιση διατομής του, όπου διακρίνεται η καλλιέργεια οστεοβλαστών, BMSCs και HSPCs σε γέλη φμπρίνης στο άνω μικροκανάλι, και η επένδυση των τοιχωμάτων του κάτω μικροκαναλιού με ενδοθηλιακά κύτταρα (δεξιά) [238]. c) Μικροδιάταξη μυελού των οστών για την *in vitro* διατήρηση τεσσάρων περιοχών της αιμοποιητικής περιοχής, και συγκεκριμένα, την περιαρτηριακή (Α), την περιαγγειακή (S), τη μεσεγγυματική (Μ), και την οστεοβλαστική (Ο), σε τέσσερις διακριτούς μικροθαλάμους. Ανεπτυγμένη άποψη των δύο επιπέδων της μικροδιάταξης, από PDMS και γυαλί, συγκολλημένων με πλάσμα οξυγόνου. Παρουσιάζονται οι διακριτοί ημικυλινδρικοί μικροθάλαμοι, όπου εισέρχεται κάθε οργανοειδές (αριστερά). Εικόνα της μικροδιάταξης μυελού των οστών διαρρέομενο από HSPCs (δεξιά) [239]..... 47

Σχήμα 1. 22. Μικροδιάταξεις μυελού των οστών που προσομοιώνουν την περιαγγειακή και ενδοστεϊκή αιμοποιητική περιοχή στην ίδια διάταξη. a) Οι Nelson et al. κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη PDMS 5 μικροκαναλιών, όπου τα MSCs αρχικά διαφοροποιούνται για 21 ημέρες στο κεντρικό μικροκανάλι της συσκευής για να σχηματίσουν ένα ενδοστεϊκό στρώμα (παραγωγή οστεοβλαστών), στη συνέχεια ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs), MSCs και HSPCs εισάγονται πάνω από το ενδοστεϊκό στρώμα, και πραγματοποιείται αγγειογένεση σε 5 ημέρες, ολοκληρώνοντας το σχηματισμό της αιμοποιητικής περιοχής [240]. b) Οι Glaser et al. προχώρησαν σε ενεργή αλληλεπίδραση μεταξύ της περιαγγειακής και ενδοστεϊκής περιοχής, οι οποίες αν και φιλοξενούνται σε διακριτούς εξαγωνικούς μικροθαλάμους, επικοινωνούν μέσω των διακένων μικροδιόδων. Σχηματική απόδοση της διάταξης, όπου απεικονίζεται η δημιουργία μικροαγγειακών δικτύων και στις δύο επενδεδυμένες με ενδοθηλιακά κύτταρα περιοχές, με την προσθήκη οστεοβλαστών και BMSCs στην ενδοστεϊκή και την περιαγγειακή περιοχή, αντίστοιχα μετά από διάστημα 4 – 7 ημερών (αριστερά). Σε ένθετο εικόνα της μικροδιάταξης PDMS [241]..... 49

Σχήμα 2. 1. Ο ευθυγραμμιστής μασιών Karl-Suss MJB 3 STD, του Εργαστηρίου Καθαρού Χώρου του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (I.N.N.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». 54

Σχήμα 2. 2. a) Ο αντιδραστήρας πλάσματος αέρα χαμηλής πίεσης Covance multi-system (Femto Science Inc., Korea) του εργαστηρίου βιο-μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (bioMEMS), του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», b) Σχηματικό διάγραμμα των βασικών μερών του αντιδραστήρα πλάσματος Covance multi-system για την παραγωγή πλάσματος στο εσωτερικό του κυρίως θαλάμου του..... 56

Σχήμα 2. 3. a) Ο αντιδραστήρας πλάσματος δραστικών ιόντων RIE (Reactive Ion Etcher), μοντέλο Nextral Alcatel NE330 στο Εργαστήριο Καθαρού Χώρου του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», b) Ο αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP (Inductively Coupled Plasma) MET της Alcatel, του Εργαστηρίου Πλάσματος του I.N.N., και επάνω αριστερά, ο κυρίως θάλαμός του σε μεγέθυνση. 58

- Σχήμα 2. 4.** Οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS MX51 INDUSTRIAL MICROSCOPE στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Καθαρού Χώρου του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». 60
- Σχήμα 2. 5.** Το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (Scanning Electron Microscopy - SEM), μοντέλο JEOL JSM-7401F, που βρίσκεται στο Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Το μικροσκόπιο με υπολογιστή μέσω κατάλληλου λογισμικού προς έλεγχο των συνθηκών και της ποιότητας απεικόνισης του δείγματος. 61
- Σχήμα 2. 6.** α) Ενεργειακό διάγραμμα που απεικονίζει σχηματικά τη βασική εξίσωση της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy - XPS) ($h\nu = BE + KE + \Phi_{\text{spec}}$), συμπεριλαμβανομένης της ενέργειας της πηγής ακτίνων X ($h\nu$), της ενέργειας δέσμησης του ηλεκτρονίου (BE), της μετρούμενης κινητικής ενέργειας του ηλεκτρονίου (KE_{measured}), και του έργου του φασματοσκοπίου ($\Phi_{\text{spectrometer}}$), β) Το φασματοσκόπιο φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X, SPECS Phoibos100, στις εγκαταστάσεις του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». 62
- Σχήμα 2. 7.** α) Αρχή λειτουργίας οπτικού προφιλόμετρου Profilm3D®, στηριζόμενη στη συμβολομετρία Michelson, β) Εικόνα του οπτικού προφιλόμετρου Profilm3D® της εταιρείας Nanotypos. 64
- Σχήμα 2. 8.** Το σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής Drop Shape Analyzer – DSA30 (KRÜSS GmbH) του Εργαστηρίου Πλάσματος, Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». 64
- Σχήμα 2. 9.** Μικροαντλία σύριγγας LabSmith SPS01 Programmable Syringe Pump για τη λειτουργία μικροθαλάμων υπό χαμηλές ροές. α) Φωτογραφία της μικροαντλίας. β) Σχηματική αναπαράσταση της συνδεσμολογίας της μικροαντλίας για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων και τη σύνδεσή της με υπολογιστή προς έλεγχο της ροής της. Η μικροαντλία συνδέεται με παρεμβαλλόμενη μικροβαλβίδα MV201, λειτουργίας «L», που καθορίζει την κατεύθυνση της ροής είτε από το erppendorf στην αντλία για την πλήρωσή της με υγρό, είτε από την αντλία προς το μικροθάλαμο. Η όλη διάταξη τοποθετείται πάνω σε πλακέτα uProcess breadboard, η οποία συνδέεται μέσω του ελεγκτή διεπαφής EIB200 με υπολογιστή, όπου με χρήση του λογισμικού uProcess v2.0, ρυθμίζεται η επιθυμητή ροή. 66
- Σχήμα 2. 10.** Περισταλτική μικροαντλία P625/900 της Instech Laboratories Inc. για την τροφοδοσία μικροθαλάμων και της μικροδιάταξης μυελού των οστών με υψηλές ροές. α) Φωτογραφία της αντλίας. β) Συνδεσμολογία της αντλίας με υπολογιστή για έλεγχο της ροής της. Η αντλία συνδέεται με πλακέτα Arduino με τη μεσολάβηση breadboard, και στη συνέχεια με υπολογιστή, όπου μέσω του λογισμικού Arduino 1.8.13 ρυθμίζεται η επιθυμητή ροή. 67
- Σχήμα 2. 11.** Εμπορική παγίδα φυσαλίδων της Elveflow που χρησιμοποιήθηκε σε σύνδεση με τη μικροδιάταξη υπό ροή στην προσπάθεια περιορισμού της εισόδου φυσαλίδων. α) Φωτογραφία της παγίδας (μέγεθος Small). β) Σχηματική αναπαράσταση της μπροστινής πλευράς και της διατομής της παγίδας. Αποτελείται από δύο κομμάτια PEEK η λειτουργία της στηρίζεται στην παρεμβαλλόμενη μεμβράνη PTFE, η οποία λόγω διαφοράς πίεσης ανάμεσα στις δύο πλευρές της, απομακρύνει τις φυσαλίδες του υγρού προς το περιβάλλον. 68
- Σχήμα 2. 12.** Εμπορική μικροδιάταξη της Darwin Microfluidics για τη 3D καλλιέργεια κυττάρων. α) Άνω και κάτω επίπεδα πολυ(ανθρακικού εστέρα) (PC) που φέρουν κυλινδρικούς μικροθαλάμους διάμετρου 6 mm, κυψελίδες για την ομοιόμορφη διανομή των υγρών, και 4 μαγνήτες για τη σφράγιση της διάταξης. Στο άνω επίπεδο διακρίνονται επιπλέον 4 εσοχές για την ενσωμάτωση Luer προσαρμογών. β) Πλαίσιο κυτταροκαλλιέργειας (culture patch) από διακρυλική πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEGDA), και σε σειριακή μεγέθυνση το πλέγμα εξαγωγικών κυψελών που υποστηρίζει το δίκτυο νανοϊνών, οι οποίες δεν ξεπερνούν σε διάμετρο τα 0.5 mm [1]. γ) Φωτογραφία της εμπορικής διάταξης ενσωματωμένης στο chip holder, και με τοποθετημένους τους Luer προσαρμογείς για τη σύνδεση κατάλληλων σωληνίσκων. 70
- Σχήμα 2. 13.** α) Βασικά εξαρτήματα και αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας φθορισμού, β) Το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο Leica DM IRE2 (Leica Microsystems) στις εγκαταστάσεις του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α., που

χρησιμοποιήθηκε για οπτική παρατήρηση, και παρατήρηση φθορισμού των κυττάρων στις μικρορρευστονικές διατάξεις..... 73

Σχήμα 2. 14. Βασικά μέρη ενός συνεστιακού μικροσκοπίου, που περιλαμβάνουν την πηγή φωτός (συνήθως laser), το διχρωμικό καθρέπτη, τον αντικειμενικό φακό, τον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστής – photomultiplier/PMT), και διάφραγμα (pinhole), b) Το συνεστιακό μικροσκόπιο Aurox Clarity Laser Free Confocal (Aurox LFC) για την παρατήρηση κυττάρων στις εγκαταστάσεις του I.IB.E.A.A. 74

Σχήμα 3. 1. Ανεπτυγμένη 3D άποψη της αρχιτεκτονικής 1^{ns} γενιάς της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip/BMoC). Στον άνω μικροθάλαμο PDMS πραγματοποιείται η καλλιέργεια κυττάρων (MSCs και HSCs), στον κάτω μικροθάλαμο PDMS η τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό, με τη μεταξύ τους επικοινωνία να διασφαλίζεται μέσω παρεμβλλόμενης πορώδους μεμβράνης. Η διάταξη σφραγίζεται εκ των άνω με γυαλί. Σε μεγέθυνση μία διατομή της μικροδιάταξης, όπου διακρίνεται και η επικοινωνία με το περιβάλλον μέσω των ροϊκών διεπαφών..... 79

Σχήμα 3. 2. Ανεπτυγμένη 3D άποψη της τελικώς επιλεγόμενης αρχιτεκτονικής 2^{ns} γενιάς της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip/BMoC). Η σχετική θέση των μικροθαλάμων αντιστρέφθηκε σε σχέση με την αρχιτεκτονική 1^{ns} γενιάς, με την καλλιέργεια των κυττάρων (MSCs και HSCs) να πραγματοποιείται στον κάτω μικροθάλαμο PDMS, και την τροφοδοσία στον άνω. Η μεταξύ τους επικοινωνία συνεχίζει να εξασφαλίζεται μέσω πορώδους μεμβράνης, ενώ ο κάτω μικροθάλαμος σφραγίζεται με γυαλί, με τη σύνδεση των ροϊκών διεπαφών να πραγματοποιείται μέσω του άνω μικροθαλάμου PDMS. Σε μεγέθυνση μια διατομή της μικροδιάταξης..... 80

Σχήμα 3. 3. a) 2D σχέδιο CAD των μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας με θρεπτικό υλικό της μικροδιάταξης αρχιτεκτονικής 1^{ns} γενιάς, όπου όλες οι διαστάσεις αποδίδονται σε mm. b) Φωτογραφία υποστρώματος αλουμινίου, κοινού για τα εκμαγεία των δύο μικροθαλάμων, όπως προέκυψε με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC). 82

Σχήμα 3. 4. a) 2D σχέδιο CAD τεσσάρων αντιγράφων μικροθαλάμων καλλιέργειας της μικροδιάταξης αρχιτεκτονικής 1^{ns} γενιάς σε κοινό υπόστρωμα. b) 3D σχέδιο μίας διατομής του εκμαγείου του μικροθαλάμου καλλιέργειας, όπου διακρίνεται το κοινό ύψος του μικροθαλάμου με το πλαίσιο προς έλεγχο του ύψους του μικροθαλάμου PDMS. Όλες οι διαστάσεις είναι σε mm. c) Κοινό υπόστρωμα πολυ(τετραφθοροαιθυλενίου) (PTFE) με εκμαγεία τεσσάρων μικροθαλάμων καλλιέργειας, όπως προέκυψε με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC). 83

Σχήμα 3. 5. 3D σχέδια CAD τεσσάρων αντιγράφων εκμαγείων a) μικροθαλάμων τροφοδοσίας και b) μικροθαλάμων καλλιέργειας στο ίδιο υπόστρωμα για τη μικροδιάταξη αρχιτεκτονικής 2^{ns} γενιάς. Όλες οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. Υλοποίηση των εκμαγείων c) μικροθαλάμων τροφοδοσίας και d) μικροθαλάμων καλλιέργειας με τη μέθοδο της 3D εκτύπωσης και τη ρητίνη Standard White FLGPWH04 χαμηλής τραχύτητας. Στο εκμαγείο μικροθαλάμου τροφοδοσίας (c) παρατηρείται πως έχουν διαρρηχθεί οι μικροκολώνες μετά από τη χρήση του. 85

Σχήμα 3. 6. a) 3D σχέδιο CAD των μικροθαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας σε κοινό υπόστρωμα, με δύο αντίγραφα για κάθε είδος μικροθαλάμου για τη μικροδιάταξη 2^{ns} γενιάς. Οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. b) Κατασκευή των εκμαγείων μικροθαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας σε υπόστρωμα αλουμινίου με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC). Διακρίνονται δια γυμνού οφθαλμού οι διαδρομές του τρυπανιού κατά την κατασκευή των εκμαγείων, οι οποίες όμως δεν επηρεάζουν την ικανότητα συγκόλλησης των μικροθαλάμων PDMS. 87

Σχήμα 3. 7. Μικροθάλαμοι PDMS τροφοδοσίας (πάνω) και καλλιέργειας (κάτω) για τη μικροδιάταξη αρχιτεκτονικής a) 1^{ns} και b) 2^{ns} γενιάς, όπως προέκυψαν από τα αντίστοιχα εκμαγεία τους αλουμινίου με την τεχνική αντιγραφής μήτρας (replica molding)..... 88

Σχήμα 3. 8. Σχηματική απόδοση των σταδίων κατασκευής πορώδους μεμβράνης PDMS. Μετά την επίστρωση προπολυμερούς PDMS στο φορέα του (στάδιο a), το σύνολό τους αναστρέφεται στο εκμαγείο με

τις μικροκολώνες (στάδιο b) και συμπιέζεται σύμμορφα με την εναπόθεση αλουμινίου βάρους 45 g (φωτογραφία σε προσθήκη) (στάδιο c). Μετά από θέρμανση, ο φορέας με το επισκληρυμένο PDMS αφαιρούνται από το εκμαγείο προς δημιουργία πορώδους μεμβράνης PDMS (στάδιο d) (τροποποίηση από τους Huh et al. [9]).

Σχήμα 3. 9. a) 2D σχέδιο CAD της φωτολιθογραφικής μάσκας για το εκμαγείο της πορώδους μεμβράνης, που αποτελεί μια τετράγωνη συστοιχία μικροκολώνων πλευράς 15 μm, αποτελούμενη από μικροκολώνες ονομαστικής διαμέτρου 8 μm και με μεταξύ τους διάκεντρο 40 μm, όπως διακρίνεται από την εικόνα σε μεγέθυνση. b) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x της μάσκας διαφάνειας. Σειριακά σε μεγέθυνση παρουσιάζονται εικόνα 100x της διαφάνειας, και εικόνα του κατασκευαστή (Selba S.A.), από όπου προκύπτει μέση διάμετρος οπών $8.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

Σχήμα 3. 10. Σχηματική απόδοση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή εκμαγείου πορώδους μεμβράνης με λιθογραφία με χρήση του αρνητικού φωτοευαίσθητου SU-8 a) μονής και b) διπλής επίστρωσης.

Σχήμα 3. 11. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x και 50x των μικροκολώνων SU-8 μονής επίστρωσης σε υπόστρωμα Si. Οι μικροκολώνες έχουν σχήμα παρεμφερές της γενέτειρας μάσκας, ενώ εντοπίζονται αρκετές αποκολλημένες. Οι διαστάσεις τους είναι μέση διάμετρος $6.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ και μέσο ύψος $32.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$.

Σχήμα 3. 12. Εικόνες SEM του εκμαγείου από διπλή επίστρωση SU-8. Οι μικροκολώνες SU-8 λόγω υπερέκθεσης εμφανίζουν αυξημένη διάμετρο σε σχέση με τη μάσκα (a), παρουσιάζουν καλή πρόσφυση στην πρώτη επίστρωση SU-8 πάχους περίπου 34 μm (b), και εμφανίζουν ελαφρώς αρνητικό προφίλ σε συνολικό ύψος περίπου 29 μm (c).

Σχήμα 3. 13. Φωτογραφία που απεικονίζει την κάλυψη της φωτολιθογραφικής μάσκας με μαύρο χαρτόνι δύο ακάλυπτων τετραγωνικών περιοχών, ευθυγραμμισμένων με τα σχέδια της μάσκας, προς περιορισμό της επιφάνειας των εκμαγείων της μεμβράνης σε $10 \times 10 \text{ mm}^2$.

Σχήμα 3. 14. a) Σχηματική απόδοση των σταδίων κατασκευής εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης με χρήση φωτολιθογραφικής μάσκας προερχόμενης από μία και δύο διαφάνειες. Η διαδικασία περιλαμβάνει κυρίως λιθογραφία αρνητικού τόνου (με φωτοευαίσθητο AZ) και τη διεργασία Bosch βαθιάς εγχάραξης με ενεργά ιόντα. b) Κατά τη χρήση της μάσκας από δύο διαφάνειες, προστέθηκαν επιπλέον κατασκευαστικά στάδια μετά τη λιθογραφία αρνητικού τόνου, που αφορούσαν σε απομάκρυνση των υπολειμμάτων ρητίνης AZ και μετέπειτα του σχηματιζόμενου οξειδίου, πριν την εκκίνηση της διεργασίας Bosch.

Σχήμα 3. 15. Εικόνες SEM του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης από τη μάσκα μίας διαφάνειας. Παρουσιάζεται κάτοψη του εκμαγείου με εμφανή την ομοιότητα του σχεδίου των μικροκολώνων με τις δομές της μάσκας, και με αμελητέα απουσία μικροκολώνων. Σε μεγέθυνση εικόνα υπό 45° , από όπου υπολογίζεται πραγματικό μέσο ύψος μικροκολώνων $22.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

Σχήμα 3. 16. Εικόνες οπτικού προφιλόμετρου Profilm3D® του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης από τη μάσκα δύο διαφανειών μετά το τέλος της διεργασίας Bosch, από δύο διαφορετικές περιοχές (a και b). Διακρίνεται θετικό προφίλ και μέσο ύψος μικροκολώνων 27 μm (συμπεριλαμβανομένης της ρητίνης AZ).

Σχήμα 3. 17. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης από τη μάσκα δύο διαφανειών μετά το τέλος της διαδικασίας κατασκευής του. a) Εικόνα 10x, και σε μεγέθυνση εικόνα 50x, που απεικονίζουν την ομαλότητα του περιγράμματος των μικροκολώνων, σε συμφωνία με τη μάσκα προέλευσης, και την ύπαρξη σκίασης, ένδειξη παρουσίας θετικού προφίλ. b) Εικόνα 50x εστιασμένη στη βάση του εκμαγείου που αποδεικνύει τη δημιουργία τραχύτητας.

Σχήμα 3. 18. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης a) 10x και b) 50x εκμαγείου μικροκολώνων SU-8 (μονής επίστρωσης) πριν τη χρήση του για την κατασκευή πορώδους μεμβράνης. Είναι εμφανής η

αποκόλληση μικροκολώνων και στις δύο εικόνες, ορισμένες από τις οποίες σημειώνονται ενδεικτικά με κόκκινα κυκλάκια στην εικόνα (α). 105

Σχήμα 3. 19. Εικόνες SEM υπό κλίση 60° του φορέα μαζί με τη μεμβράνη PDMS μετά την απομάκρυνσή τους από το εκμαγείο μικροκολώνων SU-8. α) Η μεγαλύτερη επιφάνεια της μεμβράνης έχει αποκοπεί από το φορέα, με μία παραμένουσα λεπτή στρώση της σε αυτόν, ενώ πολλές μικροκολώνες έχουν αποκολληθεί από το εκμαγείο. Σε μεγέθυνση περιοχή της μεμβράνης που έχει παραμείνει άθικτη στο φορέα, από όπου επιβεβαιώνεται η μερική απόσπαση της μεμβράνης και η αποκόλληση των μικροκολώνων. β) Από τα αποτυπώματα των μικροκολώνων υπολογίζεται ότι το πραγματικό πάχος της μεμβράνης που παρέμεινε στο φορέα δεν ξεπερνάει τα 2 – 4.3 μm 106

Σχήμα 3. 20. α) Φωτογραφία εξ'ολοκλήρου παραμονής της μεμβράνης στο εκμαγείο Si, που είχε προγενέστερα υδροφοβοποιηθεί με την έκθεσή του σε πλάσμα αερίου φθοράνθρακα C_4F_8 , με το φορέα της μεμβράνης να έχει επιστρωθεί με εμπορικό Teflon. β) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 10x, και σε μεγέθυνση εικόνα 50x, της μεμβράνης πάνω στο εκμαγείο. 107

Σχήμα 3. 21. α) Εκμαγείο Si, που έχει εναποτεθεί με υμένιο φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C_4F_8 , μετά την πλήρη απομάκρυνση της μεμβράνης από αυτό. β) Ο φορέας επικαλυμμένος με υμένιο από πλάσμα CHF_3 , με τη μεμβράνη να έχει παραμείνει άθικτη σε αυτόν. γ) Τμηματική συγκόλληση της μεμβράνης με το μικροθάλαμο καλλιέργειας, με σημαντικό ποσοστό αυτής ($\approx 60\%$) να μην απομακρύνεται από το φορέα, λόγω ανεπαρκούς μηχανικής της αντοχής. 109

Σχήμα 3. 22. (α - γ) Εικόνες SEM της πορώδους μεμβράνης PDMS που προέκυψε από εκμαγείο Si από την πλευρά σε επαφή με το φορέα της. α) Η πλειονότητα των πόρων έχουν διανοιχθεί κατά ένα ποσοστό 95%, όπως φαίνεται από την εικόνα 80x και 350x σε μεγέθυνση. β) Εικόνα προφίλ (υπό 90°) της μεμβράνης, που επιβεβαιώνει τη διάνοιξη των οπών σε όλο το πάχος της μεμβράνης των περίπου 21 μm . γ) Οι εικονιζόμενες ετεροχρωμίες είναι υπολείμματα του υμενίου CHF_3 , τα οποία από το φορέα της μεμβράνης μεταφέρθηκαν και σε αυτή. δ) Εικόνα SEM υπό 45° του εκμαγείου Si μετά από 8 χρήσεις του, όπου παρουσιάζεται άθικτο, αποδεικνύοντας την ικανότητα επαναχρησιμοποίησής του. 111

Σχήμα 3. 23. Εικόνες SEM της πορώδους μεμβράνης PDMS από το εκμαγείο Si που προέκυψε από τη μάσκα δύο διαφανειών, όπως λήφθηκαν από την από την πλευρά σε επαφή με το φορέα της. α) Εικόνα 50x και σε μεγέθυνση εικόνα 1 000x υπό 60° , όπου διακρίνεται σχεδόν 100% διάνοιξη των πόρων. β) Εικόνα 350x, όπου η μέση διάμετρος $10.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ των οπών είναι αυξημένη κατά 0.5 μm σε σχέση με τη διάμετρο των μικροκολώνων, λόγω θετικού τους προφίλ. γ) Εικόνα 400x υπό 60° , όπου διακρίνονται ετεροχρωμίες λόγω υπολειμμάτων υμενίου από πλάσμα CHF_3 113

Σχήμα 3. 24. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης μετά την απομάκρυνσή της σε μεγέθυνση α) 10x και β) 50x. Δε διακρίνεται θραύση μικροκολώνων, και το εκμαγείο δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί. 114

Σχήμα 3. 25. Απόπειρες άμεσης κατασκευής πορώδους μεμβράνης με εγχάραξη laser σε πολυμερικά υποστρώματα, α) PDMS και β – δ) εμπορικό Therm-X® IT-7270K (Kapton®). α) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 50x που αποδεικνύει την αποτυχία διάνοιξης οπών στο υμένιο PDMS πάχους 10 μm με χρήση χαμηλής ροής ενέργειας ($2 - 3 \text{ J/cm}^2$) ενός παλμού. β) Εικόνα SEM που αποδεικνύει τη διάτρηση οπών στην επιφάνεια του Kapton® συνολικού πάχους 90 μm με χρήση 10 σαρώσεων και επίπεδο πολωτή 310° . γ) Εικόνα SEM, όπου διακρίνεται πως το βάθος των οπών στο Kapton® δεν ξεπερνά τα 50 μm . δ) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 50x με τις θερμικές αλλοιώσεις στην επιφάνεια του Kapton®. 116

Σχήμα 3. 26. Εμπορική πορώδης μεμβράνη πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) και σε μεγέθυνση εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 10x, όπου διακρίνεται το πολύπλοκο, τυχαίας οργάνωσης δίκτυο πόρων της. 117

Σχήμα 3. 27. Σχηματική απεικόνιση συγκόλλησης επιπέδων PDMS με τον εαυτό τους ή με το γυαλί. Προηγείται αμοιβαία έκθεση σε πλάσμα προς οξείδωση της επιφάνειας των δύο επιπέδων και δημιουργία

- ενεργών ομάδων σιλανόλης (Si – OH). Μετέπειτα σύμμορφη επαφή των δύο επιπέδων οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συγκόλληση με τη δημιουργία δεσμών σιλοξάνης (Si – O – Si) (τροποποίηση των Xiong et al. 2014 [17]). 118
- Σχήμα 3. 28.** Σχηματική απόδοση των σταδίων συγκόλλησης των επιπέδων της μικροδιάταξης για την περίπτωση ενσωμάτωσης πορώδους μεμβράνης PDMS. Προηγείται η συγκόλληση της μεμβράνης με το μικροθάλαμο καλλιέργειας, του συνόλου τους με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, και τέλος, η σφράγιση με το γυαλί. 119
- Σχήμα 3. 29.** Φωτογραφίες κατασκευαστικά ολοκληρωμένων μικροδιατάξεων μυελού των οστών σε ψηφίδα αρχιτεκτονικής α) 1^{ης} και β) 2^{ης} γενιάς. Η μικροδιάταξη 1^{ης} γενιάς είναι αντεστραμμένη με το γυαλί από κάτω και η 2^{ης} γενιάς διαβρεγμένη και χρωστικές διαφοροτικού χρώματος προς διευκόλυνση παρατήρησης. 120
- Σχήμα 3. 30.** Εικόνα SEM (υπό 90°) διατομής της μικροδιάταξης μυελού των οστών (αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς) με ενσωματωμένη πορώδη μεμβράνη PDMS, που επιβεβαιώνει την κατασκευαστική της ολοκλήρωση. Πάνω βρίσκεται ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας και κάτω ο μικροθάλαμος καλλιέργειας με τη μεμβράνη στο ενδιάμεσο. 121
- Σχήμα 3. 31.** α) Επίπεδα (άνω και κάτω) της συσκευής συγκράτησης πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) της μικροδιάταξης μυελού των οστών. Όλες οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. β) Φωτογραφία της συσκευής συγκράτησης PMMA με ενσωματωμένη τη μικροδιάταξη μυελού των οστών. 122
- Σχήμα 3. 32.** 3D σχέδιο CAD των προσαρμογών α) εισόδου β) εξόδου, κατασκευασμένων με 3D εκτύπωση για τη μικροδιάταξη μυελού των οστών. Όλες οι διαστάσεις είναι σε mm, και αναγράφονται μόνο οι εξωτερικές διαμέτροι για κάθε προσαρμογέα. γ) Φωτογραφία της μικροδιάταξης τοποθετημένης στη συσκευή συγκράτησης, με ενσωματωμένους τους προσαρμογείς. 123
- Σχήμα 4. 1.** Σχηματική αναπαράσταση διατομής της συσκευής ατμοσφαιρικού πλάσματος, αποτελούμενης από δύο ηλεκτρόδια, με ενσωματωμένο στο ενδιάμεσο το μικροθάλαμο. Η συσκευή κατασκευάστηκε από το Δρ. Άγγελο Ζένιου. 129
- Σχήμα 4. 2.** Φωτογραφία και σχηματική απόδοση διατομής του 3D μικροθαλάμου PDMS γεμάτου με MSCs. Ο μικροθάλαμος σχηματίζεται με τη συγκόλληση PDMS πάχους 3 mm και γυαλιού στις δύο πλευρές του. 129
- Σχήμα 4. 3.** Σχηματική αναπαράσταση των δύο τρόπων ενεργοποίησης με πλάσμα αέρα των παραλληλόγραμμων πηγαδιών PDMS, αποτελούμενων από ένα υπόστρωμα PDMS επικαλυμένο με λεπτό πλαίσιο PDMS (≈ 0.5 mm). α) Απευθείας έκθεση στο πλάσμα του εσωτερικού του πηγαδιού PDMS. β) Μέσω διάχυσης κατεργασία πλάσματος του εσωτερικού του πηγαδιού μέσω των 4 διανοιγμένων οπών στο επιπλέον επίπεδο PDMS – κάλυμμα του πηγαδιού. 131
- Σχήμα 4. 4.** Φωτογραφία της συσκευής ατμοσφαιρικού πλάσματος με ενσωματωμένο το μικροθάλαμο, όπου απεικονίζεται η *in situ* δημιουργία πλάσματος στο εσωτερικό του μικροθαλάμου. 133
- Σχήμα 4. 5.** Μελέτη γήρανσης PDMS. α) Μήτρα αλουμινίου για την κατασκευή των μικροκαναλιών PDMS. Περιλαμβάνει σύνολο 10 επιμέρους μήτρες, 5 για τα μικροκανάλια, και 5 για το κάλυμμα των μικροκαναλιών. Κάθε επιμέρους μήτρα έχει διαστάσεις 60 x 11.5 mm², ενώ οι μήτρες των μικροκαναλιών φέρουν επιπλέον δύο μικροκολώνες διαμέτρου 0.7 mm για τη διάνοιξη οπών εισόδου-εξόδου στο μικροκανάλι. β) Μικροκανάλι PDMS διαστάσεων 50 x 1.5 mm², με δύο οπές εισόδου-εξόδου. γ) Φωτογραφία στιγμιότυπου πειραματικής διαδικασίας, με το ρύγχος της πιπέτας στην είσοδο του μικροκαναλιού για τη μετακίνηση μέσω τριχοειδών δυνάμεων προς την έξοδο. Οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. 134
- Σχήμα 4. 6.** Φάσματα XPS των περιοχών C1s, O1s και Si2p για την ακατέργαστη επιφάνεια PDMS, την κατεργασμένη με πλάσμα αέρα και με ατμοσφαιρικό. α) Η κορυφή 284.6 eV, χαρακτηριστική της παρουσίας -CH₃, παρουσιάζεται διευρυμένη στις κατεργασμένες επιφάνειες, ενώ εντοπίζονται και επιμέρους υψηλότερες

ενέργειες δέσμμευσης (μέχρι τα 290 eV), που υποδεικνύουν την ύπαρξη οξειδωμένου άνθρακα. b) Οι κατεργασμένες επιφάνειες σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό εμφανίζουν κορυφή SiO₂ περίπου στα 532,8 eV, ως ένδειξη οξείδωσης της επιφάνειας PDMS. c) Μετατόπιση της κορυφής Si2p σπιν-τροχιάς από τα 102.1 eV στο ακατέργαστο PDMS, στα 103.3 eV για το κατεργασμένο σε πλάσμα αέρα, και στα 103.5 eV για το ατμοσφαιρικό την 1^η και 2^η ημέρα. 139

Σχήμα 4. 7. Ανάλυση της περιοχής Si2p για a) την ακατέργαστη επιφάνεια PDMS, b) την κατεργασμένη με πλάσμα αέρα και c) την κατεργασμένη με ατμοσφαιρικό πλάσμα την 1^η και d) τη 2^η ημέρα, κατέληξε στην ύπαρξη δύο επιμέρους κορυφών, μία κύρια στα 101.9 – 102.1 eV, που αντιστοιχεί στην ένωση (=Si(O)₁₋₂), χαρακτηριστική του PDMS, και μια δευτερεύουσα στα 103.3 – 103.6 eV, ενδεικτική παρουσίας κυρίως SiO₄. Με την κατεργασία πλάσματος η δευτερεύουσα κορυφή αυξάνεται σε ένταση, με τη μεγαλύτερη ένταση να εντοπίζεται για κατεργασία στο ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις 2 ημέρες. 141

Σχήμα 4. 8. Ποσοστό συνεισφοράς συνιστωσών κορυφών Si και SiO_x της περιοχής Si2p για την ακατέργαστη και τις κατεργασμένες σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις 2 ημέρες επιφάνειες PDMS. Από 10% συνεισφορά της κορυφής SiO_x στο ακατέργαστο PDMS, αυξάνεται σε 55% για το πλάσμα αέρα, και 70% και 75% για το ατμοσφαιρικό την day 0 και day 1, αντίστοιχα. 142

Σχήμα 4. 9. Λόγοι εμβαδών a) Si/O και b) C/O για την ακατέργαστη και τις κατεργασμένες σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις 2 ημέρες επιφάνειες PDMS. Οι λόγοι μειώνονται στα κατεργασμένα δείγματα, αναδεικνύοντας την οξείδωσή τους. 143

Σχήμα 4. 10. Ταχύτητα τριχοειδούς άντλησης απιονισμένου νερού στο εσωτερικό μικροκαναλιών PDMS, ακατέργαστου και κατεργασμένων με πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα, μέχρι και την 7^η ημέρα. Όλες τις ημέρες οι ταχύτερες ροές στα κατεργασμένα κανάλια παραμένουν υψηλότερες εκείνης στο ακατέργαστο. Την day 0 διακρίνεται σημαντικά υψηλότερη ταχύτητα στο κατεργασμένο με ατμοσφαιρικό πλάσμα μικροκάναλι, με τη διαφορά να μειώνεται τις υπόλοιπες ημέρες. 144

Σχήμα 4. 11. Στατικές γωνίες επαφής νερού κατεργασμένων σε πλάσμα αέρα επιφανειών PDMS και λεπτών στρωμάτων SiO₂, με και χωρίς κολλαγόνο, σε κατάσταση ξηρασίας τις ημέρες 0 και 7. Η επικάλυψη με κολλαγόνο των κατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών PDMS και των στρωμάτων SiO₂ μονιμοποιεί την υδροφιλικότητά τους μέχρι και την 7^η ημέρα σε κατάσταση ξηρασίας, αποδεικνύοντας τη σταθεροποίηση της υδροφιλικότητας του εσωτερικού των μικροθαλάμων καλλιέργειας. ** Για τα στρώματα SiO₂, δεν είναι διαθέσιμη μέτρηση την 7^η ημέρα. 150

Σχήμα 4. 12. Στιγμιότυπα στατικών γωνιών επαφής νερού πάνω σε προκατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS, με και χωρίς κολλαγόνο την ημέρα της κατεργασίας (ημέρα 0) και την 7^η ημέρα. Η επικάλυψη των προκατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών PDMS με κολλαγόνο επιμηκύνει την υδροφιλικότητά τους, σημειώνοντας μέση γωνία επαφής 44.4° ± 2.2° σε κατάσταση ξηρασίας την 7^η ημέρα. 151

Σχήμα 4. 13. Στατική καλλιέργεια UC-MSCs στο εσωτερικό τριδιάστατων μικροθαλάμων PDMS, προκατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμένων με κολλαγόνο για 5 ημέρες, σε σύγκριση με ακατέργαστους μικροθαλάμους αναφοράς. Οι κατεργασμένοι μικροθάλαμοι εμφανίζουν μεγαλύτερη και περισσότερο οργανωμένη κυτταρική προσκόλληση οδηγώντας στο σχηματισμό τριδιάστατου στρωματικού ιστού. Οι εικόνες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο υπό μεγέθυνση 10x. 154

Σχήμα 4. 14. Ποσοστιαία επιφανειακή κάλυψη MSCs του εσωτερικού των τριδιάστατων προκατεργασμένων με πλάσμα και επικαλυμένων με κολλαγόνο μικροθαλάμων PDMS σε σύγκριση με ακατέργαστους μικροθαλάμους, κατά τις ημέρες 1, 3 και 5, υπολογισμένη με ανάλυση εικόνας. Οι κατεργασμένοι μικροθάλαμοι παρουσιάζουν περισσότερο εκτεταμένη επιφανειακή κάλυψη με στρωματικό ιστό, ξεκινώντας από την 1^η ημέρα, συνεχίζοντας την 3^η με σχεδόν πλήρη συρροή, και καταλήγοντας την 5^η με πλήρη συρροή και 100% κάλυψη. 155

- Σχήμα 5. 1.** Εικόνες SEM μικροαντιδραστήρα PDMS συγκολλημένου σε γυαλί, όπου απεικονίζεται η δημιουργία σχισμής μεταξύ των δύο επιπέδων λόγω καμπυλότητας της γωνίας του PDMS (a), και η ύπαρξη μικροτραχύτητας στο επίπεδο του PDMS (b) [9]. c) Κύκλος ανάπτυξης φυσαλίδων και αποκόλλησης από έναν πυρήνα Harvey εντός σχισμής με την εφαρμογή ροής [7]. 161
- Σχήμα 5. 2.** Παγίδευση αέρα κατά τη διαβροχή μιας επιφάνειας με ατέλεια (σχισμή). Στην υδρόφιλη επιφάνεια το υγρό θα διαβρέξει τη σχισμή (αριστερά), ενώ στην υδρόφοβη θα εγκλωβιστεί αέρας (δεξιά) [7]. Παρουσιάζεται επίσης το σχήμα της διεπαφής αέρα-υγρού λόγω των στατικών γωνιών επαφής που προκύπτουν..... 162
- Σχήμα 5. 3.** Παραδείγματα δομών που συμβάλλουν στο σχηματισμό φυσαλίδων σε μικρορευστονικές διατάξεις και τρόποι αντιμετώπισης. Α) Γωνίες και αδιέξοδα, όπου συστήνεται η καμπύλωση των γωνιών, και ο εξερισμός ή η αλλαγή τοποθέτησης των καναλιών εισόδου/εξόδου. Β) Δυσκολία στην πλήρωση θαλάμων με υψηλή αναλογία πλάτους προς ύψος, που αντιμετωπίζεται με τοποθέτηση οδηγών φάσης ή γεωμετρίας μικροκολώνων. Γ) Συγκόλληση επιπέδων με μικροτραχύτητα, όπου προτείνεται η στεγανοποίηση με κατάλληλα υλικά και η αποφυγή στρογγυλεμένων άκρων [7]. 164
- Σχήμα 5. 4.** a) Σύνδεση τριχοειδούς σωληνίσκου και περιοχές όπου μπορεί να σχηματιστούν θύλακες αέρα. b) Τοποθέτηση του τριχοειδούς σωληνίσκου στην κατεύθυνση ροής, διαπερνώντας στο εσωτερικό του μεταλλικό σύρμα, που στη συνέχεια αφαιρείται [27]. 165
- Σχήμα 5. 5.** Μικροπαγίδα φυσαλίδων συνδεδεμένη εξωτερικά με μικρορευστονική διάταξη. a) Ρεαλιστική εικόνα της παγίδας. b) Αποτελείται από δύο επίπεδα και η λειτουργία της στηρίζεται σε μηχανική παγίδευση με χρήση φυσικών εμποδίων. Στο άνω επίπεδο υπάρχουν τρεις σειρές από εμπόδια μειούμενου διάκενου για την παγίδευση φυσαλίδων μεγαλύτερων από 100 μm, ενώ το κάτω επίπεδο επιτρέπει τη διαφυγή της ροής. c) Μικρορευστονική διάταξη μCCA σε σύνδεση με τη μικροπαγίδα διατήρησε τη βιωσιμότητα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων κατά περίπου 90% (live/dead cell imaging) σε διάστημα 72 h [29]. 168
- Σχήμα 5. 6.** Μικροδιάταξη με ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, κατασκευασμένη με την τεχνική του πολυμερισμού δύο φωτονίων (two-photon polymerization – 2PP). a) Εικόνα SEM της μικροδιάταξης με την παγίδα φυσαλίδων. b) Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της παγίδας. Οι φυσαλίδες στο μικροκανάλι ανέρχονται σταδιακά προς το μικροθάλαμο παγίδευσης, όπου με εφαρμογή αρνητικής πίεσης μέσω της λεπτής μεμβράνης PDMS, απομακρύνονται συνεχώς. c) Δοκιμή λειτουργίας της μικροδιάταξης απέδωσε επιτυχή καλλιέργεια και ανάπτυξη επιθηλιακών κυττάρων A549 για 5 ημέρες με συνεχή εκτόνωση των φυσαλίδων. Σχεδόν 100% βιωσιμότητα την 1^η ημέρα (αριστερά), και 95% μετά από τις 5 ημέρες (δεξιά) [31]. 169
- Σχήμα 5. 7.** Εξωτερικά συνδεδεμένο σύστημα PDMS παγίδευσης φυσαλίδων. a) Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος, αποτελούμενο από δύο μικροκανάλια, ένα διαρροόμενο από την κυρίως ροή, και ένα για την εκτόνωση φυσαλίδων μέσω παραβολικού σωλήνα. b) Φωτογραφία του συστήματος παγίδευσης φυσαλίδων [32]. 170
- Σχήμα 5. 8.** Εξωτερικά συνδεδεμένη απλής κατασκευής φορητή παγίδα PDMS. a) Φωτογραφία της μικροδιάταξης, αποτελούμενη από τρία λειτουργικά πανομοιότυπα δίκτυα μικροκαναλιών. Κάθε δίκτυο διαθέτει τρία επίπεδα, με το ανώτερο να χρησιμεύει για την έγχυση και ανάμειξη ουσιών, το ενδιάμεσο για την τροφοδοσία θρεπτικού υλικού, και το κατώτερο για την καλλιέργεια κυττάρων. b) Φωτογραφία της διάταξης με συνδεδεμένη την παγίδα PDMS, αποτελούμενη από τρία επίπεδα, από τα οποία στο ενδιάμεσο βρίσκονται δύο μικροθάλαμοι για την εκτόνωση φυσαλίδων. c) Εικόνα φθορισμού συσσωματώματος κυττάρων παγκρέατος ποντικών ύστερα από σήμανση με πράσινη χρωστική για τα ζωντανά, και κόκκινη για τα νεκρά κύτταρα. Σχεδόν 100% των κυττάρων παρέμειναν ζωντανά [33]. 171
- Σχήμα 5. 9.** Παγίδα φυσαλίδων ενσωματωμένη στην κορυφή μικροδιάταξης εντέρου σε ψηφίδα. a) Σχηματική αναπαράσταση της μικροδιάταξης με την παγίδα. Ο κωνικός μικροθάλαμος καλλιέργειας έρχεται σε άμεση επαφή με το μικροθάλαμο της παγίδας στην κορυφή του, ο οποίος καλύπτεται από μεμβράνη PDMS, μέσω

της οποίας οι ανερχόμενες φυσαλίδες εκτονώνονται στην ατμόσφαιρα. b) Φωτογραφία της μικροδιάταξης με την ενσωματωμένη παγίδα. c) Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από την καλλιέργειας εντερικού οργανοειδούς για 30 ημέρες στη μικροδιάταξη με την παγίδα. Η σήμανση κυττάρων με διαφορετικές χρωστικές (κόκκινη, πράσινη) απέδειξε την ικανότητα των εντερικών βλαστοκυττάρων να διαφοροποιούνται [34]. 172

Σχήμα 5. 10. Φωτογραφία του μικροθαλάμου καλλιέργειας PDMS που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων. 173

Σχήμα 5. 11. a) Σχηματική αναπαράσταση της χρησιμοποιηθείσας διάταξης και συνδεσμολογίας για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων υπό χαμηλές ροές (0.04 – 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$). Αποτελείται από μικροαντλία σύριγγας LabSmith SPS01, συνδεδεμένη με το μικροθάλαμο μέσω ένωσης σωληνίσκων PEEK εσωτερικής διαμέτρου από 360 μm σε 800 μm , και μικροβαλβίδα MV201 για τη ρύθμιση δύο πιθανών κατευθύνσεων ροής (μία για την πλήρωση της αντλίας, και μία για την κατεύθυνση της ροής από την αντλία προς το μικροθάλαμο), καθοριζόμενων μέσω λειτουργίας «L». b) Ρεαλιστική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης τροφοδοσίας με μικροαντλίες σύριγγας, όπου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη μελέτη δύο μικροθαλάμων. 174

Σχήμα 5. 12. a) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας για την τροφοδοσία μικροθαλάμων υπό υψηλότερες ροές (6.7 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$), η οποία περιλαμβάνει περισταλτική μικροαντλία P625/900 (Instech Laboratories Inc.) συνδεδεμένη μέσω σωληνίσκων σλικόνης με το μικροθάλαμο. b) Ρεαλιστική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης, όπως τοποθετήθηκε εντός φούρνου για τη μελέτη της. 176

Σχήμα 5. 13. Χρονική εξέλιξη του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε σφραγισμένους με πιεζοευαίσθητη ταινία πολυολεφίνης στην είσοδο-έξοδο τους μικροθαλάμους. Είσοδος φυσαλίδας πραγματοποιήθηκε σε χρόνο $t > 2$ h, ενώ στις 12.5 h μόνο τα μικροκανάλια εισόδου-εξόδου είχαν καλυφθεί με φυσαλίδες. 177

Σχήμα 5. 14. Στιγμιότυπα παρατήρησης μικροθαλάμου υπό χαμηλές ροές σε μικρούς χρόνους, και συγκεκριμένα, a) ροής 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ την 3^η ώρα, και b) ροής 0.08 $\mu\text{L}/\text{min}$ την 4^η ώρα. Προκύπτει εξάρτηση της εμφάνισης φυσαλίδων από τη ροή, καθώς με την αύξησή της μειώνεται η επιφανειακή κάλυψη από φυσαλίδες. Προς διευκόλυνση, έχει τονιστεί το περιγράμμα του μικροθαλάμου και οι φυσαλίδες έχουν σημειωθεί με βελάνια. 179

Σχήμα 5. 15. Εικόνες του μικροθαλάμου όπου έγινε καλλιέργεια MSCs με εναλλασσόμενη τροφοδοσία υπό χαμηλή ροή (0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) και σφράγιση τους, πριν την τροφοδοσία τους (αριστερά), και μετά από δύο τροφοδοσίες (δεξιά) στη διάρκεια μίας μέρας, όπου είναι εμφανής ο κατ'ελάχιστο διπλασιασμός της επιφάνειας κάλυψης με φυσαλίδες. 181

Σχήμα 5. 16. Χρονική εξέλιξη καλλιέργειας MSCs εντός μικροθαλάμων με συνδυαστική τροφοδοσία υπό χαμηλή ροή (0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) και σφράγιση τις πρώτες 2 ημέρες, και ακόλουθη στατική καλλιέργεια μέχρι και την 6^η ημέρα. Περιορισμένη και ανομοιόμορφη ανάπτυξη ιστού στρώματος, και δημιουργία συσσωματωμάτων, επηρεαζόμενη από την έντονη παρουσία φυσαλίδων, εμφανών και στις εικόνες της 4^{ης} και 6^{ης} ημέρας. Τα συσσωματώματα υποδεικνύονται με βελάνια. 183

Σχήμα 5. 17. Αντιπροσωπευτικές εικόνες περιοχών μικροθαλάμων υπό χαμηλή ροή συνδυαστικά με σφράγιση, οι οποίες έχουν καλυφθεί με φυσαλίδες, επηρεάζοντας την οργάνωση και βιωσιμότητα των MSCs. Τα MSCs υποβάλλονται σε οξειδωτικό στρες και συμπιέζονται να αναπτυχθούν περιφερειακά ή κάτω από τις φυσαλίδες. Με βελάνια υποδεικνύεται η ανάπτυξη συσσωματωμάτων. 184

Σχήμα 5. 18. Φωτογραφία του μικροθαλάμου τροφοδοσίας PDMS με τους ειδικά κατασκευασμένους με 3D εκτύπωση προσαρμογείς για τη βελτίωση της συνδεσμολογίας του με την περισταλτική αντλία και το φαλίδιο αποβλήτων, στα πλαίσια των τροποποιήσεων για τον περιορισμό του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων. 185

- Σχήμα 5. 19.** a) Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ μετά την ενσωμάτωση βελτιωτικών ενεργειών για την αντιμετώπιση της δημιουργίας φυσαλίδων. Αυξήθηκε το πάχος του PDMS που περιβάλλει το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, κατασκευάστηκαν ειδικοί προσαρμογείς σωληνίσκων εισόδου-εξόδου με 3D εκτύπωση, υδροφιλοποιήθηκε το εσωτερικό του μικροθαλάμου, και το θρεπτικό υλικό αφέθηκε να μεταβεί σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση του. b) Ρεαλιστική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας εντός του φούρνου για τη μελέτη..... 187
- Σχήμα 5. 20.** a) Σχηματική απόδοση της χρησιμοποιηθείσας πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας τροφοδοσίας μικροθαλάμων υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ με ενσωμάτωση των βελτιωτικών ενεργειών και εμπορικής παγίδας για την αντιμετώπιση της δημιουργίας φυσαλίδων. Η παγίδα τοποθετείται μεταξύ του μικροθαλάμου τροφοδοσίας και της περισταλτικής αντλίας. b) Φωτογραφία της διάταξης εντός του φούρνου κατά την πειραματική διαδικασία..... 188
- Σχήμα 5. 21.** a) Χρονική εξέλιξη φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων στο σύστημα υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ απουσία εμπορικής παγίδας. Εντοπίστηκε είσοδος φυσαλίδας τη 2^η ώρα, καλύπτοντας προοδευτικά περίπου 25% του μικροθαλάμου σε 25 – 26 h. b) Αντιπροσωπευτική εικόνα φιαλιδίου τροφοδοσίας με πλήθος φυσαλίδων συσσωρευμένων στο σωληνίσκο σιλικόνης. 189
- Σχήμα 5. 22.** Χρονική εξέλιξη σχηματισμού φυσαλίδων στο σύστημα υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ με εμπορική παγίδα. Πραγματοποιήθηκε είσοδος φυσαλίδας την 7^η ώρα, ενώ περίπου 60% του μικροθαλάμου καλύφθηκε με φυσαλίδες την 24^η ώρα. 191
- Σχήμα 5. 23.** Συστηματικές παρατηρήσεις κατά την τροφοδοσία μικροθαλάμων υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, απουσία και παρουσία εμπορικής παγίδας φυσαλίδων. a) Συσσώρευση φυσαλίδων στο σωληνίσκο σιλικόνης στο εσωτερικό του φιαλιδίου τροφοδοσίας, b) Συγκέντρωση φυσαλίδων στις άκρες των προσαρμογών του μικροθαλάμου, καθώς και c) της παγίδας, d) Μετακίνηση μεγαλύτερων φυσαλίδων στο σύστημα με την παγίδα, πιθανώς λόγω μεγαλύτερου πλήθους διασυνδέσεων. Οι φυσαλίδες υποδεικνύονται με βελάνια. 194
- Σχήμα 5. 24.** Παρατηρήσεις κατά την τροφοδοσία μικροθαλάμων υπό ροή με ενσωματωμένη εμπορική παγίδα φυσαλίδων, όπου έχει προηγηθεί εξάερωση του θρεπτικού υλικού. a) Ροή φυσαλίδων από την έξοδο της παγίδας προς την είσοδο του μικροθαλάμου τη 2^η ώρα παρατήρησης. b) Παγίδευση φυσαλίδων στον κωνικό προσαρμογέα στην έξοδο της παγίδας την 3^η ώρα παρατήρησης. c) Ανυπαρξία φυσαλίδων ορατών δια γυμνού οφθαλμού στο φιαλίδιο τροφοδοσίας ακόμη και μετά από 18 h συνεχούς τροφοδοσίας. 196
- Σχήμα 5. 25.** Ανακύκλωση του φαινομένου δημιουργίας δυσάλιδων στο εσωτερικό μικροθαλάμων υπό ροή απιονισμένου νερού σε συστήματα απουσία και παρουσία παγίδας φυσαλίδων, ενδεικτική της ύπαρξης πυρήνων Harvey. a) Απουσία παγίδας, η κάλυψη του μικροθαλάμου με φυσαλίδα τη 16^η ώρα προσομοιάζει εκείνη της 23^{ης} ώρας. b) Παρουσία παγίδας σημειώνεται βραδύτερη ανακύκλωση των φυσαλίδων, με τη φυσαλίδα από την 20^η στην 24^η ώρα να μην έχει ακόμη αποβληθεί από το θάλαμο..... 202
- Σχήμα 5. 26.** a) Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης και συνδεσμολογίας που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη υπό υψηλότερες ροές (6 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 13 $\mu\text{L}/\text{min}$) εμπορικής μικροδιάταξης για τη 3D καλλιέργεια κυττάρων. Η μικροδιάταξη συνδέεται με περισταλτική αντλία μέσω κατάλληλων εμπορικών προσαρμογών Luer και σωληνίσκων σιλικόνης. b) Φωτογραφία της πειραματικής διάταξης στο εσωτερικό φούρνου. 204
- Σχήμα 5. 27.** Στιγμιότυπα του μικροθαλάμου τροφοδοσίας της εμπορικής μικροδιάταξης για τις ροές 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 13 $\mu\text{L}/\text{min}$, και χρόνο 18 h και 16 h, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε είσοδος φυσαλίδας σε καμία από τις περιπτώσεις..... 204
- Σχήμα 5. 28.** Απεικόνιση των κυψελίδων στην περιφέρεια του μικροθαλάμου της εμπορικής μικροδιάταξης, που λειτουργούν ως τοπικά φράγματα του μετώπου υγρού, συνεισφέροντας έτσι στην ομοιόμορφη διαβροχή του εσωτερικού του, αλλά και στην παγίδευση φυσαλίδων. 205

Σχήμα 5. 29. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) του πλαισίου κυτταροκαλλιέργειας PEGDA a) πριν και b) μετά την πραγματοποίηση κυτταροκαλλιέργειας. Διακρίνονται οπές έως και 250 μm, οι οποίες μετά φθάνουν μέχρι και τα 380 μm, αποκαλύπτοντας σχεδόν ολόκληρη την κυψέλη. Η κλίμακα είναι στα 100 μm.	206
Σχήμα 6. 1. 2D σχέδιο CAD των επιπέδων τροφοδοσίας (πάνω) και καλλιέργειας (κάτω) της προτεινόμενης μικροδιάταξης με τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας.	211
Σχήμα 6. 2. Φωτογραφία ειμαγείων επιπέδου τροφοδοσίας και καλλιέργειας της προτεινόμενης μικροδιάταξης με τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας σε υπόστρωμα Teflon.	211
Σχήμα 6. 3. 2D σχέδιο CAD του επιπέδου τροφοδοσίας, τροποποιημένου γεωμετρικά ώστε να εξασφαλίζεται α) προτίμηση πλήρωσης του προθαλάμου αντί των μικροθαλάμων, και β) ίση ογκομετρική ροή και στους 3 μικροθαλάμους. Όλες οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm.	213
Σχήμα 6. 4. Προσομοίωση ταχύτητας (ογκομετρικής ροής) για το επίπεδο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης με τους τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας για a) την τροποποιημένη γεωμετρία με άνισα μήκη μικροκαναλιών και b) ίσα μήκη μικροκαναλιών, σε μόνιμη κατάσταση και σε μέσο βάθος. Προκύπτουν παραπλήσιες ροές εξόδου, προσεγγιστικά στο 1/3 της ροής εισόδου και στις δύο γεωμετρίες.	215
Σχήμα 6. 5. Αποτελέσματα προσομοίωσης πίεσης για το επίπεδο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης των τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας για a) την τροποποιημένη γεωμετρία με άνισα μήκη μικροκαναλιών και b) ίσα μήκη μικροκαναλιών, σε μόνιμη κατάσταση και σε μέσο βάθος. Στη γεωμετρία άνισων μηκών μικροκαναλιών εξασφαλίζεται προτίμηση πλήρωσης του προθαλάμου πριν από τα μικροκανάλια που οδηγούν στους μικροθαλάμους, καθώς και παραπλήσιες απώλειες πίεσης μεταξύ εισόδων και εξόδων των μικροθαλάμων.	216
Σχήμα 7. 1. Εικόνες (μεγέθυνσης 10x) οπτικού και φθορισμού με πράσινη χρωστική diO των UC-MSCs στο εσωτερικό προκατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμένων με κολλαγόνο μικροθαλάμων από την 1 ^η έως την 4 ^η ημέρα. Στις εικόνες φθορισμού τα UC-MSCs παρουσιάζουν τη γνωστή ατρακτοειδή μορφολογία και πληθαίνουν σταθερά με το χρόνο, αποδεικνύοντας την επιτυχή χρώση τους με τη χρωστική diO, και τη δυνατότητα χρήσης της ως μια μέθοδο ποσοτικού χαρακτηρισμού.	221
Σχήμα 7. 2. Μέση επιφάνεια κάλυψης (μm ²) με UC-MSCs, σημασμένων με τη χρωστική diO, των μικροθαλάμων που έχουν προκατεργαστεί με πλάσμα και επικαλυφθεί με κολλαγόνο, όπως προκύπτει από ανάλυση εικόνων φθορισμού. Η επιφάνεια κάλυψης αυξάνεται προχωρώντας προς την 4 ^η ημέρα.	221
Σχήμα 7. 3. Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου των MSCs σε μικροθαλάμους κατεργασμένους με πλάσμα και με επιστροφή κολλαγόνου την 4 ^η ημέρα καλλιέργειας. a), b) Εικόνες μεγέθυνσης 10x, που αναδεικνύουν την ομοιομορφία ανάπτυξης ιστού στρώματος σε σπειροειδή σχηματισμό. c) Συμπυγμένη εικόνα (μεγέθυνσης 10x) συνολικής επιφάνειας περίπου 3.7 x 2.4 mm ² από επιμέρους περιοχές του μικροθαλάμου, όπου διακρίνεται η πληρότητα κάλυψης με MSCs. Οι ασυνέχειες στον ιστό (κόκκινα βέλη) οφείλονται σε κατασκευαστικές ατέλειες.	223
Σχήμα 7. 4. Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης BM-MSCs, προερχόμενων από το μυελό των οστών ενηλίκων, υγιών και ασθενών, στο εσωτερικό μικροθαλάμων μέχρι την 6 ^η ημέρα. Τα ασθενή MSCs διαθέτουν τη γνωστή ατρακτοειδή μορφολογία, ενώ τα υγιή έχουν πεπλατυστεί, και εμφανίζουν κοκκώδες κυτταρόπλασμα, υποδεικνύοντας την προέλευσή τους από ηλικιωμένο δότη. Η ομαλή ανάπτυξη των MSCs, υγιών και ασθενών, μέχρι τη 2 ^η ημέρα, ανακόπτεται από την 4 ^η , λόγω έλλειψης ανανέωσης θρεπτικού υλικού την 3 ^η ημέρα.	226
Σχήμα 7. 5. Χαρακτηριστικές εικόνες μικροσκοπίου από MSCs προερχόμενα από ενήλικα δότη, ηλικιωμένο (αριστερά), και νεαρό (δεξιά) [4].	226
Σχήμα 7. 6. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) υγιών MSCs, ομφαλίου λώρου (UC-MSCs) και μυελού των οστών ενηλίκων (BM-MSCs) στο εσωτερικό μικροθαλάμων μέχρι τη 2 ^η ημέρα καλλιέργειας. Τα	

UC-MSCs εμφανίζουν τη γνωστή μορφολογία ινοβλαστών, ενώ τα BM-MSCs είναι πεπλατυσμένα λόγω προέλευσής τους από ηλικιωμένο δότη. 227

Σχήμα 7. 7. Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα παθητικής τροφοδοσίας. α) Ανεπτυγμένη 3D άποψη της μικροδιάταξης (αριστερά), αποτελούμενη από δύο επίπεδα PDMS, τον άνω κυλινδρικό μικροθάλαμο καλλιέργειας και την κάτω δεξαμενή τροφοδοσίας, διαχωριζόμενα μεταξύ τους με πορώδη μεμβράνη. Η παρατήρηση των κυττάρων και η επικοινωνία με το περιβάλλον πραγματοποιείται μέσω γυαλιού στην κορυφή της μικροδιάταξης. Σε μεγέθυνση (δεξιά) παρουσιάζεται μια διατομή της μικροδιάταξης, όπου διακρίνεται η καλλιέργεια των κυττάρων (MSCs και HSCs) στον άνω μικροθάλαμο και οι ροϊκές διεπαφές μέσω του γυαλιού. β) Σχηματική απόδοση και γ) φωτογραφία της μικροδιάταξης βυθισμένης σε τρυβλίο 35 mm γεμάτο με θρεπτικό υλικό κατά την πειραματική διαδικασία. 230

Σχήμα 7. 8. Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης MSCs σε εμπορικές μεμβράνες πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET), με και χωρίς επικάλυψη κολλαγόνου (αντίστοιχα reference και collagen-coated membranes) εντός πιάτου 24 πηγαδιών για χρόνο 6 ημερών. Οι μεμβράνες υποστηρίζουν την ομαλή ανάπτυξη των MSCs, με τις επικαλυμμένες με κολλαγόνο να ευνοούν περισσότερο την ομοιομορφία και ταχύτητα εξάπλωσής τους. Για τις ημέρες 4^η και 6^η, με κόκκινους κύκλους εικονίζονται τοπικές ανομοιόμορφες συγκεντρώσεις κυττάρων, με κίτρινους κύκλους η παρουσία κενών από κύτταρα περιοχών, και με μπλε βέλη ο σπειροειδής σχηματισμός ιστού στρώματος. Προς διευκόλυνση παρατήρησης, την 6^η ημέρα στα πηγάδια αναφοράς παρουσιάζονται σε μεγέθυνση ενδεικτικά μια περιοχή με κόκκινο κύκλο και μία με μπλε βέλος. Με πράσινες εστιγμένες καμπύλες υποδεικνύονται στην πρώτη περίπτωση τα κύτταρα ανομοιόμορφα συσσωρευμένα, και στη δεύτερη, με πράσινες καμπύλες οι νοητές σπειροειδείς διαδρομές των κυττάρων. 232

Σχήμα 7. 9. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) της ανάπτυξης των MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με πορώδη μεμβράνη PDMS και PET την 1^η και 3^η ημέρα. Διακρίνεται περισσότερο ομοιόμορφη εξάπλωση των MSCs συνολικά στην επιφάνεια της μεμβράνης PET. 233

Σχήμα 7. 10. Εικόνες φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) των MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με πορώδη μεμβράνη PDMS και PET κατά την 1^η και 3^η ημέρα. Στη μεμβράνη PDMS εντοπίζονται περισσότερο εκτεταμένες σκοτεινές περιοχές, δηλωτικές μεγαλύτερης ανομοιομορφίας ιστού στρώματος. 234

Σχήμα 7. 11. Μέση επιφάνεια κάλυψης με MSCs (μm^2) στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με ενσωματωμένη πορώδη μεμβράνη PDMS και PET, κατά την 1^η και 3^η ημέρα. Αν και στις δύο μεμβράνες εμφανίζεται αύξηση της επιφάνειας κάλυψης από την 1^η στην 3^η ημέρα, η μεμβράνη PET παρουσιάζει μεγαλύτερη εξάπλωση των MSCs, σχεδόν διπλάσια σε σχέση με τη μεμβράνη PDMS την 3^η ημέρα. 235

Σχήμα 7. 12. 3D κατανομή ιστού στρώματος από την καλλιέργεια MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας πάνω στην πορώδη μεμβράνη α) PDMS, και β) PET την 3^η ημέρα, με βάση αντίστοιχες χαρακτηριστικές εικόνες φθορισμού. Στη μεμβράνη PDMS εμφανίζονται εκτεταμένες σκοτεινές περιοχές, ενδεικτικές απουσίας ιστού, και τοπικά μεγαλύτερες υψομετρικές διαφορές κατανομής ιστού λόγω αποφυγής επέκτασης σε περιοχές με υπολείμματα CF_x. Στη μεμβράνη PET σχεδόν σε όλη η επιφάνεια εντοπίζεται φθορίζων ιστός, που αποδεικνύει την ομοιόμορφη ανάπτυξη των MSCs σε αυτή. 237

Σχήμα 7. 13. α) Εικόνα συνεστιακού μικροσκοπίου των MSCs στη μεμβράνη PDMS κατά την 5^η ημέρα καλλιέργειας. Τα MSCs δε δημιούργησαν συνεχή ιστό, ενώ σε κάποιες περιοχές υπήρξαν σημάδια απόπτωσης (κόκκινα βέλη). β) Εικόνες απόπτωσης MSCs κατά την επώασή τους με διάλυμα νανοπολυμερούς χαμηλής τοξικότητας, και συγκεκριμένα, πολυαιθυλενιμίνης₆₀₀-β-κυκλοδεξτρίνης (polyethylenimine₆₀₀-β-cyclodextrin/PEI₆₀₀-β-CyD) (αριστερά) και υψηλού μοριακού βάρους (25 kDa) πολυαιθυλενιμίνης (PEI25kDa) (δεξιά)[13]. 238

Σχήμα 7. 14. α) Σχηματική αναπαράσταση της χρησιμοποιηθείσας διάταξης και συνδεσμολογίας για την υπό ροή λειτουργία της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (perfused BMoC). Η μικροδιάταξη διαθέτει ειδικά κατασκευασμένους με 3D εκτύπωση προσαρμογείς για τη σύνδεσή της με περισταλτική αντλία

και το φιαλίδιο αποβλήτων (50 mL) (waste bottle), με σωληνάκια σιλικόνης εσωτερικής διαμέτρου 0.5 mm και 1.5 mm, αντίστοιχα. Η άντληση θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται από το φιαλίδιο τροφοδοσίας (20 mL) (medium reservoir) παρέχοντας ροή 13 $\mu\text{L}/\text{min}$ στη μικροδιάταξη. Όλο το σύστημα τοποθετείται σε δίσκο PMMA 32 x 20 cm^2 (PMMA carrier) για ευχέρεια μετακινήσεων. b) Φωτογραφία σύνδεσης της διάταξης με υπολογιστή προς ρύθμιση της ροής. Η αντλία συνδέεται με πλακέτα Arduino (Arduino board) που ελέγχει μέσω του προγραμματιστικού περιβάλλοντος (IDE) Arduino την εφαρμοζόμενη ροή. Σε μεγέθυνση φωτογραφία της πειραματικής διάταξης τοποθετημένης στο δίσκο PMMA.240

Σχήμα 7. 15. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) καλλιέργειας MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητική τροφοδοσία μέχρι την 3^η ημέρα. Τα MSCs εμφανίζουν αριθμητική υπεροχή στη μικροδιάταξη υπό ροή όλες τις ημέρες, ενώ την 3^η ημέρα φαίνεται να ανακόπτεται η ανάπτυξή τους και στις δύο μικροδιατάξεις (όπως επιβεβαιώνεται ποσοτικά από τις παρακάτω εικόνες φθορισμού).242

Σχήμα 7. 16. Εικόνες φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) χρονικής εξέλιξης καλλιέργειας MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητική τροφοδοσία από την 1^η μέχρι την 3^η ημέρα. Τα MSCs είναι περισσότερα σε πλήθος στη μικροδιάταξη υπό ροή.243

Σχήμα 7. 17. Περιοχή κάλυψης με MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις υπό ροή (ενεργούς) και παθητική τροφοδοσία κατά τη 2^η και 3^η ημέρα. Η περιοχή κάλυψης μειώνεται από τη 2^η στην 3^η ημέρα και στις δύο μικροδιατάξεις, γεγονός που αποδίδεται σε σημαντικό ποσοστό στην αρχική χαμηλή συγκέντρωση εισόδου των MSCs. Και τις δύο ημέρες, η μικροδιάταξη υπό ροή εμφανίζει μεγαλύτερη κάλυψη λόγω μεγαλύτερης συχνότητας ανανέωσης του θρεπτικού υλικού. (n= 5, αριθμός των κουκίδων/τριγώνων που φαίνονται στο σχήμα.)244

Σχήμα 7. 18. Εικόνα συνεστιακού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) των MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στη μικροδιάταξη υπό ροή την 4^η ημέρα. Πολλά MSCs έχουν απωλέσει την ατρακτοειδή μορφολογία τους, με ορισμένα να έχουν επιμηκυνθεί, ενώ άλλα έχουν στρογγυλοποιηθεί και διαχωριστεί σε επιμέρους σώματα ως ένδειξη απόπτωσης (κόκκινα βέλη).245

Σχήμα 7. 19. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) καλλιέργειας MSCs υψηλής συγκέντρωσης (6.4×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητικής τροφοδοσίας διάρκειας 2 ημερών. Τα MSCs εμφανίζονται υγιή και στις δύο μικροδιατάξεις, με μεγαλύτερη ομοιομορφία ανάπτυξης στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας.246

Σχήμα 7. 20. Εικόνες φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) χρονικής εξέλιξης καλλιέργειας MSCs υψηλής συγκέντρωσης (6.4×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητικής τροφοδοσίας μέχρι τη 2^η ημέρα. Στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας τα MSCs είναι πληθυσμιακά περισσότερα και παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση τοπικής συσσώρευσης και καθ' ύψος επέκτασης.247

Σχήμα 7. 21. Περιοχή κάλυψης MSCs υψηλής συγκέντρωσης (6.4×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις υπό ροή (ενεργούς) και παθητικής τροφοδοσίας μέχρι τη 2^η ημέρα. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης εισόδου των MSCs, δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην επιφάνεια κάλυψης από την 1^η στη 2^η ημέρα. Και τις δύο ημέρες, τα MSCs καλύπτουν μεγαλύτερη επιφάνεια στη μικροδιάταξη υπό ροή. (n= 5 - 7, αριθμός των κουκίδων/τριγώνων που φαίνονται στο σχήμα.)248

Σχήμα 7. 22. Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs από την 1^η και την 3^η ημέρα. Τα MSCs βρίσκονται σε πλήρη συρροή.250

Σχήμα 7. 23. Εικόνες φθορισμού συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs (μεγέθυνσης 10x) από την 1^η έως την 3^η ημέρα. Παρατίθενται και οι συνιστώσες εικόνες φθορισμού των MSCs και HSPCs για την κάθε εικόνα συγκαλλιέργειας. Τα MSCs και τα HSPCs φαίνονται να αυξάνουν τον πληθυσμό τους ανά τις ημέρες και να συνυπάρχουν ομαλά μεταξύ τους.251

Σχήμα 7. 24. Ανάλυση εικόνων φθορισμού συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs διάρκειας 3 ημερών. α) Ποσοστό κάλυψης των ανώτερων στρωμάτων ιστού από MSCs ανά τις ημέρες. Παρατηρείται αύξηση του ποσοστού κάλυψης, γεγονός που αποδεικνύει τη σταδιακή εξάπλωση των MSCs στα ανώτερα στρώματα. β) Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών επιφάνειας κάλυψης με HSPCs (μm^2) μέχρι και την 3^η ημέρα. Τα HSPCs αυξάνουν ομαλά τον πληθυσμό τους ανά τις ημέρες, ενδεικτικό υγιούς συνύπαρξης με τα MSCs σε συγκαλλιέργεια. (n= 5 αριθμός των κουκίδων/τριγώνων που φαίνονται στο σχήμα).252

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1. 1.** Εταιρίες που κατασκευάζουν μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (OoCs) και ορισμένα προϊόντα τους..... 33
- Πίνακας 3. 1.** Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x και 50x των φωτολιθογραφικών μασκών quartz που προέκυψαν κατά τη μεταφορά μίας και δύο διαφανειών. Η μάσκα από τις δύο διαφάνειες παρουσιάζει περισσότερο εξομαλυμένο κυκλικό περίγραμμα και λόγω υπερέκθεσης δε μεταφέρει τις ασυμμετρίες της γενέτειρας διαφάνειας. 92
- Πίνακας 3. 2.** Μετρήσεις στατικής γωνίας επαφής ($^{\circ}$) και πάχους (nm) τριών ειδών υδρόφοβων υμενίων σε υπόστρωμα Si, και συγκεκριμένα, φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου οκταφθοροκυκλοβουτάνιο (C_4F_8) και από πλάσμα αερίου τριφθορομεθανίου (CHF_3), καθώς και εμπορικό Teflon. 104
- Πίνακας 4. 1.** Ποσοτική ανάλυση XPS ατομικών ποσοστών (at.%) PDMS, ακατέργαστου και κατεργασμένου σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό, την ημέρα της κατεργασίας (day 0) και την επομένη (day 1) για το ατμοσφαιρικό. 137
- Πίνακας 4. 2.** Διαβρεξιμότητα διαφορετικών επιφανειών PDMS, δηλαδή ακατέργαστες, επικαλυμμένες με κολλαγόνο, και κατεργασμένες με πλάσμα αέρα, με και χωρίς επίστρωση κολλαγόνου. Η προκατεργασία πλάσματος πριν από την επικάλυψη κολλαγόνου είναι απαραίτητη για ομοιόμορφη ακινητοποίηση του κολλαγόνου. Τα δεδομένα εμφανίζονται ως μέσες γωνίες επαφής \pm τυπικό σφάλμα τους. 146
- Πίνακας 4. 3.** Διαβρεξιμότητα κατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS, δοκιμασμένων για δύο τρόπους έκθεσης στο πλάσμα, μέσω διάχυσης και απευθείας, και για διαφορετικούς χρόνους, 1 h και 2 h πριν την επίστρωση κολλαγόνου, καθώς και για 1- και 3 mm – μήκος διάχυσης. Η απευθείας έκθεση στο πλάσμα προσφέρει καλύτερη ακινητοποίηση και ομοιομορφία κάλυψης κολλαγόνου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες γωνίες επαφής \pm τυπικό σφάλμα τους. 148
- Πίνακας 4. 4.** Μετρήσεις πάχους κολλαγόνου σε επιφάνειες PDMS, με και χωρίς προκατεργασία πλάσματος αέρα, και σε επιφάνειες SiO_2 χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (WLRs). Η υδροφιλοποίηση της επιφάνειας πριν την επικάλυψη με κολλαγόνο είναι απαραίτητη ώστε να υπάρξει ακινητοποίηση του κολλαγόνου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. 152
- Πίνακας 5. 1.** Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα μικροθαλάμων υπό χαμηλή ροή (0.08 $\mu L/min$) σε μικρούς χρόνους (2 h και 6 h) με το breadboard της αντλίας τοποθετημένο οριζόντια και υπό κλίση 10° – 20° . Η τοποθέτηση του breadboard υπό κλίση παρατηρήθηκε να καθυστερεί την είσοδο φυσαλίδων κατά το μέγιστο 2 h. Προς διευκόλυνση, έχει τονιστεί το περίγραμμα του μικροθαλάμου και οι φυσαλίδες έχουν σημειωθεί με βελόνια. 177
- Πίνακας 5. 2.** Συμπεριφορά μικροθαλάμων υπό ροή σε μικρούς και μεγάλους χρόνους, με καταγραφή των ωρών εισόδου φυσαλίδας και αδειάσματός τους, αντίστοιχα, για τρεις καταστάσεις i) μηδενικής ροής (σφραγισμένοι μικροθάλαμοι), ii) χαμηλής ροής (0.04 – 0.2 $\mu L/min$), και iii) υψηλότερης ροής (6.7 – 13.6 $\mu L/min$). Μεγαλύτερη καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας, καθώς και στο άδειασμα του μικροθαλάμου, παρουσιάζουν οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι. 179
- Πίνακας 5. 3.** Αντιπαραβολή λειτουργίας μικροθαλάμων υπό υψηλότερες ροές (6.7 – 13.6 $\mu L/min$) σε μικρούς και μεγάλους χρόνους, πριν και μετά την ενσωμάτωση βελτιωτικών ενεργειών περιορισμού εμφάνισης φυσαλίδων, όπως για παράδειγμα, η τροποποίηση της συνδεσμολογίας, η υδροφιλοποίηση του PDMS, και η μείωση βαθμίδας θερμοκρασίας. Με τις ενέργειες αυτές, επιτεύχθηκε κύρια περιορισμός των φυσαλίδων στους μεγάλους χρόνους, με περίπου 25% κάλυψη σε διάρκειας μίας ημέρας. 190
- Πίνακας 5. 4.** Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα των μικροθαλάμων υπό υψηλότερη ροή (11.3 $\mu L/min$) με και χωρίς τη διαμεσολάβηση εμπορικής παγίδας φυσαλίδων σε αντιπροσωπευτικούς χρόνους 2 h, 5h, 7h, και 24 – 26 h. Η παγίδα παρουσιάζεται ευεργετική στους μικρούς χρόνους, καθυστερώντας κατά 5 h την είσοδο

φυσαλίδας, ενώ στους μεγάλους χρόνους φαίνεται να επιδεινώνει κατά περίπου 35% την επιφανειακή κάλυψη με φυσαλίδες..... 191

Πίνακας 5. 5. Εξέλιξη φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθάλαμο τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού χωρίς ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, με ή χωρίς να έχει προγενέστερα απομακρυνθεί ο αέρας από το θρεπτικό υλικό στο φιαλίδιο τροφοδοσίας. Παρουσιάζεται η 2^η και 5^η ώρα και για τα δύο συστήματα, και η 23^η, 25^η – 26^η του συστήματος, με και χωρίς την εξαέρωση, αντίστοιχα. Προκύπτει θετική επίδραση της εξαέρωσης στους μικρούς χρόνους, με τουλάχιστον 3 h καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας, όχι όμως στους μεγάλους χρόνους..... 195

Πίνακας 5. 6. Μικροθάλαμος υπό ροή με ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, με ή χωρίς να έχει προγενέστερα απομακρυνθεί ο αέρας από το θρεπτικό υλικό στο φιαλίδιο τροφοδοσίας, κατά την 24^η και 19^η ώρα, για το σύστημα χωρίς και με εξαέρωση, αντίστοιχα. Συγκρίσιμες καταστάσεις κάλυψης με φυσαλίδες των δύο συστημάτων για 5 h μεταξύ τους χρονική διαφορά, που επιβεβαιώνει τη μη συνεισφορά της εξαέρωσης στους μεγάλους χρόνους..... 197

Πίνακας 5. 7. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα μελέτης δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθάλαμο τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού, απουσία και παρουσία εμπορικής παγίδας, έχοντας προγενέστερα απομακρύνει τον αέρα από το φιαλίδιο τροφοδοσίας. Παρουσιάζονται οι ώρες 3^η και για τα δύο συστήματα, καθώς και 21^η για το σύστημα απουσία παγίδας, και 19^η για το σύστημα παρουσία παγίδας. Στους μικρούς χρόνους εμφανίζεται η συνεισφορά της εξαέρωσης και στα δύο συστήματα, σε αντίθεση με τους μεγάλους χρόνους, όπου αναδεικνύεται αυτούσια η συμπεριφορά τους..... 197

Πίνακας 5. 8. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα μελέτης φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθάλαμο τροφοδοσίας χωρίς ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, με το υγρό τροφοδοσίας να είναι θρεπτικό υλικό ή απιονισμένο νερό. Παρουσιάζεται η 2^η ώρα και για τα δύο υγρά, καθώς και η 23^η για το απιονισμένο σε αντιστοιχία με την 25^η-26^η για το θρεπτικό υλικό. Δε μεταβλήθηκε η ώρα εισόδου φυσαλίδες με το απιονισμένο νερό, ενώ προέκυψε μεγαλύτερη επιφάνεια κάλυψης με φυσαλίδες σε μεγάλους χρόνους..... 199

Πίνακας 5. 9. Αντιπαράβολή συστημάτων μικροθαλάμων τροφοδοσίας συνδεδεμένων με παγίδα φυσαλίδων με το υγρό τροφοδοσίας να είναι θρεπτικό υλικό ή απιονισμένο νερό. Στους μεγάλους χρόνους (24 h) τα δύο συστήματα είναι συγκρίσιμα..... 200

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΜΙΚΡΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ

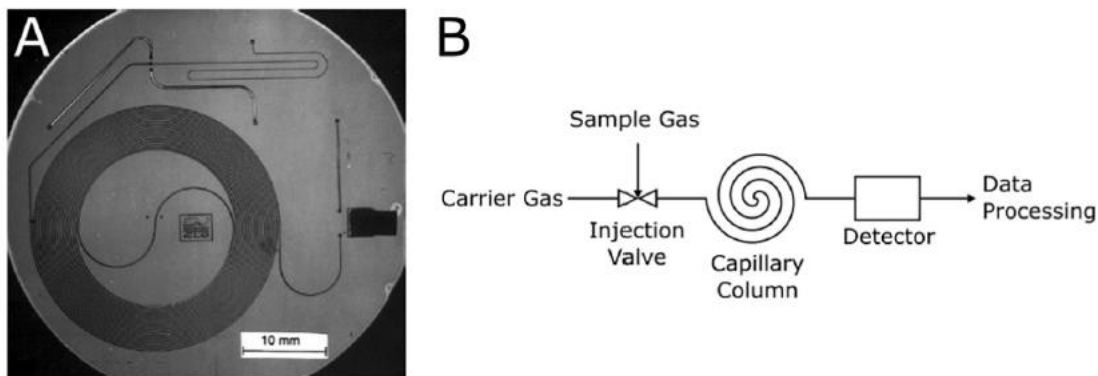
Στο εισαγωγικό αυτό κεφάλαιο πραγματοποιείται σύντομη παρουσίαση των μικρορευστονικών διατάξεων, της προέλευσης της τεχνολογίας κατασκευής τους από τον τομέα της μικροηλεκτρονικής, και των αδιαμφισβήτητων πλεονεκτημάτων τους, ώστε να κατανοηθεί καλύτερα ο κλάδος αυτός των τελευταίων δεκαετιών στον οποίο εντάσσονται οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα. Ακολουθούν τα συνήθη υλικά, και οι τεχνικές κατασκευής των μικροδιατάξεων οργάνων, με προεξέχον υλικό την πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη) (PDMS) και τεχνική σχηματοποίησης του τη λιθογραφία μαλακής ύλης, καθώς και ορισμένα αντιπροσωπευτικά παραδείγματα μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα. Ιδιαίτερη προσοχή τελικά δίνεται στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών, με την πραγματοποίηση ενδεδειγμένης ανασκόπησης των σύγχρονων εξελίξεων, ενώ τέλος, παρουσιάζονται οι στόχοι της διδακτορικής διατριβής.

1.1 Μικρορευστονικές διατάξεις

Η μικρορευστονική περιλαμβάνει την επιστήμη και την τεχνολογία χειρισμού μικροσκοπικών ποσοτήτων ρευστών (10^{-6} - 10^{-15} L), γεωμετρικά περιορισμένων σε δομές με χαρακτηριστικές διαστάσεις ορισμένων δεκάδων έως εκατοντάδων μικρομέτρων [1]. Ασχολείται με την κατασκευή και την πρακτική χρήση μικροδιατάξεων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να μελετηθεί η συμπεριφορά μορίων και ρευστών. Συγκεκριμένα, οι μικροδιατάξεις αυτές αποτελούνται από ένα δίκτυο μικροκαναλιών, μέσα από τα οποία τα ρευστά καθοδηγούνται, διαχειρίζονται, αναμειγνύονται ή διαχωρίζονται, υπηρετώντας κάθε φορά συγκεκριμένες λειτουργίες, όπως για παράδειγμα, ανίχνευση παθογόνων, ηλεκτροφόρηση, ανάλυση DNA κ.λπ.

Παρ'όλο που πολλές από τις εξελίξεις στον κλάδο της μικρορευστονικής σημειώθηκαν στο τέλος του 20^{ου} αιώνα, οι ρίζες της εντοπίζονται σε εκείνες της μικροηλεκτρονικής, έχοντας υιοθετήσει πολλές από τις τεχνικές κατασκευής της [2]. Η πρώτη σημαντική ανακάλυψη, που παράλληλα σηματοδότησε και την απαρχή της μικροηλεκτρονικής, ήταν η εφεύρεση του τρανζίστορ από τα εργαστήρια Bell το 1947 [3]. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των ημιαγωγών, και με τη σημαντική συμβολή της ανακάλυψης της φωτολιθογραφίας στις αρχές της δεκαετίας του 1950, ακολούθησε η εφεύρεση του πρώτου ολοκληρωμένου κυκλώματος σε υπόστρωμα πυριτίου, στα πλαίσια μιας ανερχόμενης ανάγκης σμίκρυνσης των ηλεκτρονικών κυκλωμάτων. Περιελάμβανε πολυάριθμα τρανζίστορ, πυκνωτές και αντιστάσεις, ενωμένα με τις κατάλληλες καλωδιώσεις πάνω σε λεπτό δισκίο πυριτίου, εργασία που κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον Jack Kilby της εταιρίας Texas Instruments το 1964 [2]. Με την πάροδο του χρόνου, οι στρατηγικές της σμίκρυνσης και της ενσωμάτωσης από τον κλάδο της μικροηλεκτρονικής, άρχισαν να επεκτείνονται και σε άλλους τομείς, όπως η μηχανική και η οπτική, με την εμφάνιση των μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (Microelectromechanical systems – MEMS), με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα επιταχυνσιόμετρα, τους αισθητήρες πίεσης, τους μικροκαθρέπτες, και τους οπτικούς διακόπτες [3].

Ήταν το 1979 όταν οι Terry et al. [4] στο πανεπιστήμιο Stanford δημοσίευσαν το σχεδιασμό και την κατασκευή ενός μικροσυστήματος αέριας χρωματογραφίας, που προέκυψε από το συνδυασμό κλασικών τεχνικών μικροηλεκτρονικής, και συγκεκριμένα, φωτολιθογραφίας σε πυρίτιο και ορισμένων σταδίων εγχάραξης, υλοποιώντας έτσι, μια συσκευή μοριακής ανάλυσης. Στο Σχήμα 1.1 απεικονίζεται μακροσκοπική φωτογραφία της διάταξης, καθώς και μια σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της. Πρόκειται για την πρώτη συσκευή που θεωρείται “μικροεργαστήριο σε ψηφίδα” (Lab-on-a-Chip/LoC) ή “σύστημα μικροολικής ανάλυσης” (micro-Total Analysis System/μΤΑΣ), αν και οι όροι αυτοί δεν είχαν εισαχθεί μέχρι τότε. Επίσης, είναι γενικώς αποδεκτό ότι η εργασία αυτή προανήγγειλε την αναγώρευση της μικρορευστονικής σε ξεχωριστό, αυθύπαρκτο τεχνολογικό πεδίο.



Σχήμα 1. 1. Α) Φωτογραφία του μικροσυστήματος αέριας χρωματογραφίας, όπως περιγράφηκε από τους Terry et al. [4]. Η συσκευή αποτελείται από μια σπειροειδή τριχοειδή στήλη μήκους 1.5 m, με την είσοδο να απεικονίζεται πάνω δεξιά και την έξοδο δεξιά για δείγμα αερίου. Η ροή μέσα στη συσκευή ελέγχεται με μια βαλβίδα, που εμφανίζεται πάνω αριστερά, πριν το τριχοειδές πηνίο, ενώ ο ανιχνευτής εντοπίζεται στα δεξιά της συσκευής. Β) Σχηματική αναπαράσταση που απεικονίζει όλα τα εξαρτήματα χειρισμού υγρών που βρίσκονται σε ένα δισκίο πυρίτιου. Ανατύπωση από αναφορά [4].

Η έννοια του μΤΑΣ εισήχθη από τους Manz et al. το 1990 [5], οι οποίοι πρότειναν όλα τα απαιτούμενα στάδια ανάλυσης, εννοώντας τη δειγματοληψία, τη μεταφορά του δείγματος, τυχόν στάδια προετοιμασίας του, συμπεριλαμβανομένων χημικών αντιδράσεων και διαχωρισμών, καθώς και την ανίχνευση, να ενσωματώνονται και να διενεργούνται αυτόματα σε μια διάταξη στη μικροκλίμακα. Με αυτό τον τρόπο, αποδείχθηκε η δυνατότητα συμπερίληψης σε μία μικροδιάταξη όλων των εργασιών σχετιζόμενων με τη χημική ανάλυση, που κανονικά πραγματοποιούνται σε ένα εργαστήριο.

Με την ανάδειξη των μΤΑΣ, το ενδιαφέρον για τη μικρορευστονική και τις πιθανές εφαρμογές της άρχισε να επεκτείνεται και σε άλλους τομείς, εκτός της μοριακής – χημικής ανάλυσης. Ένας τομέας που επωφελήθηκε σημαντικά από τη μικρορευστονική ήταν η μοριακή βιολογία. Συγκεκριμένα, το 1990 η ανάπτυξη της γονιδιωματικής, στα πλαίσια του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project – HGP), απαιτούσε τη χαρτογράφηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος μέσα σε 15 χρόνια, γεγονός που δεν ήταν εφικτό με τις υπάρχουσες συμβατικές μεθόδους. Η μικρορευστονική κατόρθωσε να δώσει λύσεις βελτιώνοντας σημαντικά την ακρίβεια και την ταχύτητα της αλληλούχισης DNA, και ολοκληρώνοντας το HGP εγκαίρως το 2003. Επιπλέον, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -

PCR), η γνωστή μοριακή μέθοδος ανάλυσης, υπέφερε από τα ίδια μειονεκτήματα, τα οποία επιλύθηκαν με την υλοποίηση του πρώτου θερμοκυκλωτή PCR σε ψηφίδα (τσιπ), που αποτέλεσε μια ενιαία μικροδιάταξη, η οποία ενσωματώνει όλα τα στάδια, την προετοιμασία, την ανίχνευση, και τέλος, την ανάλυση του δείγματος [6]. Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι ο όρος Lab-on-a-Chip (LoC), εισήχθηκε μεταγενέστερα για να συμπεριλάβει όλες αυτές τις διεργασίες που δε σχετίζονται μόνο με την ανάλυση, όπως συνέβαινε με τα μTAS [7,8], και αποτελεί υποκατηγορία των MEMS. Παρ'όλα αυτά, μέχρι και σήμερα, οι δύο όροι συχνά συγχέονται.

Όλα αυτά άνοιξαν το δρόμο για τη σταδιακή εφαρμογή της μικρορευστονικής γενικότερα στην κυτταρική βιολογία και στην προώθηση της βιοϊατρικής έρευνας. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα, κατά την προσκόλληση και εξάπλωσή τους σε μία επιφάνεια, έχουν (γραμμικές) διαστάσεις των 10 – 100 μm, εμπιπτουσες στο εύρος διαστάσεων των μικροδιατάξεων [1]. Συγκεκριμένα, σε αυτήν την κλίμακα μεγέθους, οι διαστάσεις των μικροκαναλιών συμπίπτουν με εκείνες του εγγενούς κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος, επιτρέποντας έτσι καλύτερη *in vitro* προσομοίωσή του. Επιπλέον, μια μικρορευστονική διάταξη μπορεί να ενσωματώνει αρκετά πολύπλοκο δίκτυο μικροκαναλιών στην ίδια πλατφόρμα, αποδίδοντας πιο πιστά την *in vivo* ετερογένεια του εξωκυττάρου μικροπεριβάλλοντος. Εκτός όμως των συναφών γεωμετρικών χαρακτηριστικών, σε ένα μικρορευστονικό σύστημα, προσομοιάζονται καλύτερα και οι *in vivo* συνθήκες του κυτταρικού και εξωκυττάρου μικροπεριβάλλοντος. Πιο αναλυτικά, η αναλογία επιφάνειας προς όγκο αυξάνεται, καθιστώντας κυρίαρχα τα επιφανειακά φαινόμενα έναντι εκείνων που επιδρούν στον όγκο. Για παράδειγμα, η σχετική επίδραση της βαρύτητας στη μικροκλίμακα είναι σημαντικά εξασθενημένη συγκριτικά με την επιφανειακή τάση και τις τριχοειδείς δυνάμεις [9]. Έτσι, η επικράτηση του παράγοντα της επιφάνειας, εξασφαλίζει αποτελεσματικότερη μεταφορά αερίων (O₂, CO₂) μέσω διάχυσης, καθώς και καλύτερο έλεγχο της θερμοκρασίας, διαμορφώνοντας ένα ομοιόμορφο θερμοκρασιακό πεδίο [7,10]. Ακόμη, ο αριθμός Reynolds, η αδιάστατη παράμετρος που ορίζεται ως ο λόγος των δυνάμεων αδράνειας προς τις ιξώδεις του ρευστού, είναι χαμηλός στα μικρορευστονικά συστήματα ($10 > Re > 0.001$), καθιερώνοντας στρωτή ροή, απουσία αναταράξεων, και στηριζόμενη κυρίως στη διάχυση για τη μεταφορά μάζας [11]. Το γεγονός αυτό επιτρέπει καλύτερο έλεγχο των συνθηκών καλλιέργειας, τόσο χρονικά όσο και χωρικά, με τη δυνατότητα δημιουργίας επιθυμητών βαθμίδων πίεσης, ταχύτητας, και συγκέντρωσης μορίων [10,12]. Ασφαλώς βέβαια, ανάμεσα στα πλεονεκτήματα των μικρορευστονικών διατάξεων στη βιολογική έρευνα, δε θα μπορούσαν να αμεληθούν η μείωση του όγκου αντιδραστηρίων και του αριθμού κυττάρων, και συνεπαγόμενα του χρόνου επεξεργασίας, καθώς και η αύξηση της ακρίβειας και ευαισθησίας ανάλυσης/εντοπισμού [7,12]. Τέλος, δίνεται η δυνατότητα παράλληλης μελέτης και αυτοματοποίησης, ενώ το χαμηλό κόστος και η φορητότητα ολοκληρώνουν την πληθώρα των δυνατοτήτων τους [1,13].

Δε θα ήταν υπερβολή να ισχυριστούμε ότι η ραγδαία ανάπτυξη των μικρορευστονικών διατάξεων, ιδιαίτερα στο κλάδο των βιολογικών εφαρμογών, αποδίδεται στην εισαγωγή ενός νέου υλικού κατασκευής, της πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (poly(dimethylsiloxane) – PDMS) από την ομάδα του George Whitesides στο Πανεπιστήμιο Harvard το 1998 [1,14,15]. Οι πρώιμες συσκευές μTAS κατασκευάζονταν από πυρίτιο [16] και γυαλί [17], με τη χρήση των καθιερωμένων τεχνικών της μικροηλεκτρονικής (τεχνικές “καθαρού χώρου”), που όμως δυσχέραιναν σημαντικά τη βιολογική έρευνα. Συγκεκριμένα, και τα δύο αποτελούν εύθραστα υλικά, με μη τετριμμένα πρωτόκολλα συγκόλλησης, ενώ επιπλέον, το πυρίτιο είναι αδιαφανές στο ορατό και το υπεριώδες, παρεμποδίζοντας την παρατήρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο [9]. Στον αντίποδα, το PDMS είναι ένα ελαστομερές με βάση το πυρίτιο, αποτελούμενο από επαναλαμβανόμενα μονομερή -OSi(CH₃)₂-, και με μια πληθώρα πλεονεκτημάτων, που βρίσκουν άμεσο αντίκρουσμα σε βιολογικές εφαρμογές [18]. Ονομαστικά, είναι καταρχάς βιοσυμβατό, διαπερατό στο ορατό και το υπέρυθρο (240 – 1 100 nm), επιτρέποντας την κυτταρική παρατήρηση, καθώς επίσης και σε αέρια, όπως το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, απαραίτητα για την καλλιέργεια και συντήρηση κυττάρων, ενώ παράλληλα, είναι μη διαπερατό σε

υγρά, εξασφαλίζοντας τη στεγανοποίηση των διατάξεων [1,19]. Επιπλέον, μπορεί εύκολα να συγκολληθεί με τον εαυτό του και το γυαλί με μία απλή ενεργοποίηση με πλάσμα, καθώς και να τροποποιηθούν οι επιφανειακές του ιδιότητες με διάφορες τεχνικές (κατεργασία πλάσματος, υπεριώδης ακτινοβολία, εφαρμογή επιστρώσεων, κ.λ.π.) ώστε να καταστεί υδρόφιλο [20,21], ενώ η ελαστικότητά του επιτρέπει την εύκολη σχηματοποίησή του είτε προς τη δημιουργία μικροδομών, που επηρεάζουν με επιθυμητό τρόπο τη μηχανοβιολογία των κυττάρων [22], είτε προς την κατασκευή βαλβίδων και ενεργοποιητών [23]. Τέλος, διαθέτει χαμηλό κόστος και είναι εύκολα παρασκευάσιμο και διαχειρίσιμο από το μη ειδικό [9,18].

Σήμερα, οι μικρορρευστονικές διατάξεις αποτελούν απαραίτητο εργαλείο στη βιοτεχνολογία, τη βιοϊατρική έρευνα και την υγειονομική περίθαλψη. Υπάρχουν πολλές επιτυχείς εφαρμογές τους στη διαγνωστική στο σημείο φροντίδας (point-of-care diagnostics), προσίτες και εύκολες στη χρήση ως κοινά διαγνωστικά τεστ. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε το τεστ εγκυμοσύνης, τις ταινίες για την παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, και τα τεστ προς έλεγχο σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, όπως ο HIV [24,25]. Αποτελούν επίσης αναπόσπαστο κομμάτι της γονιδιωματικής αλληλουχίας επόμενης γενιάς [26], ενώ χρησιμοποιούνται στη σύνθεση λιπιδικών νανοσωματιδίων για χορήγηση φαρμάκων [27] και στην παραγωγή μικροσωματιδίων σε καλλυντικά προϊόντα [26].

1.2 Σύγχρονες προκλήσεις στον τομέα της υγείας

Η σύγχρονη βιοϊατρική έρευνα για την ανάπτυξη βιολογικών διεργασιών, τη διερεύνηση θεραπευτικών στρατηγιών και την ανακάλυψη ή τον έλεγχο φαρμάκων στηρίζεται σε δύο βασικά εργαλεία, τις *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες και τα πειράματα σε ζώα [28,29]. Παρόλο που τα εργαλεία αυτά είναι βοηθητικά ως πηγές πληροφοριών, διαθέτουν σημαντικά μειονεκτήματα.

Οι συμβατικές 2D και 3D *in vitro* στατικές καλλιέργειες είναι χρήσιμες για τη μελέτη σε μοριακό επίπεδο φυσιολογικών και παθολογικών αποκρίσεων, επιτρέποντας για παράδειγμα τη διερεύνηση διαφορετικών μεθόδων σηματοδότησης για τον εντοπισμό πρωτεϊνών, γονιδίων, και υποδοχέων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις [28]. Επιπλέον, συνεχίζουν να προτιμώνται μέχρι σήμερα λόγω της απλότητας, του χαμηλού κόστους τους, και των καθιερωμένων πρωτοκόλλων τους ήδη από τις αρχές του 1900 [30]. Αποτυγχάνουν όμως να αποδώσουν κρίσιμες πτυχές της ανθρώπινης φυσιολογίας, καθώς δεν μπορούν να προσομοιώσουν την πολυπλοκότητα ενός δυναμικού 3D μικροπεριβάλλοντος, και την εξάρτησή του από πολλαπλούς γειτονικούς ιστούς με τους οποίους αλληλεπιδρά [28,31,32].

Συγκεκριμένα, οι 2D καλλιέργειες βασίζονται στην προσκόλληση των κυττάρων, ενός ή και περισσότερων ειδών, σε μία επίπεδη επιφάνεια, που είναι συνήθως γυαλί ή πολυστυρένιο (τρυβλία petri), όπου αναπτύσσονται σε μονοστρώματα [33,34]. Όμως, η επίπεδη επιφάνεια δεν αποτελεί ακριβή αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο τα κύτταρα αναπτύσσονται και διατηρούν τις λειτουργίες τους σε τρεις διαστάσεις, ή του πώς επηρεάζονται από ασθένειες, γεγονός που με τη σειρά του περιορίζει σημαντικά την ικανότητά τους να αναπαραστήσουν τις *in vivo* κυτταρικές αποκρίσεις [34].

Η μετάβαση σε 3D καλλιέργειες δίνει τη δυνατότητα καλύτερης μίμησης των φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων, αλλά και των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα τους (Extracellular Matrix – ECM), βελτιώνοντας την προσομοίωση της *in vivo* φυσιολογίας και λειτουργίας του ιστού [35]. Αποτελέσματα μελετών αποδεικνύουν ότι επεκτείνοντας την εξωκυττάρια μήτρα σε 3D, ευνοούνται σημαντικά κυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση [36,37]. Διάφορες τεχνικές 3D καλλιέργειας έχουν δοκιμαστεί, μεταξύ των οποίων η καλλιέργεια των κυττάρων σε σφαιροειδή διαμόρφωση (spheroid culture), η καλλιέργεια οργανοειδών, και η 3D “εκτύπωση” ιστών και οργάνων [18]. Κατά την καλλιέργεια σε σφαιροειδή διαμόρφωση, σφαιρικές δομές αποτελούμενες από συσσωματώματα κυττάρων, δεν

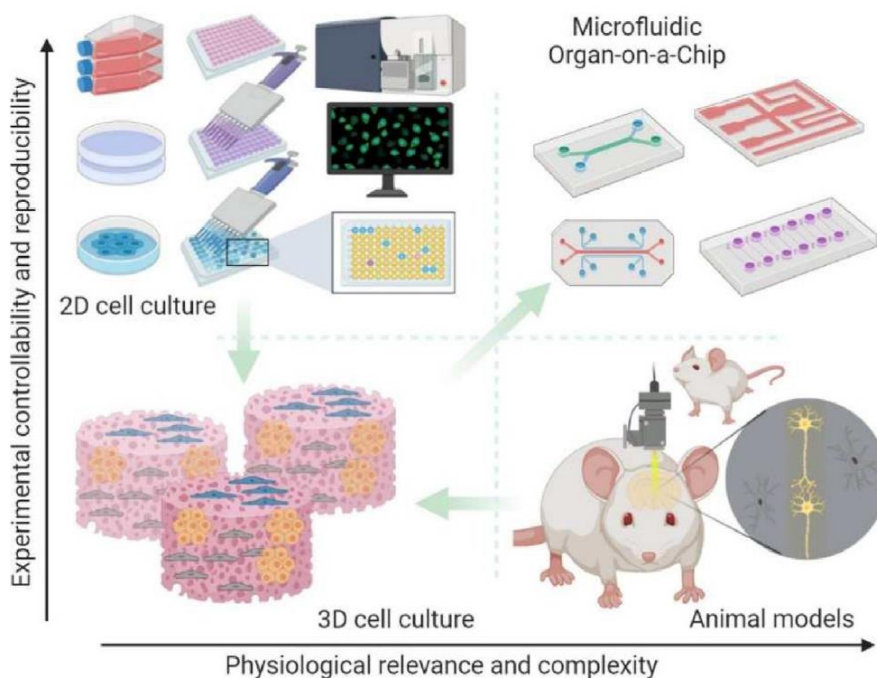
προσκολλώνται σε ένα υπόστρωμα, αλλά μεταξύ τους [38]. Αποτελεί μια από τις πρώτες 3D μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν, που όμως εμφανίζει μειονεκτήματα σχετιζόμενα με το μέγεθος των σφαιροειδών [39]. Τα οργανοειδή, αυτο-οργανωμένες 3D κυτταρικές δομές που αντιπροσωπεύουν ένα όργανο, με τις *in vivo* λειτουργίες και τη φυσιολογία του [40], αν και παράγουν μεγαλύτερης πολυπλοκότητας ιστούς και ενδείκνυνται για τη μελέτη της λειτουργίας ιστών, δεν είναι δυνατή η εφαρμογή μηχανοβιολογικών ερεθισμάτων, όπως η ροή και οι διατμητικές δυνάμεις [41]. Επιπλέον, λόγω της παρουσίας στερεών επιφανειών, τα κύτταρα τείνουν να προσκολλώνται, το οποίο θέτει σε κίνδυνο τον αξιόπιστο σχηματισμό και την καλλιέργεια σφαιροειδών [42]. Η 3D “εκτύπωση” ιστών και οργάνων, δηλαδή η ελεγχόμενη εναπόθεση κυττάρων και υλικών προς σχηματισμό 3D ιστών/οργάνων [43], με την τοποθέτηση 3D ικριωμάτων στη μικροκλίμακα βελτιώνει περαιτέρω την απόδοση του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος, αλλά υπάρχουν περιορισμοί λόγω αδυναμίας ακριβούς κυτταρικής τοποθέτησης και ανάπτυξης κυττάρων σε υψηλή πυκνότητα [44]. Οι 3D τεχνικές αυτές στο σύνολό τους αποτυγχάνουν να δημιουργήσουν ένα δυναμικά μεταβαλλόμενο μικροπεριβάλλον, περιορίζοντας έτσι την *in vivo* συνάφειά του στον εκάστοτε ιστό ή όργανο.

Ως προς τα *in vivo* πειράματα σε ζώα, προσφέρουν την πολυπλοκότητα ενός ζωντανού οργανισμού και μπορούν να παράγουν αποκρίσεις από πολλαπλά όργανα, γεγονός αδύνατο στις συμβατικές *in vitro* καλλιέργειες. Το γεγονός αυτό βέβαια καθιστά δύσκολη και κοστοβόρα την απομόνωση των ιστών ή κυττάρων ενδιαφέροντος, που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη φυσιολογική ή παθολογική απόκριση [28]. Εκτός αυτών, τα μοντέλα ζώων υποκλύπτουν σε σημαντικές γενετικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τον ανθρώπινο οργανισμό [10,45]. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε ότι το 2004 ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) υπολόγισε ότι το 92% των φαρμάκων που περνούν από δοκιμές σε ζώα αποτυγχάνουν να κυκλοφορήσουν στην αγορά λόγω προβλημάτων αποτελεσματικότητας και ασφάλειας που δεν είχαν προβλεφθεί από δοκιμές σε ζώα [46]. Πιο πρόσφατες αναλύσεις υποδεικνύουν ότι, παρά τις προσπάθειες για τη βελτίωση της προβλεψιμότητας των δοκιμών σε ζώα, το ποσοστό αποτυχίας έχει πράγματι αυξηθεί και είναι τώρα πιο κοντά στο 96% [46]. Το γονιδίωμα, η ανατομία και η φυσιολογία των ζώων διαφέρουν από εκείνες του ανθρώπου, και επομένως οι αποκρίσεις των ζώων σε φαρμακευτικές αγωγές διαφέρουν σημαντικά από εκείνες του ανθρώπου, οδηγώντας έτσι, σε ψευδή δεδομένα δοκιμών φαρμάκων [29]. Δε θα μπορούσαν βέβαια να αγνοηθούν οι ανερχόμενες ηθικές ανησυχίες που σχετίζονται με την καλή διαβίωση και μεταχείριση των ζώων. Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση *in vitro* μοντέλων πολυπλοκότητας που προσεγγίζει εκείνη του ανθρώπινου οργανισμού, ώστε να ξεπεραστούν οι περιορισμοί των συμβατικών *in vitro* και *in vivo* μοντέλων.

1.3 Μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα ως η επιτομή βιομημητικών συστημάτων

Σε αυτό το πλαίσιο, η μικρορρευστονική έρχεται να αντιμετωπίσει τα προαναφερόμενα μειονεκτήματα των συμβατικών *in vitro* καλλιέργειών και των πειραμάτων σε ζώα, με την ανάδειξη των μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα (organ-on-a-chip (OoC) devices ή organs-on-chips (OoCs)). Οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα αποτελούν 3D μικρορρευστονικές διατάξεις καλλιέργειας, αποτελούμενες από ανθρώπινα κύτταρα, που προσομοιώνουν βασικές λειτουργικές μονάδες ενός οργάνου. Συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα των τομέων της μικρομηχανικής και της κυτταρικής βιολογίας, ικανοποιούν τρεις βασικές πτυχές των οργάνων: τη 3D μικροαρχιτεκτονική, χαρακτηριζόμενη από κατάλληλη χωρική κατανομή πολλαπλών τύπων ιστών, τη σύναψη διεπαφών ιστού με ιστό, και τέλος, την πολυπλοκότητα ενός μηχανικά και βιοχημικά μεταβαλλόμενου μικροπεριβάλλοντος του εκάστοτε οργάνου [9]. Ειδικότερα, ως μικρορρευστονικό σύστημα, λόγω δυνατότητας καλύτερου χωροχρονικού ελέγχου και στρωτής ροής πεδίου, μπορεί να αναπαράγει τις απαραίτητες βιοχημικές βαθμίδες μεταβολιτών, κυτταροκινών και γενικότερα, μορίων, τις κατάλληλες ροές και βαθμίδες

ταχυτήτων, καθώς και μηχανικές τάσεις (διατμητικές δυνάμεις και πιέσεις) [47]. Με αυτό τον τρόπο, αναπαρίσταται με μεγαλύτερη πιστότητα η δυναμικότητα του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος, οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου με την εξωκυττάρια μήτρα του, καθώς και με γειτονικά κύτταρα, φθάνοντας έτσι σε επίπεδο ιστού, ενώ χάρη στη δυνατότητα καλλιέργειας πολλαπλών ειδών κυττάρων, αποδίδονται οι αλληλεπιδράσεις ιστού με ιστό, οδηγούμενοι έτσι, στην καλύτερη προσομοίωση της φυσιολογίας και λειτουργίας μικροσκοπικών μονάδων οργάνων [48,49]. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα υπερτερούν τόσο των συμβατικών στατικών *in vitro* καλλιέργειών, όσο και των πειραμάτων σε ζώα, αποτελώντας τα περισσότερο επιτυχημένα βιομιμητικά συστήματα. Στο Σχήμα 1.2 συνοψίζεται διαγραμματικά η αύξηση της πολυπλοκότητας του μικροπεριβάλλοντος του οργάνου, και συνάμα, της ακρίβειας ελέγχου και της συστημικής συνάφειας, καθώς μετακινούμαστε από τις στατικές *in vitro* καλλιέργειες και τα μοντέλα ζώων, αντίστοιχα, προς τα μικροφυσιολογικά συστήματα των μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα.



Σχήμα 1. 2. Διαφορετικά μοντέλα στη σύγχρονη βιοϊατρική και έρευνα, απεικονιζόμενα ως προς τη δυνατότητα ελέγχου και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, έναντι της συνάφειας και της πολυπλοκότητας. Οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (organs-on-chips/OoCs) συνδυάζουν τη μεγαλύτερη αξιοπιστία *in vitro* απόδοσης του μικροπεριβάλλοντος του οργάνου, με τη συνάφεια στον ανθρώπινο οργανισμό, σε σχέση με τις υπάρχουσες συμβατικές *in vitro* 2D και 3D καλλιέργειες και τα πειράματα σε ζώα.

Εφαρμογές των OoCs

Λόγω του καταφανούς πλεονεκτημάτος τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως *in vitro* μοντέλα για τη μελέτη και θεραπεία ασθενειών, οδηγώντας στην ανακάλυψη καινοτόμων θεραπευτικών οδών [50]. Χρησιμοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα, είναι δυνατόν να αποδοθεί η σύνθετη παθοφυσιολογία των ασθενειών, να εντοπιστούν οι αιτίες πρόκλησής της και οι μηχανισμοί δράσης της, και να προταθούν πιθανές μέθοδοι αντιμετώπισης. Ως

παράδειγμα κρίσιμης εφαρμογής των ΟοCs αναφέρουμε τις παιδιατρικές ασθένειες και τις σπάνιες ασθένειες, οι μελέτες των οποίων είναι περιορισμένες λόγω της έλλειψης καθιερωμένων *in vitro* μελετών, των μικρών πληθυσμών ασθενών και τέλος, της περιορισμένης διαθεσιμότητας ασθενών [51]. Τα ΟοCs θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων για ανθρώπινες παιδιατρικές και σπάνιες νόσους.

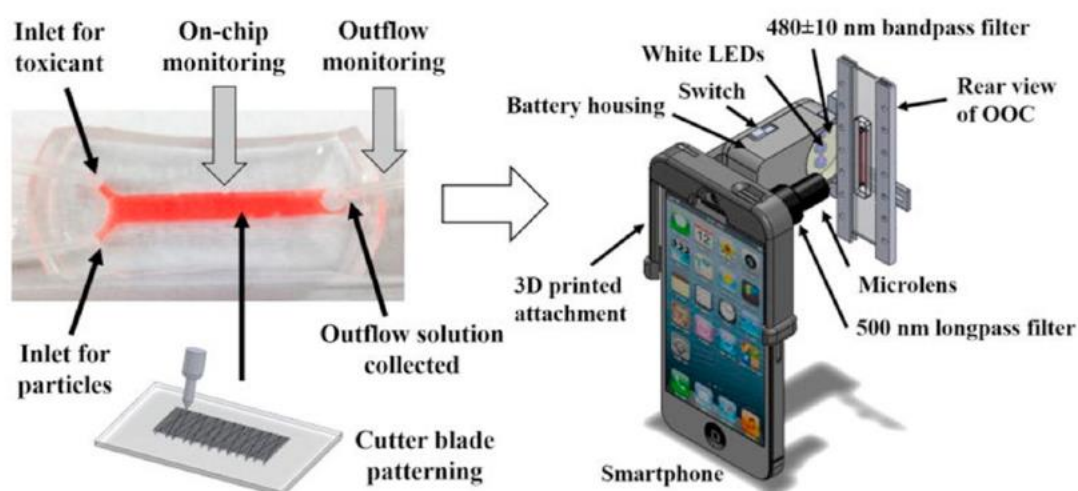
Επιπρόσθετα, τα ΟοCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανακάλυψη, χορήγηση και μεταφορά φαρμάκων. Συγκεκριμένα, ως προς την ανακάλυψη φαρμάκων, μπορούν να ενσωματωθούν συνεργιστικά με ήδη υπάρχοντα εργαλεία μοντελοποίησης και ανάλυσης, ώστε οι μελέτες από το μοριακό επίπεδο, να επεκταθούν σε επίπεδο οργάνου, όπως για παράδειγμα για την επικύρωση θεραπευτικών στόχων μετά από γονιδιωματική και/ή πρωτεϊνική ανάλυση. Άλλη περίπτωση συνέργειας, θα μπορούσε να επιτευχθεί στα τελευταία στάδια ελέγχου του φαρμάκου, για παράδειγμα στην ανάλυση δυσμενών αποτελεσμάτων ώστε να ανιχνευθούν ενδεχόμενες τοξικότητες, που δεν καλύπτονται από τις υπάρχουσες συμβατικές μεθόδους [52]. Εκτός αυτών, τα ΟοCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων θεραπευτικών μεθόδων, όπως ιατρικά αντίμετρα κατά ραδιολογικών, χημικών ή βιολογικών παραγόντων για τους οποίους δεν είναι ηθική η διεξαγωγή κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους [53].

Συνεχίζοντας, ως προς τη χορήγηση και μεταφορά φαρμάκων, τα ΟοCs εξυπηρετούν όταν αντικείμενα μελέτης είναι πολύπλοκοι 3D ιστοί, όπως είναι οι συμπαγείς όγκοι, περιπτώσεις δηλαδή όπου δεν προσφέρεται δυνατότητα μελέτης από τις συμβατικές μεθόδους. Η συμβολή αυτή είναι σημαντική για τις φαρμακοδυναμικές αναλύσεις, καθώς προσδιορίζονται (ή επικυρώνονται) οι δόσεις του φαρμάκου, καθώς και τα σχήματα χορήγησής του, ώστε να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα [51]. Ακόμη, μπορούν να προσδιοριστούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες σε διάφορα όργανα, με τη χρήση των αντίστοιχων μικροδιατάξεων οργάνων, με ακρίβεια που δεν παρέχεται με τα *in vitro* μοντέλα [50,54].

Ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι τα ΟοCs ανοίγουν το δρόμο προς την εξατομικευμένη ιατρική (personalized medicine) και την ενίσχυση της διαγνωστικής στο σημείο φροντίδας (point-of-care/POC diagnostics). Χρησιμοποιώντας δείγματα που προέρχονται από ασθενείς (κύτταρα, βιοψίες ιστών κ.λπ.), μπορούν να αναπτυχθούν μεμονωμένες, προσωποποιημένες θεραπευτικές οδοί προσαρμοσμένες στον εκάστοτε ασθενή. Με την εξατομικευμένη ιατρική γίνεται εφικτή η ακριβέστερη και περισσότερο γρήγορη θεραπευτική αντιμετώπιση. Για παράδειγμα, τα ΟοCs μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα του σώματος, χρησιμοποιώντας τα μοναδικά κύτταρα του ασθενή, και συμβάλλοντας έτσι, στην προώθηση εξατομικευμένης θεραπείας για ασθένειες, όπου δεν υπάρχει χρόνος για δοκιμές στον ασθενή, όπως είναι ο καρκίνος. Πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής, αποτελεί η πρόοδος της τεχνολογίας βλαστοκυττάρων, που θα μπορούσε να εφαρμοστεί στα ΟοCs, με την ενσωμάτωση των βλαστοκυττάρων συγκεκριμένων ασθενών προς διαμόρφωση προσωποποιημένων θεραπειών [51].

Τέλος, σημαντικό προβάδισμα των ΟοCs σε σχέση με τις *in vitro* καλλιέργειες, αλλά και τα πειράματα σε ζώα, αποτελεί η δυνατότητα ενσωμάτωσης σε αυτά διαφορετικών αισθητήρων, συστοιχιών μικροηλεκτροδίων (microelectrode arrays/MEAs), και η απευθείας σύνδεσή τους διαφορετικές τεχνικές μικροσκοπίας (π.χ. οπτικά, συνεστιακά μικροσκόπια), καθώς με αυτό το τρόπο επιτρέπεται η *in situ* συλλογή δεδομένων και η παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο [48,49]. Οι αισθητήρες ανιχνεύουν και μετρούν οπτικά, χημικά, ηλεκτρικά ή/και μηχανικά σήματα από τα κύτταρα και τους ιστούς για να αναλύσουν τη δομή και τη λειτουργία τους, ενώ τα μικροσκόπια δίνουν τη δυνατότητα ποιοτικού και ποσοτικού χαρακτηρισμού τους [42,50,55]. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε τη μικροδιάταξη νεφρού σε ψηφίδα (kidney-on-a-chip) από τους Cho et al. [56], οι οποίοι κατασκεύασαν μία πλατφόρμα για την *in situ* διπλής λειτουργίας παρακολούθηση της επαγόμενης από φάρμακα νεφροτοξικότητας, ενσωματώνοντας τεχνικές ανοσοσύλληψης/ανοσοσυγκόλλησης φθορισμένων νανοσωματιδίων (Σχήμα 1.3). Μικροσκόπιο φθορισμού προσαρμοσμένο σε smartphone κατασκευάστηκε ως φορητή συσκευή παρακολούθησης και ανίχνευσης, και συνδέθηκε με το μικροδιάταξη για

την *in situ*, σύγχρονη παρατήρηση. Συνεπώς, η δυνατότητα αυτοματοποίησης των ΟοCs ενισχύει το ρόλο τους ως διαγνωστικές πλατφόρμες, και ευνοεί τη χρήση τους από φαρμακευτικές εταιρίες και από κλινικούς γιατρούς για εφαρμογές POC [48]. Παράλληλα, μειώνοντας την παρεμβολή του χρήστη, διευκολύνει τη χρήση τους από το μη ειδικό.



Σχήμα 1. 3. Διπλής λειτουργίας παρακολούθησης μικροδιάταξη νεφρού σε ψηφίδα (kidney-on-a-chip) για την *in situ* ανίχνευση νεφροτοξικότητας. Τόσο η παρουσία του ενζύμου γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση (Gamma-Glutamyl-Transpeptidase/GGT) στη μεμβράνη των κυττάρων 786-O του εγγύς εσπειραμένου σωληνάριου του νεφρού, όσο και η απελευθέρωσή του στην εκροή του ΟοC, αξιολογούνται με την ανίχνευση φθορισμού των δεσμευμένων και των ανοσοσυγκολλημένων συζευγμένων με αντίσωμα anti-GGT νανοσωματιδίων, αντίσωμα. Στην περίπτωση απουσίας νεφροτοξικότητας, τα αντισώματα δεσμεύονται από τα 786-O, δίνοντας μικρό σήμα φθορισμού, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, απελευθερώνονται και συγκολλώνται δίνοντας ενισχυμένο σήμα. Αυτές οι δύο λειτουργίες, ανοσοσύλληψης και ανοσοσυγκόλλησης νανοσωματιδίων, παρακολουθούνται και ανιχνεύονται *in situ* μέσω μικροσκοπίου φθορισμού, προσαρμοσμένου σε smartphone. Αναπροσαρμογή από την αναφορά [56].

Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερόμενες ιδιότητες και εφαρμογές των ΟοCs, συμπεραίνεται ότι δύνανται να χρησιμεύουν ως επιτυχημένα προκλινικά μοντέλα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς το παρόν συμπληρωματικά με τα πειράματα σε ζώα, επικυρώνοντας ή καταρρίπτοντας τα αποτελέσματά τους. Αυτό συνεπάγεται σημαντική μείωση των δοκιμών σε ζώα, με την ελπίδα εξάλειψής τους μελλοντικά. Επιπλέον, μπορούν να οδηγήσουν και σε μείωση των προκλινικών δοκιμών, ενώ μάλιστα ενδέχεται να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό κλινικών πρωτοκόλλων [51].

1.3.1 Υλικά κατασκευής ΟοCs

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν συγκεκριμένα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των ΟοCs, και συγκεκριμένα, η πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη) (PDMS), το γυαλί, και ορισμένα θερμοπλαστικά, καθώς και υλικά που χρησιμοποιούνται στο εσωτερικό των ΟοCs ή σε κάποιο ενδιάμεσο στάδιο κατασκευής τους, όπως οι υδρογέλες, και το πυρίτιο.

Το PDMS είναι το πιο συνηθισμένο υλικό για την κατασκευή ΟοCs, όπως και γενικότερα των μικρορευστονικών διατάξεων [57]. Όπως αναλύθηκε και νωρίτερα (παράγραφος 1.1), το PDMS διαθέτει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων, αναφέροντας επιγραμματικά την ευελιξία κατασκευής, την οπτική διαφάνεια, τη διαπερατότητα στο οξυγόνο, και ασφαλώς, τη βιοσυμβατότητα. Παρ' όλα αυτά, χαρακτηρίζεται από ορισμένα μειονεκτήματα, που περιορίζουν κάποιες εφαρμογές του. Το πιο σημαντικό από αυτά είναι ενδεχομένως ότι είναι υδρόφοβο (γωνία επαφής $\approx 112^\circ$ [58]) με άμεση επίδραση ιδιαίτερα σε εφαρμογές σχετιζόμενες με καλλιέργειες κυττάρων. Επιπλέον, απορροφά υδρόφοβα μόρια, γεγονός που επηρεάζει πειράματα που αφορούν σε μελέτη τοξικότητας, αποτελεσματικότητας, καθώς και προβλέψεις φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής [59]. Επιπλέον, είναι μερικώς φθορίζον στα μήκη κύματος 403 – 633 nm (με δείκτη διάθλασης 1.410 έως 1.428), και δεν ενδείκνυται για πειράματα με οργανικούς διαλύτες [60,61]. Υπάρχει όμως η δυνατότητα επιφανειακής τροποποίησης του PDMS, χρησιμοποιώντας κατεργασία πλάσματος [58], έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία [62], και επικάλυψη με επιστρώσεις που μειώνουν την επιφανειακή του ενέργεια. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιου είδους επιστρώσεων αποτελούν κάποια μέταλλα/οξείδια μετάλλων, όπως το οξείδιο του τιτανίου και ο χρυσός [63], η επιστροφή sol-gel [64], αλλά και τεχνικές επιφανειακής σιλανοποίησης για τη δημιουργία δεσμών σιλοξάνης (Si-O-Si), π.χ. με την αναπόθεση αμιμών, καρβοξυλίων ή θειόλων [21].

Συνεχίζοντας, άλλο υλικό που χρησιμοποιείται στα ΟοCs είναι το γυαλί, ένα από τα παλαιότερα υλικά στον τομέα της μικρορευστονικής. Αποτελεί ένα μείγμα διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2), που είναι και το βασικό του συστατικό, με άλλα οξείδια, όπως CaO και MgO [65]. Τα πλεονεκτήματα στη χρήση του στην κατασκευή των ΟοCs είναι η διαφάνεια, η αντοχή στη μηχανική καταπόνηση, η υδροφιλικότητα, και βέβαια, η βιοσυμβατότητα, ενώ επιπλέον, παρουσιάζει χαμηλότερη απορρόφηση μορίων και φαρμάκων σε σύγκριση με το PDMS [66]. Όμως, ένα σημαντικό του μειονέκτημα αποτελεί το ότι δεν είναι διαπερατό σε αέρια (π.χ. O_2 , CO_2), γεγονός που δεν το καθιστά ιδανικό υλικό σε βιολογικές εφαρμογές, ενώ επειδή δεν επιτρέπει την εκτόνωση παγιδευμένων φυσαλίδων στα μικροκανάλια, απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευσή τους σε αυτά [67]. Ακόμη, παρ' όλο που είναι συμβατό με πολλές καθιερωμένες τεχνικές μικρομηχανικής, όπως είναι η φωτολιθογραφία, η υγρή εγχάραξη και η εγχάραξη με laser, απαιτείται υψηλό κόστος κατασκευής, ενώ επιπρόσθετα, οι διαθέσιμες μέθοδοι συγκόλλησής του, όπως η ανοδική ή θερμική συγκόλληση, είναι αρκετά απαιτητικές [68,69]. Ωστόσο, ορισμένες εφαρμογές όπου συνίσταται η χρήση του γυαλιού είναι οι προβλέψεις φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής για το έλεγχο φαρμάκων και την αλληλεπίδρασή τους με κύτταρα, καθώς και εφαρμογές όπου χρειάζεται η ενσωμάτωση των ηλεκτροδίων, λόγω της υψηλής ακαμψίας του [70,71].

Πρόσφατα, τα θερμοπλαστικά προτείνονται συχνά για την κατασκευή μικρορευστωνικών συσκευών λόγω των περιορισμών, τόσο του PDMS, όσο και του γυαλιού [9]. Υπάρχουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες που κάνουν τα θερμοπλαστικά πολυμερή ελκυστικά για την κατασκευή των ΟοCs, συμπεριλαμβανομένων του χαμηλού κόστους, της μικρής πυκνότητας, της βιοσυμβατότητας, και της ευκολίας κατασκευής [72]. Επιπρόσθετα, επειδή έχουν γραμμικά και διακλαδισμένα μόρια, είναι πιο ανθεκτικά στις διακυμάνσεις της πίεσης και της θερμοκρασίας, γεγονός που τα καθιστά χημικά σταθερά και κατάλληλα για βιοϊατρικές και βιοχημικά μελέτες [73]. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί μικρορευστονικές συσκευές που βασίζονται σε πολυμερή, όπως ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (poly(methyl methacrylate)/PMMA) ή ορισμένα συμπολυμερή, όπως το συμπολυμερές κυκλικής ολεφίνης (cyclic olefin copolymer/COC), τα οποία συνοδεύτηκαν με την εισαγωγή νέων τεχνικών, όπως η χύτευση, η χύτευση με έγχυση και η κοπή με laser [74]. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στη χρήση των θερμοπλαστικών πολυμερών. Συγκεκριμένα, δεν είναι όλα τα πολυμερή διαφανή, αναφέροντας χαρακτηριστικά την κετόνη πολυαιθεριού αιθέρα (polyether ether ketone/PEEK) και το πολυπροπυλένιο (polypropylene/PP), γεγονός που καθιστά αδύνατη την παρατήρηση ή απεικόνιση σε

μικροσκόπιο [75,76]. Ακόμη, μερικά εμφανίζουν ισχυρό αυτοφθορισμό και δεν είναι κατάλληλα για σκιόπους ανίχνευσης [77], ενώ άλλα έχουν κακή διαπερατότητα στα αέρια, με αρνητικές επιπτώσεις στη μακροπρόθεσμη κυτταρική καλλιέργεια, που απαιτείται στα OoCs [78].

Ως προς τα άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται όχι ως βασικά υλικά κατασκευής των OoCs, αλλά αποτελούν τμήμα τους ή ενσωματώνονται στο εσωτερικό τους, αναφέρουμε αρχικά τις υδρογέλες, ένα σχετικά νέο υλικό στον τομέα των OoCs. Χρησιμοποιούνται κυρίως ικρίωματα σε 3D κυτταρικές καλλιέργειες, με σκοπό να αποδώσουν καλύτερα την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) [79], καθώς εμφανίζουν παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες, ενώ ενδείκνυται για μακροχρόνιες βιολογικές μελέτες, καθώς προστατεύουν γιατί προστατεύουν και συντηρούν τη λειτουργία ορισμένων κυττάρων. Χαρακτηριστικά, οι Sung et al. το 2011 χρησιμοποίησαν τα πρώτα 3D ικρίωματα υδρογέλης για να μελετήσουν το γαστρεντερικό σωλήνα [80]. Πρόκειται για συμπαγείς υδρόφιλες πολυμερικές αλυσίδες, κατασκευασμένες σαν δίκτυο και συνδεδεμένες με μεγάλο όγκο νερού για να σχηματίσουν γέλη [81]. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στη μηχανική των ιστών, και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε άλλους τομείς, όπως η βιομηχανία τροφίμων και οι βιοαισθητήρες φαρμάκων [79,82]. Αυτά τα 3D πολυμερή είναι σε θέση να απορροφούν υψηλά επίπεδα νερού, παραμένοντας παράλληλα αδιάλυτα. Διακρίνονται βασικά δύο είδη υδρογέλης, οι φυσικές, όπως για παράδειγμα η ζελατίνη, το μετάξι και το κολλαγόνο, και οι συνθετικές, αναφέροντας χαρακτηριστικά, την πολυβινυλική αλκοόλη (polyvinyl alcohol/PVA), και την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (polyethylene glycol/PEG) [83]. Οι φυσικές υδρογέλες εμφανίζουν πλεονεκτήματα, όπως η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα και η χαμηλή κυτταροτοξικότητα, αλλά δε διαθέτουν ελεγχόμενες μηχανικές ιδιότητες, γι' αυτό συχνά συνδυάζονται με συνθετικές υδρογέλες [84]. Είναι συμβατές με διάφορες τεχνικές μικρομηχανικής, όπως η φωτολιθογραφία, η 3D εκτύπωση και η χύτευση [85]. Στα μειονεκτήματά τους αναφέρουμε κυρίως τη χαμηλή ακαμψία τους, που περιορίζει τη διαδικασία κατασκευής των OoCs, καθώς και τη μακροχρόνια χρήση τους για ερευνητικούς σκοπούς [86], με αποτέλεσμα οι υδρογέλες να μην επιλέγονται συχνά προς ενσωμάτωση στα OoCs. Αρκετοί όμως χρησιμοποιούν υδρογέλες σε 3D καλλιέργειες, όπως για παράδειγμα, οι Sung et al. που χρησιμοποίησαν υδρογέλη κολλαγόνου για την *in vitro* 3D μοντελοποίηση των εντερικών λαχνών στο πραγματικό τους μέγεθος [80], οι Tsang et al. που προσομοίωσαν ηπατικούς ιστούς με χρήση υδρογέλης PEG [87], ενώ ενδιαφέρουσα εφαρμογή τους αποτελεί η χρήση τους στη μοντελοποίηση του δέρματος, λόγω της παρόμοιας μηχανικής τους συμπεριφοράς [88].

Άλλο σημαντικό υλικό των OoCs, που αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της διαμόρφωσης ενός μικροσκοπικού οργάνου, είναι οι πορώδεις μεμβράνες. Καθώς τα OoCs αναπαριστούν τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών διαμερισμάτων του ιστού ή μεταξύ διαφορετικών ιστών, απαιτείται ένα όριο για τον διαχωρισμό τους, το οποίο συνηθέστερα επιτυγχάνεται με τη χρήση πορώδους μεμβράνης. Αυτή η συνθετική, διαπερατή μεμβράνη, διαχωρίζει τα διαφορετικά διαμερίσματα, επιτρέποντας παράλληλα τη μεταξύ τους επικοινωνία και τη μεταφορά μορίων και υλικών μέσω των πόρων της [89]. Βασικές ιδιότητες που θα πρέπει να διαθέτει μια τέτοια μεμβράνη για την ενσωμάτωσή της σε OoCs, είναι η ελαστικότητα (ευελιξία), η διαφάνεια, η βιοσυμβατότητα και συγκεκριμένα, η κυτταροσυμβατότητα [90]. Το PDMS, το πολυανθρακικό (poly(carbonate)/PC) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (poly(ethylene terephthalate)/PET) είναι τα πιο κοινά υλικά που ικανοποιούν τα συγκεκριμένα προαπαιτούμενα [91].

Μια άλλη ομάδα υλικών που ενσωματώνονται στα OoCs είναι τα μέταλλα, που χρειάζονται στις περιπτώσεις που στη σχεδίαση των OoCs συμπεριλαμβάνονται αισθητήρες. Τα συστήματα αυτά αισθητήρων κατασκευάζονται από την απόθεση/ενσωμάτωση μετάλλων, όπως είναι ο χρυσός και το τιτάνιο [92]. Για παράδειγμα, οι Henry et al. έχουν αναπτύξει ένα OoC με ηλεκτρόδια χρυσού ενσωματωμένα στο υπόστρωμα (με χρήση απόθεσης μετάλλων) για τη μέτρηση της διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης. Το σύστημα αυτό ηλεκτροδίων για τη μέτρηση της διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για τον πνεύμονα όσο και για το έντερο και επιτρέπει μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο [93]. Επιπλέον, οι Quirós-

Solano et al. χρησιμοποίησαν τιτάνιο για αισθητήρα μέτρησης καταπόνησης ενσωματωμένο σε μικροδιάταξη καρδιάς σε ψηφίδα [94].

Τέλος, το πυρίτιο συγκαταλέγεται στα υλικά που χρησιμοποιούνται σε ενδιάμεσα στάδια κατασκευής των ΟοCs. Χρησιμοποιείται σε διάφορες μορφές, όπως μονοκρυσταλλικό πυρίτιο, πολυκρυσταλλικό πυρίτιο, διοξειδίο του πυριτίου και νιτρίδιο πυριτίου, και σε εφαρμογές που αφορούν την κατασκευή αισθητήρων και ενεργοποιητών [95]. Είναι συμβατό με διάφορες διεργασίες μικροκατασκευής, όπως εγχάραξη (υγρή εγχάραξη ή εγχάραξη με χρήση πλάσματος), κατεργασία με laser και με διάφορες μεθόδους συγκόλλησης, λόγω των ευνοϊκών μηχανικών ιδιοτήτων του [96].

1.3.2 Μέθοδοι κατασκευής ΟοCs

Οι μέθοδοι κατασκευής μικροδιατάξεων γενικότερα, αλλά και ειδικότερα, των ΟοCs, διαφέρουν σημαντικά από τις συμβατικές τεχνικές κατασκευής και κατεργασίας. Ειδικότερα, περιλαμβάνουν μεθόδους για την προσθήκη ή την αφαίρεση υλικών, τη σχηματοποίηση του υποστρώματος για τη δημιουργία της επιθυμητής γεωμετρίας και την εκτέλεση άλλων σταδίων τροποποίησης. Γενικά, υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την κατασκευή των ΟοCs: (i) από κάτω προς τα πάνω (bottom-up), και (ii) από πάνω προς τα κάτω (top-down). Στην bottom-up προσέγγιση, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ένα μικροπεριβάλλον, το οποίο είναι συνηθέστερα μια βιολογικά εμπνευσμένη υδρογέλη, και δεν απαιτούνται μικροδομές για την καθοδήγησή τους στη δημιουργία του μικροφυσιολογικού περιβάλλοντος του οργάνου [97]. Στην top-down προσέγγιση, πρώτα σχεδιάζεται και κατασκευάζεται το μικροπεριβάλλον και μετά εισάγονται τα κύτταρα [97]. Πρόκειται για τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη προσέγγιση στην κατασκευή γενικότερα των μικρορευστονικών διατάξεων. Μερικές φορές υλοποιείται μια υβριδική προσέγγιση που περιλαμβάνει τόσο την bottom-up, όσο και την top-down προσέγγιση. Παρακάτω αναφέρονται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των επιθυμητών μικροδομών στη συσκευή ή το υπόστρωμα, και οι οποίες αφορούν στην top-down προσέγγιση.

1.3.2.1 Λιθογραφία μαλακής ύλης

Η λιθογραφία μαλακής ύλης (soft lithography) αποτελεί μια συλλογή από τεχνικές βασιζόμενες στην εντύπωση, χύτευση και αποτύπωση, με τη χρήση μιας ελαστομερικής σφραγίδας [98]. Ο όρος "μαλακή ύλη" σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα μηχανικά μαλακών υλικών. Η λιθογραφία μαλακής ύλης λοιπόν, μπορεί να επεξεργαστεί μαλακά υλικά, όπως για παράδειγμα, πολυμερή, γέλες, και οργανικές μονοστοιβάδες, εκ των οποίων, το PDMS είναι το περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενο. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται το ότι παρέχει τη δυνατότητα κατασκευής τριδιάστατων και καμπύλων δομών, είναι συμβατή με μια πληθώρα υλικών και παράγει καλώς καθορισμένες και ελεγχόμενες επιφανειακές χημικές τροποποιήσεις, ενώ είναι γενικά συμβατή με βιολογικές εφαρμογές [98]. Επιπλέον, είναι χαμηλή σε κόστος, με σχετικά εύκολες πειραματικές διεργασίες, και έχει αναδειχθεί ως μια τεχνολογία ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές που περιλαμβάνουν την κυτταρική βιολογία, τα μικρορευστονικά συστήματα και ειδικότερα, τα μικροεργαστήρια σε ψηφίδα (LoC), τα μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα (MEMS), καθώς και τα ευέλικτα ηλεκτρονικά/φωτονικά συστήματα [98].

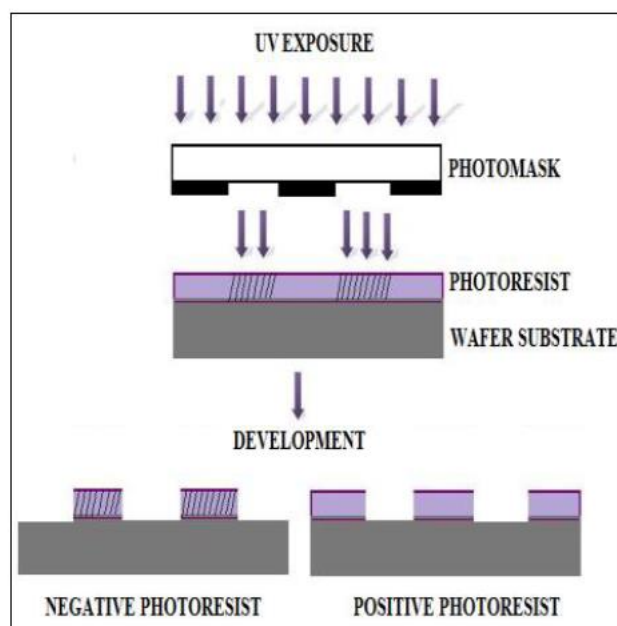
Η λιθογραφία μαλακής ύλης ανέκυψε λόγω περιορισμών της φωτολιθογραφίας σε εφαρμογές σχετιζόμενες με βιολογικά συστήματα. Το σχετικά υψηλό κόστος, τόσο για τη διαδικασία, όσο και για τις εγκαταστάσεις καθαρού χώρου που απαιτούνται, η ασυμβατότητα με καμπύλα υποστρώματα, η πρόσβαση σε περιορισμένο πλήθος υλικών, και η έλλειψη ελέγχου της επιφάνειας, αναφέρονται ως οι σημαντικότεροι περιορισμοί της φωτολιθογραφίας [99]. Αντιθέτως, η λιθογραφία μαλακής ύλης αντιπροσωπεύει μια εννοιολογικά διαφορετική προσέγγιση για την ταχεία δημιουργία πρωτοτύπων διαφόρων τύπων δομών στη μικρο και νανοκλίμακα,

καθώς και συσκευών σε επίπεδα, καμπύλα, εύκαμπτα και μαλακά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, οι τεχνικές της περιλαμβάνουν την εκτύπωση μικροεπαφών (microcontact printing/μCP) [100], αντιγραφή μήτρας (replica molding/REM) [101], χύτευση μικρομεταφοράς (microtransfer molding) [102], μικροκαλούπωμα σε τριχοειδή (micromolding in capillary) [103], μικροκαλούπωμα με υποβοήθηση διαλύτη (solvent-assisted micromolding/SAMIM) [104], λιθογραφία ακμής μετατόπισης φάσης (phase-shifting edge lithography) [105], εκτύπωση νανομεταφοράς [106], λιθογραφία χαλιογραφίας (decals transfer lithography) [107], και νανοαπόξεση (nanoskiving) [108]. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούν μια σχηματοποιημένη σφραγίδα PDMS για τη δημιουργία ή μεταφορά ενός μοτίβου.

Για να πραγματοποιηθεί η λιθογραφία μαλακής ύλης απαιτούνται τέσσερα βασικά βήματα: (i) σχεδιασμός του μοτίβου, (ii) κατασκευή της μάσκας και της μήτρας, (iii) κατασκευή της ελαστομερικής σφραγίδας PDMS, και (iv) κατασκευή μικρο και νανοδομών με χρήση της σφραγίδας PDMS μέσω εντύπωσης, χύτευσης και αποτύπωσης. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο όρος λιθογραφία μαλακής ύλης αφορά στην κατασκευή αντιγράφων με το επιθυμητό μοτίβο με χρήση της σφραγίδας PDMS, ενώ η συνολική διαδικασία, από το σχεδιασμό του μοτίβου έως την κατασκευή των λειτουργικών δομών, αναφέρεται συχνά ως “ταχεία προτυποποίηση” (rapid prototyping) [109].

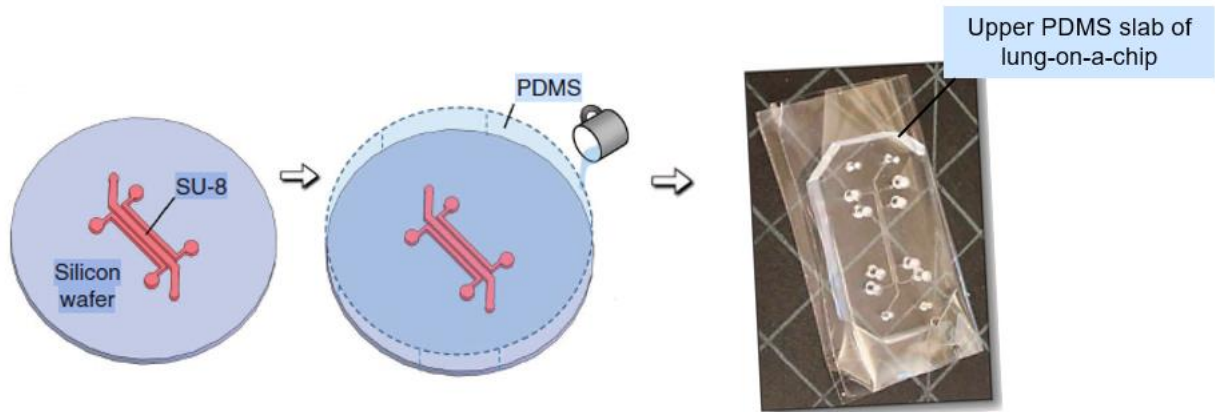
Υπάρχουν πολλά διαθέσιμα προγράμματα σχεδίασης υποβοηθούμενα από υπολογιστή Computer-aided design/CAD) για το σχεδιασμό του επιθυμητού μοτίβου, όπως για παράδειγμα, το AutoCAD και το Illustrator. Το μοτίβο μεταφέρεται στη συνέχεια σε μια φωτολιθογραφική μάσκα με τη βοήθεια εμπορικού εκτυπωτή υψηλής ανάλυσης. Αναλόγως της απαιτούμενης ανάλυσης, η μάσκα μπορεί να είναι χρωμίου, γυαλιού ή χαλαζία (quartz) ή ακόμη και διαφάνεια. Στο στάδιο της κατασκευής της μήτρας χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί φωτολιθογραφία ή λιθογραφία ηλεκτρονικής δέσμης (e-beam lithography) [98], κι αυτό είναι ένα μειονέκτημα της λιθογραφία μαλακής ύλης. Όμως, το θετικό είναι πως το στάδιο αυτό πρέπει να πραγματοποιηθεί μόνο μία φορά, για την κατασκευή της μήτρας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα για την κατασκευή της σφραγίδας PDMS [110].

Συγκεκριμένα, στη φωτολιθογραφία, που είναι και σχετιζόμενη με την παρούσα διατριβή, το μοτίβο της μάσκας, που αποτελείται από διαφανείς και αδιαφανείς περιοχές, μεταφέρεται σε φωτοευαίσθητο πολυμερές μέσω επιλεκτικής έκθεσης σε οπτική ακτινοβολία, για να δημιουργηθεί η επιθυμητή πολυμερική δομή στο υπόστρωμα [111]. Πιο αναλυτικά, ένα υμένιο του φωτοευαίσθητου πολυμερούς επικαλύπτει ομοιόμορφα δια περιστροφής το υπόστρωμα, το οποίο στη συνέχεια ευθυγραμμίζεται και έρχεται σε στενή επαφή με τη μάσκα. Ακολούθως, το φωτοευαίσθητο εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μέσω της μάσκας, η οποία προστατεύει ορισμένες περιοχές του φωτοευαίσθητου και εκθέτει άλλες, αναλόγως των διαφανών και αδιάφανων περιοχών του μοτίβου της. Η έκθεση του φωτοευαίσθητου στη UV μεταβάλλει τη διαλυτότητά του, με αποτέλεσμα η εμβάπτιση του σε κατάλληλο διαλύτη να αφαιρεί επιλεκτικά ορισμένες περιοχές του [111]. Ειδικότερα, αν το φωτοευαίσθητο είναι θετικού τόνου (positive tone photoresist), τότε απομακρύνονται οι εκτεθειμένες περιοχές, ενώ αν είναι αρνητικού τόνου (negative tone photoresist), τότε απομακρύνονται οι ανέκθετες. Στο Σχήμα 1.4 απεικονίζονται τα στάδια των δύο ειδών φωτολιθογραφιών, θετικού και αρνητικού τόνου.



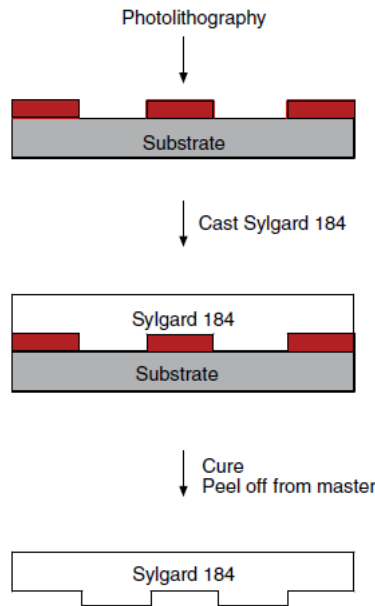
Σχήμα 1. 4. Σχηματική απεικόνιση των δύο ειδών φωτολιθογραφίας, αναλόγως του αν το φωτοευαίσθητο είναι αρνητικού ή θετικού τόνου. Μετά την επίστρωση λεπτού υμενίου του φωτοευαίσθητου και την έκθεσή του σε ακτινοβολία UV μέσω της φωτολιθογραφικής μάσκας, κατά την εμβάπτιση σε διαλύτη, παραμένουν είτε οι εκτεθειμένες είτε οι ανέκθετες στην ακτινοβολία περιοχές, αν το φωτοευαίσθητο είναι αρνητικού ή θετικού τόνου, αντίστοιχα [112].

Γνωστά φωτοευαίσθητα πολυμερή είναι το AZ, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως θετικού είτε ως αρνητικού τόνου, με κατάλληλη μεταβολή των συνθηκών και των σταδίων διεργασίας, καθώς και το SU-8, το οποίο είναι αποκλειστικά αρνητικού τόνου. Συγκεκριμένα, το SU-8 αποτελείται από εποξειδικές ομάδες, 8 στο πλήθος, από όπου προκύπτει και η ονομασία του. Είναι θερμικά και μηχανικά σταθερό, καθώς και χημικά αδρανές. Χρησιμοποιείται όχι μόνο για την κατασκευή των μητρών των σφραγίδων PDMS, αλλά και απευθείας για την κατασκευή μικροκαναλιών, ενώ είναι διαθέσιμο σε διάφορες μορφές που καλύπτουν πάχη από 1 έως 600 μm [112]. Ενδεικτικά, το SU-8 έχει χρησιμοποιηθεί από τους Huh et al. [113] το 2010 στην κατασκευή της μικροδιάταξης πνεύμονα σε ψηφίδα, καθώς και αργότερα, το 2012, από τους Kim et al. [47] για τη μικροδιάταξη εντέρου σε ψηφίδα, που διαθέτει παρόμοια αρχιτεκτονική με του πνεύμονα. Και στις δύο περιπτώσεις, το SU-8 αποτέλεσε τη μήτρα για το άνω επίπεδο PDMS της μικροδιάταξης, που φέρει σχηματοποιημένα τα μικροκανάλια (Σχήμα 1.5) [114].



Σχήμα 1. 5. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής του άνω επιπέδου PDMS της μικροδιάταξης πνεύμονα σε ψηφίδα με λιθογραφία μαλακής ύλης, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα μικροκανάλια φωτοευαίσθητου SU-8 που προέκυψαν με φωτολιθογραφία αρνητικού τόνου [114].

Βασικό στάδιο στη λιθογραφία μαλακής ύλης αποτελεί η κατασκευή της ελαστομερικής σφραγίδας PDMS, σχηματοποιημένης με τις επιθυμητές δομές στην επιφάνειά της. Η σφραγίδα κατασκευάζεται με την έγχυση του ρευστού προπολυμερούς PDMS, αποτελούμενου από τη μίξη της βάσης (base) του πολυμερούς με το διασταυρωτή (curing agent), πάνω στη μήτρα που φέρει το συμπληρωματικό μοτίβο. Μεταξύ των διαφόρων τύπων εμπορικών PDMS, το Sylgard 184 από την Dow Corning χρησιμοποιείται συχνότερα, για αποτύπωση δομών μεγαλύτερων από 500 nm, και χρησιμοποιήθηκε και στην εν λόγω διατριβή. Στο Σχήμα 1.6 αποδίδεται σχηματικά η διαδικασία κατασκευής σφραγίδας PDMS, Sylgard 184, από φωτολιθογραφικά παραγόμενη μήτρα. Στη συνέχεια, το προπολυμερές θερμαίνεται σε κατάλληλη θερμοκρασία και χρόνο, υπαγορευόμενα από τον κατασκευαστή [115], που έχει ως αποτέλεσμα να πολυμεριστεί και να σκληρύνει, διευκολύνοντας την αφαίρεσή του από τη μήτρα. Στο τέλος της διαδικασίας, η σφραγίδα PDMS φέρει το επιθυμητό μοτίβο.

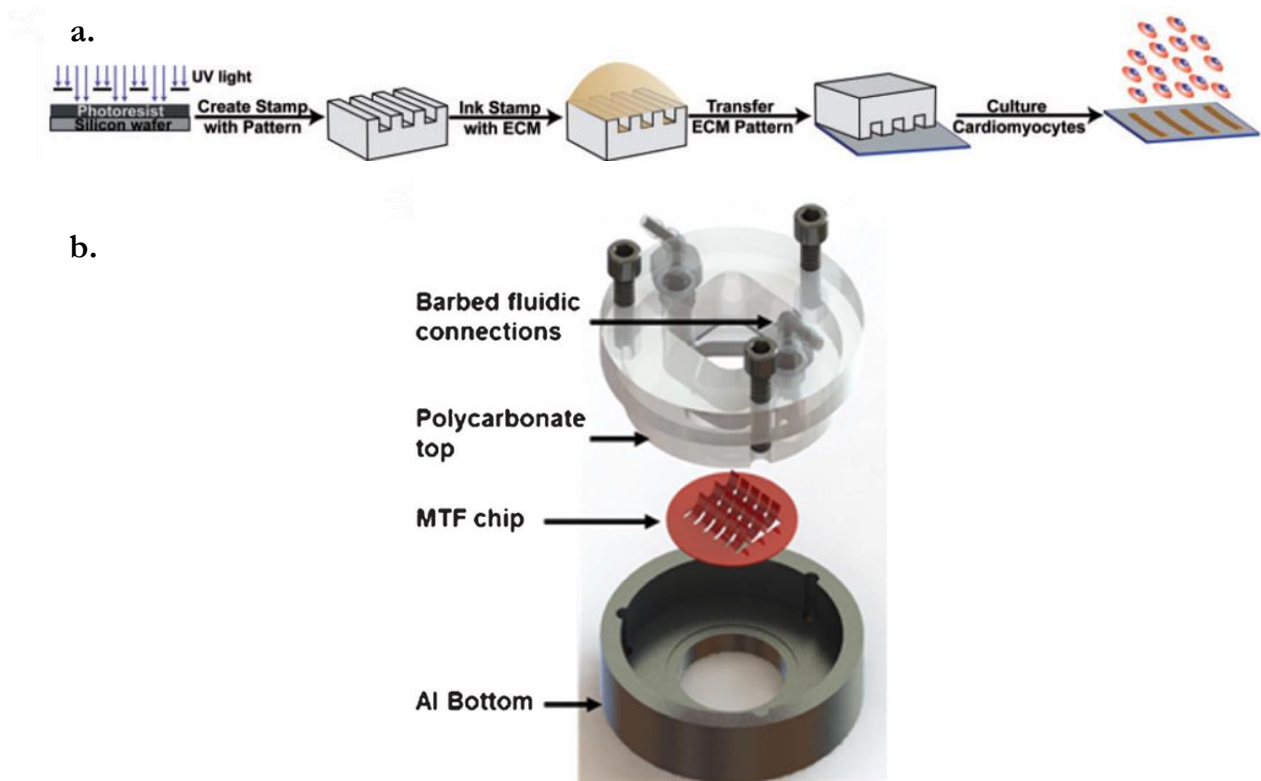


Σχήμα 1. 6. Σχηματική απόδοση της διαδικασίας παρασκευής της ελαστομερικής σφραγίδας PDMS (Sylgard 184) από φωτολιθογραφικά κατασκευασμένη μήτρα, στα πλαίσια της λιθογραφίας μαλακής ύλης [98].

Από το σύνολο των τεχνικών της λιθογραφίας μαλακής ύλης, οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες στην κατασκευή μικροδιατάξεων οργάνων είναι η εκτύπωση μικροεπαφών (μCP) και η αντιγραφή μήτρας (REM). Το μCP, αποτελεί τον πρόδρομο της λιθογραφίας μαλακής ύλης, και δίνει τη δυνατότητα κατεργασίας των ιδιοτήτων μιας επιφάνειας με ακρίβεια μοριακού επιπέδου, κατασκευάζοντας μικροδομές χρήσιμες σε εφαρμογές στην κυτταρική βιολογία και τη βιοτεχνολογία [98]. Η τεχνική χρησιμοποιεί αυτο-οργανωμένες μονοστρώσεις (self-assembled monolayers/SAMs) αλιανοθειολών σε υπόστρωμα επικαλυμένο με μέταλλα, όπως χρυσός (Au), ασήμι (Ag), χαλκός (Cu), παλλάδιο (Pd), και πλατίνα (Pt) [98]. Για βιολογικές εφαρμογές, που άπτεται και του ενδιαφέροντος της διατριβής, χρησιμοποιεί πρωτεΐνες για την παραγωγή συστοιχιών σε υπόστρωμα πυριτίου ή γυαλιού, ή οργανικές ομάδες για το μοριακό εντοπισμό βιομορίων [116] ή ακόμη και βακτήρια [117] και κύτταρα θηλαστικών [118]. Σύμφωνα με τη διαδικασία, η ελαστομερική σφραγίδα επικαλύπτεται με τις μονοστρώσεις ή τα μακρομόρια, και στη συνέχεια έρχεται σε σύμμορφη επαφή μοριακού/ατομικού επιπέδου με το υπόστρωμα, το οποίο μετά την απομάκρυνση της σφραγίδας, έχει αποκτήσει το επιθυμητό μοτίβο μονοστρώσεων ή μακρομορίων. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χωρικά ελεγχόμενη ανάπτυξη κυττάρων, δημιουργώντας περιοχές φιλικές και μη προς την προσκόλλησή τους, με την εναπόθεση για παράδειγμα, πρωτεϊνών και μονοστρώσεων με απολήξεις πολυαιθυλενογλυκόλης, αντίστοιχα [119].

Συγκεκριμένα στα OoCs, οι Agarwal et al. ενσωμάτωσαν τη μέθοδο μCP στη μικροδιάταξη καρδιάς σε ψηφίδα, “εκτυπώνοντας” ταινίες από φιμπρονεκτίνη, βασική πρωτεΐνη της εξωκυττάριας μήτρας, στην επιφάνεια PDMS της μικροδιάταξης, πάνω στις οποίες καλλιέργησαν καρδιακά μυοκύτταρα, με σκοπό να αποδώσουν την ανισότροπη *in vivo* αρχιτεκτονική του μυοκαρδίου [120]. Αργότερα, οι Sheehy et al. επικεντρώθηκαν στο ανισότροπο αυτό μοτίβο του μυοκαρδίου, κατασκευασμένο με την τεχνική μCP, και απέδειξαν ότι η κατευθυνόμενη καλλιέργεια καρδιακών μυοκυττάρων, εκτός της αρχιτεκτονικής, επηρεάζει και το φαινότυπο του ενήλικου μυοκαρδίου, επιδρώντας άμεσα στη γονιδιακή καρδιακή έκφραση [121]. Στο

Σχήμα 1.7 διακρίνεται τόσο η μέθοδος μCP παρασκευής των ταινιών μυοκαρδίου (Σχήμα 1.7a), όσο και η μικροδιάταξη καρδιάς που τις ενσωμάτωσε (Σχήμα 1.7b).



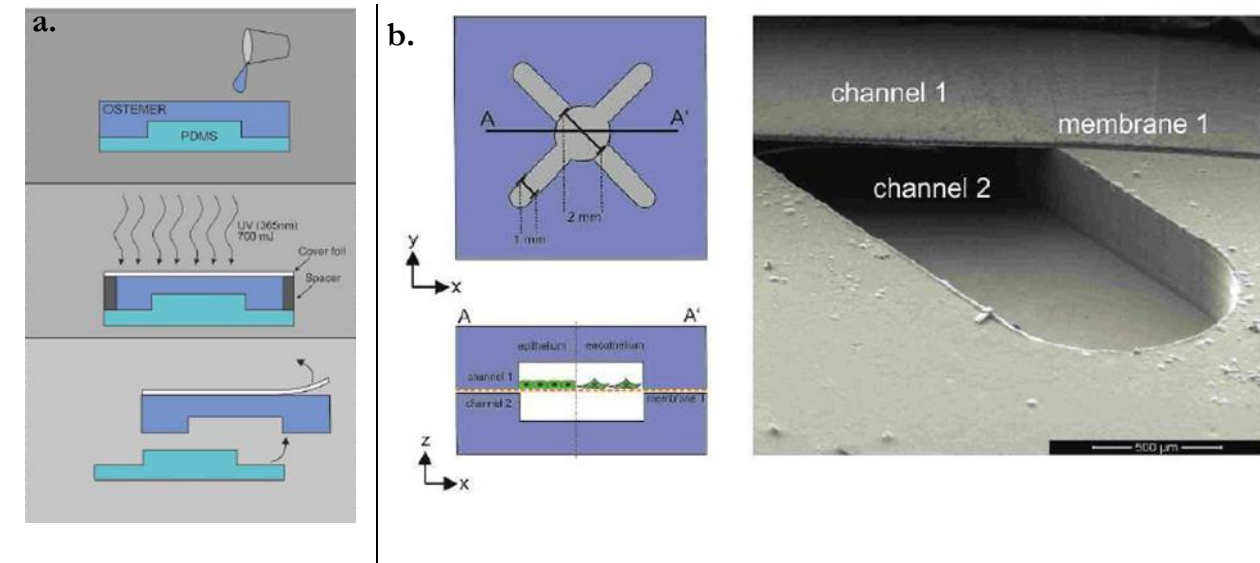
Σχήμα 1. 7. a) Διαδικασία παραγωγής με την τεχνική εκτύπωσης μικροεπαφών (μCP) ταινιών φμπρονεκτίνης πάνω σε γυαλί επιστρωμένο με PDMS, για την ελεγχόμενη καλλιέργεια καρδιακών μυοκυττάρων, κατ' αναλογία της *in vivo* ανισοτροπίας της αρχιτεκτονικής του μυοκαρδίου [121]. b) Ενσωμάτωση του επιπέδου με τις ταινίες καρδιακού μυϊκού ιστού (muscular thin films/MTFs), κατασκευασμένες με μCP, στη μικροδιάταξη καρδιάς σε ψηφίδα. Το επίπεδο MTF καλύπτεται από πάνω από διαφανές πολυ(ανθρακικό εστέρα) (polycarbonate), συγκρατούμενο στη θέση του με τρεις βίδες, και από κάτω στηρίζεται σε κυλινδρικό αλουμίνιο, με κατάλληλη εσοχή για να το συγκρατεί [120].

Η τεχνική (REM) προέκυψε ως μια εναλλακτική μέθοδος των υπάρχοντων στη μικροηλεκτρονική για την κατασκευή εν γένει των μικρορευστονικών διατάξεων χρησιμοποιώντας PDMS. Περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια (i) τη δημιουργία μιας μήτρας με την επιθυμητή τοπογραφία, (ii) τη μεταφορά της συμπληρωματικής τοπογραφίας της μήτρας στο PDMS με την τεχνική REM, και τέλος, (iii) τη μεταφορά της τοπογραφίας του PDMS πίσω σε ένα αντίγραφο της αρχικής μήτρας με τη σιλήρυνση ενός υγρού προπολυμερούς, όπως είναι η σιληρυνόμενη σε υπεριώδη ακτινοβολία πολυουρεθάνη (polyurethane/PU), ή κάποιο θερμικά πολυμεριζόμενο εποξειδίο [98].

Η REM διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα έναντι συμβατικών μεθόδων κατασκευής στη μικρο και νανοκλίμακα. Αρχικά, μπορεί να παράγει πολλά αντίγραφα μητρών (> 50), με δομές ανάλυσης που μπορεί να κατεβαίνουν σε ατομικό επίπεδο [122]. Επιπλέον, μπορεί να λειτουργήσει με μια ευρεία γκάμα πολυμερών, και να δημιουργήσει δομές σε εκτεταμένη επιφάνεια σε λίγο χρόνο, χωρίς να περιορίζεται από σειριακές διαδικασίες. Τέλος, μπορεί να μεταφέρει το επιθυμητό μοτίβο σε μη επίπεδες επιφάνειες [123].

Ακολουθώντας όλα τα στάδια της τεχνικής REM, το φωτοευαίσθητο OSTEMER, όπως προτάθηκε από τους Sticker et al., μπορεί να σχηματοποιηθεί με τη χρήση σφραγίδας PDMS ως καλούπι (Σχήμα 1.8a) για την κατασκευή μικροδιατάξεων οργάνων. Το OSTEMER αποτελεί ένα θερμοσκληρυνόμενο πλαστικό, συμβατό με τις μεθόδους της λιθογραφίας μαλακής ύλης, που πλεονεκτεί σε σχέση με το PDMS ως προς την ευκολία συγκόλλησής του. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον πολυμερισμό του σε δύο στάδια, όπου στο πρώτο, εκτίθεται σε UV ακτινοβολία, που οδηγεί σε μερική σκλήρυνσή του, επαρκή για την ολοσχερή αφαίρεσή του από την σφραγίδα PDMS, και στο δεύτερο, θερμαίνεται, επιτρέποντας τη συγκόλλησή του [99]. Έτσι, οι Sticker et al. [99] κατασκεύασαν μικροδιατάξη του ανθρώπινου κυτταρικού φραγμού του πλακούντα, αποτελούμενη από δύο κανάλια καλλιέργειας OSTEMER, διαχωριζόμενα από πορώδη μεμβράνη πολυανθρακικού (PC), που προσομοιώνει τη διεπιφάνεια μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του πλακούντα (ACH-3P) και των ενδοθηλιακών των αγγείων (HUVEC) (Σχήμα 1.8b).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο ορισμός της τεχνικής REM μπορεί να διευρυνθεί, ορίζοντας απλά τη μεταφορά μιας τοπογραφίας από μία μήτρα σε ένα παραμορφώσιμο υλικό για την παραγωγή του συμπληρωματικού μοτίβου [124]. Υπό αυτή την έννοια, η REM αποτελεί τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την κατασκευή OoCs από PDMS, κατά την οποία τα συνιστώσα επίπεδα PDMS έχουν προκύψει από μια μεταφορά του αντίστοιχου μοτίβου από την αρχική τους μήτρα. Ενδεικτικά, αναφέρουμε την εργασία των Nakao et al. [125], οι οποίοι χρησιμοποιώντας την τεχνική REM κατασκεύασαν μικροδιατάξη ήπατος, η οποία προσομοιώνει τη διεπιφάνεια μεταξύ ενδοθηλίου και επιθηλίου στο ηπατικό ημιτονοειδές. Η γεωμετρία της μικροδιατάξης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.8c, αποτελείται από μικροδομές ανάλογες του ενδοθηλιακού φράγματος, ενώ περιλαμβάνει και ένα μεγαλύτερο κανάλι, που χρησιμεύει για την απόδοση της ροής αίματος στο ήπαρ. Αποδείχθηκε ότι η απόδοση της *in vivo* μικροαρχιτεκτονικής του φράγματος ενδοθηλίου-επιθηλίου είχε ως αποτέλεσμα τα ηπατοκύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα ήπατος) αρουραίου να αυτο-οργανωθούν και να ευθυγραμμιστούν σε δύο σειρές στο εσωτερικό του κεντρικού θαλάμου καλλιέργειας, σχηματίζοντας λειτουργικά χοληφόρα κανάλια, όπως συμβαίνει στο φυσικό μικροπεριβάλλον του ηπατικού ημιτονοειδούς.

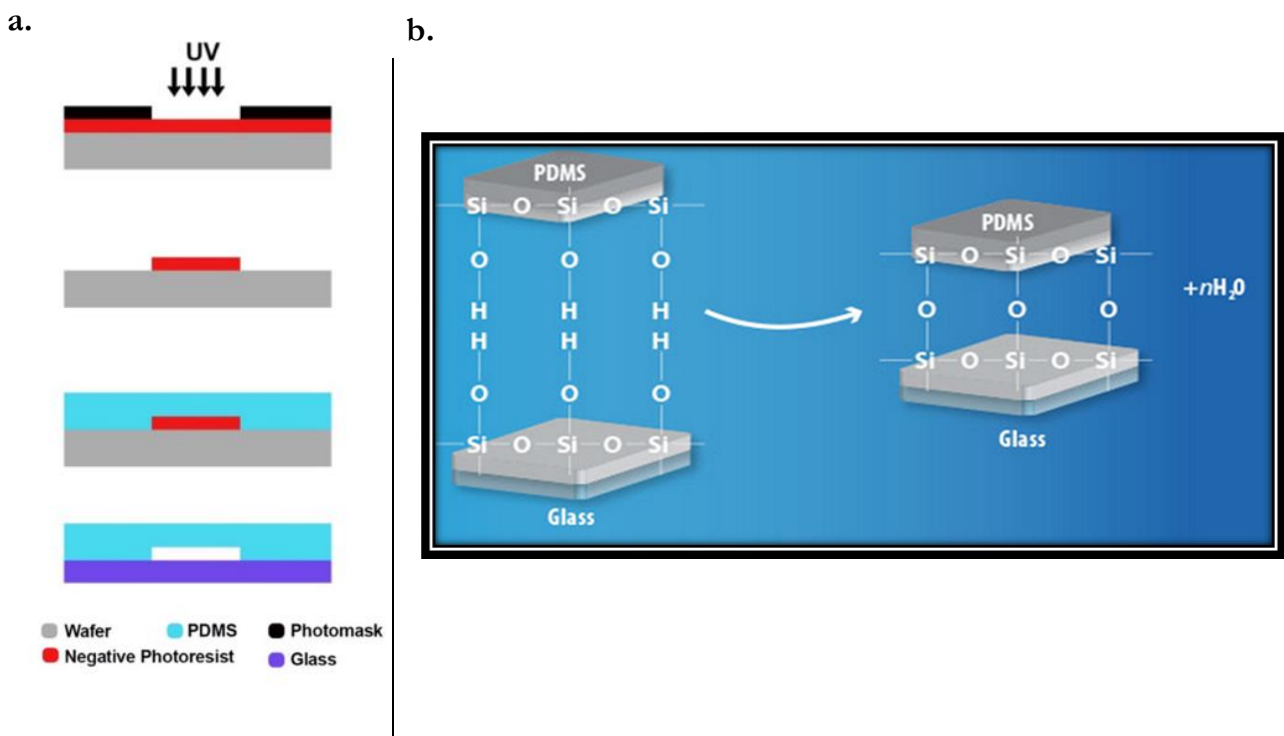


Σχήμα 1. 8. α) Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής του θερμοσκληρυνόμενου OSTEMER με την τεχνική REM, χρησιμοποιώντας σφραγίδα PDMS ως μήτρα. Χρήση REM με το πλαστικό OSTEMER για την κατασκευή μικροδιάταξης ανθρώπινου κυτταρικού φραγμού του πλακούντα. β) Σχηματικό (αριστερά) και εικόνα SEM (δεξιά) της μικροδιάταξης που αποδίδει τη διεπιφάνεια μεταξύ του επιθηλίου του πλακούντα και του ενδοθηλίου των αγγείων (HUVEC) [99]. γ) Σχέδιο της γεωμετρίας της μικροδιάταξης ήπατος σε ψηφίδα, κατασκευασμένη από PDMS με τεχνική REM. Αποτελείται από το μικροθάλαμο καλλιέργειας ηπατοκυττάρων, φράγμα με μικροδομές που προσομοιώνει τη διεπιφάνεια ενδοθηλίου-επιθηλίου, και κανάλι ροής για την απόδοση της κυκλοφορίας αίματος. Το πλάτος του μικροθαλάμου καλλιέργειας είναι 37 μm , γεγονός που επιτρέπει την ευθυγράμμιση των ηπατοκυττάρων σε δύο γραμμές. δ) Εικόνα SEM της μικροδιάταξης [125].

Για τη σφράγιση των μικροδιατάξεων οργάνων, αν επικεντρωθούμε στο PDMS, που είναι και το συχνότερα χρησιμοποιούμενο στις τεχνικές λιθογραφίας μαλακής ύλης, απαιτείται η συγκόλλησή του με υλικά, όπως PDMS και το γυαλί συνήθως. Στο Σχήμα 1.9α παρουσιάζεται η διαδικασία ολοκλήρωσης μιας μικροδιάταξης, ξεκινώντας από την κατασκευή της μήτρας με χρήση φωτολιθογραφίας αρνητικού φωτοευαίσθητου, την παρασκευή του επιπέδου PDMS με τεχνική REM, και τέλος, τη σφράγιση του PDMS με γυαλί.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος συγκόλλησης είναι η επιφανειακή οξείδωση του PDMS με χρήση τεχνολογίας πλάσματος [58], η οποία δημιουργεί ομάδες σιλανόλης (-Si-OH), με αποτέλεσμα κατά την επαφή του με άλλο PDMS ή γυαλί, να σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί σιλοξάνης (Si-O-Si), που οδηγούν σε ισχυρή, μη αναστρέψιμη συγκόλληση [126]. Το Σχήμα 1.9b απεικονίζει σχηματικά τη διαδικασία συγκόλλησης ενός επιπέδου PDMS με το γυαλί και τις δημιουργούμενες ενεργές ομάδες μετά την έκθεσή τους σε πλάσμα οξυγόνου. Περισσότερες λεπτομέρειες για την εν λόγω μέθοδο επιφανειακής τροποποίησης αναφέρονται στο Κεφάλαιο 4.

Άλλη μέθοδος συγκόλλησης είναι η ηλεκτρική εκκένωση κορώνας, κατά την οποία δημιουργείται ισχυρή διαφορά δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων, που οδηγεί σε ιονισμό του αέρα και προκαλεί τοπική εκκένωση κορώνας, που τροποποιεί την επιφάνεια PDMS [127]. Επιπλέον, ειδικότερα για τη συγκόλληση PDMS – PDMS, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίπεδα με διαφορετικές αναλογίες βάσης – διασταυρωτή, όπου το ένα επίπεδο θα είναι λιγότερο πολυμερισμένο σε σχέση με το άλλο [23]. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να δοκιμαστεί ο μερικός πολυμερισμός του PDMS, όπου για παράδειγμα, για τη συνήθη αναλογία μίξης βάσης – διασταυρωτή 10:1, το δείγμα μπορεί να θερμανθεί για μικρότερο χρονικό διάστημα (π.χ. 30–60 min στους 60 °C) [128,129]. Ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα PDMS σκληραίνουν αρκετά ώστε να είναι διαχειρίσιμα, αλλά παραμένουν επαρκώς μη πολυμερισμένα, ώστε να δημιουργήσουν δεσμούς μεταξύ τους ερχόμενα σε επαφή. Τέλος, είναι δυνατή η χρήση ενός ενδιάμεσου επιπέδου μη πολυμερισμένου PDMS ή κόλλας θερμαινόμενης σε UV ως συγκολλητική στρώση, μεταξύ των επιπέδων προς συγκόλληση [130]. Η στρώση αυτή επικαλύπτει ένα από τα δύο επίπεδα, τα οποία έρχονται σε επαφή, και εν συνεχεία είτε θερμαίνονται, είτε εκτίθενται σε UV, όπου στο τέλος της διαδικασίας έχουν συγκολληθεί. Η συγκεκριμένη μέθοδος συγκόλλησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη σφράγιση PDMS με άλλα υλικά εκτός του γυαλιού και του εαυτού του.



Σχήμα 1.9. α) Σχηματική απόδοση των σταδίων κατασκευής μιας μικροδιάταξης, που περιλαμβάνουν φωτολιθογραφία αρνητικού τόνου για την κατασκευή της μήτρας, τεχνική αντιγραφής μήτρας (REM) για την κατασκευή του επιπέδου

PDMS με τις επιθυμητές δομές, και τέλος τη συγκόλληση του PDMS με το γυαλί. b) Σχηματική απεικόνιση των ενεργών ομάδων σιλανόλης (-Si-OH) στην επιφάνεια PDMS και γυαλιού κατά την αμοιβαία έκθεσή τους σε πλάσμα οξυγόνου και μετέπειτα σύναψη δεσμών σιλοξάνης (Si-O-Si) κατά τη σύμμορφη μεταξύ τους επαφή, που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συγκόλλησή τους.

1.3.2.2 Εν θερμώ σφράγιση (hot embossing)

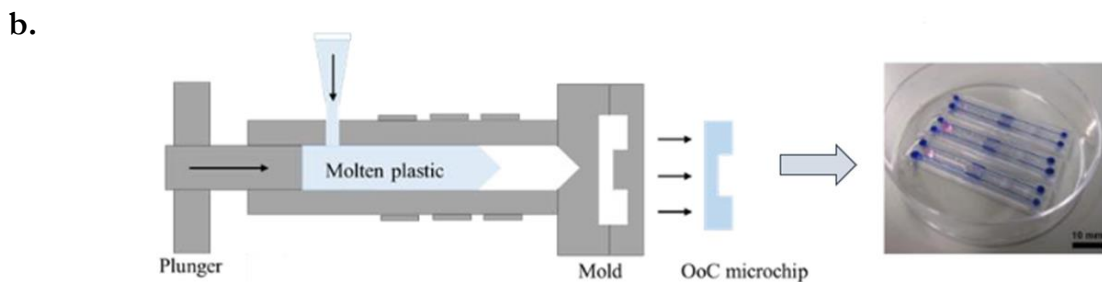
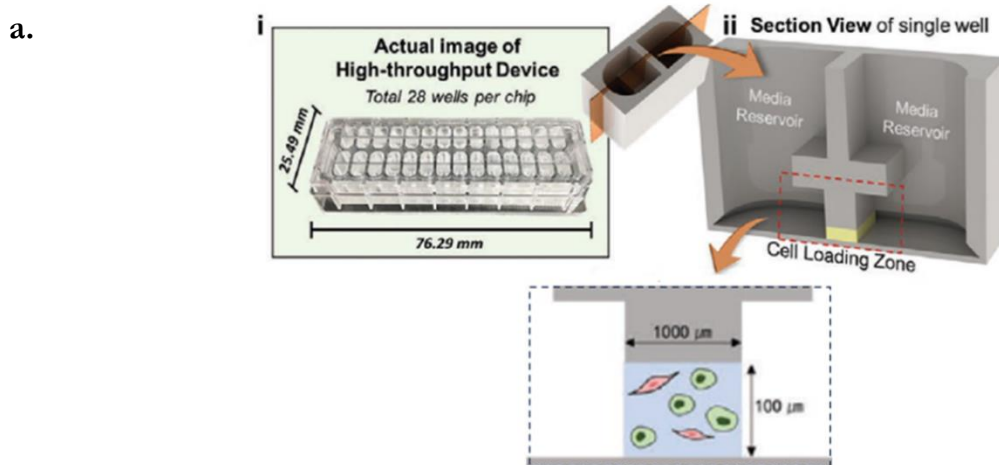
Η διαδικασία εν θερμώ σφράγισης χρησιμοποιείται για την κατασκευή μικροδιατάξεων οργάνων (και μικροδιατάξεων γενικότερα) με βάση θερμοπλαστικά πολυμερή, όπως ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (poly(methyl methacrylate)/PMMA), το συμπολυμερές κυκλικής ολεφίνης (cyclic olefin copolymer/COC), το πολυανθρακικό (polycarbonate/PC), το πολυστυρένιο (polystyrene/PS), και το πολυβινυλοχλωρίδιο (polyvinylchloride/PVC). Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σχηματοποίηση του πολυμερούς από μια σφραγίδα με την εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας κοντά στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) του πολυμερούς [131]. Ειδικότερα, το θερμοπλαστικό σε επαφή με τη σφραγίδα τοποθετούνται σε ένα υδραυλικό πιεστήριο (πρέσα), και με την εφαρμογή κατάλληλης πίεσης και θερμοκρασίας, μεταφέρεται στο πολυμερές το συμπληρωματικό μοτίβο της σφραγίδας. Η σφραγίδα είναι συνήθως σε υπόστρωμα πυριτίου, παραγόμενη με φωτολιθογραφία, ή σε μέταλλο. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου εντάσσονται το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα παραγωγής πολυμερικών μικροδομών με υψηλή αναλογία βάρους προς πλάτος [132]. Ωστόσο, για να επιτευχθεί μια επιφάνεια υψηλής ποιότητας, απαιτείται ακριβής έλεγχος της θερμοκρασίας και άλλων παραμέτρων σχετιζόμενων με το υλικό και τη διεργασία.

1.3.2.3 Μορφοποίηση με έγχυση σε καλούπι (injection molding)

Η μορφοποίηση με έγχυση σε καλούπι (injection molding) είναι μια καθιερωμένη κατασκευαστική μέθοδος για την παραγωγή πλαστικών προϊόντων μέσω έγχυσης του τηγμένου πολυμερούς σε ένα καλούπι [133]. Για τη διαδικασία απαιτείται η ύπαρξη συγκεκριμένου εξοπλισμού, και συγκεκριμένα, ειδικού μηχανήματος για τη μορφοποίηση του πολυμερούς, αποτελούμενο από μία χοάνη, ένα έμβολο με σπειρώματα (τύπου βίδας) και μια μονάδα θέρμανσης-ψύξης. Σφαιρίδια από το πολυμερές εισάγονται στη χοάνη, θερμαίνονται και αναμειγνύονται κατά τη μετακίνηση του εμβόλου με τα σπειρώματα, με αποτέλεσμα να λιώσουν και να εγχυθούν υπό υψηλή πίεση στην κοιλότητα του καλουπιού. Το τήγμα ψύχεται σταδιακά σε θερμοκρασία χαμηλότερη από εκείνη της υαλώδους μετάπτωσης T_g του υλικού, και αφαιρείται από το καλούπι, έχοντας σχηματοποιηθεί στο επιθυμητό μοτίβο.

Χρησιμοποιείται ευρέως στη μακρομηχανική και τη βιομηχανία, όπου απαιτείται μεγάλη παραγωγή, ενώ συνήθως χρησιμοποιεί θερμοπλαστικά και θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή, όπως π.χ. PMMA και PC, και πιο σπάνια ελαστομερή και μέταλλα. Στη μικρομηχανική, και συγκεκριμένα στη μικρορευστοτική, η πλειονότητα των τεχνικών κατασκευής, όπως για παράδειγμα η τεχνική REM, απαιτούν χειρωνακτικό χειρισμό και εξαρτώνται από τη δεξιότητα του χειριστή, καθιστώντας περισσότερο δύσκολη τη μαζική παραγωγή [134]. Έτσι, η μορφοποίηση με έγχυση προσφέρεται ως μια εναλλακτική λύση, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλος όγκος παραγωγής. Συγκεκριμένα στα OoCs, ενδείκνυται για εφαρμογές όπου χρειάζεται αντίστοιχα μαζική παραγωγή, όπως για παράδειγμα για τη δοκιμή μεγάλου αριθμού φαρμακευτικών ενώσεων για ένα συγκεκριμένο βιολογικό στόχο [134,135]. Συνήθως χρησιμοποιείται για την παραγωγή εμπορικών πλατφορμών OoCs [133], ενώ στον ερευνητικό κλάδο, τα OoCs που κατασκευάζονται με την λόγω τεχνική έχουν συχνά διαστάσεις ανάλογες με εκείνες των συμβατικών φρεατίων

κυτταροκαλλιέργειας [136–139]. Ενδεικτικά, οι Lee et al. [136] κατασκεύασαν ένα 3D μοντέλο ανθρώπινου λεμφικού αγγείου εντός του ανοσοποιητικού μικροπεριβάλλοντος ενός όγκου σε μικροδιάταξη πολυστυρενίου (PS) χρησιμοποιώντας μορφοποίηση με έγχυση σε καλούπι (Σχήμα 1.10a). Η πλατφόρμα αυτή υψηλής απόδοσης αποτελείται από 28 φρεάτια, και το μέγεθος κάθε φρεατίου είναι ίσο με δύο φρεάτια μιας εμπορικής πλάκας 384 φρεατίων. Επιπλέον, οι Virumbrales-Muñoz et al. [140] με τη ίδια τεχνική χρησιμοποίησαν συμπολυμερές κυκλικής ολεφίνης (COC) για την κατασκευή 3D μικροπεριβάλλοντος ενός όγκου σε μικροδιάταξη (Σχήμα 1.10b). Εναλλακτικά, μικροδομημένα πλαστικά εξαρτήματα, κατασκευασμένα με μορφοποίηση με έγχυση σε καλούπι, ενσωματώνονται σε ολοκληρωμένες συσκευές OoCs, οι οποίες συναρμολογούνται με ράβδους ή σφραγίζονται με θερμική συγκόλληση [11].



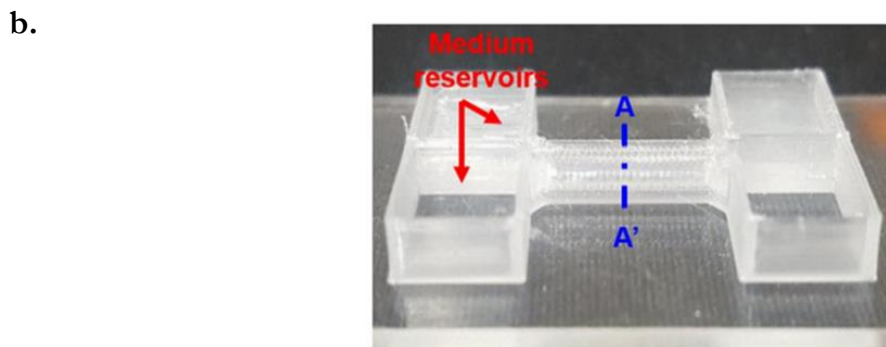
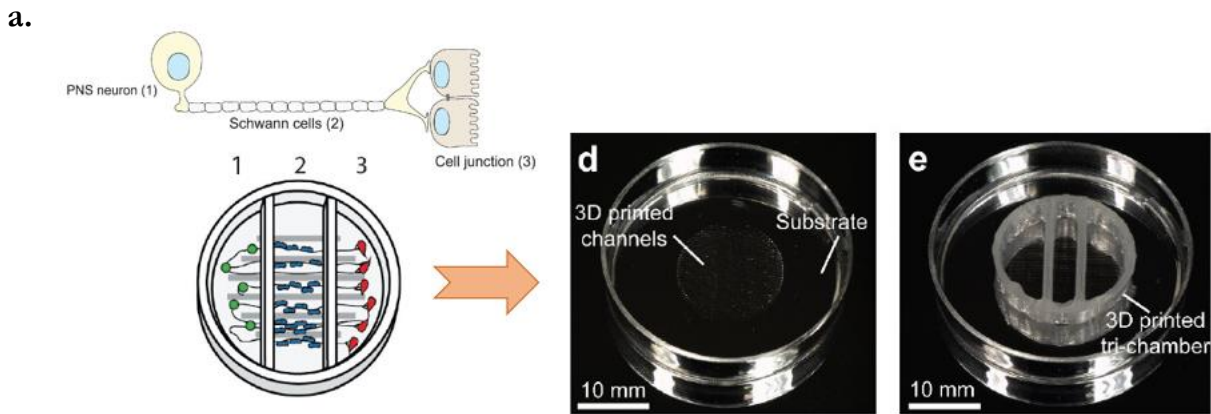
Σχήμα 1. 10. a) Πλατφόρμα πολυστυρενίου (PS) υψηλής απόδοσης για την 3D *in vitro* απόδοση λεμφικού αγγείου σε μικροπεριβάλλον όγκου, με χρήση μορφοποίησης με έγχυση σε καλούπι. (i) Εικόνα της πλατφόρμας αποτελούμενης από 28 φρεάτια, (ii) Διατομή ενός φρεατίου που απεικονίζει την κατανομή των καναλιών, με ένα κεντρικό κανάλι για την καλλιέργεια κυττάρων, και δύο περιφερειακά που χρησιμεύουν ως δεξαμενές θρεπτικού υλικού [136]. (b) Σχηματική αναπαράσταση (αριστερά) και εικόνες (δεξιά) μικροδιατάξεων όγκου σε φηρίδα, παρασκευασμένων από συμπολυμερές κυκλικής ολεφίνης (COC) με την τεχνική μορφοποίησης με έγχυση σε καλούπι [140].

1.3.2.4 Τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing)

Η έλευση νέων τεχνολογιών έχει δημιουργήσει δυνατότητες κατασκευής υψηλής ανάλυσης, και συνάμα χαμηλού κόστους. Η τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing) αποτελεί μια αναδυόμενη μέθοδο για την κατασκευή τριδιάστατων προτύπων, εξαρτημάτων και διατάξεων στη μικροκλίμακα [141]. Αυτή η τεχνική προσφέρει το πλεονέκτημα του ακριβούς ελέγχου της γεωμετρίας μικροκαναλιών, και μικροδομών εν γένει, ενώ επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της χωρικής κατανομής μέσω της κατασκευής στρώση-προς-στρώση (layer-by-layer assembly) του υλικού, δηλαδή τοποθέτησης υλικού από τα κάτω στρώματα προς τα πάνω [142]. Στον αντίποδα, οι τεχνικές λιθογραφίας μαλακής ύλης, αν και επεκτείνονται στην τρίτη διάσταση, με μικροδομές που μπορούν να εμφανίζουν διαφορετικά μεταξύ τους ύψη, κάθε μικροδομή περιορίζεται σε ένα σταθερό ύψος, χωρίς τη δυνατότητα χωρικής επέκτασης. Είναι ενδιαφέρον πως μπορούν να “εκτυπωθούν” κύτταρα και ιστοί σε τρεις διαστάσεις σε ένα υπόστρωμα, μαζί την εξωκυττάρια μήτρα τους, όπως για παράδειγμα, μια υδρογέλη [143]. Το “μελάνι” εκτύπωσης μπορεί να είναι φυσικό υλικό, όπως κολλαγόνο, υδρογέλη, κυτταρίνη, αλγίνη, ή συνθετικό, όπως πολυκαπρολακτόνη, σιλικόνη και Pluronic 127 κ.λπ. [144]. Αυτά τα “μελάνια” μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διάφορες μεθόδους, όπως (i) εκτύπωση μικροεξώθησης (micro-extrusion printing), όπου το “μελάνι” εναποτίθεται απευθείας σε ένα υπόστρωμα χρησιμοποιώντας μια κεφαλή μικροεξώθησης, (ii) εκτύπωση ψεκασμού μελάνης (inkjet printing), όπου το “μελάνι” διανέμεται από ηλεκτρικά θερμαινόμενο ή πιεζοηλεκτρικό ακροφύσιο ενεργοποιητή και αποτίθεται στο υπόστρωμα σε μορφή σταγονιδίων, και (iii) εκτύπωση υποβοηθούμενη με laser (laser-assisted printing), όπου μια δέσμη laser εκτυπώνει σε υπόστρωμα επικαλυμένο με “μελάνι”. Καλύτερη ανάλυση επιτυγχάνεται στην εκτύπωση υποβοηθούμενη με laser, ενώ η εκτύπωση ψεκασμού μελάνης προτιμάται για την εκτύπωση των κυττάρων μαζί με την εξωκυττάρια μήτρα υποστήριξης τους [133].

Η 3D εκτύπωση μπορεί να αναπαράγει με μεγαλύτερη ακρίβεια σύνθετες αρχιτεκτονικές ανθρώπινων οργάνων, επιτρέποντας καλύτερη προσομοίωση βασικών λειτουργιών σε επίπεδο ιστού και οργάνου. Επιπλέον, μειώνει το χρόνο κατασκευής, συμβάλλοντας στην ταχεία παρασκευή πρωτοτύπων, καθώς δεν προαπαιτεί φωτολιθογραφικά παραγόμενες μήτρες, αλλά κατασκευάζει άμεσα τις επιθυμητές δομές [145]. Τα χαρακτηριστικά αυτά, καθιστούν τη μέθοδο εφαρμόσιμη σε εμπορευματοποιημένα προϊόντα και μεγάλης κλίμακας παραγωγή OoCs, καταλαμβάνοντας έτσι, σημαντική θέση και στη βιομηχανία. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί, που αφορούν στις μικρότερες διαστάσεις που μπορούν να επιτευχθούν (σήμερα μέχρι περίπου 350 μm), καθώς επίσης και στην αδυναμία συμβατότητας με ορισμένα υλικά [146]. Σε κάθε περίπτωση, η χρήση των τεχνικών 3D εκτύπωσης για την κατασκευή OoCs παρουσιάζει αυξητική τάση. Χαρακτηριστικά, οι Johnson et al. [147] μελέτησαν τον ρόλο της ψευδολύσσας κατασκευάζοντας μια 3D μικροδιάταξη νευρικού συστήματος με τεχνολογία 3D εκτύπωσης μικροεξώθησης (Σχήμα 1.11a), που αναπαριστά τις διεπιφάνειες νευραξόνων και νευρογλοιακών κυττάρων αρουραίου στο νευρικό σύστημα, χρησιμοποιώντας σιλικόνη, πολυκαπρολακτόνη και κυτταρικά εναιωρήματα.

Οι Lee et al. [148] κατασκεύασαν με 3D εκτύπωση μια μικροδιάταξη ήπατος διπλής ροής (Σχήμα 1.11b) για την προσομοίωση αγγειακών και χοληφόρων καναλιών, χρησιμοποιώντας πολυ(οξικού βινυλεστέρα αιθυλενίου) (poly (ethylene/vinyl acetate)/PEVA) ως δομικό υλικό της μικροδιάταξης και “βιομελάνια” ζελατίνης και ηπατικής αποκυτταρωμένης εξωκυττάριας μήτρας (dECM) για την κυτταρική εκτύπωση.

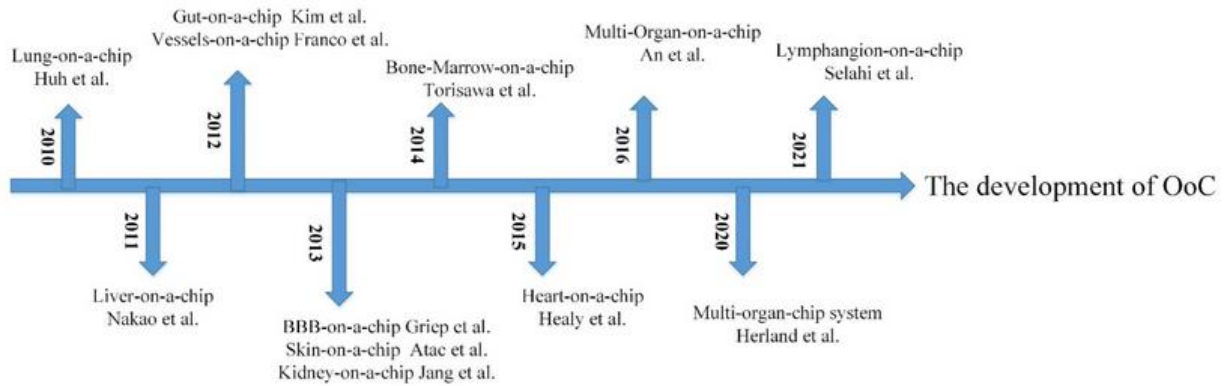


Σχήμα 1. 11. Σχέδιο της 3D μικροδιάταξης νευρικού συστήματος, κατασκευασμένου με 3D εκτύπωση μικροεξώθησης με ένα-προς-ένα αντιστοιχία των κυττάρων του νευρικού συστήματος μέσα στους εκτυπωμένους μικροθαλάμους, και συγκεκριμένα, των νευρώνων περιφερειακού νευρικού συστήματος (peripheral nervous system/PNS) στο θάλαμο 1, των κυττάρων Schwann στον θάλαμο 2, και των τερματικών κυτταρικών συνδέσεων στο θάλαμο 3. Εικόνες του κυκλικού πλέγματος με τα 3D εκτυπωμένα μικροκανάλια σιλικόνης προς καθοδήγηση νευραξονικών κυττάρων και της 3D υποστηρικτικής δομής που διαχωρίζει τη μικροδιάταξη σε 3 θαλάμους [147]. (b) Μικροδιάταξη ήπατος διπλής ροής (αγγειακής και χοληφόρου), κατασκευασμένη με 3D εκτύπωση [148].

1.3.3 Κατηγοριοποίηση και παραδείγματα μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα

Ήταν στις αρχές του 21^{ου} αιώνα, όταν ο Mike Shuler πρότεινε την ιδέα της χρήσης κυττάρων από διαφορετικά ανθρώπινα όργανα για την κατασκευή μικροδιάταξης ανθρώπινου ιστού σε ψηφίδα (tissue-on-a-chip) για την προσομοίωση του ανθρώπινου μικροπεριβάλλοντος [149]. Το γεγονός αυτό οδήγησε το 2010 τους Huh et al. [113] να εισαγάγουν για πρώτη φορά την έννοια της μικροδιάταξης οργάνου σε ψηφίδα, με την ανάπτυξη της μικροδιάταξης πνεύμονα σε ψηφίδα, μιας βιομιμητικής μικρορευστονικής διάταξης, που αναπαριστούσε τη διεπιφάνεια κυψελίδων και τριχοειδών αγγείων του πνεύμονα, αποδίδοντας τις μηχανικές, δομικές και λειτουργικές ιδιότητές της. Η κύρια διαφοροποίησή της σε σχέση με τις προηγούμενες προσπάθειες των μικροδιατάξεων ιστού σε ψηφίδα, ήταν η ενσωμάτωση σε μία διάταξη διαφορετικών ιστών ικανών να αναδημιουργήσουν ένα λειτουργικό μικροπεριβάλλον. Τα επόμενα χρόνια, ακολούθησαν επιτυχείς κατασκευές μικροδιατάξεων για το ήπαρ [125], τα νεφρά [150], την καρδιά [151,152], το έντερο [47], τα αγγεία [153], το δέρμα [154], το μυελό των οστών [155], και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain

barrier/BBB) [156]. Το Σχήμα 1.12 δείχνει το χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης των μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα.



Σχήμα 1. 12. Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης των μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα (OoCs), εκκινώντας το 2010 με την εργασία των Huh et al. [113], που εισήγαγαν τη μικροδιάταξη πνεύμονα σε ψηφίδα (lung-on-a-chip).

Συνολικά, οι μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα μπορούν να διακριθούν με βάση δύο διαφορετικά κριτήρια, (i) το πλήθος οργάνων που αναπαριστούν, αν δηλαδή είναι ένα ή περισσότερα, οπότε αντίστοιχα ονομάζονται μικροδιατάξεις ενός (single-organ systems), και πολλών οργάνων (multi-organ systems), καθώς και (ii) το σύστημα του οργάνου που προσομοιώνουν, που επηρεάζει την επιλεγόμενη αρχιτεκτονική, οπότε και διαχωρίζονται σε μικροδιατάξεις συμπαγών οργάνων (solid organ chips), και μικροδιατάξεις διεπιφάνειας ιστών (barrier tissue chips) [134].

Πιο αναλυτικά, ως προς την πρώτη κατηγοριοποίηση, οι μικροδιατάξεις ενός οργάνου επιτυγχάνουν σε υψηλό βαθμό βιολογική συγγένεια με το όργανο που προσομοιώνουν, επιτρέποντας την αξιολόγηση της λειτουργικότητάς του, και της απόκρισής του σε κάποιο ερέθισμα, όπως ενδεχομένως, μια ασθένεια, ένα φάρμακο, ή και γενικότερα, μια ένωση ή ένα μείγμα ενώσεων. Οι μικροδιατάξεις πολλών οργάνων παρέχουν ένα πλαίσιο για την εξέταση της πιθανής αλληλεπίδρασης ενός οργάνου με τουλάχιστον άλλο ένα, κυρίως μέσω της ανταλλαγής μεταβολιτών ή μορίων σηματοδότησης. Αποτελούνται από πολλαπλά κυτταρικά μικροπεριβάλλοντα σε μεταξύ τους επικοινωνία, και δίνουν τη δυνατότητα μοντελοποίησης της συστηματικής λειτουργίας του ανθρώπινου σώματος. Συνήθως, οι μικροδιατάξεις πολλών οργάνων αναφέρονται και ως μικροδιάταξη σώματος σε ψηφίδα (body-on-a-chip) [157]. Η επιλογή μίας μικροδιάταξης ενός ή πολλών οργάνων εξαρτάται από τις εκάστοτε λειτουργίες που χρειάζεται να προσομοιωθούν, και από τις απαιτήσεις τους ώστε το σύστημα να αποτελέσει ένα καλό μοντέλο των φυσιολογικών *in vivo* διεργασιών. Σε κάθε περίπτωση, ο βαθμός πολυπλοκότητας θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο που απαιτείται για την αναπαράσταση της βιολογικής εφαρμογής, χωρίς να εισάγονται περιττοί παράγοντες, οι οποίοι καθιστούν το σύστημα δύσκολο στη χρήση και την ανάλυση. Γενικώς, οι μικροδιατάξεις πολλών οργάνων περιλαμβάνουν πιο πολύπλοκο μηχανικό σχεδιασμό από τις μικροδιατάξεις ενός οργάνου, ώστε να επιτρέπεται ο έλεγχος της μεταφοράς και της κατανομής των θεραπευτικών υλικών μεταξύ των επιμέρους οργάνων. Αντίστοιχα, οι μικροδιατάξεις ενός οργάνου είναι περισσότερο βιολογικά λεπτομερείς ως προς την αρχιτεκτονική και τη λειτουργία ενός οργάνου, εν αντιθέσει με τις μικροδιατάξεις πολλών οργάνων, που χρησιμοποιούν λιγότερο

λεπτομερή μοντέλα για κάθε όργανο, εστιάζοντας στις συστημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οργάνων [157].

Ως προς τη δεύτερη κατηγοριοποίηση, στις μικροδιατάξεις συμπαγών οργάνων τα κύτταρα καλλιεργούνται ως τριδιάστατες μάζες ιστών, που μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και με το μέσο καλλιέργειας με καθορισμένο τρόπο. Παραδείγματα αυτού του τύπου αρχιτεκτονικής περιλαμβάνουν συστοιχίες μικροκυττάρων και μικροφρεατίων, που χρησιμοποιούνται συχνά σε μικροδιατάξεις του ήπατος, όγκων, καρδιάς, και λιπώδη ιστού [158,159]. Στις μικροδιατάξεις διεπιφάνειας ιστών, σχεδιάζεται συγκεκριμένη αρχιτεκτονική, η οποία υποστηρίζει τα κύτταρα να σχηματίσουν ένα φυσικό φράγμα μεταξύ δύο διαμερισμάτων, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη επιλεκτικών διαδικασιών μεταφοράς κατά μήκος του φραγμού. Τέτοιου είδους αρχιτεκτονικές απαντώνται τυπικά σε μικροδιατάξεις του εντέρου, των πνευμόνων και του δέρματος. Κι εδώ, η επιλογή του είδους της αρχιτεκτονικής για τη μικροδιάταξη, εξαρτάται από την τελική λειτουργικότητα που είναι επιθυμητό να μελετηθεί.

Παρακάτω αναλύονται συνοπτικά ορισμένα αντιπροσωπευτικά παραδείγματα μικροδιατάξεων που έχουν αναπτυχθεί, συμβάλλοντας σημαντικά στην εξέλιξη του κλάδου.

1.3.3.1 Μικροδιατάξεις ενός οργάνου σε ψηφίδα (single-organ systems)

A. Μικροδιάταξη πνεύμονα σε ψηφίδα (lung-on-a-chip)

Η μικροδιάταξη πνεύμονα σε ψηφίδα (lung-on-a-chip) ήταν ένα μνημειώδες επίτευγμα στην ανάπτυξη των ΟοCs, κι αυτό γιατί, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτέλεσε την απαρχή των εν λόγω συστημάτων, με την εργασία των Huh et al. το 2010 [113]. Συγκεκριμένα, κατασκεύασαν μια μικρορευστονική διάταξη PDMS που αναδομεί την κυψελιδική-τριχοειδή διεπιφάνεια του ανθρώπινου πνεύμονα, εισάγοντας κυκλική μηχανική διάταση, που προσομοιώνει τη φυσιολογική αναπνευστική κίνηση. Στο Σχήμα 1.13a φαίνεται η πολυστρωματική μικρορευστονική δομή της μικροδιάταξης, που αποτελείται από δύο κεντρικά μικροκανάλια, διαχωριζόμενα από μία λεπτή (10 μm) πορώδη μεμβράνη, εκατέρωθεν της οποίας καλλιεργούνται κυψελιδικά επιθηλιακά και πνευμονικά μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Πλευρικά των μικροκαναλιών υπάρχουν δύο μεγαλύτεροι μικροθάλαμοι για την κυκλική εφαρμογή κενού, η οποία προκαλεί ελαστική παραμόρφωση της μεμβράνης, αποδίδοντας τη φυσιολογική μηχανική τάση που ασκείται στη διεπιφάνεια κατά την αναπνοή. Η μικροδιάταξη χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της τοξικής επίδρασης ναοσωματιδίων διοξειδίου πυριτίου (SiO₂), από όπου διαπιστώθηκε ότι η αναπνευστική κίνηση μπορεί να αυξήσει σημαντικά την προφλεγμονώδη δραστηριότητα των ναοσωματιδίων, γεγονός που συνέβαλε σημαντικά στην ανάπτυξη οξείας φλεγμονής των πνευμόνων [113]. Τα πειραματικά αποτελέσματα απέδειξαν ότι σε σύγκριση με τα παραδοσιακά συστήματα στατικής καλλιέργειας, η μικροδιάταξη αποδίδει καλύτερα την κινητικότητα των μικροσκοπικών σωματιδίων στο ανθρώπινο σώμα, αποτελώντας ένα αξιόπιστο μέσο για τη μελέτη της αρχής διαφόρων ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος, αλλά και της τοξικότητας των φαρμάκων.

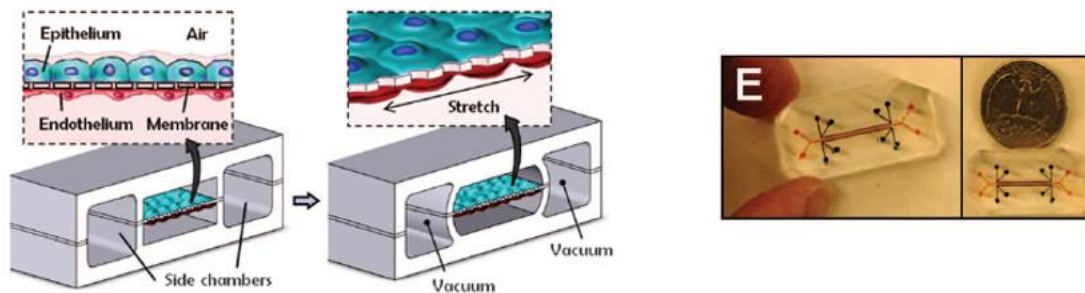
Πρόσφατα, οι Zamprogno et al. [160] σχεδίασαν τη δεύτερη γενιά της μικροδιάταξης πνεύμονα σε ψηφίδα, του οποίου η μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) του πνεύμονα, δηλαδή κολλαγόνο και ελαστίνη. Το πλεονέκτημα της βιολογικής μεμβράνης κολλαγόνου-ελαστίνης (CE) έναντι της προηγούμενα χρησιμοποιούμενης PDMS, είναι ότι παρουσιάζει μικρότερη προσρόφηση μικρών μορίων, και συγκεκριμένα της ροδαμίνης B που ελέγχθηκε. Ως εκ τούτου, η χρήση βιολογικών μεμβρανών, κατασκευασμένων από μόρια ECM, μπορεί να αποτελέσει καλή εναλλακτική της PDMS, σε εφαρμογές όπου ελέγχεται η βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων για τη μελέτη της επίδρασής τους στο όργανο.

B. Μικροδιάταξη ήπατος σε ψηφίδα (liver-on-a-chip)

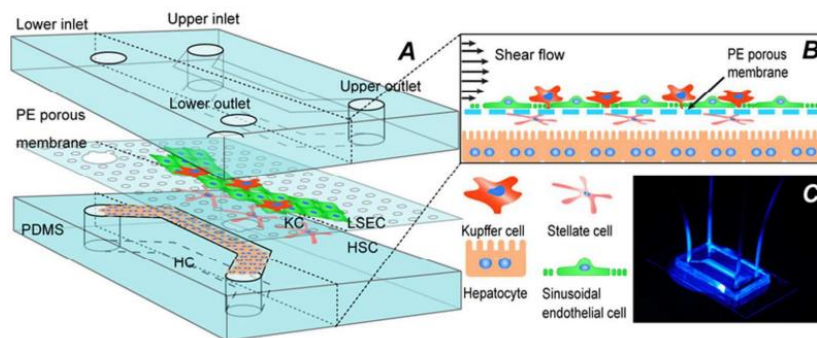
Το συκώτι είναι το μεγαλύτερο εσωτερικό όργανο του ανθρώπινου σώματος και διαδραματίζει βασικό ρόλο στη σύνθεση και το μεταβολισμό διαφόρων ουσιών, και ιδιαίτερα στο μεταβολισμό των φαρμάκων, γεγονός που καθιστά σημαντική την προσομοίωσή του για τον ακριβή *in vitro* έλεγχο της μεταβολικής διαδικασίας και της τοξικότητας φαρμάκων [161]. Μοντέλα ΟοCs ηπατικής τοξικότητας, που μιμούνται ηπατοκυτταρική βλάβη, στεάτωση, χολόσταση ή ίνωση, χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση ενώσεων φαρμάκων. Χαρακτηριστικά, οι Yu et al. [162] μελέτησαν τη χρόνια ηπατοτοξικότητα λόγω χορήγησης επαναλαμβανόμενων δόσεων φαρμάκων, κατασκευάζοντας μια μικροδιάταξη 3D καλλιέργειας σφαιροειδών ηπατοκυττάρων αρουραίου, που λειτουργεί ως επωαστήρας με ενσωματωμένο θερμοστοιχείο προς διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας, παγίδα φυσαλίδων, και παροχή 5% CO₂, το οποίο υπό πίεση καθοδηγεί τη ροή θρεπτικού υλικού. Η μικροδιάταξη αξιολόγησε τη χρόνια ανταπόκριση σε επαναλαμβανόμενες δόσεις Diclofenac και Acetaminophen στο τέλος 24 ημερών, με αποτελέσματα πιο ακριβή σε σχέση με αντίστοιχες μελέτες στατικής καλλιέργειας.

Εκτός αυτού, οι Du et al. [163] κατασκεύασαν μια μικροδιάταξη που αναπαράγει τα ηπατικά ιγμοροειδή, αποτελούμενο από δύο μικροκανάλια PDMS, διαχωριζόμενα από λεπτή πορώδη μεμβράνη πολυαιθυλενίου (polyethylene/PE), όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.13b. Χρησιμοποίησαν τέσσερα είδη ηπατικών κυττάρων, ενδοθηλιακά ιγμοροειδή κύτταρα (liver sinusoidal endothelial cells/LSECs), κύτταρα Kupfer, αστεροειδή κύτταρα και ηπατοκύτταρα, που εναποτέθηκαν στρώμα προς στρώμα στις δύο πλευρές της μεμβράνης PE. Η πλατφόρμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης της κυτταρικής συγκαλλιέργειας και της ροής στην έκκριση πρωτεϊνών, τον κυτταροτοξικό μεταβολισμό και την ανοσολογική απόκριση. Αποδείχτηκε ότι η συγκαλλιέργεια των LSECs με τους άλλους τρεις τύπους ηπατικών κυττάρων προάγει την προσέλκυση ουδετερόφιλων στην κυκλοφορία του αίματος.

a.



b.



Σχήμα 1. 13. α) Βιολογικά εμπνευσμένος σχεδιασμός της μικροδιάταξης “αναπνέοντος” πνεύμονα σε ψηφίδα (lung-on-a-chip), αποτελούμενος από διαμερισματοποιημένα μικροκανάλια PDMS για να διαμορφώσει το κυψελιδικό-τριχοειδές φράγμα σε μια λεπτή, πορώδη, και εύκαμπτη μεμβράνη PDMS επικαλυμμένη με πρωτεΐνη ECM. Η μικροδιάταξη προσομοιώνει τις φυσιολογικές αναπνευστικές κινήσεις των πνευμονικών κυψελίδων εφαρμόζοντας κενό στους πλευρικούς θαλάμους, προκαλώντας έτσι μηχανικό τέντωμα της μεμβράνης PDMS. Μακροσκοπική εικόνα της μικροδιάταξης πνεύμονα σε ψηφίδα, προβεβλημένη από πάνω [113]. β) Ανεπτυγμένη άποψη της μικροδιάταξης ήπατος σε ψηφίδα (liver-on-a-chip). Το ανώτερο και κατώτερο μικροκανάλι είναι κατασκευασμένα από PDMS και διαχωρίζονται από μια μεμβράνη PE. Τέσσερα είδη κυττάρων καλλιιεργούνται στρώμα-προς-στρώμα εκατέρωθεν της μεμβράνης PE. Ένθετο της φωτογραφίας της μικροδιάταξης ήπατος σε ψηφίδα [163].

Γ. Μικροδιάταξη νεφρού σε ψηφίδα (kidney-on-a-chip)

Η νεφροτοξικότητα θεωρείται κύριος λόγος για την απόσυρση ενός φαρμάκιου στην προκλινική φάση. Περίπου το 20% των φαρμάκων αποτυγχάνουν να περάσουν τις δοκιμασίες νεφροτοξικότητας και επομένως δεν μπορούν να προχωρήσουν στις κλινικές δοκιμές. Η συμπερίληψη βιοφυσικών ερεθισμάτων σε μοντέλα ΟοCs ήπατος, όπως για παράδειγμα διατμητικής τάσης από την ενσωμάτωση ροής, αποδείχθηκε ότι ενισχύει την εκροή φαρμάκων και την πρόσληψη λευκωματίνης, καθώς το επιθήλιο στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια εκτίθεται συνεχώς σε διατμητική τάση [164]. Οι Musah et al. [165] δημιούργησαν ένα *in vitro* μοντέλο του ανθρώπινου νεφρικού σπειράματος, που αναπαριστά επιτυχώς τη λειτουργία του ως φυσιολογικό φραγμό διήθησης (Σχήμα 1.14α). Συγκεκριμένα, η μικροδιάταξη είναι κατασκευασμένη εξ' ολοκλήρου από PDMS, και αποτελείται από δύο μικροκανάλια διαχωριζόμενα από μια πορώδη μεμβράνη PDMS, η οποία παίζει το ρόλο του τριχοειδούς σπειραματικού τοιχώματος, διαχωρίζοντας τα ποδοκύτταρα του ουροποιητικού συστήματος του άνω μικροκαναλιού από τα σπειραματικά ενδοθηλιακά στο κάτω μικροκανάλι. Παράλληλα, ενσωμάτωνε άσκηση κυκλικών μηχανικών τάσεων με εφαρμογή κενού σε πλευρικούς μικροθαλάμους, καθώς και διατμητικών τάσεων στα κύτταρα με την παροχή ροής. Ως αποτέλεσμα, η μικροδιάταξη απέδωσε επιτυχώς τη λειτουργία του σπειράματος για τη διαφορική κάθαρση λευκωματίνης και ινουλίνης.

Αντίστοιχα, οι Wang et al. [166] ασχολήθηκαν με την προσομοίωση του νεφρικού σπειράματος σε μικροδιάταξη, εστιάζοντας στη μελέτη της διαβητικής νεφροπάθειας, μιας σημαντικής χρόνιας νεφρικής επιπλοκής του σακχαρώδη διαβήτη, που αποτελεί την κύρια αιτία νεφρικής νόσου τελικού σταδίου. Η μικροδιάταξη αποτελείται από παράλληλα μικροκανάλια PDMS επενδεδυμένα από απομονωμένους πρωτογενείς σπειραματικούς μικροϊστούς, διαβρεχόμενους από θρεπτικό υλικό, κατ'αναλογία της ροής αίματος στο σπείρωμα. Το δίκτυο μικροκαναλιών αναπαριστά το φράγμα σπειραματικής διήθησης (glomerular filtration barrier/GFB), το οποίο αποτελείται από τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα

ποδοκύτταρα και τη σπειραματική μεμβράνη βάσης (glomerular basement membrane/GBM). Το εν λόγω μοντέλο κατάφερε να ανακεφαλαιώσει τις κρίσιμες παθολογικές αποκρίσεις που προκαλούνται από καταστάσεις υψηλής γλυκόζης, χαρακτηριστικές της διαβητικής νεφροπάθειας.

Δ. Μικροδιάταξη καρδιάς σε ψηφίδα (heart-on-a-chip)

Η καρδιά είναι ένα από τα λιγότερο αναγεννητικά όργανα του σώματος αλλά και ένα από τα πιο σημαντικά. Τα τελευταία χρόνια, τα καρδιαγγειακά προβλήματα υγείας αυξάνονται, και έχουν κερδίσει ιδιαίτερη προσοχή, γεγονός που καθιστά σημαντική την κατανόηση της παθογένειάς τους. Έχει αποδειχθεί ότι ο ρυθμός των καρδιομυοκυττάρων χρησιμοποιείται συνήθως για την αξιολόγηση της ικανότητας άντλησης της καρδιάς, καθώς και των επιδράσεων φαρμάκων της καρδιάς [167]. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Grosberg et al. [168] σχεδίασαν μία μικροδιάταξη καρδιάς σε λεπτή επίστρωση PDMS χρησιμοποιώντας την τεχνική κατασκευής μυϊκής μεμβράνης (muscular thin film/MTF). Πρόκειται για μια βιοϋβριδική διάταξη ανισότροπου κοιλιακού μυοκαρδίου σε επίστρωση PDMS για τη μέτρηση της συσταλτικότητας των μυοκυττάρων, και τον ποσοτικό προσδιορισμό της διάδοσης του δυναμικού δράσης. Χρησιμοποιήθηκε εκτύπωση μικροεπαφών (microcontact printing) για την αποτύπωση συστοιχιών φμπρονεκτίνης πάνω στο PDMS, στις οποίες στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν καρδιακά μυοκύτταρα νεογνών αρουραίων, επιτυγχάνοντας την κατευθυνόμενη αυτο-οργάνωσή τους. Τοποθέτηση ηλεκτροδίων στις συστοιχίες, προκαλεί συσπάσεις των μυοκυττάρων και καμπύλωση της μεμβράνης, καθιστώντας έτσι εφικτή τη μέτρηση της συσταλτικότητας των κυττάρων από τη μέτρηση του βαθμού καμπύλωσης της μεμβράνης. Αργότερα, οι Marsano et al. [169] εξέτασαν το φυσιολογικό μικροπεριβάλλον των καρδιακών μυοκυττάρων, ενσωματώνοντας τη φυσιολογική μηχανική του οργάνου στο σχεδιασμό της μικροδιάταξης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.14b. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή κυκλικής μηχανικής τάσης οδήγησε σε ανώτερη καρδιακή διαφοροποίηση, καθώς και ηλεκτρική και μηχανική σύζευξη των μυοκυττάρων, παρέχοντας ένα λειτουργικό τριδιάστατο καρδιακό μοντέλο για την πρόβλεψη υπερτροφικών αλλαγών στον καρδιακό φαινότυπο.

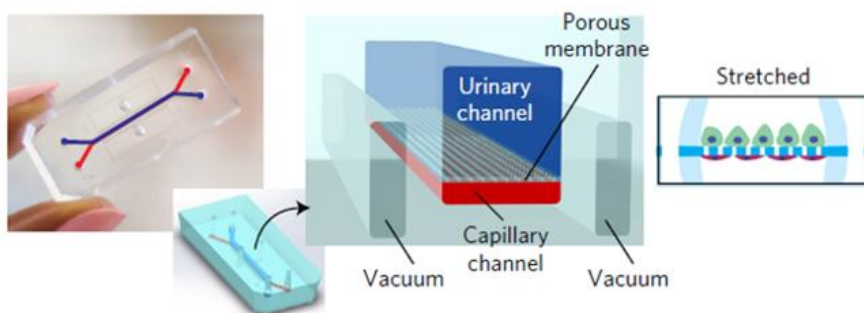
Ε. Μικροδιάταξη αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε ψηφίδα (blood-brain barrier-on-a-chip)

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (blood-brain barrier/BBB) είναι μια σημαντική ρυθμιστική διεπιφάνεια μεταξύ του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Είναι σημαντικός για τη διατήρηση των λειτουργιών του εγκεφάλου και της ομοιόστασης του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς μπορεί να αποτρέψει την είσοδο τοξικών ουσιών στον εγκέφαλο [170]. Μια ποικιλία νευρολογικών παθήσεων σχετίζονται με τραυματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [171], καθιστώντας σημαντική την καθιέρωση ενός αποτελεσματικού *in vitro* μοντέλου για τη μελέτη της υγείας του ανθρώπινου εγκεφάλου. Τα κύτταρα στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό περιλαμβάνουν κυρίως μικροαγγειακά ενδοθηλιακά εγκεφαλικά κύτταρα, αστροκύτταρα και περικύτταρα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οποίων επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη λειτουργία του φραγμού [172]. Οι Jeong et al. [173] κατασκεύασαν μια πλατφόρμα, αποτελούμενη από δύο επίπεδα PDMS, διαχωριζόμενα από μια μεμβράνη πολυανθρακικού (PC). Κάθε επίπεδο έφερε 4 συστοιχίες μικροκαναλιών, με τις συστοιχίες κάθε επιπέδου να είναι μεταξύ τους κάθετες, δημιουργώντας έτσι 14 σημεία διασταύρωσης των συστοιχιών. Στα μικροκανάλια του άνω επιπέδου καλλιεργούνταν ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ στον κάτω αστροκύτταρα, διαμορφώνοντας 14 μικροπεριβάλλοντα αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Περαιτέρω ενσωμάτωση ηλεκτροδίων και παροχή ροής απέδωσε μια πιστή αναπαραγωγή της *in vivo* δράσης

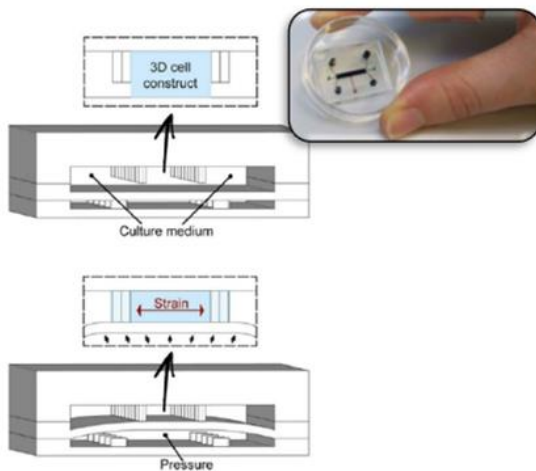
του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, δημιουργώντας ισχυρότερες συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων και μειώνοντας τη διαπερατότητα του φραγμού.

Αργότερα, οι Park et al. [174] κατασκεύασαν μια δεύτερης γενιάς μικροδιάταξη, το οποίο απέδιδε καλύτερα τη φυσιολογία και τη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αναπαράγοντας τη διεπιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με συγκαλλιέργεια αστροκυττάρων και περικυττάρων. Η μικροδιάταξη, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.14c, αποτελείται από δύο παράλληλα μικροκανάλια PDMS, διαχωριζόμενα από μια πορώδη μεμβράνη τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου poly(ethylene terephthalate)/PET), όπου στην άνω πλευρά της καλλιεργείται μια μίξη αστροκυττάρων και περικυττάρων, και στην κάτω ενδοθηλιακά κύτταρα. Το εγκεφαλικό ενδοθήλιο διατήρησε ισχυρές συνδέσεις για 8 ημέρες καλλιέργειας και εμφάνισε επιλεκτική διακυττάρωση πεπτιδίων και αντισωμάτων, ανάλογη των *in vivo* μελετών.

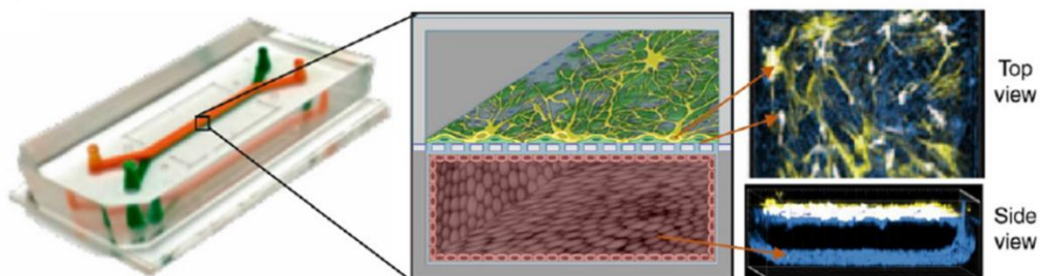
a.



b.



c.



Σχήμα 1. 14. a) Φωτογραφία (αριστερά) και σχηματική αναπαράσταση (δεξιά) μικροδιάταξης νεφρού σε ψηφίδα (kidney-on-a-chip), αποτελούμενης από μικροκανάλια που αναπαράγουν το σουροποιητικό και το τριχοειδές διαμέρισμα του νεφρικού σπειράματος, διαχωριζόμενα από λεπτή εύκαμπτη μεμβράνη PDMS που λειτουργεί ως σπειραματική

μεμβράνη βάσης (glomerular basement membrane/GBM). Κυκλική μηχανική καταπόνηση εφαρμοζόμενη στα κύτταρα της μεμβράνης επιτυγχάνεται με την εφαρμογή κενού στους πλευρικούς θαλάμους [165]. b) Ανεπτυγμένη άποψη της μικροδιάταξης καρδιάς σε ψηφίδα (heart-on-a-chip). Στο κεντρικό μικροκανάλι καλλιεργούνται καρδιομυοκύτταρα σε μήτρα γέλης, και η μεμβράνη PDMS παραμορφώνεται ασκώντας πίεση στο κάτω μικροκανάλι. Λόγω παρουσίας ανοιγμάτων μεταξύ των μικροκολώνων, η συμπίεση μεταφράζεται σε μονοαξονικές παραμορφώσεις που εφαρμόζονται στα κύτταρα. Ένθετο φωτογραφίας της μικροδιάταξης καρδιάς σε ψηφίδα [169]. c) Μικροδιάταξη αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε ψηφίδα (blood-brain barrier-on-a-chip). Φωτογραφία (αριστερά), σχηματική απεικόνιση (κέντρο) και μικρογραφίες ανοσοφθορισμού (δεξιά) της μικροδιάταξης. Εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργούνται στο αγγειακό μικροκανάλι και μία μίξη αστροκυττάρων και περικυττάρων στο παρεγχυματικό μικροκανάλι. Επάνω και κάτω δεξιά, εικόνες διατομής και πλάγιας άποψης των φθορισμένων κυττάρων (περικύτταρα με χρώση κίτρινη F-ακτίνης, αστροκύτταρα με χρώση λευκή GFAP, και ενδοθηλιακά κύτταρα με χρώση μπλε ZO-1) [174].

1.3.3.2 Μικροδιάταξεις πολλών οργάνων σε ψηφίδα (multi-organ systems)

Δεδομένων των εκτεταμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των οργάνων του ανθρώπινου σώματος, μία ανεξάρτητη μικροδιάταξη οργάνου σε ψηφίδα δεν μπορεί να ανακεφαλαιώσει πλήρως την πολυπλοκότητα ενός οργανισμού [175]. Τα τελευταία χρόνια, έχει καταγραφεί αξιοσημείωτη προσπάθεια ενσωμάτωσης της τεχνολογίας OoCs σε πολλά όργανα μέσω του εγχειρήματος “μικροδιάταξη σώματος σε ψηφίδα (body-on-a-chip)”. Πρόκειται για ολοκληρωμένα συστήματα με πολλαπλά κυτταρικά μικροπεριβάλλοντα, που συνδέονται μεταξύ τους μέσω αγγειακών μικροακαναλιών, όπως συμβαίνει φυσιολογικά στο ανθρώπινο σώμα, με σκοπό να προσομοιώσουν τη λειτουργία του ανθρώπινου σώματος σε επίπεδο συστήματος. Τέτοιου είδους συστημική μελέτη είναι μέχρι σήμερα επικεντρωμένη κυρίως στη μελέτη και την αξιολόγηση της απόκρισης των οργάνων σε φάρμακα. Κι αυτό γιατί, για την έγκριση ενός φαρμάκου είναι σημαντικό να εξεταστεί ο τρόπος με τον οποίο το χειρίζεται ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα, και συγκεκριμένα, να αξιολογηθεί ο τρόπος με τον οποίο το απορροφά, διανέμει, μεταβολίζει και αποβάλλει (γνωστά συντημητικά ως ADME (Absorbs – Distributes – Metabolizes – Eliminates) ή πώς η ορμονική σηματοδότηση ενορχηστρώνεται σε πολλά όργανα [176]. Συνεπώς, η μελέτη της φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής (PK/PD) για την καταγραφή των βιοχημικών και φυσιολογικών πτυχών των φαρμάκων ευνοείται σε τέτοιου είδους πολυόργανα μικροευστονιακά συστήματα.

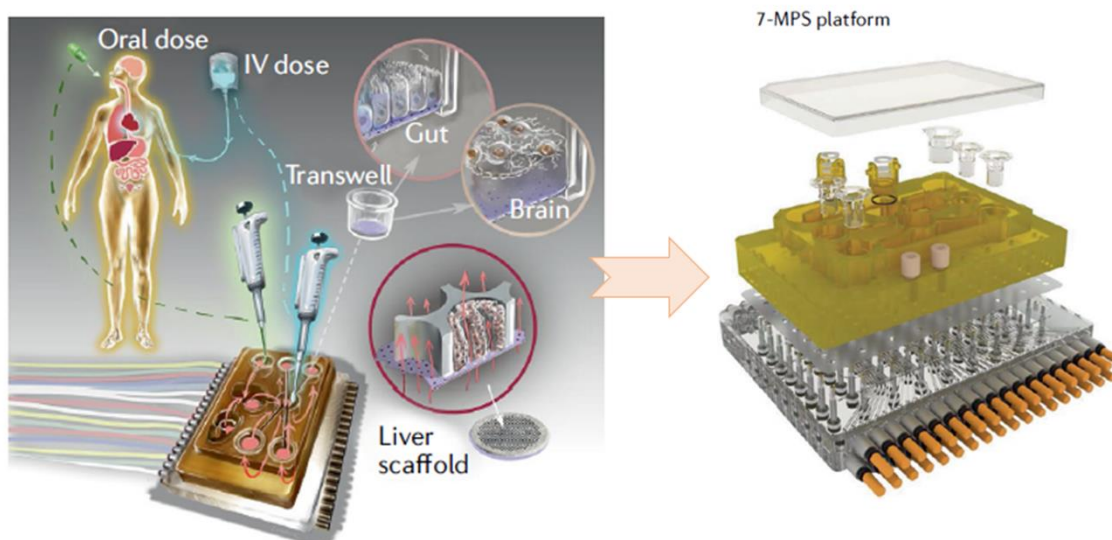
Οι Choe et al. [177] κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη εντέρου και ήπατος (gut-liver-on-a-chip) για να μελετήσουν τον “μεταβολισμό πρώτης διόδου (first pass metabolism)” του φαρμάκου, με σκοπό να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητά του στο σημείο δράσης. Ένα άλλο επίτευγμα στον τομέα αυτό, σημειώθηκε από τους Schimek et al. [178], οι οποίοι συγκαλλιέργησαν κύτταρα πνεύμονα και ήπατος, για τη μελέτη της πρόσβασης των εισπνεόμενων τοξικών ουσιών. Οι Skardal et al. [179] ενσωμάτωσαν τρεις διαφορετικούς ιστούς σε μια πλατφόρμα, συμπεριλαμβανομένων του πνεύμονα, του ήπατος και της καρδιάς για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη χορήγηση φάρμακων.

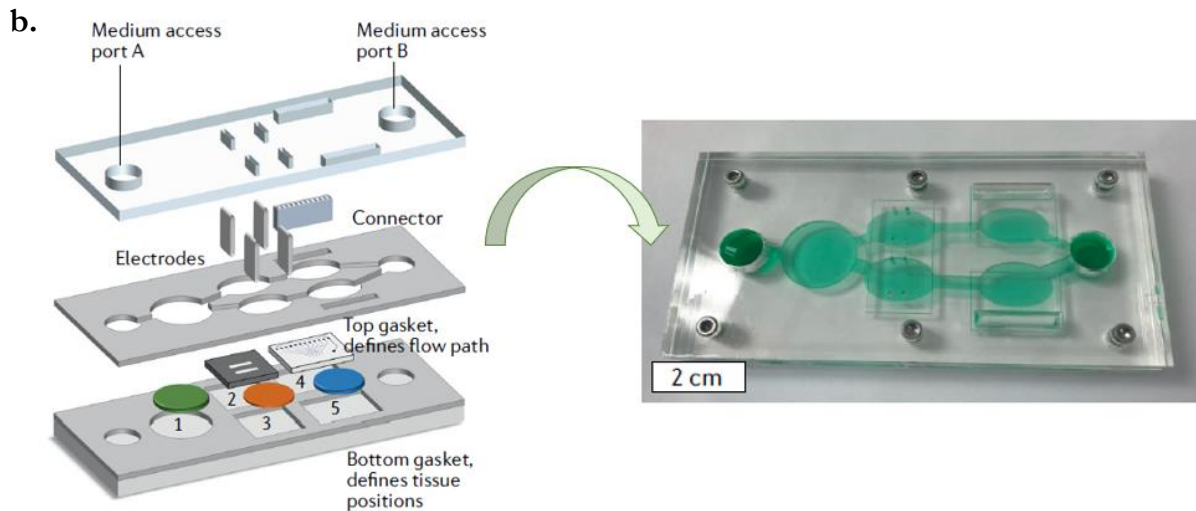
Προχωρώντας σε μεγαλύτερο πλήθος οργάνων, οι Edington et al. [180] ανέπτυξαν ένα φυσιολογικά σχετιζόμενο σύστημα πολλαπλών οργάνων για την ανακάλυψη φαρμάκων, το οποίο περιελάμβανε τέσσερα, επτά ή δέκα μοντέλα οργάνων, τα οποία συνδυάζονταν με ενσωματωμένα ρευστονιακά κυκλώματα για τη μελέτη των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 1.15a). Συγκεκριμένα, το σύστημα κατασκευάστηκε από πολυσουλφόνη και πολυουρεθάνη, και διαθέτει ενσωματωμένες ελεγχόμενες βαλβίδες πίεσης αέρα, που λειτουργούν ως αντλίες για την ανακυκλοφορία θρεπτικών υλικών. Το σύστημα άντλησης ενσωματώνεται στην τελική συσκευή, απαιτώντας μόνο εξωτερική πίεση αέρα για τη ρύθμιση των βαλβίδων μέσω λογισμικού. Τα

όργανα που μοντελοποιήθηκαν ήταν ανθρώπινης προέλευσης και περιλάμβαναν, μεταξύ άλλων, το νεφρό, τους μύες, το ήπαρ, την καρδιά και το έντερο. Ως προς τη λειτουργία του, χορηγήθηκε το φάρμακο δικλοφενάκη στο τμήμα του εντέρου, όπου απορροφήθηκε και στη συνέχεια, κατανεμήθηκε μεταξύ των άλλων μοντέλων οργάνων. Το εν λόγω σύστημα, αν και διαθέτει σημαντική πολυπλοκότητα περιφερειακού συστήματος υποστήριξης (για παράδειγμα, ένας ελεγχτής πίεσης/κενού 36 καναλιών), απάντησε σε περίπλοκα επιστημονικά ερωτήματα.

Μια διαφορετική προσέγγιση στην ανάπτυξη των μικροδιατάξεων πολλών οργάνων, περισσότερο κατάλληλη για βιολογικές εφαρμογές, και με λιγότερη έμφαση στους ακριβείς χειρισμούς μεμονωμένων μικροκαναλιών, συστήθηκε από τους McAleer et al. [181], με σκοπό τη δοκιμή της αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας διαφόρων αντικαρκινικών παραγόντων (Σχήμα 1.15b). Ειδικότερα, το σύστημα περιείχε ένα επαναδιαμορφώσιμο σχέδιο με πολλαπλά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων προερχόμενων από συμπαγή όγκο και λευχαιμία, για τη διερεύνηση των επιδράσεων των αντικαρκινικών παραγόντων στον στόχο τους, καθώς και των τοξικών επιδράσεων στα άλλα όργανα. Το σύστημα κατασκευάστηκε κύρια από PDMS και γυαλί, διευκολύνοντας έτσι την κατασκευή του, ενώ δε διέθετε αντλία, καθιστώντας το φιλικό προς το χρήστη, καθώς απαιτούσε λιγότερα μηχανήματα υποστήριξης.

a.








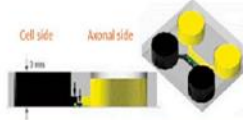

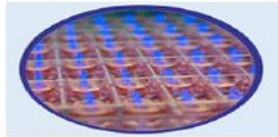



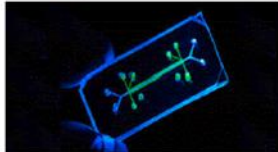

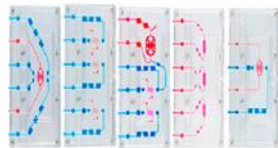
Σχήμα 1. 15. a) Σχηματικό διάγραμμα μίας επαναδιαμορφώσιμης μικροδιάταξης πολλών οργάνων σε ψηφίδα (multi-organ systems), που τέσσερα, επτά ή δέκα διαφορετικά μοντέλα οργάνων, με δυνατότητα μεταξύ τους αλληλεπίδρασης μέσω μικροαναλιών (αριστερά). Εικόνα της πολυεπίπεδης συσκευής, όπου διακρίνονται όλες οι συνδέσεις για την παροχή θρεπτικών υλικών και τα κανάλια αέρα για την ενεργοποίηση των ενσωματωμένων μικροαντλιών (δεξιά) [180]. b) Ανεπτυγμένη άποψη της μικροδιάταξης πολλών οργάνων, όπου φαίνονται τα συνιστώσα επίπεδά της, και συγκεκριμένα, το επίπεδο καλλιέργειας κυττάρων ήπατος (1), καρδιάς με τις συστοιχίες μικροηλεκτροδίων ((2) και (4), αντίστοιχα), καρδίνου του αιδοίου (3), και καρδίνου του μαστού (5), καθώς και το επίπεδο με τις ενσωματωμένες δομές ανάγνωσης και το επίπεδο με τις θύρες πρόσβασης (αριστερά). Εικόνα της μικροδιάταξης, διαρροεμένης με πράσινη βαφή προς καλύτερη οπτικοποίηση [181] (δεξιά).

1.3.4 Εταιρίες κατασκευής μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα

Η ραγδαία ανάπτυξη που παρουσιάζουν τα ΟοCs ως πολλά υποσχόμενες βιομιμητικές πλατφόρμες, οδήγησε ήδη από τις αρχές του 2010 στην ίδρυση νεοφυών επιχειρήσεων για την εμπορευματοποίηση των ΟοC, χρησιμοποιώντας τη δική τους καινοτόμο τεχνολογία, όπως η Emulate Inc., η TissUse, κ.ά. Ο Πίνακας 1.1 παρουσιάζει μια λίστα των σημαντικότερων εταιριών και επιλεκτικά ορισμένα προϊόντα τους. Ορισμένες εταιρίες εξειδικεύονται στην κατασκευή μικροδιατάξεων ενός οργάνου, ενώ άλλες παράγουν μικροδιατάξεις πολλών οργάνων. Σε κάθε περίπτωση, η κάθε εταιρία προτείνει τη δική της μοναδική τεχνολογία, η οποία διαθέτει συγκεκριμένες εφαρμογές, μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει ένα σημαντικό χάσμα μεταξύ των αναγκών της αγοράς και των διαθέσιμων τεχνολογιών και φαίνεται ότι οι νέες εταιρίες θα πρέπει να παρουσιάσουν αξιοσημείωτη πρόοδο για να αποδείξουν την προγνωστική εγκυρότητα και την επαναληψιμότητα των πλατφορμών ΟοCs σε κρίσιμες εφαρμογές, όπως η μοντελοποίηση ασθενειών και η ανακάλυψη φαρμάκων.

Συνοπτικά, η υιοθέτηση μιας τεχνολογίας ΟοCs από τη βιομηχανία, είναι χρονοβόρα και απαιτητική διαδικασία, καθώς προϋποθέτει άφθονη έρευνα, ώστε να αποδειχθεί ότι οι προτεινόμενες συσκευές ΟοCs αποτελούν έμπιστα βιομιμητικά συστήματα, πριν να διοχετευθούν στην αγορά και να υπηρετήσουν φαρμακοβιομηχανίες και γενικότερα, επιταγές της υγειονομικής περιθαλψής.

Πίνακας 1. 1. Εταιρίες που κατασκευάζουν μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (ΟοCs) και ορισμένα προϊόντα τους.

Company	Product Image	Selected Products
		3D Cell Culture- on-a-Chip
		Standard/Triple Chamber Neuron Device
		MyrPlate MyrScreen
		HUMIMIC Chip2 HUMIMIC Chip4
		Liver Bio-Kit Intestine Bio-Kit Kidney Bio-Kit
		ParVivo™ Microfluidic-on-a-Chip

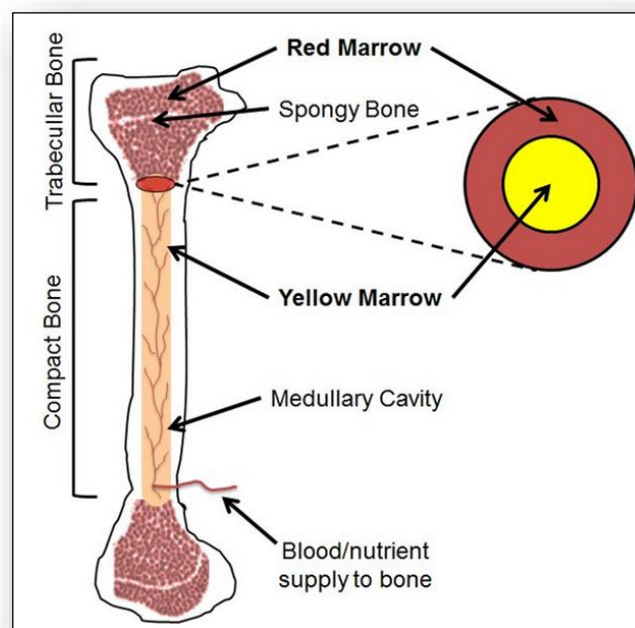


1.4 Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow on-a-chip)

Ο μυελός των οστών αποτελεί ένα σύνθετο όργανο, που είναι υπεύθυνο για κρίσιμες διεργασίες για την επιβίωση του ανθρώπου, όπως είναι η αιμοποίηση και η στελέχωση του λεμφικού συστήματος. Συνεπώς, η δημιουργία 3D βιομιμητικών μοντέλων για την αξιόπιστη αναπαραγωγή της *in vivo* φυσιολογίας και λειτουργικότητάς του είναι υψίστης σημασίας για την καλύτερη κατανόηση του οργάνου, και την αντιμετώπιση ή και πρόβλεψη των σχετιζόμενων ασθενειών. Σε αυτό το πλαίσιο, οι μικροδιατάξεις μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip) αναδύονται ως οι ιδανικές πλατφόρμες *in vitro* μελέτης του μυελού των οστών, με σημαντικές εργασίες να καταγράφονται σχετικά πρόσφατα, από το 2014. Αποτελώντας το αντικείμενο έρευνας της συγκεκριμένης διατριβής, στις ενότητες που ακολουθούν αναλύονται οι πιο αξιοσημείωτες εργασίες ανάπτυξης μικροδιατάξεων μυελού των οστών, στα πλαίσια των σύγχρονων state-of-the-art εξελίξεων. Προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα ο σχεδιασμός, η αρχιτεκτονική και οι εφαρμογές των εν λόγω μικροδιατάξεων, είναι σημαντικό να προηγηθεί μια παρουσίαση του ίδιου του οργάνου, της αιμοποιητικής του περιοχής και των κυττάρων που τη συνθέτουν.

1.4.1 Μυελός των οστών – φυσιολογία και δομή του

Ο μυελός των οστών (bone marrow/BM) είναι μαλακός, εύκαμπτος, σπογγώδης ιστός που εδράζεται στο εσωτερικό των οστών, και συγκεκριμένα στα επίπεδα και μακρά οστά. Του αποδίδεται ο ζωοποιητικός ρόλος της αιμοποίησης, ενώ αποτελεί και τμήμα του λεμφικού συστήματος, συμβάλλοντας στη θωράκιση του ανοσοποιητικού συστήματος [182]. Διαχωρίζεται στον ερυθρό μυελό των οστών (red bone marrow), που ασχολείται με την αιμοποίηση, και τον κίτρινο ή ωχρό μυελό των οστών (yellow bone marrow) (Σχήμα 1.16) [183], ο οποίος δεν είναι πλέον αιμοποιητικά ενεργός, αλλά είναι ένας έμμεσος αιμοποιητικός ρυθμιστής, και αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα και κύτταρα στρώματος [184]. Ο ερυθρός μυελός των οστών βρίσκεται κυρίως σε μακρά οστά, όπως το μηριαίο και το βραχιόνιο, αλλά και στα επίπεδα οστά του στήθους, της λεκάνης, των πλευρών, της ωμοπλάτης, του κρανίου, και των σπονδύλων, ενώ ο ωχρός μυελός των οστών εντοπίζεται κυρίως στα μακρά οστά. Ο ερυθρός μυελός, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί την περιοχή όπου παράγονται τα αρχέγονα **αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (hematopoietic stem cells/HSCs)**, τα οποία αυτο-ανανεώνονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα αιμοσφαίρια, όπως λεμφοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια) και άλλα κύτταρα (π.χ. μακροφάγα ή θρομβοκύτταρα) που διανέμονται στο σώμα μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας [185].



Σχήμα 1. 16: Σχηματική απόδοση της ανατομίας ενός μακρού οστού, που διαχωρίζεται στο δοικιδωτό οστό (trabecular bone), όπου εντοπίζεται ο ερυθρός μυελός των οστών (red bone marrow), και στο συμπαγές οστό, τοποθεσία του κίτρινου ή ωχρού μυελού των οστών (yellow bone marrow) [183].

Η λειτουργία των HSCs ορίζεται ως η ικανότητα δημιουργίας όλων των γενεαλογιών κυττάρων αίματος, και διατήρησης της παραγωγής τους εφ' όρου ζωής. Η ιεραρχία των HSCs αποδίδεται σχηματικά στο Σχήμα 1.17a, όπου διακρίνεται η ταξινόμησή τους σε δύο υποσύνολα, τα μακροπρόθεσμα HSCs (long-term HSCs/LT-HSCs) και τα βραχυπρόθεσμα HSCs (short-term HSCs/ST-HSCs), εκ των οποίων μόνο τα

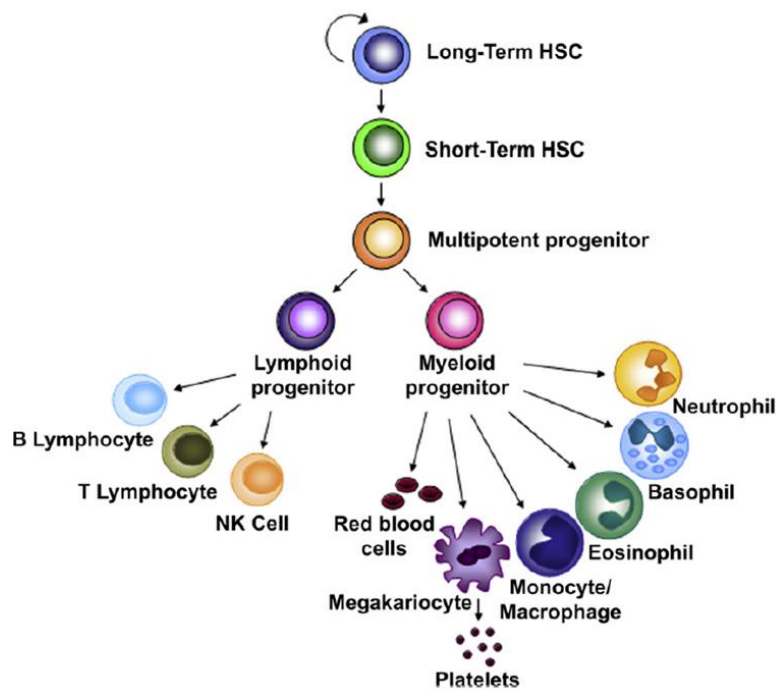
μακροπρόθεσμα HSCs μπορούν να υποβληθούν σε απεριόριστες αυτο-ανανεώσιμες διαιρέσεις, οι οποίες επιτρέπουν τη διατήρηση ενός πλήθους βλαστοκυττάρων, διασφαλίζοντας τη δια βίου ανασύσταση του αίματος [186]. Συνεχίζοντας, μεταβαίνοντας προς προσδευτική απώλεια ικανότητας αυτο-ανανέωσης, ακολουθούν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (multi-potent progenitors/MPPs), διαχωριζόμενα σε λεμφοειδείς και μυελοειδείς προγόνους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αιμοποιητικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα (hematopoietic stem and progenitor cells/HSPCs) περιλαμβάνουν τόσο τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, όσο και τους απογόνους τους, τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα. Τέλος, ακολουθούν τα τερματικά διαφοροποιημένα ώριμα κύτταρα [187,188], στα οποία συγκαταλέγονται τα μεγακαρουκύτταρα, τα ερυθροκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα (B και T λεμφοκύτταρα), τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells/NK cells), τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα. Τα κύτταρα αυτά, αν και δεν μπορούν να αυτο-ανανεωθούν, είναι κρίσιμα για τη διατήρηση της ομοιόστασης της αιμοποίησης και την ανοσολογική ανανέωση του αίματος [187,189–191].

Βασικά κύτταρα για τη διατήρηση των HSCs και της λειτουργίας τους είναι τα **μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchymal stem cells/MSCs)** ή **κύτταρα στρώματος μυελού των οστών (bone marrow stromal cells/BMSCs)** [192], καθώς συμβάλλουν στον έλεγχο ή επηρεάζουν τη μετανάστευση των HSCs [193], και εκφράζουν σε υψηλά ποσοστά αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες, κρίσιμους για τη συντήρηση των HSCs, όπως η χημειοκίνη (CXCL12) [194,195], μόρια προσκόλλησης σε αγγειακά κύτταρα [196,197], τον βλαστοκυτταρικό παράγοντα (stem cell factor/SCF) [193] και την οστεοποντίνη [198]. Τα MSCs έχουν επίσης την ικανότητα να αυτο-ανανεώνονται, και να διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες και λιποκύτταρα, αποτελώντας έτσι, υποστηρικτικό ιστό για την ανάπτυξη των HSCs [199,200]. Τα HSCs ενός ενήλικα εντοπίζονται κυρίως σε ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον εντός του μυελού των οστών, που ονομάζεται **αιματοποιητική περιοχή (hematopoietic niche)**. Πρόκειται για μια σύνθετη δομή, ευρισκόμενη συγκεκριμένα στη δοκιδωτή/σπογγώδη περιοχή του μυελού, αποτελούμενη από πολλαπλά είδη κυττάρων, την εξωκυττάρια μήτρα (ECM), και εκκρινόμενους παράγοντες, που στο σύνολό τους προάγουν τη διατήρηση, τη διαφοροποίηση και τη ρύθμιση της λειτουργίας των HSCs [201]. Ειδικότερα, η αιμοποιητική περιοχή είναι υπεύθυνη να διατηρεί ένα πληθυσμό πολυδύναμων HSCs, να τα κινητοποιεί, όπως απαιτείται, στην κυκλοφορία, και τέλος, να συμβάλλει στη διαφοροποίησή τους στα αιμοποιητικά προγονικά, καθώς και στα ώριμα κύτταρα. Για την επιτέλεση του ρόλου της, είναι πρωταρχικής σημασίας η σύμπραξη των MSCs, που όπως αναλύθηκε παραπάνω, είναι απαραίτητα για τη συντήρηση της αιμοποίησης. Εκτός όμως των MSCs, υπάρχουν και άλλα κύτταρα που συντονίζουν τη λειτουργία των HSCs, όπως ενδοθηλιακά, περιαγγειακά, οστεοβλάστες, ινοβλάστες, νευρικά και μυϊκά κύτταρα, και μακροφάγα [202–204].

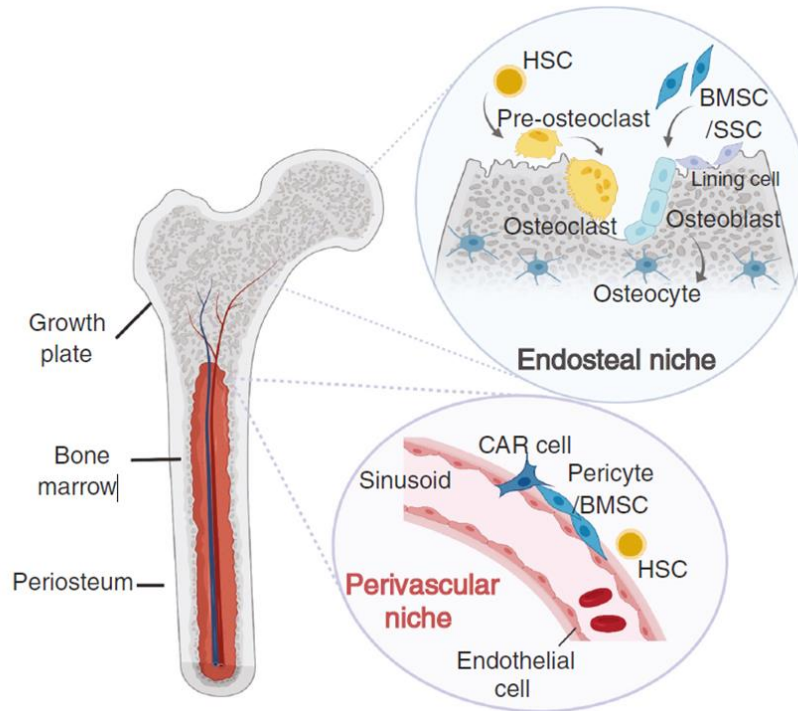
Η αιμοποιητική περιοχή οργανώνεται σε δύο κύριες περιοχές, την **ενδοστεϊκή (endosteal niche)**, που εντοπίζεται στην επιφάνεια του φλοιώδους και δοκιδωτού οστού, και την **περιαγγειακή (perivascular niche)**, που περιβάλλει τα αγγεία, όπως αποδίδεται στο Σχήμα 1.17b. Οι δύο περιοχές χαρακτηρίζονται από διαφορετική φυσιολογία, πρωτεΐνες και είδη κυττάρων, και η μεταξύ τους συντονισμένη λειτουργία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της αιμοποίησης. Η ενδοστεϊκή περιοχή περιέχει κολλαγόνο τύπου I και IV, οστεοποντίνη και φμπρονεκτίνη; και αποτελείται κυρίως από διάφορα οστεϊκά κύτταρα προερχόμενα τόσο από τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα, όπως είναι οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και τα κύτταρα οστικής επένδυσης; όσο και από τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, όπως είναι οι οστεοκλάστες [205]. Η περιαγγειακή περιοχή αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, φμπρονεκτίνη και λαμνίνη, ενώ από κύτταρα, περιλαμβάνει μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα, κύτταρα στρώματος, ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα, που εντοπίζονται στην επιφάνεια των αγγείων [205]. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ενδοστεϊκή περιοχή αποτελείται από περισσότερα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, ενώ στην περιαγγειακή εντοπίζονται περισσότερα διαφοροποιημένα HSCs [206–208]. Σε αυτή την κατεύθυνση, τα LT-HSCs έχει αποδειχθεί ότι βρίσκονται πλησιέστερα στο ενδόστεο και τους οστεοβλάστες, ενώ τα πιο “ώριμα”, διαφοροποιημένα HSCs

κατοικούν σταδιακά όλο πιο μακριά από το ενδόστεο, ώσπου να εξέλθουν στην περιφερική κυκλοφορία του αίματος μέσω των αγγείων [209–212]. Όμως, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα HSCs συνυπάρχουν μαζί με αρκετούς ώριμους απογόνους τους, και μάλιστα, ότι η μεταξύ τους επικοινωνία είναι κρίσιμη για τη συντήρηση και τη διαφοροποίησή των HSCs [213,214]. Επομένως, παραμένει αμφιλεγόμενο το εάν υπάρχουν συγκεκριμένες περιοχές για διάφορους προγόνους των HSCs, και εάν ναι, το πώς αυτές κατανέμονται χωρικά εντός της αιμοποιητικής μήτρας.

a.



b.



Σχήμα 1. 17. α) Διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (hematopoietic stem cells/HSCs). Τα μακροπρόθεσμα HSCs (long-term HSCs/LT-HSCs) είναι ικανά για αυτο-ανανέωση και διαφοροποίηση προς βραχυπρόθεσμα HSCs (short-term HSCs/ST-HSCs), και πολυδύναμα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (hematopoietic stem and progenitor cells/HSPCs) ή απλά πολυδύναμους προγόνους (multi-potent progenitors/MPPs). Τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ολιγοδύναμα προγονικά κύτταρα προς τη μυελοειδή και λεμφοειδή γενεαλογία. Με τη σειρά τους, οι μυελοειδείς και λεμφοειδείς πρόγονοι διαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα με περιορισμένη δυνατότητα διαφοροποίησης, που μπορούν να εξελιχθούν σε ώριμα κύτταρα, αν και τα τελικά στάδια ωρίμανσης συχνά συμβαίνουν εκτός του μυελού των οστών [215]. β) Η αιμοποιητική περιοχή στο εσωτερικό του δοικιδωτού/σπογγώδους μυελού των οστών αποτελείται από δύο βασικές περιοχές, την ενδοστεϊκή (endosteal niche) και την περιαγγειακή περιοχή (perivascular niche), η ενεργητικότερη δράση των οποίων είναι απαραίτητη για την υποστήριξη της αιμοποίησης [216].

1.4.2 Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (ΣΕΛ)

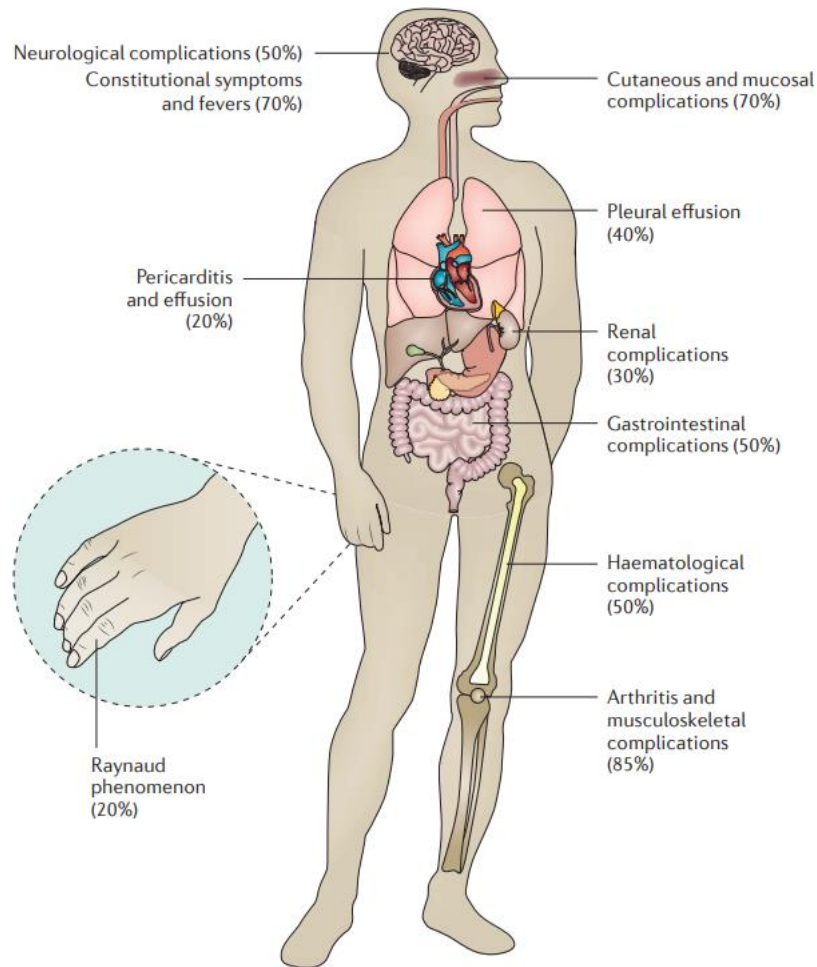
Δεδομένης της προέλευσης των HSCs και της αιμοποίησης από το μυελό των οστών, αρκετές ασθένειες με αιματολογικές παθολογίες και/ή επιβάρυνση του ανοσοποιητικού συστήματος, έχουν συνδεθεί με το μυελό των οστών, μεταξύ των οποίων και αυτοάνοσες νόσοι, με μία από τις πιο χαρακτηριστικές να είναι ο Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (ΣΕΛ).

Ο ΣΕΛ είναι μια χρόνια, πολυσυστημική αυτοάνοση νόσος με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου θανάτου, που συνήθως επηρεάζει γυναίκες από την εφηβεία μέχρι την εμμηνόπαυση. Πρόκειται για μια παγκόσμια ασθένεια, που όμως παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα σε ορισμένες φυλετικές και εθνοτικές ομάδες [217,218]. Συγκεκριμένα, οι άνθρωποι αφρικανικής καταγωγής, ιδιαίτερα εκείνοι που έχουν μεταναστεύσει στη Βόρεια Αμερική ή την Ευρώπη, έχουν υψηλότερο επιπολασμό του ΣΕΛ από εκείνους λευκής βορειοευρωπαϊκής

καταγωγής. Οι ετήσιες συχνότητες εμφάνισης της νόσου στις Ηνωμένες Πολιτείες κυμαίνονται από 2 έως 7.6 ανά 100 000, και αντίστοιχα στην Ευρώπη μεταξύ 1 και 4.9 ανά 100 000 [217,219].

Ως προς το μηχανισμό δράσης του, προκάλειται από μια αυτοάνοση αντίδραση, κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα κατευθύνει μια ακατάλληλη ανοσοαπόκριση σε κυτταρικά σωματίδια που περιέχουν νουκλεϊκό οξύ. Ωστόσο, η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον αυτών των νουκλεϊκών οξέων (αντιπυρηνικά αντισώματα - antinuclear antibodies/ANA) είναι αρκετά συχνή στο γενικό πληθυσμό, και δεν αναπτύσσουν όλα τα άτομα που έχουν ANA ΣΕΛ, γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλοι μηχανισμοί πρέπει να προάγουν την εξέλιξη της αυτοανοσίας σε νόσο [220]. Ειδικότερα, τόσο γενετικοί, όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη του ΣΕΛ. Παρ'όλα αυτά, στους περισσότερους ασθενείς, ο ΣΕΛ είναι ένα ποσοτικό γενετικό χαρακτηριστικό, με πολλά γονίδια να συμβάλλουν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Μελέτες συσχέτισης με το γονιδίωμα εμπλέκουν το ρυθμιστικό παράγοντα 5 (IRF5) της ιντερφερόνης (interferon/IFN), και μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αυξήσεις στα επίπεδα μορίων IFN τύπου 1 [221]. Επιπλέον, ο ΣΕΛ είναι πιο συχνός στις γυναίκες παρά στους άνδρες, με αναλογία 10-15 : 1 μετά την εφηβεία [222], ενώ η επικράτησή του αυτή στις γυναίκες υποδηλώνει ότι οι ενδοκρινικοί παράγοντες είναι σημαντικοί [220].

Η πολυπλοκότητα της νόσου μπορεί να γίνει αντιληπτή από την πληθώρα συμπτωμάτων που είναι δυνατόν να εμφανιστούν, ασύγχρονα και με ασταθή ένταση με το πέρασμα του χρόνου. Τα κλινικά χαρακτηριστικά μπορούν να κυμαίνονται από μια ήπια ασθένεια με εξάνθημα και αρθρίτιδα έως μια καταστροφική ασθένεια, ικανή να προκαλέσει νευρολογικές διαταραχές [223]. Άλλες διαταραχές που μπορεί να εκδηλωθούν, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.18, είναι νεφρικές, γαστρεντερικές, εγκεφαλικές, πνευμονικές, καρδιολογικές, καθώς και εργαστηριακές ανωμαλίες, αναφέροντας χαρακτηριστικά, αιματολογικές και ορμονικές μεταβολές, όπως για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων [224].



Σχήμα 1. 18. Κλινική ετερογένεια του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου (ΣΕΛ). Η πολύπλοκη φύση της αυτοάνοσης νόσου εκδηλώνεται από το πλήθος των διαφορετικών συστημάτων οργάνων που μπορούν να προσβληθούν [220].

1.4.3 Σύγχρονες εξελίξεις στην κατασκευή μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα

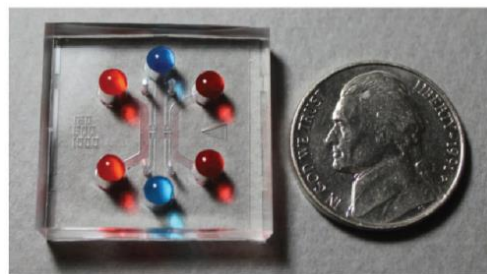
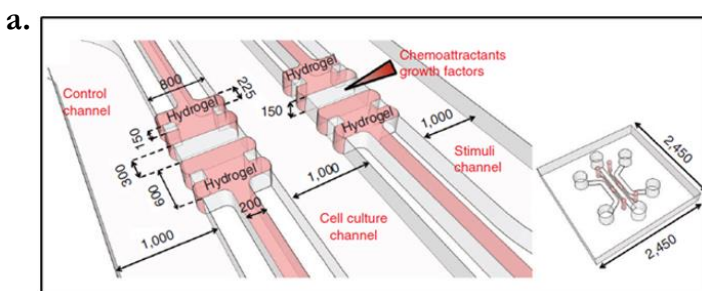
Το σύνολο των εργασιών που έχουν πραγματοποιηθεί για τη μικροδιάταξη μυελού των οστών προσανατολίζεται προς συγκεκριμένες προσεγγίσεις, οι οποίες μπορούν να διακριθούν ως εξής: α) προσομοίωση συγκεκριμένης περιοχής του μυελού των οστών, β) διαφορετικές προσεγγίσεις για την απόδοση της εξωκυττάριας μήτρας του μυελού, γ) μελέτη φυσιολογικών διεργασιών, όπως για παράδειγμα, η αιμοποίηση, και τέλος δ) μελέτη παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι οι ασθένειες. Η πλειονότητα των εργασιών ακολουθεί συνδυαστικά δύο ή και παραπάνω προσεγγίσεις, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

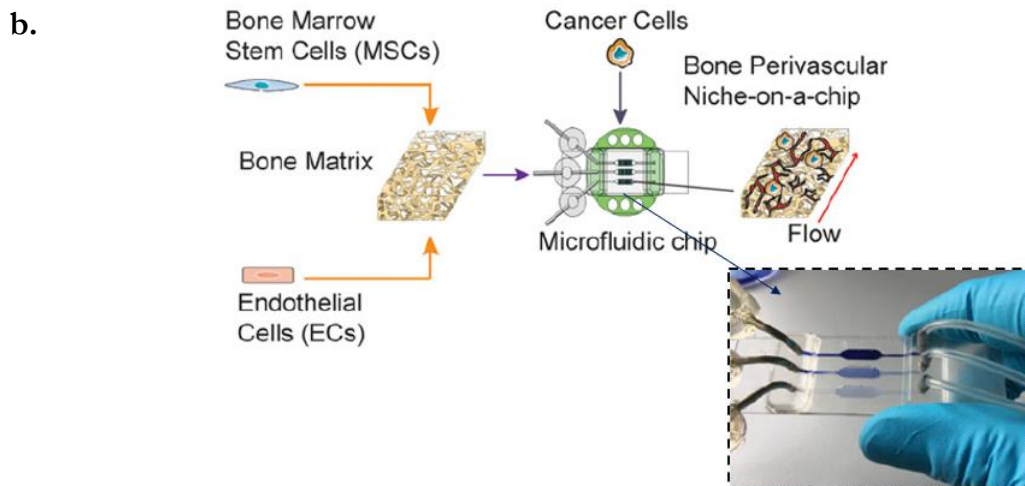
Η ενδοστεϊκή περιοχή υπενθυμίζεται είναι κοντά στο σπογγώδες οστό και αποτελεί την περιοχή του μυελού των οστών με τη μεγαλύτερη ακαμψία, κυμαινόμενη από 35 έως 40 kPa [197,225,226]. Οι Zhang et al. [227] κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη αποτελούμενη από οκτώ μικροθαλάμους για τη μελέτη της συμπεριφοράς κυττάρων πολλαπλού μυελώματος στο ενδοστεϊκό μικροπεριβάλλον. Οι μικροθαλάμοι καλλιέργειας, κατασκευασμένοι από PDMS και γυαλί, σχηματοποιήθηκαν με λιθογραφία μαλακής ύλης σε εξαγωνικό σχήμα, ενώ οστεοβλάστες αφέθηκαν να σχηματίσουν στο εσωτερικό τους 3D ενδοστεϊκή μήτρα. Ακόλουθη καλλιέργεια των κυττάρων πολλαπλού μυελώματος για 21 ημέρες, απέδειξε την κινητικότητά τους προς την

επιφάνεια του στρώματος των οστεοβλαστών, ως ένδειξη της αλληλεπίδρασής τους με τον οστικό ιστό. Η ίδια ομάδα αργότερα [228] χρησιμοποιώντας την ίδια διάταξη, έδειξε ότι η μακροχρόνια *in vitro* συντήρηση των οστεοβλαστών είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων πολλαπλού μυελώματος, και συνεπώς για τη μελέτη της ασθένειας του μυελώματος. Έτσι, για την παράταση του χρόνου ζωής των κυττάρων, βελτιστοποίησαν τη ροή τροφοδοσίας και ανεφοδίασαν εκ νέου την καλλιέργεια με οστεοβλάστες, επιτυγχάνοντας διατήρηση των κυττάρων μυελώματος για 4 εβδομάδες.

Άλλη εργασία εστιασμένη στην ενδοστεϊκή περιοχή, στην οποία μελετά μια παθολογική κατάσταση, έχει πραγματοποιηθεί από τους Bersini et al. [229], που ανέπτυξαν ένα 3D μικρορευστονικό μοντέλο για να αναλύσουν τη μετάσταση του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού στα οστά, δημιουργώντας ένα μικροπεριβάλλον αποτελούμενο από οστεοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Η μικροδιάταξη αποτελείται από 4 ανεξάρτητα μικροκανάλια καλλιέργειας και 3 μικροκανάλια τροφοδοσίας κατασκευασμένα από PDMS συγκολλημένο με γυαλί. Στα μικροκανάλια καλλιέργειας εγχέεται υδρογέλ κολλαγόνου τύπου I για να ενισχύσει τη δημιουργία 3D μήτρας από τα οστεοκύτταρα, ενώ μετά από 3 ημέρες στο κεντρικό μικροκανάλι τροφοδοσίας εισάγονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και στο ίδιο κανάλι τα καρκινικά κύτταρα μετά από επιπλέον 3 ημέρες. Αντιπροσωπευτικό σχέδιο της μικροδιάταξης με διαστατοποιημένα τα μικροκανάλια καλλιέργειας και τροφοδοσίας, καθώς και αντίστοιχη μακροσκοπική εικόνα της παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.19a. Σε διάρκεια 5 ημερών παρατήρησης, μελετήθηκε η διαενδοθηλιακή μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού στην ενδοστεϊκή περιοχή και η δημιουργία μικροπεριοχών μετάστασης, συνιστώντας επιτυχές μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου.

Μεταβαίνοντας στην περιαγγειακή περιοχή, οι Marturano et al. [230] παρουσίασαν μία μικροδιάταξη με τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας για τη διερεύνηση της εξέλιξης και της αντοχής στα φάρμακα καρκινικών κυττάρων του μαστού που αποικίζουν την περιαγγειακή περιοχή του μυελού. Έχοντας αρχικά δημιουργήσει εκτός της διάταξης μια 3D αποκυτταρωμένη οστεϊκή μήτρα στην οποία συγκαλλιέργησαν ενδοθηλιακά και μεσεγγυματικά κύτταρα, την τοποθέτησαν στη συνέχεια στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, όπου εισήγαγαν τα καρκινικά κύτταρα, με παράλληλη εφαρμογή ροής. Στο Σχήμα 1.19b παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία παραγωγής της περιαγγειακής περιοχής στη μικροδιάταξη. Η ύπαρξη της 3D μήτρας σε συνδυασμό με την παρεχόμενη ροή οδήγησε σε φυσιολογικό σχηματισμό αγγείων, ενώ τα καρκινικά κύτταρα του μαστού στην περιαγγειακή περιοχή παραμένουν σε κατάσταση αργού πολλαπλασιασμού, και εμφανίζουν αυξημένη αντοχή στα φάρμακα.



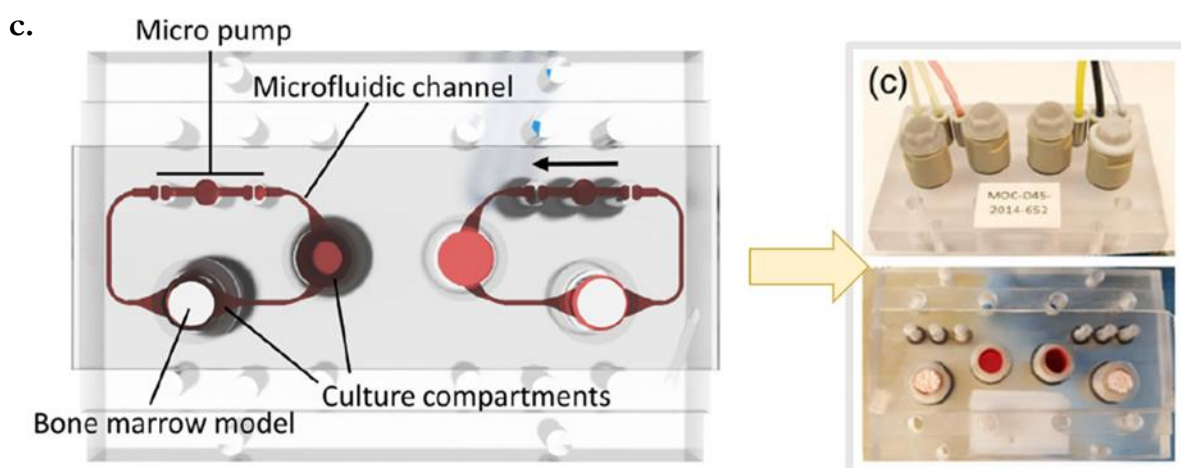
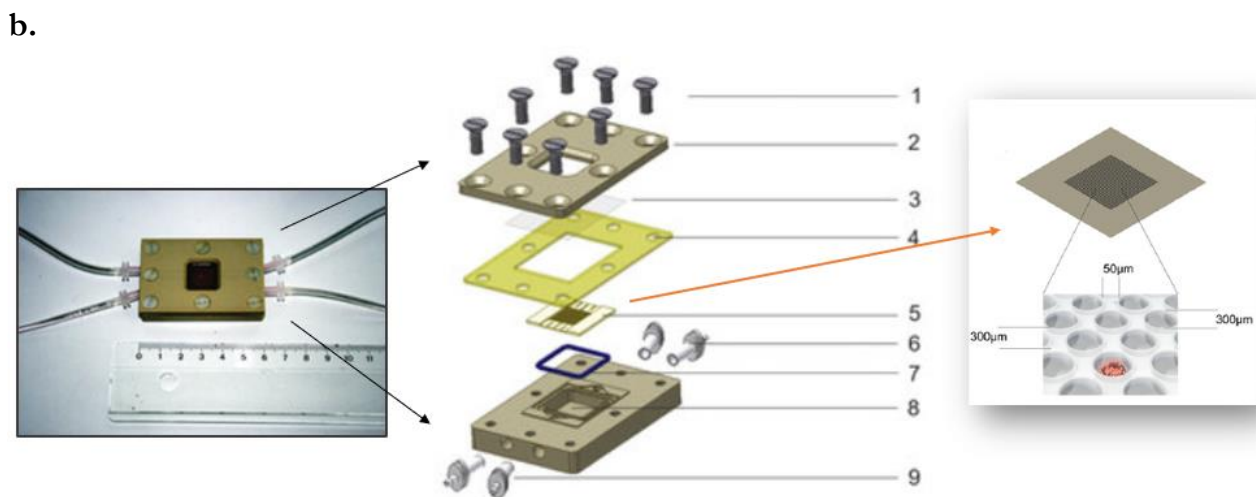
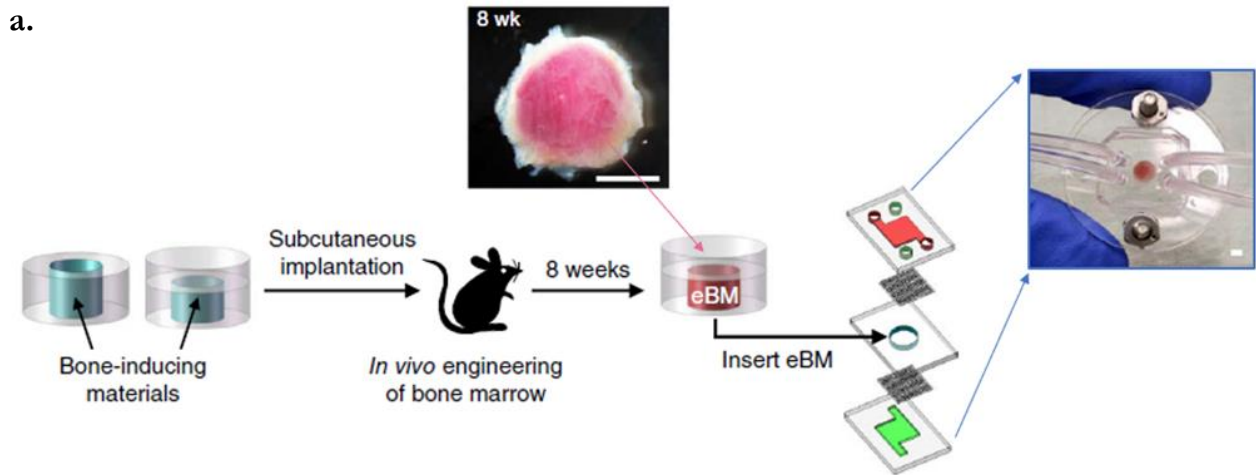


Σχήμα 1. 19. α) Μικροδιάταξη ενδοστεϊκής περιοχής μυελού των οστών για τη μελέτη της μεταστατικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων μαστού στο οστό. Σχηματική αναπαράσταση της μικροδιάταξης, όπου διακρίνονται οι διαστάσεις των μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας (αριστερά), και φωτογραφία της μικροδιάταξης περιέχοντας υδρογέλη και χρωματισμένα υγρά στα πλευρικά κανάλια (κόκκινο) και το κεντρικό κανάλι (μπλε) (δεξιά). Όλες οι κλίμακες είναι σε μm [229]. β) Μικροδιάταξη περιαγγειακής περιοχής μυελού των οστών για τη μελέτη καρκίνου του μαστού. Σχηματική απόδοση των σταδίων δημιουργίας της περιαγγειακής περιοχής στη μικροδιάταξη. Σε ένθετο φωτογραφία της μικροδιάταξης [230].

Θα πρέπει εδώ να τονιστεί ότι η πρώτη απόπειρα *in vitro* συντήρησης της αιμοποίησης του μυελού των οστών και συμπερίληψης των HSCs στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών εντός μία μικροδιάταξης σημειώθηκε από τους Torisawa et al. [155] το 2014, οι οποίοι κατασκεύασαν μία υβριδική *in vivo/in vitro* μικροδιάταξη μυελού των οστών. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.20α, η διάταξη PDMS αποτελείται από ένα κεντρικό κυλινδρικό μικροθάλαμο καλλιέργειας, διαχωριζόμενο από το ανώτερο και κατώτερο μικροκανάλι τροφοδοσίας μέσω πορώδους μεμβράνης PDMS, ενώ στο σύνολό της η διάταξη εγγιλείται με δύο ακρυλικά επίπεδα, που φέρουν κατάλληλες θύρες εισόδου/εξόδου. Ο μυελός των οστών κατασκευάστηκε *in vivo* με υποδόρια εμφύτευση παρόμοιου κυλινδρικού μικροθαλάμου PDMS εμπλουτισμένου με γέλη κολλαγόνου τύπου I μαζί με οστικά επαγώμενους παράγοντες για 8 εβδομάδες. Ο *in vivo* κατασκευασμένος μυελός των οστών (engineered bone marrow/eBM) μετέπειτα αφαιρέθηκε και εισήχθη στη μικροδιάταξη, όπου κατόρθωσε να διατηρηθεί *in vitro* για μία εβδομάδα υπό συνεχή τροφοδοσία. Η μικροδιάταξη επέτρεψε τη διατήρηση των μακροπρόθεσμων HSCs (LT-HSCs), ενώ η κατανομή των ώριμων αιμοσφαιρίων παρέμεινε σταθερή. Τέλος, έκθεση σε γ-ακτινοβολία είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής λευκοκυττάρων, σχεδόν πανομοιότυπη με ανάλογες μετρήσεις σε ολόκληρο τον μυελό από ζωντανά ποντίκια. Η ίδια ομάδα, σε συνέχεια της μελέτης τους αργότερα [231], διατήρησαν *in vitro* την αιμοποιητική περιοχή του μυελού για 2 εβδομάδες, επιτυγχάνοντας συνεχή παραγωγή αιμοσφαιρίων, και χαρτογραφώντας την απόκριση του μυελού των οστών σε πιθανά φάρμακα αντιμέτρων ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, η μικροδιάταξη διατήρησε τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (HSPCs) ποντικού σε φυσιολογικά επίπεδα για 2 εβδομάδες σε καλλιέργεια, απέδωσε αυξημένο πλήθος ώριμων κυττάρων (λευκοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια και ερυθροκύτταρα), και τέλος, σε χορήγηση δύο πιθανών θεραπευτικών μεθόδων προκάλεσε σημαντικές αυξήσεις στον αριθμό των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και μυελοειδών κυττάρων, κατ' αναλογία με *in vivo* μελέτες.

Αξιοσημείωτες προσπάθειες προσομοίωσης της εξωκυττάριας μήτρας ECM του μυελού των οστών στην κατεύθυνση της *in vitro* προώθησης διαδικασιών της αιμοποίησης, έχουν σημειωθεί με τις εργασίες κατασκευής βιοαντιδραστήρων. Ειδικότερα, οι Thon et al. [232] κατασκεύασαν το 2014 ένα βιοαντιδραστήρα, που αποτελεί μία μικροδιάταξη αιμοπεταλίων εξομοιώνοντας το μικροπεριβάλλον των ανθρώπινων τριχοειδών αγγείων του μυελού, με σκοπό τη μοντελοποίηση της δημιουργίας αιμοπεταλίων από τα μεγακαρουκυτταρα (προγόνους προ-αιμοπεταλίων) στο εξωτερικό των φλεβών αίματος. Η διάταξη αποτελείται από ένα ανώτερο και κατώτερο μικροκανάλι PDMS, διαχωριζόμενα μεταξύ τους από μικροκολώνες με διάκενο 2 μm, που δημιουργούν ένα ενδοθηλιακό φράγμα, έτσι ώστε κατά την εισαγωγή μεγακαρουκυττάρων (ποντικίου) στο ανώτερο μικροκανάλι να παραχθούν τα προ-αιμοπετάλια στο κατώτερο μικροκανάλι υπό συνθήκες ελεγχόμενης ροής. Η μικροδιάταξη κατορθώνει να προσομοιώσει, χημικά και δομικά, την ECM του μυελού των οστών, αποδίδοντας τη φυσιολογική παραγωγή αιμοπεταλίων. Αργότερα, οι Wuchter et al. [233] το 2016 χρησιμοποίησαν μία εμπορική μικροδιάταξη, το 3D-KITChip, για την προσομοίωση της ανθρώπινης αιμοποιητικής περιοχής, το οποίο στη συνέχεια ενσωμάτωσαν σε αντίστοιχα εμπορικά διαθέσιμο βιοαντιδραστήρα για την παροχή κατάλληλης ροής και αερίων. Το 3D-KITChip αποτελείται από συστοιχία 625 μικροκοιλοτήτων, μεγέθους 300 μm σε κάθε διάσταση, και με διάκενο 50 μm, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.20b. Τα MSCs χρησιμοποίησαν ως ικρίσματα τις μικροκοιλοότητες για την κατασκευή 3D πλέγματος που φιλοξένησε τα HSPCs ομφάλιου λώρου. Μετά από 14 ημέρες, παρατηρήθηκε ότι τα HSPCs διατήρησαν *in vitro* την αρχέγονη κατάστασή τους, σε αναλογία με τον *in vivo* φαινότυπό τους. Πρόκειται για την πρώτη απόπειρα **μακροπρόθεσμης *in vitro* δημιουργίας και συντήρησης** της αιμοποιητικής περιοχής, με τη συμβολή βέβαια εμπορικής πλατφόρμας.

Όμως, η πρώτη κατασκευασμένη μικροδιάταξη μυελού των οστών που κατόρθωσε να επιτύχει **μακροπρόθεσμη *in vitro* διατήρηση** των ανθρώπινων HSPCs παρουσιάστηκε από τους Sieber et al. το 2017 [234]. Πρόκειται για μία πλατφόρμα αποτελούμενη από δύο ανεξάρτητα κυκλικά συστήματα καναλιών, με δύο θαλάμους το καθένα, εκ των οποίων ο ένας είναι καλλιέργειας και ο άλλος χρησιμεύει ως δεξαμενή τροφοδοσίας, ενώ φέρει ενσωματωμένη περισταλτική αντλία, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.20c. Είναι κατασκευασμένη από PDMS συγκολλημένο με γυαλί, ενώ κάθε θάλαμος είναι χωρητικότητας 400 μL. Στην εν λόγω εργασία, προηγήθηκε η συγκαλλιέργεια MSCs και HSPCs σε κεραμική μήτρα επικαλυμμένη με υδροξυαπατίτη, προς προσομοίωση του σπογγώδους οστού, εκτός της μικροδιάταξης, η οποία στη συνέχεια εισήχθη προς διατήρηση στο θάλαμο καλλιέργειας της μικροδιάταξης, όπου και παρέμεινε για 4 εβδομάδες υπό συνεχή τροφοδοσία. Στο τέλος της παρατήρησης, χαρακτηρισμός των HSPCs με κυτταρομετρία ροής, απέδειξε ότι είχαν διατηρήσει σε σημαντικό ποσοστό τον αρχέγονο φαινότυπό τους, ενώ επιβεβαιώθηκε και η δυνατότητα διαφοροποίησής τους σε κοκκιοκύτταρα, ερυθροκύτταρα, μακροφάγα, και μεγακαρουκυτταρα. Συνολικά, η μικροδιάταξη προσομοίωσε το ενδοστεϊκό αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού, φέροντας μοριακή και δομική ομοιότητα με *in vivo* μελέτες του οργάνου. Ένα χρόνο μετά, το 2018, οι Sieber et al. [235] με την ίδια πλατφόρμα, επέκτειναν την *in vitro* διατήρηση της αιμοποιητικής περιοχής σε 8 εβδομάδες, επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα της προηγούμενης εργασίας τους ως προς τη διατήρηση των αρχέγονων HSPCs και της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται *in vitro*. Εκτός αυτών, τα HSCs που καλλιεργήθηκαν στη μικροδιάταξη, μεταμοσχεύτηκαν σε ακτινοβολημένα ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια και επανεποίκισαν μια κενή θέση μυελού των οστών, αποδεικνύοντας ότι είναι ενεργά βλαστοκύτταρα.



Σχήμα 1. 20. α) Υβριδικό *in vivo/in vitro* μοντέλο κατασκευής μυελού των οστών. Διαδικασία παραγωγής της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα, κατά την οποία ο κατασκευασμένος μυελός των οστών (engineered bone marrow/eBM) σχηματίζεται *in vivo* σε μικροθάλαμο PDMS, εμφυτευμένο υποδόρια σε ποντίκι, και στη συνέχεια

συντηρείται *in vitro* στη μικροδιάταξη. Σε ένθετα φωτογραφίες του eBM (ροζ ιστός 8 εβδομάδων) πριν την εισαγωγή του στη μικροδιάταξη, και της ίδιας της μικροδιάταξης με ενσωματωμένο τον eBM. Οι κλίμακες είναι στα 2 mm [155]. b) Εμπορική μικροδιάταξη 3D-KITChip, ενσωματωμένη σε βιοαντιδραστήρα για την προσομοίωση της ανθρώπινης αιμοποιητικής περιοχής. Εικόνα της συναρμολογημένης μικροδιάταξης (αριστερά). Ανεπτυγμένη άποψη του 3D-KITChip, και συγκεκριμένα, 1 = βίδες, 2 = άνω καπάκι, 3 = καλυπτρίδα μικροσκοπίου, 4 = εξωτερική φλάντζα, 5 = 3 D -KITchip, 6 = εσωτερική φλάντζα, 7 = βιοαντιδραστήρας, 8 = σύνδεσμοι Luer-Lock (κέντρο). Σε ένθετο σχηματική απεικόνιση της συστοιχίας 625 μικροκοιλοτήτων του 3 D -KITchip, με σημειωμένες τις διαστάσεις των κοιλοτήτων [233]. c) Πρώτη κατασκευασμένη μικροδιάταξη μυελού των οστών για την μακροπρόθεσμη *in vitro* διατήρηση της αιμοποίησης (4 εβδομάδες). Σχηματική απόδοση της μικροδιάταξης (αριστερά), όπου διακρίνεται η καλλιέργεια του οργανοειδούς στον ένα μικροθάλαμο, η χρήση του δεύτερου ως δεξαμενή τροφοδοσίας και η ενσωμάτωση περισταλτικής αντλίας on-chip. Ρεαλιστική εικόνα της μικροδιάταξης μυελού των οστών [234].

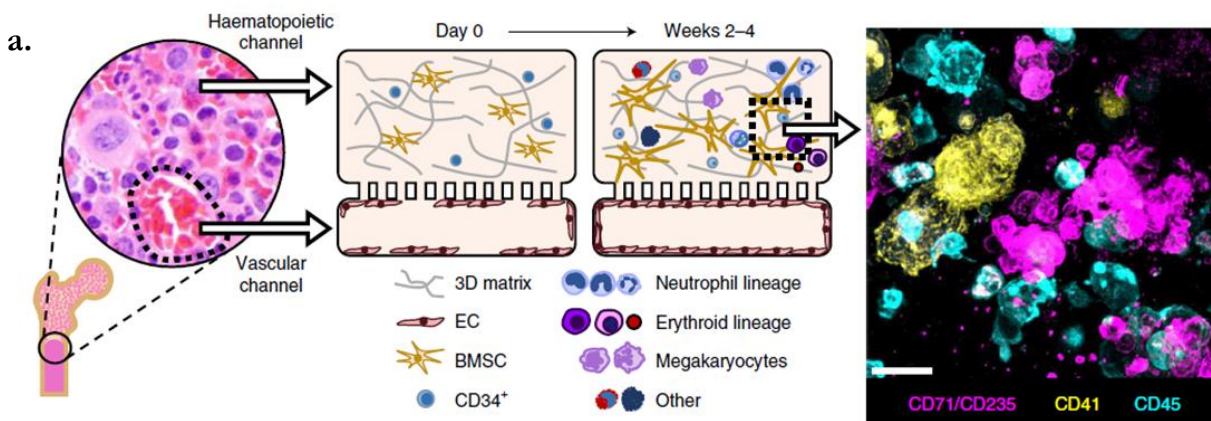
Παρ' όλα αυτά, η βιολογία των προαναφερόμενων συστημάτων είναι αρκετά απλοποιημένη με την ενσωμάτωση ενός ή το πολύ δύο ειδών κυττάρων της αιμοποιητικής περιοχής, εκτός των HSCs, και εξετάζει κύρια την διατήρηση των αρχέγονων HSCs. Προέκυψε συνεπώς η ανάγκη ανάπτυξης περισσότερο πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, με την προσθήκη περισσότερων κυττάρων της αιμοποιητικής περιοχής, στρέφοντας έτσι το ενδιαφέρον σε περισσότερο εφαρμοσμένες μελέτες της φυσιολογίας και της παθολογίας του μυελού των οστών. Σε αυτή την κατεύθυνση, οι Kotha et al. [236] κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη της ανθρώπινης περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής, χρησιμοποιώντας συγκαλλιέργεια έξι ειδών κυττάρων, και συγκεκριμένα, MSCs, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών, μονοκυττάρων και τέλος, HSPCs, υγιών και λευχαιμικών, με σκοπό να μελετήσουν τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που κατευθύνουν τη διακίνηση των HSPCs, σε υγιή και παθολογική κατάσταση. Η μικροδιάταξη κατασκευάστηκε από PDMS, και με την ενσωμάτωση 3D γέλης κολλαγόνου τύπου I μελέτησε τη μετανάστευση και την προσκόλληση των HSPCs στον υγιή και παθολογικό μυελό.

Επιπλέον, οι Chou et al. [237] κατόρθωσαν να αναπτύξουν μία μικροδιάταξη για την **μακροπρόθεσμη δημιουργία και συντήρηση *in vitro*** της περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής, με στόχο την παράλληλη μελέτη παθολογικών καταστάσεων τραυματισμού του μυελού, όπως η τοξικότητα των μυελοερυθροειδών μετά από έκθεση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα και ιονίζουσα ακτινοβολία, καθώς και η μυελοκαταστολή που προκαλείται από φάρμακα. Για το λόγο αυτό, κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη PDMS αποτελούμενη από δύο μικροκανάλια, διαχωριζόμενα από πορώδη μεμβράνη, όπου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.21a, στο ανώτερο συγκαλλιεργήθηκαν MSCs και HSPCs σε γέλη κολλαγόνου, και στο κατώτερο ενδοθηλιακά (human vascular endothelial cells/HUVECs) προς απόδοση του αγγειακού μικροπεριβάλλοντος, από όπου πραγματοποιούταν συνεχής τροφοδοσία. Στο τέλος των 4 εβδομάδων, η εν λόγω μελέτη εστίασε στην κατασκευή ενός μοντέλου που προωθεί τη διαφοροποίηση των HSPCs προς τα μυελοερυθροειδή, σε αντίθεση με τα προηγούμενα που εστιάζουν στη διατήρηση του αρχέγονου τους φαινότυπου, καθώς στοχεύει στην ανάπτυξη ενός αξιόπιστου προκλινικού μοντέλου για μη νεοπλασματικές ασθένειες.

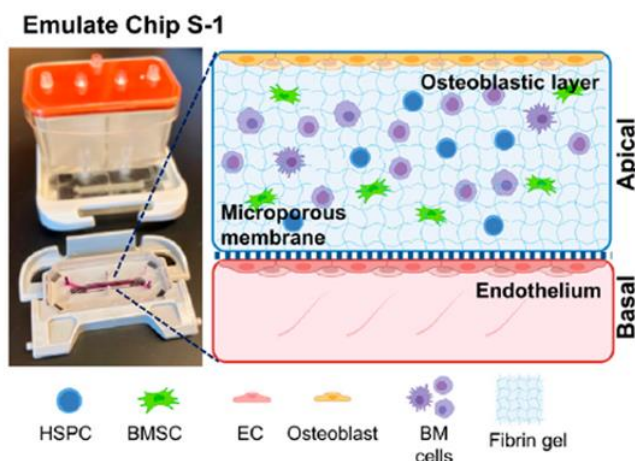
Παρ' όλο που οι τελευταίες αυτές εργασίες είναι πιο σύνθετες βιολογικά, και παρέχουν ορισμένες πολύτιμες γνώσεις ως προς συγκεκριμένες περιοχές αιμοποίησης (π.χ. της περιαγγειακής), είναι περιορισμένες στη μελέτη της μυελοτοξικότητας έναντι φαρμάκων και ακτινοβολίας, μην παρέχοντας πληροφορίες για τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης των HSCs με την ελάχιστη περιοχή. Η πρόσφατη εργασία των Sharipol et al. [238] χρησιμοποίησε την εμπορική μικροδιάταξη Emulate Chip S-1™ για να **δημιουργήσει και να διατηρήσει *in vitro*** την ενδοστεϊκή αιμοποιητική περιοχή ποντικού για 14 ημέρες, ενσωματώνοντας την αλληλεπίδραση με την αγγειακή περιοχή. Η μικροδιάταξη, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.21b, αποτελείται από δύο μικροκανάλια διαχωριζόμενα από πορώδη μεμβράνη, όπου στο ανώτερο καλλιεργούνται τα HSCs

σε οστεοποιημένο περιβάλλον, δημιουργημένο από την παρουσία MSCs και οστεοβλαστών σε υδρογέλη φιβρίνης, και στο κατώτερο ενδοθηλιακά κύτταρα, καλύπτοντας τα τοιχώματά του. Τα HSCs διατήρησαν την ικανότητα αυτο-ανανέωσής τους, ενώ ήταν ικανά να αναπαράγουν ολόκληρο το αιμοποιητικό σύστημα, διαφοροποιούμενα σε μυελικά και λεμφοειδή κύτταρα, γεγονός που δεν έχει ξαναεπιτευχθεί στα υπάρχοντα 3D *in vitro* μοντέλα. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με τη μεταμόσχευση των HSPCs σε ποντίκια, τα οποία εμφάνισαν ανοσοποίηση.

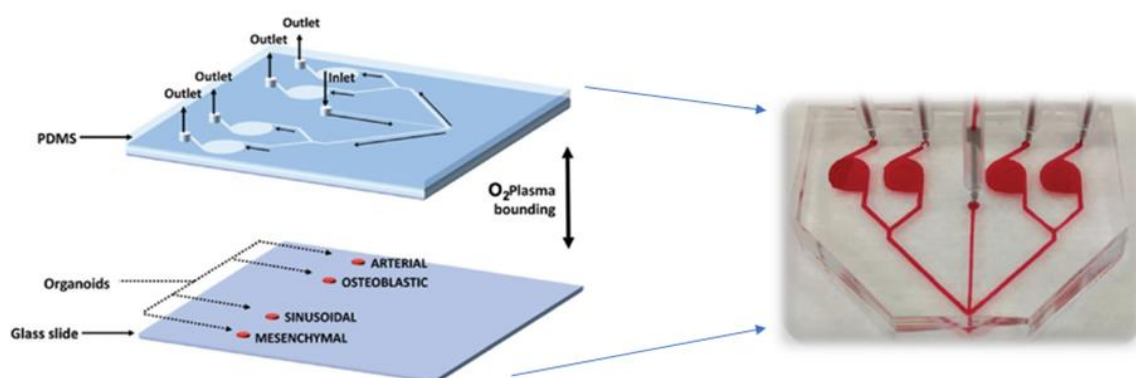
Οι Aleman et al. [239] προχώρησαν περαιτέρω στην απόδοση της πολυπλοκότητας της αιμοποιητικής περιοχής, καθώς είναι οι μοναδικοί που εισήγαγαν μία μικροδιάταξη που συμπεριελάμβανε τέσσερις διαφορετικές πτυχές της αιμοποιητικής περιοχής του μυελού, και συγκεκριμένα, την περιαρτηριακή (A), την περιαγγειακή (S), τη μεσεγγυματική (M), και την οστεοβλαστική (O). Όπως διακρίνεται στο Σχήμα 1.21c, οι περιοχές αυτές, αν και διακριτές, στεγάζονται σε μια ενιαία, κλειστή, μικρορρευστονική διάταξη, και συνδέονται με μικροκανάλια διαρρεόμενα από ανθρώπινα υγιή ή ασθενή (λευκαιμίας ή λεμφώματος) HSPCs, αναπαράγοντας έτσι ένα αρχέγονο κυκλοφορικό σύστημα. Η διάταξη είναι κατασκευασμένη από PDMS και φέρει ημικυλινδρικούς θαλάμους για την υποδοχή των αντίστοιχων 3D οργανοϊδών κάθε περιοχής, δημιουργημένων εκτός της διάταξης σε ειδική υδρογέλη (με βάση το υαλουρονικό οξύ τροποποιημένο με θειόλη). Με αυτή τη διάταξη, **διατηρήθηκαν *in vitro*** διακριτές περιοχές αιμοποίησης για 5 ημέρες, με στόχο τη μελέτη της φυσιολογικής προτίμησης παραμονής υγιών και ασθενών HSPCs στις διαφορετικές περιοχές. Ωστόσο, αυτές οι περιοχές δεν θεωρήθηκαν ως ένα ολοκληρωμένο σύστημα, καθώς δεν αλληλεπιδρούσαν φυσικά μεταξύ τους, καθώς λήφθηκε υπόψη μόνο η βιοχημική τους αλληλεπίδραση. Ως εκ τούτου, η έλλειψη φυσικών αλληλεπιδράσεων και άλλων κυτταρικών διεργασιών, όπως για παράδειγμα η κυτταρική μετανάστευση, αντιπροσωπεύουν ελάχιστα τη δυναμική πολυπλοκότητα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.



b.



c.

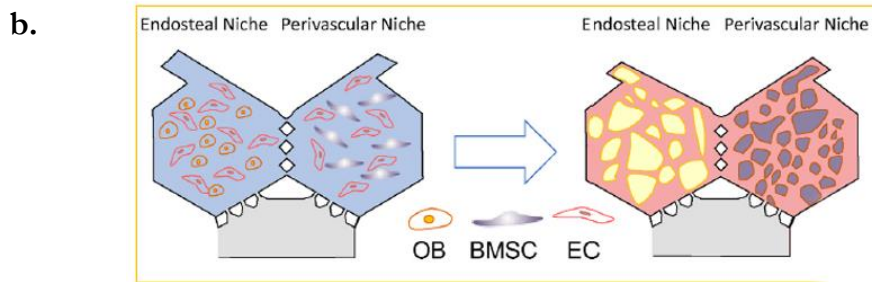
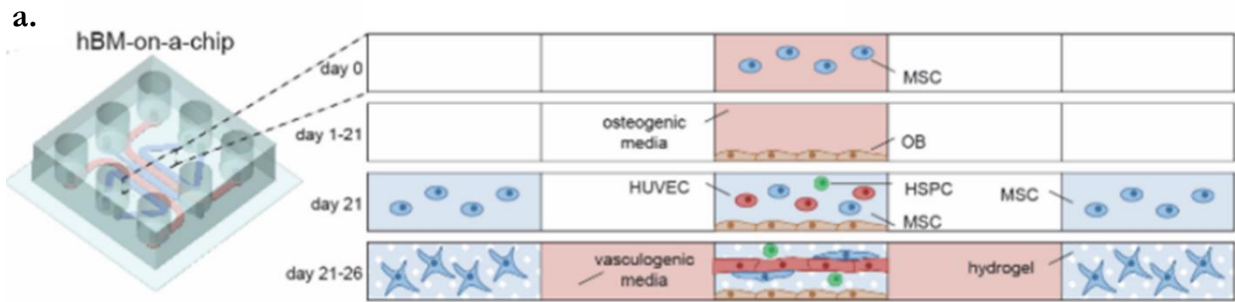


Σχήμα 1. 21. α) Μικροδιάταξη περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής. Σχηματική απεικόνιση ανθρώπινου οστού, με ένθετη μικρογραφία που εστιάζει στην περιαγγειακή αιμοποιητική περιοχή (αριστερά). Εγκάρσια τομή της μικροδιάταξης την ημέρα 0, όπου διακρίνονται μεμονωμένα διασκορπισμένα HSPCs και BMSCs σε γέλη στο άνω μικροκανάλι, και μια ατελή αγγειακή επένδυση στο κάτω μικροκανάλι. Εντός δύο εβδομάδων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύσσονται, επενδύοντας τα τοιχώματα του κάτω μικροκαναλιού, ενώ τα HSPCs διαφοροποιούνται σε πολλές κυτταρικές σειρές (μέση). Εικόνα ανοσοφθορισμού κατακόρυφης διατομής της μικροδιάταξης, όπου διακρίνονται ερυθροειδή (ροζ), μεγακαρουκύτταρα (κίτρινο) και ουδετερόφιλα (μπλε) (δεξιά) [237]. β) Εμπορική μικροδιάταξη Emulate Chip S-1™ για τη δημιουργία και διατήρηση *in vitro* της ενδοστεϊκής αιμοποιητικής περιοχή ποντικού. Ρεαλιστική εικόνα του Emulate Chip S-1™ (αριστερά) και σχηματική απεικόνιση διατομής του, όπου διακρίνεται η καλλιέργεια οστεοβλαστών, BMSCs και HSPCs σε γέλη φιμπρίνης στο άνω μικροκανάλι, και η επένδυση των τοιχωμάτων του κάτω μικροκαναλιού με ενδοθηλιακά κύτταρα (δεξιά) [238]. γ) Μικροδιάταξη μυελού των οστών για την *in vitro* διατήρηση τεσσάρων περιοχών της αιμοποιητικής περιοχής, και συγκεκριμένα, την περιαρτηριακή (A), την περιαγγειακή (S), τη μεσεγχυματική (M), και την οστεοβλαστική (O), σε τέσσερις διακριτούς μικροθαλάμους. Ανεπτυγμένη άποψη των δύο επιπέδων της μικροδιάταξης, από PDMS και γυαλί, συγκολλημένων με πλάσμα οξυγόνου. Παρουσιάζονται οι διακριτοί ημικυλινδρικοί μικροθάλαμοι, όπου εισέρχεται κάθε οργανοειδής (αριστερά). Εικόνα της μικροδιάταξης μυελού των οστών διαρρέομενο από HSPCs (δεξιά) [239].

Προς αντιμετώπιση αυτού, οι Nelson et al. [240] κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη που περιελάμβανε (δημιούργησε και συντήρησε *in vitro*) και τις δύο περιοχές της αιμοποιητικής περιοχής, την περιαγγειακή και την ενδοστεϊκή, στην ίδια διάταξη, επιτρέποντας τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Η μικροδιάταξη PDMS, ύψους μόλις 150 μm, είναι κατασκευασμένη με τυπικές τεχνικές λιθογραφίας μαλακής ύλης, και αποτελείται από πέντε μικροκανάλια, όπως διακρίνεται στο Σχήμα 1.22a. Αρχικά, στο κεντρικό μικροκάνάλι δημιουργείται η ενδοστεϊκή περιοχή μετά από διαφοροποίηση των MSCs σε οστεοβλάστες εντός 21 ημερών, όπου στη συνέχεια, ενδοθηλιακά κύτταρα μαζί με MSCs εμφυτεύονται σε ένα δίκτυο υδρογέλης διαμορφώνοντας την περιαγγειακή περιοχή πάνω από την ενδοστεϊκή, ενώ παράλληλα, εισάγονται και HSPCs, τα οποία παρέμειναν σε συγκαλλιέργεια για 5 ημέρες. Η μικροδιάταξη μιμείται επιτυχώς τη φυσιολογία της ECM, επιτρέπει τη συντήρηση και τον πολλαπλασιασμό των HSPCs, και αναπαριστά τις μετακινήσεις τους εντός της ενοποιημένης αιμοποιητικής περιοχής, ενώ τέλος, απέδειξε ότι η ενδοστεϊκή περιοχή επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση της φυσιολογίας του μυελού.

Πρόσφατα, οι Glaser et al. [241] ανέπτυξαν μία μικροδιάταξη για την *in vitro* δημιουργία και συντήρηση της αιμοποιητικής περιοχής, που την προσέγγιζε ακόμη καλύτερα δομικά, αλλά και φυσιολογικά/βιοχημικά, αναπαριστώντας την ενδοστεϊκή και την περιαγγειακή περιοχή ως διακριτές, αλλά διασυνδεδεμένες και μεταξύ τους αλληλεπιδρούσες περιοχές (Σχήμα 1.22b). Η διάταξη PDMS αποτελείται από δύο εφαπτόμενους εξαγωνικούς μικροθαλάμους, έναν για κάθε περιοχή, που επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω μικροδιόδων, οι οποίες επιτρέπουν τη διάχυση μορίων και τη μετακίνηση κυττάρων. Στους δύο μικροθαλάμους εισήχθηκε υδρογέλη φμπρίνης και ενδοθηλιακά κύτταρα για τη δημιουργία αγγειακού δικτύου, ενώ επιπλέον, στο μικροθάλαμο της περιαγγειακής περιοχής προστέθηκαν κύτταρα στρώματος (BMSCs), και αντίστοιχα, στην ενδοστεϊκή οστεοβλάστες. Ακολούθησε η είσοδος HSPCs, τα οποία καλλιεργήθηκαν για 14 ημέρες, στο τέλος των οποίων είχαν διατηρηθεί, και διαφοροποιηθεί σε ώριμα ουδετερόφιλα (CD66b+/CD33-). Τέλος, η μικροδιάταξη μιμείται την *in vivo* απόκριση τόσο στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα δοξορουβικίνη, όσο και στο φάρμακο G-CSF, τα οποία μειώνουν και αυξάνουν, αντίστοιχα τις συγκεντρώσεις ουδετερόφιλων στην περιφερική κυκλοφορία.

Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί, ότι παρά την ομολογουμένως σημαντική εξέλιξη στην προσομοίωση της αιμοποιητικής περιοχής, ειδικότερα με τις εργασίες των Nelson et al. [240] και Glaser et al. [241] δεν αξιολόγησαν το ρόλο της υποξίας στην κυτταρική απόκριση, αποτυγχάνοντας να αντιπροσωπεύσουν τη φυσιολογική κατάσταση της συγκέντρωσης οξυγόνου εντός του μυελού των οστών. Ο μυελός των οστών βρίσκεται σε κατάσταση υποξίας ή χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, και οι επικρατούσες συνθήκες οξυγόνου, είναι επομένως σημαντικές για τη ρύθμιση των κυττάρων. Είναι μάλιστα χαρακτηριστικό, ότι υπάρχει βαθμίδα οξυγόνου στην αιμοποιητική περιοχή, με τη συγκέντρωσή του να είναι υψηλότερη στην περιαγγειακή περιοχή, και χαμηλότερη στην ενδοστεϊκή [205]. Έχει αναφερθεί [242] ότι αυτή η παράμετρος ρυθμίζει και τη συμπεριφορά των αιμοποιητικών κυττάρων, γεγονός που καθιστά σημαντική την συμπερίληψή της σε μικροδιατάξεις μυελού των οστών για να αποκτηθούν περισσότερο ρεαλιστικά μοντέλα. Αυτό το ζήτημα τέθηκε από τους Chou et al. [237], οι οποίοι επεσήμαναν τη δυνατότητα προσαρμογής της συγκέντρωσης οξυγόνου σε *in vivo* επίπεδα σε μελλοντικές μελέτες, προς καλύτερη απόδοση της αιμοποίησης.



Σχήμα 1. 22. Μικροδιατάξεις μυελού των οστών που προσομοιώνουν την περιαγγειακή και ενδοστεϊκή αιμοποιητική περιοχή στην ίδια διάταξη. a) Οι Nelson et al. κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη PDMS 5 μικροκαναλιών, όπου τα MSCs αρχικά διαφοροποιούνται για 21 ημέρες στο κεντρικό μικροκανάλι της συσκευής για να σχηματίσουν ένα ενδοστεϊκό στρώμα (παραγωγή οστεοβλαστών), στη συνέχεια ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs), MSCs και HSPCs εισάγονται πάνω από το ενδοστεϊκό στρώμα, και πραγματοποιείται αγγειογένεση σε 5 ημέρες, ολοκληρώνοντας το σχηματισμό της αιμοποιητικής περιοχής [240]. b) Οι Glaser et al. προχώρησαν σε ενεργή αλληλεπίδραση μεταξύ της περιαγγειακής και ενδοστεϊκής περιοχής, οι οποίες αν και φιλοξενούνται σε διακριτούς εξαγωνικούς μικροθαλάμους, επικοινωνούν μέσω των διακένων μικροδιόδων. Σχηματική απόδοση της διάταξης, όπου απεικονίζεται η δημιουργία μικροαγγειακών δικτύων και στις δύο επενδεδυμένες με ενδοθηλιακά κύτταρα περιοχές, με την προσθήκη οστεοβλαστών και BMSCs στην ενδοστεϊκή και την περιαγγειακή περιοχή, αντίστοιχα μετά από διάστημα 4 – 7 ημερών (αριστερά). Σε ένθετο εικόνα της μικροδιάταξης PDMS [241].

Από όλα τα παραπάνω, προκύπτει ότι από το σύνολο των υπαρχουσών εργασιών κατασκευής μικροδιάταξης μυελού των οστών, η συντριπτική τους πλειονότητα ασχολείται μόνο με την *in vitro* συντήρηση, και όχι συνδυαστικά με την *in vitro* δημιουργία της αιμοποιητικής περιοχής στη μικροδιάταξη. Είναι χαρακτηριστικό, ότι στις εργασίες-πρωτοπόρους για την ανάπτυξη της μικροδιάταξης, των Torisawa et al. [155,231] και των Sieber et al. [234,235], πραγματοποιείται στη μεν πρώτη περίπτωση, δημιουργία του μυελού *in vivo* και μετέπειτα διατήρησή του *in vitro* στη μικροδιάταξη, και στη δε δεύτερη, συγκαλλιέργεια των MSCs/HSPCs σε κεραμική μήτρα *in vitro* εκτός της μικροδιάταξης, και ακόλουθη μεταφορά της προς συντήρηση *in vitro* στη μικροδιάταξη. Επιπλέον, από τις εργασίες που επιτυγχάνουν συνδυαστική **δημιουργία και συντήρηση *in***

in vitro, είναι αρκετές εκείνες που χρησιμοποιούν εμπορικές πλατφόρμες, όπως οι Wuchter et al. [233] και οι Sharipol et al. [238], οι οποίες είναι πιο σύνθετες γεωμετρικά διατάξεις, που επιτρέπουν παράλληλα και καλύτερο έλεγχο των πειραματικών συνθηκών, με ενσωματωμένες θύρες παροχής ροής και αερίων. Ως προς τις κατασκευασμένες διατάξεις που επιχειρούν τη συνδυαστική δημιουργία και διατήρηση, προέρχονται από τις πρόσφατες μελέτες των Chou et al., Nelson et al. και Glaser et al., οι οποίες το κατορθώνουν γιατί ενσωματώνουν παραπάνω από δύο είδη κυττάρων, από τρία [237] έως και τέσσερα [240,241]. Η προσθήκη μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων συνεισφέρει σημαντικά στην *in vitro* δημιουργία και διατήρηση της αιμοποιητικής περιοχής, καθώς προσομοιώνει ακριβέστερα τη βιολογία της, με αποτέλεσμα να ενισχύει την επιβίωση των HSPCs. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των Nelson et al. και Glaser et al. κατασκευάστηκαν μικροδιατάξεις που προσομοίωναν και τις δύο περιοχές αιμοποίησης (περιαγγειακή και ενδοστεϊκή), και που ήταν δομικά κατάλληλα, ώστε να επιτρέπεται η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, κατ' αναλογία με την *in vivo* φυσιολογία του μυελού.

Εκτός των παραπάνω, όλες οι κατασκευασμένες μικροδιατάξεις αιμοποιητικού μυελού των οστών, ενσωματώνουν κάποια γέλη, είτε φυσικής προέλευσης ECM, όπως π.χ. κολλαγόνο ή φιμπρίνη, είτε συνθετική, ή κάποια τεχνητή μήτρα, όπως για παράδειγμα, κεραμικά ικρίωματα. Τόσο οι γέλες, όσο και η τεχνητή μήτρα, βοηθούν στη δημιουργία πηκτώματος ή ικρίωμάτων, αντίστοιχα, για τη διαμόρφωση μιας 3D υποστηρικτικής μήτρας για τη φιλοξενία των HSCs.

1.5 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Όπως προκύπτει από την ανάλυση του κεφαλαίου, οι σύγχρονες μέθοδοι στον τομέα της βιοϊατρικής και της βιοτεχνολογίας, εννοώντας τις συμβατικές στατικές κυτταροκαλλιέργειες και τα πειράματα σε ζώα, αποτυγχάνουν να αποτελέσουν αξιόπιστα προκλινικά μοντέλα, αναδεικνύοντας τις μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα, ως αποτέλεσμα της σύμπραξης μεταξύ της μικρορευστονικής και κυτταρικής βιολογίας, ως την επιτομή των βιομιμητικών συστημάτων. Ο μυελός των οστών, δεδομένης ιδιαίτερα της δυσκολίας προσβασιμότητάς του, και σε συνδυασμό με το ζωτικής σημασίας ρόλο του για τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και το πλήθος των ασθενειών που σχετίζονται με αυτόν, αποτελεί ένα όργανο που χρήζει ενδελεχούς χαρτογράφησης της φυσιολογίας και των μηχανισμών λειτουργίας του. Οι μικροδιατάξεις μυελού των οστών σε ψηφίδα αποτελούν ελπιδοφόρα προσθήκη στον τομέα της έρευνας, ευνοώντας την *in vitro* προσομοίωση της πολυπλοκότητας του μυελού σε επίπεδο οργάνου. Ο στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής μπορεί να αποδοθεί συνοπτικά ως: **η κατασκευή μιας λειτουργικής μικροδιάταξης μυελού των οστών για την αμιγώς *in vitro*, και απουσία ικρίωμάτων ή γέλης (για λόγους απλοποίησης της κατασκευής), δημιουργία και συντήρηση της ανθρώπινης περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής του μυελού.** Πιο αναλυτικά, η εργασία μπορεί να διαχωριστεί σε δύο βασικές ενότητες:

1. Κατασκευή και λειτουργικότητα της μικροδιάταξης μυελού των οστών

1) Κατασκευή της μικροδιάταξης

Πρωταρχική μέριμνα αποτελεί η επιτυχής κατασκευή μίας μικροδιάταξης από πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη) (PDMS) για τη φιλοξενία κυττάρων του μυελού των οστών. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια και οι εφαρμοζόμενες τεχνικές κατασκευής της μικροδιάταξης, ξεκινώντας από το σχεδιασμό μέχρι την τελική υλοποίησή της (Κεφάλαιο 3). Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν κυρίως την τεχνική αντιγραφής μήτρας (replica molding) για την κατασκευή των τμημάτων του, καθώς και την επιφανειακή τροποποίηση (με τεχνολογία πλάσματος).

ii) Λειτουργικότητα της μικροδιάταξης

- **Επιφανειακή τροποποίηση PDMS**

Δεδομένης της βιολογικής εφαρμογής της μικροδιάταξης, προτείνεται μια μέθοδος επιφανειακής τροποποίησής της με πλάσμα αέρα πριν να επιστρωθεί με κολλαγόνο για την καλλιέργεια κυττάρων (Κεφάλαιο 4). Η τροποποίηση αυτή επιβάλλεται από την υδρόφοβη φύση του PDMS, ώστε να μπορέσει να υποστηριχθεί καλύτερη πρόσδεση κολλαγόνου και συνεπώς, καλύτερη κυτταρική προσκόλληση.

- **Τροφοδοσία της μικροδιάταξης με θρεπτικό υλικό**

Βασική παράμετρος στη λειτουργία μίας μικροδιάταξης είναι η τροφοδοσία του με θρεπτικό υλικό για τη δημιουργία ενός μηχανικά, χημικά και φυσιολογικά μεταβαλλόμενου μικροπεριβάλλοντος. Έτσι, εξετάζεται η ενεργός (υπό ροή) τροφοδοσία της μικροδιάταξης, ενώ επιπλέον, δοκιμάζεται και η παθητική τροφοδοσία της (Κεφάλαιο 5).

2. Εφαρμογές της μικροδιάταξης

Δημιουργία και συντήρηση περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής μυελού των οστών

Όπως προκύπτει και από την βιβλιογραφική επισκόπηση του συγκεκριμένου κεφαλαίου, οι περισσότερες εργασίες μικροδιάταξεων μυελού των οστών στοχεύουν στην ***in vitro* συντήρηση** της αιμοποιητικής περιοχής [155,231,234,235]. Από το σύνολο των εργασιών που επιτυγχάνουν συνδυαστική ***in vitro* δημιουργία και συντήρηση** της αιμοποίησης, είναι πολλές που χρησιμοποιούν εμπορικές διατάξεις [233,238], ενώ όσες κατασκευάζουν τις μικροδιάταξεις, χρησιμοποιούν κατ' ελάχιστο τρία είδη κυττάρων, στοχεύοντας στην προσομοίωση και των δύο περιοχών αιμοποίησης, της περιαγγειακής και της ενδοστεϊκής [237,240,241]. Εκτός αυτών, στο σύνολό τους οι εργασίες χρησιμοποιούν γέλη ή τεχνητά ικρίωματα για τη δημιουργία της 3D υποστηρικτικής μήτρας που θα φιλοξενήσει τα HSCs.

Στον αντίποδα, η παρούσα διατριβή συστήνει την αμιγώς *in vitro* δημιουργία και διατήρηση της αιμοποίησης, με τη χρήση μόνο δύο ειδών κυττάρων, των μεσεγχυματιών (MSCs) και των αιμοποιητικών προγονικών βλαστοκυττάρων (Hematopoietic Stem and Progenitor Cells/HSPCs) (Κεφάλαιο 7). Πρόκειται για ένα απλουστευμένο βιολογικά μοντέλο, το οποίο όμως επαρκεί για τη διερεύνηση της συντήρησης του φαινότυπου των HSPCs και της ικανότητας διαφοροποίησής τους. Επιπλέον, η μικροδιάταξη στοχεύει στην απόδοση της περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής, την οποία επιδιώκει να δημιουργήσει χωρίς τη χρήση γέλης ή ικριωμάτων, σε αντίθεση με τις υφιστάμενες εργασίες. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι η προστατευτική τριδιάστατη μήτρα των HSPCs αποτελείται κυρίως από διαφοροποιημένες γενιές των MSCs [243], συστήνεται ο αυθόρμητος σχηματισμός της από τα εγχέομενα MSCs. Για το λόγο αυτό, η καλλιέργεια των MSCs στη μικροδιάταξη προηγείται της εισόδου των HSPCs, μέχρι το σημείο όπου τα MSCs έχουν οργανωθεί σε ικανοποιητικό επίπεδο για να φιλοξενήσουν τα HSPCs. Εκτός αυτών όμως, η περιοχή μελέτης, η περιαγγειακή αιμοποιητική, σε αντίθεση με την ενδοστεϊκή, είναι ρευστή και όχι συμπαγής, χωρίς υψηλή ακαμψία, οπότε η απουσία στερεών, συμπυκνωμένων ικριωμάτων δεν αλλοιώνει τη φυσιολογία και τις μηχανικές ιδιότητες του περιαγγειακού μικροπεριβάλλοντος της μικροδιάταξης.

Ακόμη, στόχος είναι η συντήρηση των HSPCs σε συγκαλλιέργεια με τα MSCs να διατηρηθεί για 7 ημέρες, χρόνος που επαρκεί για την ανίχνευση διαφοροποιήσεων και των δύο ειδών κυττάρων, καθώς και για την *in vitro* δοκιμή αποτελεσματικότητας και τοξικότητας φαρμάκων [244].

Τέλος, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι για την παρούσα έρευνα, θα χρησιμοποιηθούν ανθρώπινα κύτταρα (MSCs και HSPCs), γεγονός που δεν επιχειρείται από όλες τις υπάρχουσες εργασίες, συνεισφέροντας έτσι στην κατανόηση του ανθρώπινου μυελού των οστών.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ, ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

Στόχος αυτού του κεφαλαίου είναι η παρουσίαση των βασικότερων πειραματικών διατάξεων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή και το χαρακτηρισμό των μικρορευστονικών διατάξεων που αναπτύχθηκαν. Αντίστοιχα, αναλύονται οι διατάξεις για την απομόνωση, την καλλιέργεια των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και για την αξιολόγηση της ανάπτυξής τους, ενώ τέλος, παρουσιάζονται τα πρωτόκολλα καλλιέργειας μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών σε ψηφίδα.

2.1 Κατασκευή μικρορευστονικών διατάξεων

2.1.1 Ευθυγραμμιστής μασκών Karl-Suss

Ο ευθυγραμμιστής μασκών Karl-Suss, μοντέλο MJB 3 STD, ευρισκόμενος στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Καθαρού Χώρου του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (I.N.N.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση όλων των διεργασιών φωτολιθογραφίας που εμπεριέχονται στην κατασκευή της μικροδιατάξης μυελού των οστών. Ειδικότερα, εμπλέκεται στη διεργασία κατασκευής της πορώδους μεμβράνης PDMS, και συγκεκριμένα, στο στάδιο της κατασκευής του εκμαγείου της μεμβράνης με χρήση λιθογραφίας αρνητικού τόνου (Κεφάλαιο 3).

Ο ευθυγραμμιστής προσφέρει λιθογραφία υψηλής ανάλυσης και μεγάλη ευελιξία στο χειρισμό υποστρωμάτων ακανόνιστου σχήματος και διαφορετικού πάχους, καθώς και των κλασικών δισκιδίων πυριτίου διαμέτρου μέχρι 3". Διαθέτει αρθρωτή κατασκευή και εργονομικό σχεδιασμό, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.1, με όλα τα χειριστήρια λειτουργίας να είναι τοποθετημένα με τέτοιο τρόπο, ώστε η διαδικασία της ευθυγράμμισης να είναι εύκολο στην εκμάθηση και την εκτέλεση, όπως απαιτείται για την διεξαγωγή εξειδικευμένων διεργασιών. Είναι εξοπλισμένος με λάμπα βραχέος τόξου υδραργύρου 200 W που παρέχει ευρυζωνική έκθεση, καθώς και με οπτικό σύστημα σχετικά υψηλής ανάλυσης. Τα κύρια μήκη κύματος έκθεσης είναι 350-500 nm, ενώ παρέχει ανάλυση γραμμής/χώρου 1.5 μm, και ακρίβεια ευθυγράμμισης 0.2 μm υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Ο ευθυγραμμιστής διαθέτει δύο δυνατές λειτουργίες έκθεσης, τη λειτουργία σκληρής επαφής (πίεση αζώτου κάτω από το υπόστρωμα), και τη λειτουργία μαλακής επαφής (κενό κάτω από το υπόστρωμα), εκ των οποίων, η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας. Τέλος, ο ευθυγραμμιστής μπορεί να εξοπλιστεί και για την εκτέλεση εκθέσεων εγγύτητας.



Σχήμα 2. 1. Ο ευθυγραμμιστής μασκών Karl-Suss MJB 3 STD, του Εργαστηρίου Καθαρού Χώρου του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (I.N.N.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

2.1.2 Υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (Computerized Numerical Control – CNC Micromachining)

Χρησιμοποιήθηκε υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC Micromachining) για την κατασκευή των εκμαγείων των επιπέδων των μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε υποστρώματα πολυ(τετραφθοροαιθυλενίου) (poly(tetrafluoroethylene)/ PTFE και αλουμινίου (Κεφάλαιο 3). Η CNC μικρομηχανική δίνει τη δυνατότητα κοπής και εγχάραξης εξαρτημάτων και υποστρωμάτων διαφόρων υλικών, όπως, σίδηρος, ορείχαλκος, ανοξείδωτος χάλυβας, αλουμίνιο, και πλαστικά. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας του, απαιτείται η δημιουργία ενός σχεδίου CAD (Computer-Aided Design), το οποίο χρησιμοποιεί ως οδηγό η CNC εργαλειομηχανή για να εγχαράξει το υπόστρωμα με την υποβοήθηση κατάλληλου λογισμικού. Πρόκειται για μία μέθοδο υψηλής ακρίβειας και ελέγχου, που προσφέρεται για τη δημιουργία κατασκευών με πολύπλοκα ή/και μικροσκοπικά σχέδια, όπως για παράδειγμα, στενά κανάλια και λεπτά τοιχώματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι μπορεί να επιτευχθεί ανάλυση μέχρι και 0.5 μm , με τη μικρότερη εγχαρασόμενη διάσταση να είναι στα 100 μm , αναλόγως βέβαια και της χρησιμοποιούμενης εργαλειομηχανής. Στην περίπτωσή μας, χρησιμοποιήθηκε η μηχανή LPKF ProtoMat S63 με την καθοδήγηση του λογισμικού LPKF CircuitPro στις εγκαταστάσεις του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», ενώ συχνά οι κατασκευές ανατέθηκαν εξωτερικά σε εταιρείες κατεργασίας CNC.

2.1.3 Αντιδραστήρες πλάσματος

Η τεχνολογία πλάσματος υπεισέρχεται σε διάφορα στάδια κατασκευής της μικροδιάταξης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διάφορα είδη αντιδραστήρων πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν, και το στάδιο στο οποίο ενσωματώθηκαν.

Covance multi-system

Ο αντιδραστήρας πλάσματος Covance multi-system (Femto Science Inc., Korea) είναι ένα σύστημα παραγωγής πλάσματος αέρα χαμηλής πίεσης, που βρίσκεται στο εργαστήριο βιο-μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (bioMEMS), του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.2a. Χρησιμοποιείται κυρίως για διεργασίες επιφανειακής ενεργοποίησης και καθαρισμού, αλλά και πολυμερισμού με χρήση πλάσματος (plasma polymerization) και εγχάραξης, βρίσκοντας εφαρμογές στα (βιο)μικροσυστήματα και τη μικροηλεκτρονική. Αποτελείται από ένα κεντρικό θάλαμο από ανοξείδωτο ατσάλι, μια πλακέτα ελέγχου με οθόνη αφής για τον προσδιορισμό των παραμέτρων λειτουργίας, μία γεννήτρια μέγιστης ισχύος 200 W, και μια μηχανική αντλία κενού.

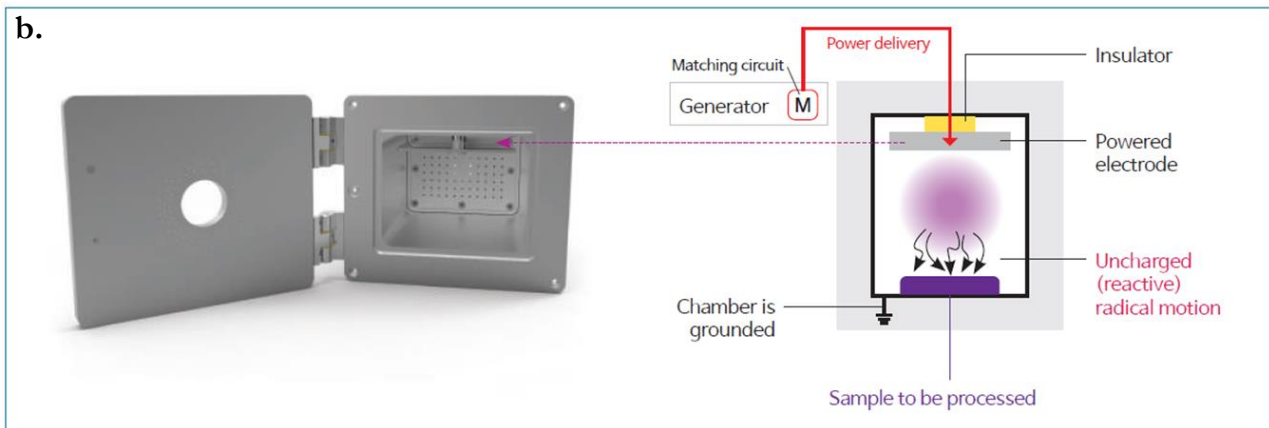
Πιο συγκεκριμένα, ο θάλαμος είναι κυλινδρικός (σε ορισμένα μοντέλα ορθογώνιος), με εσωτερική διάμετρο 152 mm, και στο εσωτερικό του φέρει ανοξείδωτη σχάρα, πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα. Στην κορυφή του βρίσκεται το ηλεκτρόδιο, το οποίο συνδέεται με τη γεννήτρια χαμηλής συχνότητας (LF) 50/60 Hz και τη γείωση (Σχήμα 2.2b). Στο εξωτερικό του, σφραγίζεται ερμητικά με πόρτα από κράμα ατσαλιού/αλουμινίου.

Ο αντιδραστήρας διαθέτει αυτόματο δίκτυο προσαρμογής (matching network), ώστε να περιορίζεται η ανακλώμενη ισχύς προς την πηγή. Υπάρχει η δυνατότητα σύνδεσης 4 καναλιών αερίων, μέγιστης ροής 200 sccm το καθένα, τα οποία εισάγονται ομοιόμορφα στο εσωτερικό του θαλάμου, χάρη στο σχεδιασμό του. Η μηχανική αντλία Pirani μπορεί να εξασφαλίσει κενό μέχρι 5×10^{-4} Torr. Τέλος, μέσω της πλακέτας ελέγχου υποστηρίζεται η δυνατότητα ορισμού αυτόματης ή χειροκίνητης λειτουργίας.

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε πλάσμα αέρα στο οργανικό στάδιο της συγκόλλησης των επιπέδων PDMS, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το γυαλί, εξασφαλίζοντας τη σφράγιση της μικροδιάταξης (Κεφάλαιο 3). Παράλληλα, το πλάσμα αέρα εξασφάλισε την επιφανειακή ενεργοποίηση του υδρόφοβου PDMS για την ακινητοποίηση κολλαγόνου και τη μετέπειτα καλλιέργεια κυττάρων (Κεφάλαιο 4). Σε κάθε περίπτωση, οι συνθήκες κατεργασίας ήταν ισχύς 100 W, πίεση 5×10^{-2} Torr (8.27×10^{-1} Torr μετά την εισαγωγή αερίου), ροή αέρα 50 sccm, και χρόνος 1 min.

a.





Σχήμα 2. 2. a) Ο αντιδραστήρας πλάσματος αέρα χαμηλής πίεσης Covance multi-system (Femto Science Inc., Korea) του εργαστηρίου βιο-μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (bioMEMS), του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». b) Σχηματικό διάγραμμα των βασικών μερών του αντιδραστήρα πλάσματος Covance multi-system για την παραγωγή πλάσματος στο εσωτερικό του κυρίως θαλάμου του.

Αντιδραστήρας πλάσματος δραστικών ιόντων RIE (Reactive Ion Etcher)

Ο αντιδραστήρας πλάσματος RIE, μοντέλο Nextral Alcatel NE330 (Σχήμα 2.3a) βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Καθαρού Χώρου του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Πρόκειται για αντιδραστήρα χαμηλής πυκνότητας πλάσματος και χωρητικής σύζευξης (capacitively coupled). Χρησιμοποιεί τη λειτουργία εγχάραξης δραστικών ιόντων, και είναι σχεδιασμένος για να παρέχει ικανοποιητική επαναληψιμότητα και δυνατότητα κατεργασίας εκτεταμένων περιοχών ή πολλαπλών δειγμάτων. Ενδείκνυται για την εγχάραξη υλικών, όπως πυρίτιο (Si), διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂), νιτρίδιο του πυριτίου (Si₃N₄), καθώς και ρητίνες και πολυμερή. Παρέχει υψηλή ακρίβεια και δυνατότητα ελέγχου, επιτρέποντας είτε ανισότροπη, είτε ισότροπη εγχάραξη, αναλόγως των επιλεγόμενων συνθηκών (πίεσης, ισχύος, ροής αερίου) και του δείγματος προς κατεργασία.

Πιο αναλυτικά, στο εσωτερικό του θαλάμου διεργασιών, εσωτερικής διαμέτρου 420 nm, βρίσκεται το ηλετρόδιο της ανόδου, συνδεδεμένο με τη γείωση, ενώ η κάθοδος επικαλύπτεται από δίσκο χαλαζία, για την τοποθέτηση των δειγμάτων και την αποφυγή μολύνσεων. Με την εφαρμογή τάσης ραδιοσυχνότητας (RF), τυπικής τιμής 13.56 MHz, τα ιόντα λόγω της διαφοράς δυναμικού επιταχύνονται προς την κάθοδο, προσκρούοντας στο δείγμα με ενέργεια δεκάδων eV. Το πλάσμα γεννάται υπό χαμηλή πίεση (5 – 100 mTorr), γεγονός που εξασφαλίζει καλή ανισοτροπία, αλλά έχει ως συνέπεια χαμηλό ρυθμό εγχάραξης. Για το λόγο αυτό, συχνά οι αντιδραστήρες RIE χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές λεπτών επιστρώσεων.

Παρέχεται η δυνατότητα εισαγωγής 3 διαφορετικών αερίων, O₂, SF₆, και CHF₃, τα οποία εισάγονται συμμετρικά από την άνοδο του θαλάμου διεργασιών, εξασφαλίζοντας ομοιομορφία εγχάραξης. Για καθένα από τα αέρια, υπάρχει αντίστοιχος ρυθμιστής της ροής τους, που δεν ξεπερνά τα 25 sccm, 50 sccm και 100 sccm για SF₆, CHF₃, και O₂, αντίστοιχα. Εκτός της μηχανικής αντλίας κενού, υπάρχει και τυρβομοριακή, που εξασφαλίζει κενό έως και 10⁻⁶ mbar, και η οποία αντίστοιχα διαθέτει ποτενσιόμετρο πίεσης για τη ρύθμισή της. Τέλος, η μέγιστη ισχύς της γεννήτριας είναι 600 W, ενώ υπάρχει και δίκτυο προσαρμογής για την ελαχιστοποίηση της ανακλώμενης ισχύος.

Ο συγκεκριμένος αντιδραστήρας χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή της πορώδους μεμβράνης PDMS (Κεφάλαιο 3), και συγκεκριμένα για την απόθεση υδροφοβού υμενίου CHF_3 στο φορέα της υπό συνθήκες 50 mTorr, 50 sccm, 50 W, και 6min.

Αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης (Inductively Coupled Plasma, ICP)

Ο αντιδραστήρας επαγωγικής σύζευξης (ICP) και υψηλής πυκνότητας πλάσματος, μοντέλο MET (Micromachining Etch Tool) της Alcatel, αποτελεί εξοπλισμό του Εργαστηρίου Πλάσματος, του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Χρησιμοποιείται κυρίως σε διαδικασίες εγχάραξης Si, μικρο-νανοϋφανσης πολυμερών και απόθεσης λεπτών υμενίων φθοράνθρακα. Η υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρονίων, της τάξης των $10^{10} - 10^{13} \text{ cm}^{-3}$, αυξάνει την αναλογία ιόντων προς ουδέτερων ατόμων που συμμετέχουν στην εγχάραξη, εξασφαλίζοντας έτσι, ανισοτροπικότητα και υψηλούς ρυθμούς εγχάραξης.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.3b, αποτελείται από τον προθάλαμο, τον κυρίως θάλαμο, και διάφορες επιμέρους μονάδες για τον καθορισμό των παραμέτρων λειτουργίας του αντιδραστήρα. Συγκεκριμένα, διαθέτει μια κεντρική μονάδα για τον έλεγχο βασικών διεργασιών, όπως για παράδειγμα, η δημιουργία κενού στον προθάλαμο, η μεταφορά του δισκίου από και προς τον προθάλαμο, η εκκίνηση πλάσματος, κ.ά. Επιπλέον, υπάρχει σύστημα ελέγχου πίεσης και θερμοκρασίας στον κυρίως θάλαμο, μονάδα ρύθμισης ισχύος της γεννήτριας και του δυναμικού (bias), ρυθμιστές ροής των αερίων, καθώς και σύστημα ενημέρωσης για την κατάσταση των αντλιών.

Η πηγή πλάσματος βρίσκεται στο επάνω μέρος του κυρίως θαλάμου, και διασυνδέεται με τη γεννήτρια μέσω παρεμβαλλόμενης επιχαλωμένης κεραίας τύπου Helicon μονής σπείρας. Η μέγιστη ισχύς της γεννήτριας μπορεί να φθάσει μέχρι και τα 2 000 W, δημιουργούμενη από ρεύματα ραδιοσυχνότητας (RF), και το παραγόμενο εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο διαθέτει συχνότητα 13.56 MHz. Στη διατήρηση της υψηλής πυκνότητας ηλεκτρονίων, συμβάλλουν συστήματα μαγνητών σε διάταξη NS-SN, εγκατερωθέν του θαλάμου, τα οποία εξαναγκάζουν τα ηλεκτρόνια να κατευθυνθούν προς τον κύριο όγκο του πλάσματος, με αυτό τον τρόπο ανατροφοδοτώντας το. Επίσης, υπάρχει και δεύτερη γεννήτρια RF για τη δημιουργία τάσης πόλωσης, η οποία λαμβάνει τιμές εντός της περιοχής -200 – 0 V, χωρίς όμως ποτέ πρακτικά να είναι μεγαλύτερη των -100 V. Η θερμοκρασία του υποστρώματος στο εσωτερικό του θαλάμου μπορεί να οριστεί μεταξύ των τιμών -150°C - +50°C, ρυθμιζόμενη με τη βοήθεια υγρού αζώτου και θερμοαντικής αντίστασης, για την ψύξη και τη θέρμανσή του, αντίστοιχα. Η πίεση καθορίζεται με τον έλεγχο της θέσης μιας βαλβίδας, η οποία ανοιγόμενη ή κλεινόμενη, μειώνει ή αυξάνει, αντίστοιχα την τιμή της πίεσης στο θάλαμο εντός εύρους 5 – 100 mTorr. Τέλος, μπορούν να εισαχθούν μέχρι και τέσσερα αέρια στο θάλαμο, ξεχωριστά ή και μίξη αυτών, με ροές μεταξύ 0 – 200 sccm.

Ο αντιδραστήρας ICP χρησιμοποιήθηκε στη διεργασία κατασκευής της πορώδους μεμβράνης PDMS (Κεφάλαιο 3), και συγκεκριμένα σε δύο σημαντικά στάδιά της. Το πρώτο στάδιο αφορά στην κατασκευή του εκμαγείου Si της μεμβράνης, το οποίο εγχάραχθηκε ανισοτροπικά με τη διεργασία Bosch, χρησιμοποιώντας μείγμα αερίων $\text{SF}_6/\text{C}_4\text{F}_8$, για τη δημιουργία μικροκολώνων. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 1800 W, -70 V (τάση πόλωσης), 15 °C, 40 mTorr, 171 sccm SF_6 / 115 sccm C_4F_8 , βήματα χρονισμού 7s/3s για SF_6 και C_4F_8 , αντίστοιχα, και συνολικός χρόνος διεργασίας 10 min. Το δεύτερο στάδιο εντοπίζεται στην υδροφοβοποίηση του εκμαγείου Si μετά την ολοκλήρωση της κατασκευής του, με την απόθεση λεπτού υδροφοβού υμενίου C_4F_8 , στις συνθήκες συνθήκες 5.25 Pa, 900 W, 25 sccm, 0°C, 0 bias, και 1 min.

a.



b.



Σχήμα 2. 3. a) Ο αντιδραστήρας πλάσματος δραστηκών ιόντων RIE (Reactive Ion Etcher), μοντέλο Nextral Alcatel NE330 στο Εργαστήριο Καθαρού Χώρου του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», b) Ο αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP (Inductively Coupled Plasma) MET της Alcatel, του Εργαστηρίου Πλάσματος του Ι.Ν.Ν., και επάνω αριστερά, ο κυρίως θάλαμος του σε μεγέθυνση.

2.1.4 Λοιπά όργανα για την κατασκευή των μικρορευστονικών διατάξεων

Για την κατασκευή των μικρορευστονικών διατάξεων χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα τα παρακάτω όργανα:

1. Περιστροφικός επιστρωτής (spin coater) WS-650Mz-23NPPB της εταιρείας Laurell Technologies, για την επίστρωση λεπτών υμενίων σε δισκία και πολυμερή. Ενσωματώθηκε κύρια στη δημιουργία λεπτής επίστρωσης προπολυμερούς PDMS (πάνω σε φορέα PDMS), για τη μετέπειτα μετατροπή του σε πορώδη μεμβράνη PDMS, καθώς και συχνά σε επιστρώσεις υμενίων εμπορικού Teflon. Ο επιστρωτής συνδέεται με μηχανική αντλία κενού, η οποία δημιουργώντας υποπίεση (≥ 15 inHg) συγκρατεί το δείγμα κατά την περιστροφή του στην κεφαλή του περιστροφέα, καθώς και με κανάλι παροχής αέρα, το οποίο βοηθάει στη στεγανοποίηση του εσωτερικού του επιστρωτή. Οι παράμετροι επίστρωσης (στροφές, χρόνος, επιτάχυνση) καθορίζονται από εξωτερικό πίνακα ελέγχου λειτουργίας.
2. 3D εκτυπωτής, μοντέλο Form 3+ της Formlabs, στις εγκαταστάσεις του I.N.N, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των προσαρμογών της μικροδιάταξης μυελού των οστών, με χρήση της ρητίνης High Temp V2 (FLHTAM02).
3. Δράπανο DREMEL μαζί με τη βάση του (DREMEL® Workstation (220)), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη διάνοιξη διαμπερών οπών σε γυαλί μικρορρευστονικών διατάξεων, με τη χρήση κάθε φορά τρυπανακίου κατάλληλης διαμέτρου. Χαρακτηριστικά αναφέρεται το γυαλί της μικροδιάταξης μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας, όπου οι οπές εισόδου/εξόδου διανοίχθηκαν με τρυπάνι διαμέτρου 1.2 mm.
4. Φούρνος υψηλής θερμοκρασίας Nabertherm High Temperature Furnace (HTC) 08/16/P330, για τη σκλήρυνση/πολυμερισμό των προπολυμερών PDMS, καθώς και για τη μελέτη της ενεργούς τροφοδοσίας μικρορρευστονικών διατάξεων σε θερμοκρασία 37°C.

2.2 Χαρακτηρισμός και αξιολόγηση υποστρωμάτων και μικρορρευστονικών διατάξεων

2.2.1 Οπτικό μικροσκόπιο

Το οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS MX51 INDUSTRIAL MICROSCOPE στο Εργαστήριο Καθαρού Χώρου του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Σχήμα 2.4), χρησιμοποιήθηκε πολύ συχνά για μια πρώτη αξιολόγηση διεργασιών κατασκευής μικροδιατάξεων ή τμημάτων αυτών. Ελέγχθηκε κυρίως η έκβαση διεργασιών που εκτελούνται στο Εργαστήριο Καθαρού Χώρου, όπως για παράδειγμα, η μεταφορά μάσκας διαφάνειας σε γυαλί quartz ή η κατασκευή του εικμαγείου της πορώδους μεμβράνης με φωτολιθογραφία, αλλά και μετέπειτα κατασκευαστικά στάδια εκτός του Καθαρού Χώρου, όπως η διεργασία Bosch. Λόγω της κατεργασίας στη μικροκλίμακα, το οπτικό μικροσκόπιο αποτελεί μια πρώτη αξιόπιστη απεικονιστική μέθοδο για τον έλεγχο της ποιότητας των διενεργούμενων διαδικασιών.

Το MX51 είναι μικροσκόπιο ανακλώμενου φωτός, αποτελούμενο από ένα σύνολο συγκλίνοντων και αποκλίνοντων φακών, λάμπα αλογόνου, και αντικειμενικούς φακούς που προσφέρουν μεγεθύνσεις 10x, 50x, 100x. Διαθέτει εργονομικό σχεδιασμό, με χειριστήριο που επιτρέπει ομοαξονικές κινήσεις της τράπεζας κατά τον x και y άξονα προς διευκόλυνση του χειριστή, ρυθμιστές φωτεινότητας και εστίασης σε θέσεις που διευκολύνουν την παρατήρηση, καθώς και δυνατότητα παρατήρησης φωτεινού (brightfield) και σιοτεινού πεδίου (darkfield). Ακόμη, είναι συνδεδεμένο με το λογισμικό Image-Pro Express (Media Cybernetics Inc.) που δίνει τη δυνατότητα λήψης και αποθήκευσης εικόνων σε υψηλή ανάλυση, καθώς και ανάλυσης και επεξεργασίας τους (λήψη μετρήσεων, προσθήκη σχολίων, εφαρμογή στατιστικής).



Σχήμα 2. 4. Οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS MX51 INDUSTRIAL MICROSCOPE στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Καθαρού Χώρου του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

2.2.2 Μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (Scanning Electron Microscopy - SEM)

Προς λεπτομερέστερη παρατήρηση των μικροδομών σε μεγαλύτερη ανάλυση και μεγέθυνση, μη εφικτή με το οπτικό μικροσκόπιο, χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης εκπομπών πεδίου (Field Emission SEM – FE SEM), μοντέλο JEOL JSM-7401F του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Σχήμα 2.5). Όπως υποδηλώνεται και από την ονομασία του, στηρίζει τη λειτουργία του σε δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής κινητικής ενέργειας, τα οποία προσπίπτουν στην επιφάνεια του δείγματος προς παρατήρηση, προκαλώντας εκπομπή μίας ποικιλίας ηλεκτρονίων και ενεργειών, που διαμορφώνουν με αυτό τον τρόπο την τοπογραφία του δείγματος. Συγκεκριμένα, αναλόγως της ενέργειας και της γωνίας πρόσπτωσης της προσπίπτουσας δέσμης, καθώς και του ατομικού αριθμού των ατόμων και της πυκνότητας του δείγματος, εκπέμπονται τρία διαφορετικά είδη ηλεκτρονίων: τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, ενέργειας μικρότερης των 50 eV, προερχόμενα από στρώμα κοντά στην επιφάνεια του δείγματος, τα οπισθοσκιεδαζόμενα ηλεκτρόνια, υψηλότερης ενέργειας προερχόμενα από μεγαλύτερα βάθη, και τέλος, τα ηλεκτρόνια Auger ή ακτινοβολία X, που προέρχονται από ακόμη μεγαλύτερα βάθη, όπως για παράδειγμα εσωτερικές στοιβάδες ατόμων του δείγματος.

Ως προς την αρχή λειτουργίας του, ένα κανόνι εκπομπής πεδίου ψυχρής καθόδου (field emission electron gun) παράγει τη δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία επιταχυνόμενη και εστιαζόμενη σε περιοχή διαμέτρου 2 – 100 nm στην επιφάνεια του δείγματος, σαρώνει τελικά όλη την επιφάνειά του, καταμετρώντας παράλληλα τα παραγόμενα δευτερογενή ηλεκτρόνια από τον αντίστοιχο ανιχνευτή. Μέσω σύνδεσης με ειδικό λογισμικό που συνοδεύει το SEM, η δέσμη ηλεκτρονίων συγχρονίζεται με την κηλίδα της οθόνης CRT, σαρώνοντας την οθόνη με φωτεινότητα ανάλογη εκείνης από το ενισχυμένο σήμα των δευτερογενών ηλεκτρονίων καταλήγοντας έτσι, να διαμορφώνεται 3D οπτική εικόνα του δείγματος. Με χρήση των αντίστοιχων ανιχνευτών από τα οπισθοσκιεδαζόμενα ή τα ηλεκτρόνια Auger, είναι δυνατή η λεπτομερέστερη απόδοση της οπτικής εικόνας. Έτσι, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την απεικόνιση SEM είναι το ανάγλυφο της επιφάνειας (δευτερογενή ηλεκτρόνια), και η χημική της σύσταση (οπισθοσκιεδαζόμενα ηλεκτρόνια).

Η τάση επιτάχυνσης της δέσμης κυμαίνεται μεταξύ 0.1 kV και 30 kV, ενώ το κενό κατεβαίνει στα 10^{-8} Pa. Η εικόνα μπορεί να μεγεθυνθεί μέχρι και 1 000 000x, και η ανάλυσή της να φθάσει το 1.0 nm στα 15 kV, και τα 1.5 nm στο 1 kV. Η μετακίνηση κατά τους x, y και z άξονες ελέγχεται μέσω υπολογιστή, ενώ δίνεται η

δυνατότητα χειροκίνητου χειρισμού του άξονα z κατά 1.5 mm έως 25 mm και περιστροφής υπό γωνία -5° έως $+70^\circ$. Υλικά απεικόνισης είναι μέταλλα, κεραμικά, πλαστικά, πολυμερή, οξείδια, ημιαγωγοί, σύνθετα υλικά, νανοσωματίδια, μικτά οξείδια, αλλά και μη αγώγιμα δείγματα. Τα δείγματα συνήθως υφίστανται επιμετάλλωση με ιονοβολή με λεπτό στρώμα πλατίνας (Pt), ώστε να αποφευχθεί η φόρτισή τους κατά τη σάρωση με την ηλεκτρονική δέσμη.

Στην εν λόγω διατριβή το SEM χρησιμοποιήθηκε σε πολλές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα, για την απεικόνιση της κατασκευαστικά ολοκληρωμένης μικροδιάταξης μυελού των οστών, της κατασκευασμένης πορώδους μεμβράνης PDMS, αλλά και του εκμαγείου της Si (Κεφάλαιο 3).



Σχήμα 2. 5. Το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (Scanning Electron Microscopy - SEM), μοντέλο JEOL JSM-7401F, που βρίσκεται στο Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Το μικροσκόπιο με υπολογιστή μέσω κατάλληλου λογισμικού προς έλεγχο των συνθηκών και της ποιότητας απεικόνισης του δείγματος.

2.2.3 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy - XPS)

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS) αποτελεί μία ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική ανάλυσης της μοριακής σύστασης του δείγματος. Βασίζεται στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το οποίο πρωτοανακαλύφθηκε το 1887 από τον Heinrich Hertz, για να περιγραφεί επίσημα το 1905 από τον Albert Einstein, ο οποίος έλαβε μεταγενέστερα βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1921 για τη δουλειά του. Όλα τα στοιχεία, εκτός του υδρογόνου και του ηλίου μπορούν να ανιχνευθούν με XPS, και σχεδόν όλα τα υλικά, από πλαστικά μέχρι ημιαγωγούς και υφάσματα. Η τεχνική διακρίνεται για την υψηλή ευαισθησία της, σε συγκεντρώσεις μόλις 0.1 at.%, καθώς και για την επιφανειακή της εξειδίκευση σε πάχη μικρότερα των 10 nm. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας του, ακτίνες X βομβαρδίζουν την επιφάνεια του δείγματος και μετράται η κινητική ενέργεια των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων, μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί η στοιχειακή σύσταση της επιφάνειας. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα ακτινοβολείται με ακτίνες X ενέργειας χαμηλότερης των ≈ 6 keV, και εκπέμπονται φωτοηλεκτρόνια, ως αποτέλεσμα της πλήρους μεταφοράς της ενέργειας των ακτίνων X σε ηλεκτρόνια του πυρήνα. Αυτό εκφράζεται μαθηματικά με την παρακάτω σχέση (1), όπου περιγράφεται πως η ενέργεια της ακτίνας X ($h\nu$) ισούται με την ενέργεια δέσμευσης (binding energy - BE)

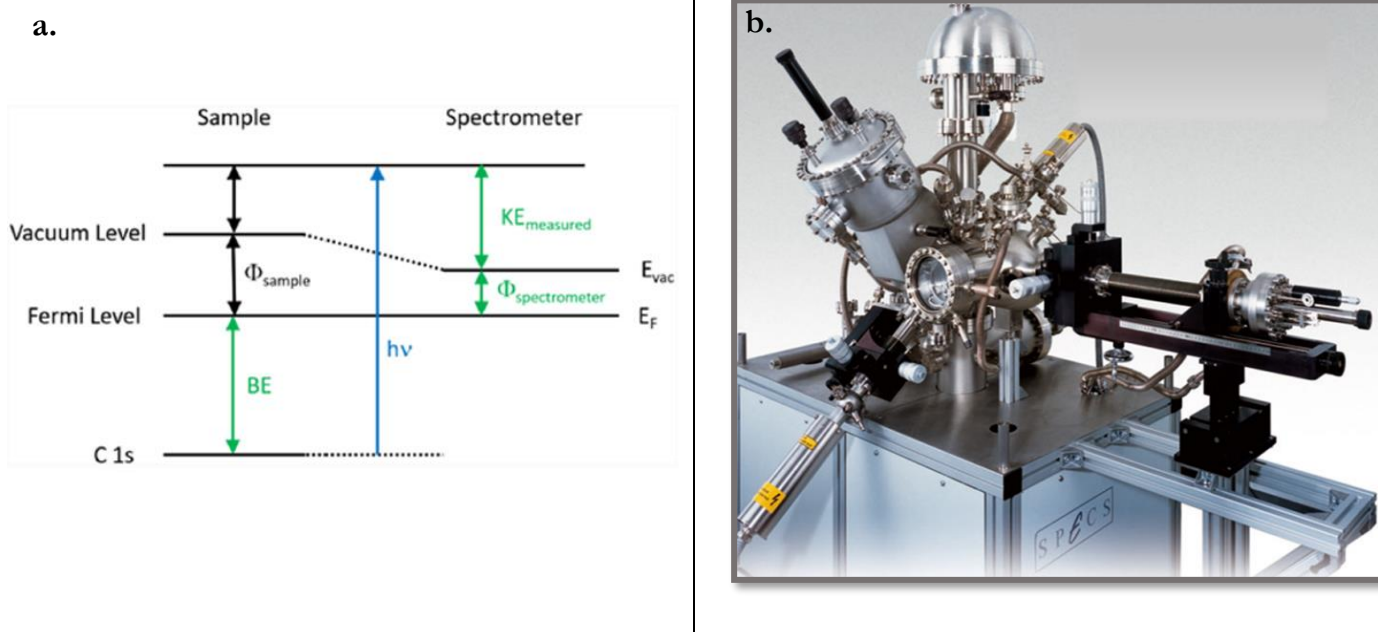
του ηλεκτρονίου, την κινητική ενέργεια (kinetic energy - KE) του ηλεκτρονίου που εκπέμπεται, και τη συνάρτηση του έργου του φασματοσκοπίου (Φ_{spec}), που είναι μία σταθερά.

$$h\nu = BE + KE + \Phi_{\text{spec}} \quad (1) \Rightarrow$$

$$BE = h\nu - KE - \Phi_{\text{spec}} \quad (2)$$

Έτσι, για τον ορισμό της ενέργειας δέσμευσης του ηλεκτρονίου, μεταβαίνουμε στη σχέση (2), η λογική της οποίας απεικονίζεται και διαγραμματικά στο Σχήμα 2.6a. Η ενέργεια δέσμευσης του ηλεκτρονίου είναι ιδιότητα του υλικού και είναι ανεξάρτητη της πηγής ακτίνων X που χρησιμοποιήθηκε, και συνεπώς, χαρακτηρίζει τη χημική κατάσταση του στοιχείου. Κάθε ηλεκτρόνιο με ενέργεια δέσμευσης χαμηλότερη των ακτίνων X ανιχνεύεται με την τεχνική XPS.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η διάταξη SPECS Phoibos100 (Σχήμα 2.6b) για τη στοιχειακή ταυτοποίηση των μικροθαλάμων PDMS που κατεργάστηκαν με πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα (Κεφάλαιο 4). Η διάταξη βρίσκεται εργαστήριο του Ερευνητή Α' Αθανάσιου Δημουλά του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», και όλες οι μετρήσεις και αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τη Δρ. Ευαγγελία Ξενογιαννοπούλου. Χρησιμοποιήθηκε μονοχρωματική πηγή αλουμινίου, που επιτρέπει τη διέλευση μόνο των



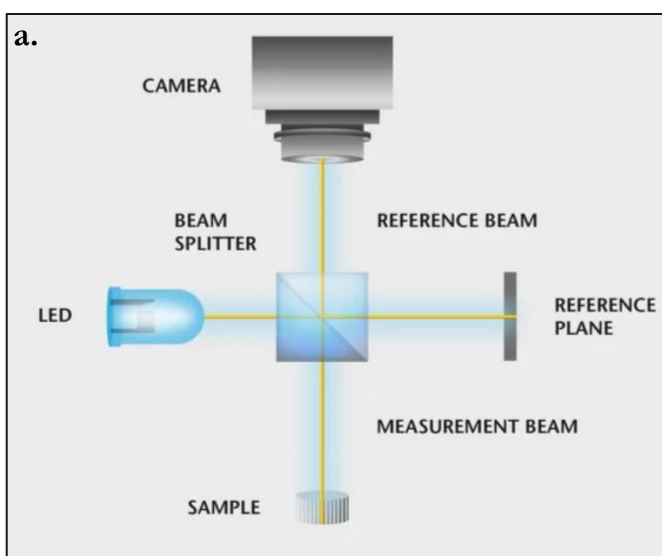
Σχήμα 2. 6. a) Ενεργειακό διάγραμμα που απεικονίζει σχηματικά τη βασική εξίσωση της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy - XPS) ($h\nu = BE + KE + \Phi_{\text{spec}}$), συμπεριλαμβανομένης της ενέργειας της πηγής ακτίνων X ($h\nu$), της ενέργειας δέσμευσης του ηλεκτρονίου (BE), της μετρούμενης κινητικής ενέργειας του ηλεκτρονίου (KE_{measured}), και του έργου του φασματοσκοπίου ($\Phi_{\text{spectrometer}}$), b) Το φασματοσκόπιο φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X, SPECS Phoibos100, στις εγκαταστάσεις του Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

2.2.4 Οπτικό προφιλόμετρο Profilm3D®

Για το χαρακτηρισμό της τοπογραφίας και του προφίλ των εμαγείων Si της πορώδους μεμβράνης PDMS μετά τη διεργασία Bosch, χρησιμοποιήθηκε το όργανο Profilm3D® της εταιρείας Nanotypos, χειριζόμενο από την κα Κωνσταντίνα Τουρλούκη, MSc (Κεφάλαιο 3). Το οπτικό προφιλόμετρο Profilm3D® είναι σύστημα 3D χαρακτηρισμού της τοπογραφίας της επιφάνειας του δείγματος, χωρίς επαφή, βασιζόμενο στη συμβολομετρία λευκού φωτός (White Light Interferometry - WLI).

Η σύγχρονη συμβολομετρία λευκού φωτός στηρίζεται στα φαινόμενα συμβολής που λαμβάνουν χώρα κατά την υπέρθεση του φωτός που ανακλάται από το δείγμα με το ανακλώμενο φως που προέρχεται από καθρέπτη αναφοράς υψηλής ακριβείας. Η μέθοδος μέτρησης στηρίζεται αρχή της συμβολομετρίας Michelson (Σχήμα 2.7a), σύμφωνα με την οποία, η ειπεμπόμενη ακτινοβολία από την πηγή φωτός διαχωρίζεται αρχικά σε δύο δέσμες, τη δέσμη μέτρησης και τη δέσμη αναφοράς μετά την πρόσπτωσή της σε διαχωριστή δέσμης. Η δέσμη μέτρησης προσκρούει στο δείγμα, ενώ η δέσμη αναφοράς χτυπά έναν καθρέπτη. Το φως που ανακλάται από τον καθρέπτη και το δείγμα ανασυνδυάζεται στον διαχωριστή δέσμης και εστιάζεται σε μια κάμερα. Μετά τον ανασυνδυασμό των δεσμών, όταν η οπτική διαδρομή για ένα σημείο του αντικειμένου είναι ίδια με εκείνη από τον καθρέπτη αναφοράς, τότε λαμβάνει χώρα ενισχυτική συμβολή και το εν λόγω σημείο του αντικειμένου απεικονίζεται μέσω της κάμερας με μέγιστη ένταση. Για σημεία του αντικειμένου με διαφορετικές οπτικές διαδρομές, η απεικόνιση είναι μικρότερης έντασης. Η τοπογραφία του δείγματος καθορίζει τη διαφορά μεταξύ των δύο οπτικών διαδρομών, κι έτσι το μοτίβο συμβολών μεταφράζεται σε κορυφές και κοιλάδες στην επιφάνεια του δείγματος.

Το Profilm3D® προσφέρει απεικόνιση της επιφάνειας στην κλίμακα νανομέτρων έως και χιλιοστών, με τη ρύθμιση μέσω του συνοδού λογισμικού Profilm® της κατάλληλης διεργασίας, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει μεμονωμένες σαρώσεις ή αυτοματοποιημένες μετρήσεις σε πολλαπλές τοποθεσίες. Η τράπεζα έχει τη δυνατότητα μετακίνησης στους x-y-z άξονες κατά 100 mm, ενώ διαθέτει αντικειμενικούς φακούς με μεγεθύνσεις που κυμαίνονται από 5x έως 100x, ώστε να υποστηρίζονται εφαρμογές νανο-, μικρο- και μακροτοπογραφίας. Ο αντικειμενικός φακός 5x είναι ένας φακός Michelson, και οι φακοί 10x, 20x, 50x και 100x, είναι φακοί συμβολομετρίας Mirau. Στο Σχήμα 2.7b απεικονίζεται το προφιλόμετρο Profilm3D® που χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 2. 7. α) Αρχή λειτουργίας οπτικού προφιλόμετρου Profilm3D®, στηριζόμενη στη συμβολομετρία Michelson, β) Εικόνα του οπτικού προφιλόμετρου Profilm3D® της εταιρείας Nanotypos.

2.2.5 Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής

Για τη μέτρηση των ιδιοτήτων διαβροχής επιφανειών και λεπτών υμενίων χρησιμοποιήθηκε το όργανο Drop Shape Analyzer – DSA30 της εταιρείας KRÜSS GmbH, εξοπλισμός του Εργαστηρίου Πλάσματος, Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Πρόκειται για ευέλικτο όργανο ακριβείας που καταμετρά στατικές και δυναμικές γωνίες επαφής, καθώς και την ελεύθερη ενέργεια επιφάνειας. Ο χειρισμός του είναι ημι-αυτόματος με τη βοήθεια του λογισμικού ADVANCE. Διαθέτει κάμερα κάμερα υψηλής ταχύτητας CF06, μονόχρωμο LED υψηλής ισχύος, μήκους κύματος 470 nm, τράπεζα τοποθέτησης των δειγμάτων (100 x 100 x 45 mm³), και γυάλινη σύριγγα 450 μL ελεγχόμενη αποκλειστικά από το λογισμικό.

Στην παρούσα διατριβή το DSA30 χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση στατικών γωνιών επαφής, όπου συνοπτικά, εναποτίθενται 2 μL απιονισμένου νερού στην επιφάνεια προς μέτρηση, και με εφαπτομενική προσαρμογή υπολογίζεται αυτόματα η γωνία επαφής με συστηματικό σφάλμα $\approx 2^\circ$. Παρακάτω στο Σχήμα 2.8, παρουσιάζεται η χρησιμοποιηθείσα διάταξη.



Σχήμα 2. 8. Το σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής Drop Shape Analyzer – DSA30 (KRÜSS GmbH) του Εργαστηρίου Πλάσματος, Ι.Ν.Ν., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

2.3 Λειτουργία μικρορευστονικών διατάξεων υπό ροή

Για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων και των μικροδιατάξεων μυελού των οστών, χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη μικροαντλιών, μικροαντλίες σύριγγας και περισταλτική μικροαντλία, με το κάθε είδος να ενσωματώνεται με κριτήριο την επιθυμητή ροή. Επιπλέον, για τη μελέτη και αντιμετώπιση του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων, που προκύπτει κατά την τροφοδοσία των μικρορευστονικών διατάξεων, ενσωματώθηκε εμπορική παγίδα φυσαλίδων, καθώς και εμπορική μικροδιάταξη τριδιάστατης καλλιέργειας κυττάρων. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι χρησιμοποιηθείσες συσκευές:

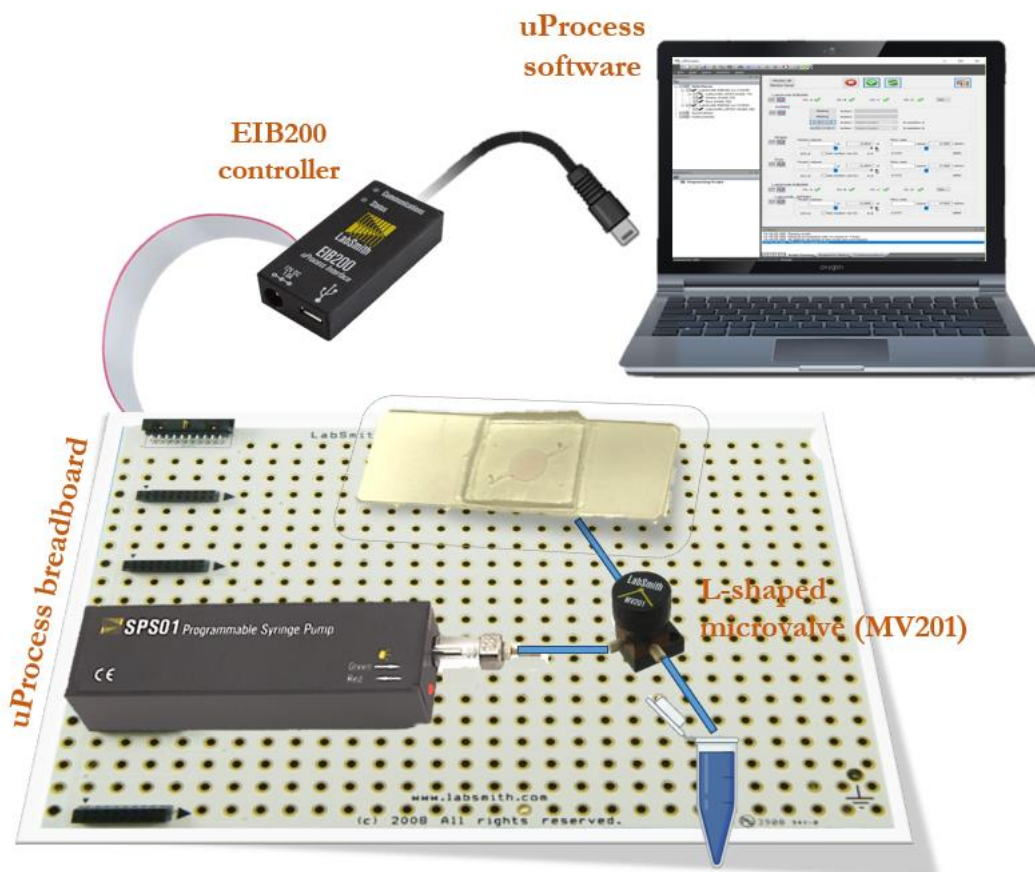
- Μικροαντλίες σύριγγας

Για την τροφοδοσία μικροθαλάμων με θρεπτικό υλικό, χρησιμοποιήθηκαν μικροαντλίες σύριγγας LabSmith SPS01 Programmable Syringe Pump (Σχήμα 2.9a). Διαθέτουν βηματικό μοτέρ το οποίο μετακινεί ανάλογα τον εμπεριεχόμενο στη σύριγγα εμβολέα προς έγχυση/άντληση των υγρών. Η λειτουργία τους και ο προσδιορισμός της ροής του καθορίζεται μέσω του λογισμικού uProcess v2.0, ενώ για είναι εφικτή η σύνδεσή τους με υπολογιστή απαιτείται η σύνδεσή του με ελεγκτή διεπαφής EIB200 (LabSmith Inc.). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας, χρησιμοποιήθηκαν μικροαντλίες με σύριγγες μέγιστου όγκου 20 μL και 50 μL , με αντίστοιχα βηματικά μεγέθη 0.033 μL και 0.083 μL , αντίστοιχα. Για τον έλεγχο της κατεύθυνσης της ροής (άντληση από το erpendorf/έγχυση προς το μικροθάλαμο) χρησιμοποιήθηκαν χειροκίνητες μικροβαλβίδες MV201 της ίδιας εταιρείας, με τρεις θύρες και δύο πιθανές κατευθύνσεις ροής, που καθορίζονται μέσω λειτουργίας «L». Οι μικροαντλίες και οι μικροβαλβίδες προσαρμόζονται πάνω στους ενσωματωμένους υποδοχείς/βύσματα της πλακέτας uProcess breadboard (LabSmith Inc.) (Σχήμα 2.9b).

a.



b.

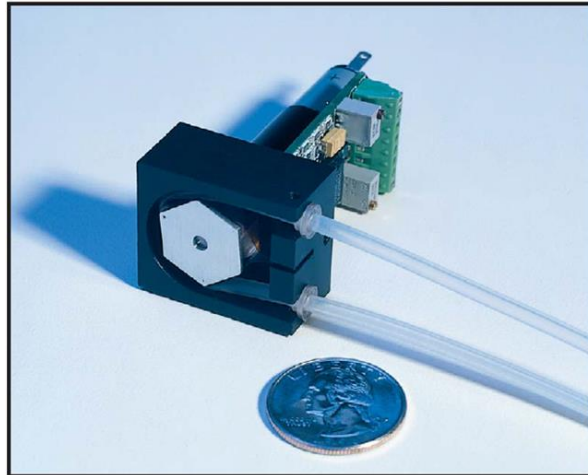


Σχήμα 2. 9. Μικροαντλία σύριγγας LabSmith SPS01 Programmable Syringe Pump για τη λειτουργία μικροθαλάμων υπό χαμηλές ροές. α) Φωτογραφία της μικροαντλίας. β) Σχηματική αναπαράσταση της συνδεσμολογίας της μικροαντλίας για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων και τη σύνδεσή της με υπολογιστή προς έλεγχο της ροής της. Η μικροαντλία συνδέεται με παρεμβαλλόμενη μικροβαλβίδα MV201, λειτουργίας «L», που καθορίζει την κατεύθυνση της ροής είτε από το erpendorf στην αντλία για την πλήρωσή της με υγρό, είτε από την αντλία προς το μικροθάλαμο. Η όλη διάταξη τοποθετείται πάνω σε πλακέτα uProcess breadboard, η οποία συνδέεται μέσω του ελεγκτή διεπαφής EIB200 με υπολογιστή, όπου με χρήση του λογισμικού uProcess v2.0, ρυθμίζεται η επιθυμητή ροή.

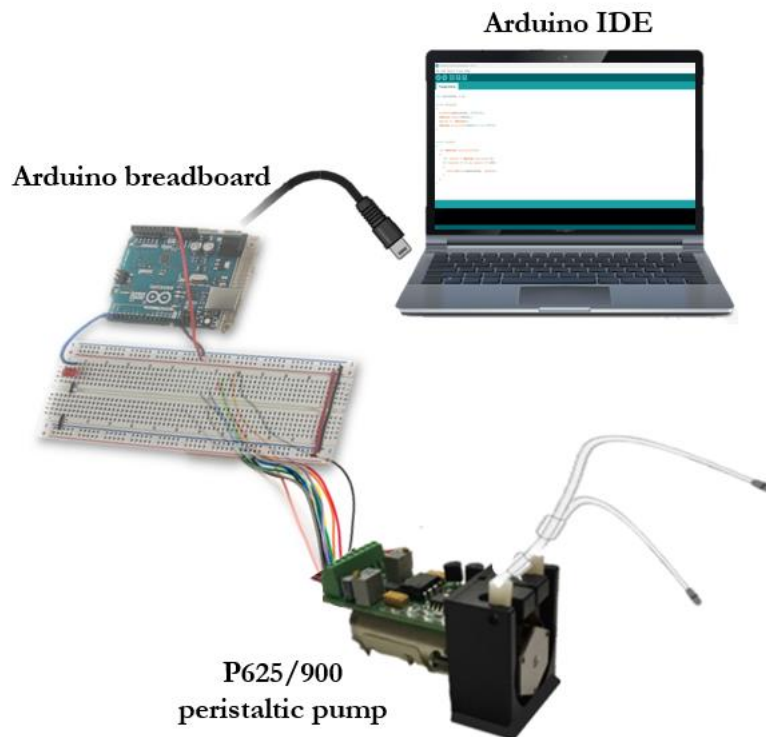
- Περισταλτική μικροαντλία

Για τη μελέτη υψηλότερων ροών τροφοδοσίας μικρορευστονικών διατάξεων με θεραπευτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε περισταλτική μικροαντλία P625/900 της Instech Laboratories Inc. (Σχήμα 2.10a), διαστάσεων μόλις 27 x 32 x 54 mm, συνοδευόμενη από σωληνάκια σιλικόνης που αναλόγως της εσωτερικής διαμέτρου τους αποδίδουν το επιθυμητό εύρος ροών. Στην περίπτωση μας ήταν εσωτερικής διαμέτρου 0.5 mm και εξωτερικής 2 mm, δίνοντας ροές μέχρι και 140 $\mu\text{L}/\text{min}$. Η λειτουργία της στηρίζεται στη συμπίεση και χαλάρωση των εύκαμπτων αυτών σωλήνων από περιστρεφόμενο μεταλλικό κύλινδρο μέσα στην αντλία, που δημιουργεί κενό στους σωλήνες, προωθώντας έτσι το υγρό. Ο μεταλλικός κύλινδρος είναι ειδικά διαμορφωμένος σε εξαγωνικό σχήμα ώστε να ελαχιστοποιεί τους παλμούς και να βελτιώνει την ακρίβεια ροής ($\pm 5\%$). Η ροή της ελέγχεται μέσω υπολογιστή με τη διαμεσολάβηση πλακέτας Arduino, που συνδέεται μέσω πλακέτας breadboard με την αντλία (Σχήμα 2.10b). Για τον προγραμματισμό της πλακέτας Arduino χρησιμοποιείται το προγραμματιστικό περιβάλλον (IDE) Arduino 1.8.13, όπου στην ουσία μέσω ρύθμισης της τάσης εντός εύρους 0 – 5 V, καθορίζεται ανάλογα και η ροή τροφοδοσίας.

a.



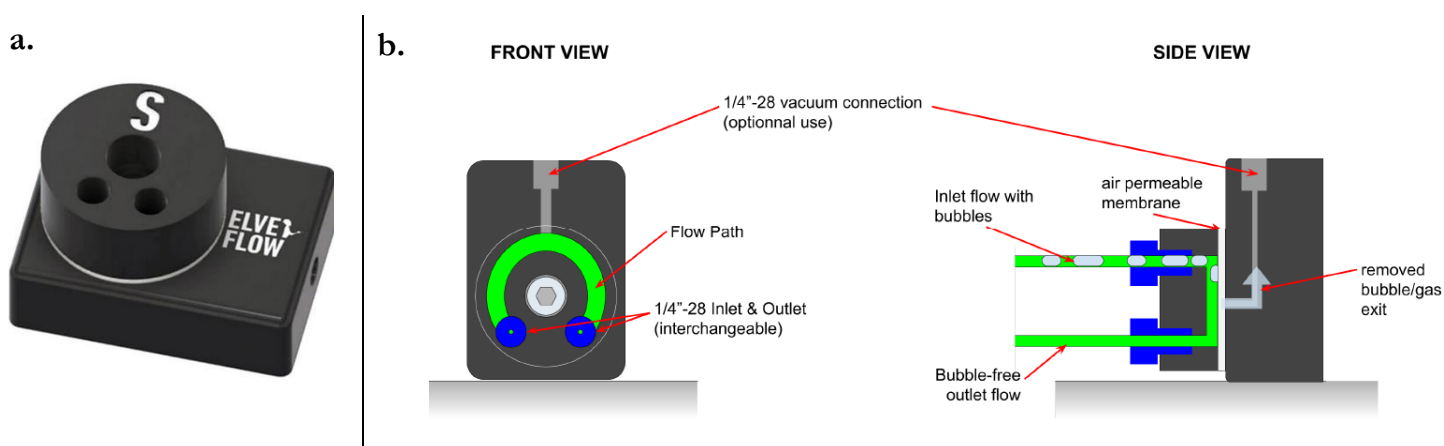
b.



Σχήμα 2. 10. Περισταλτική μικροαντλία P625/900 της Inotech Laboratories Inc. για την τροφοδοσία μικροθαλάμων και της μικροδιάταξης μυελού των οστών με υψηλές ροές. a) Φωτογραφία της αντλίας. b) Συνδεσμολογία της αντλίας με υπολογιστή για έλεγχο της ροής της. Η αντλία συνδέεται με πλακέτα Arduino με τη μεσολάβση breadboard, και στη συνέχεια με υπολογιστή, όπου μέσω του λογισμικού Arduino 1.8.13 ρυθμίζεται η επιθυμητή ροή.

Εμπορική παγίδα

Η εμπορική παγίδα, που αγοράστηκε από την Elveflow (Σχήμα 2.11a), προορίζεται για μικρορρευστονικές εφαρμογές και είναι κατάλληλη για τοποθέτηση σε αυτόκλειστο. Το κυρίως σώμα της είναι διαστάσεων 47 mm x 34 mm x 28 mm και κατασκευασμένο από PEEK. Αποτελείται συγκεκριμένα από δύο κομμάτια, ένα κυβοειδές κι ένα κυλινδρικό, ενώ η διατομή του είναι σχήματος «L» για να διευκολύνει τη σταθεροποίησή του στον εργαστηριακό πάγκο. Στο κυλινδρικό κομμάτι της υπάρχουν στην εξωτερική πλευρά του εσοχές για την σύνδεση κατάλληλων προσαρμογών που τη συνδέουν με την αντλία και τη διάταξη, και στην εσωτερική του είναι χαραγμένο τόξο που συνδέει μεταξύ τους την είσοδο και την έξοδο. Το κυβοειδές κομμάτι της φέρει στο πίσω μέρος του οπή ερχόμενη σε επαφή με την ατμόσφαιρα, όπου μπορεί προαιρετικά να συνδεθεί αντλία κενού. Μεταξύ των δύο κομματιών PEEK, παρεμβάλλεται μια υδρόφοβη μικροπορώδης μεμβράνη PTFE, διαμέτρου 30 mm, η συγκράτηση της οποίας πραγματοποιείται μέσω βίδας που διαπερνά το κέντρο του κυλινδρικού κομματιού. Στο Σχήμα 2.11b απεικονίζεται μια μπροστινή εικόνα και μια διατομή της παγίδας προς καλύτερη κατανόηση. Ο μηχανισμός της παγίδευσης στηρίζεται στη λειτουργία της μεμβράνης η οποία, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.11b, εκμεταλλεύεται τη διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών της για να απομακρύνει τις φυσαλίδες που υπάρχουν στην εισερχόμενη ροή, αποδίδοντας ροή χωρίς φυσαλίδες στην έξοδο. Χρησιμοποιήθηκε η παγίδα μικρού μεγέθους (S), με μέγιστο όγκο υγρού που μπορεί να συγκρατήσει 23 μ L.



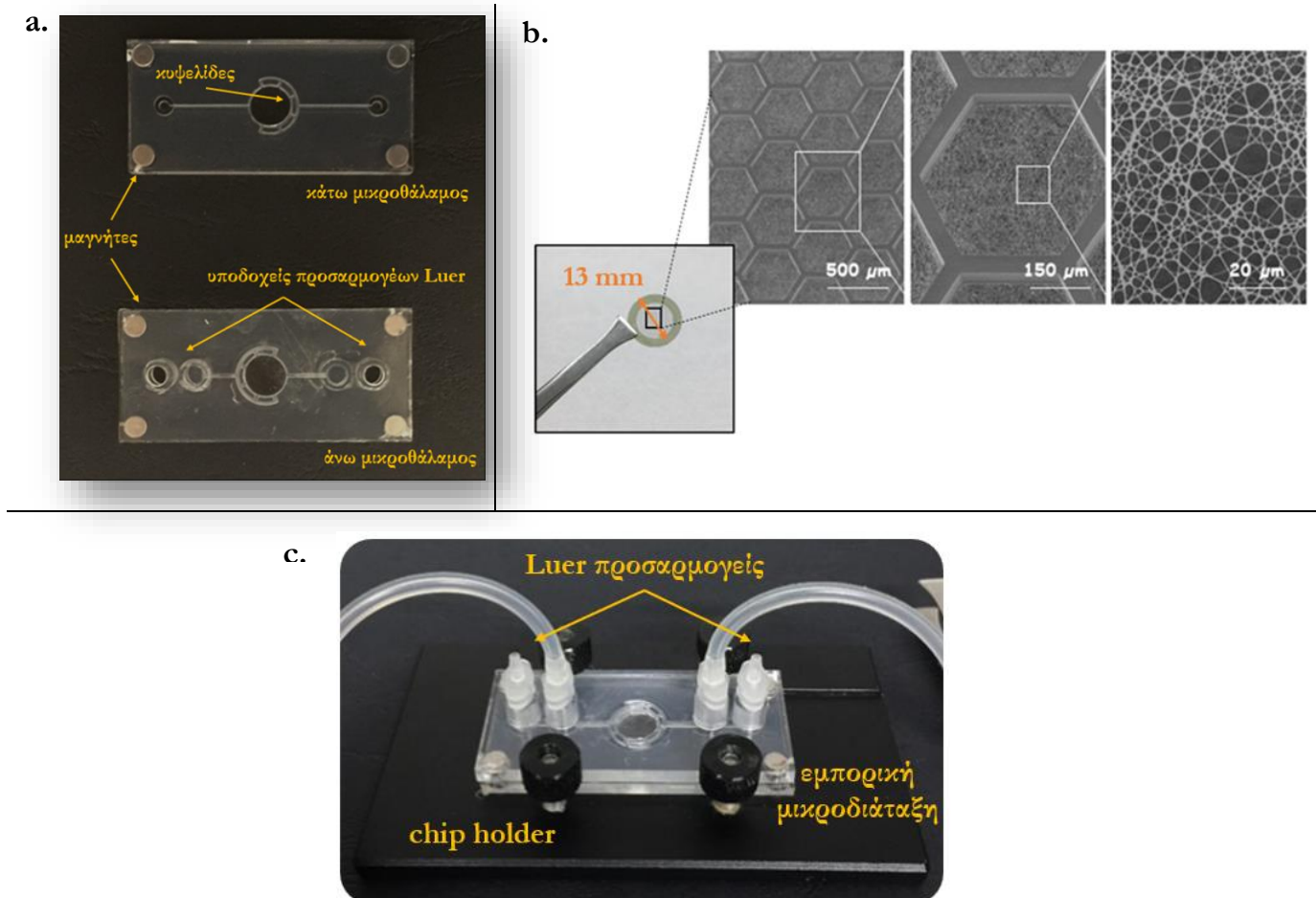
Σχήμα 2. 11. Εμπορική παγίδα φυσαλίδων της Elveflow που χρησιμοποιήθηκε σε σύνδεση με τη μικροδιάταξη υπό ροή στην προσπάθεια περιορισμού της εισόδου φυσαλίδων. α) Φωτογραφία της παγίδας (μέγεθος Small). β) Σχηματική αναπαράσταση της μπροστινής πλευράς και της διατομής της παγίδας. Αποτελείται από δύο κομμάτια PEEK η λειτουργία της στηρίζεται στην παρεμβαλλόμενη μεμβράνη PTFE, η οποία λόγω διαφοράς πίεσης ανάμεσα στις δύο πλευρές της, απομακρύνει τις φυσαλίδες του υγρού προς το περιβάλλον.

Εμπορική μικροδιάταξη τριδιάστατης καλλιέργειας κυττάρων

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε εμπορική μικροδιάταξη οργάνου σε ψηφίδα της εταιρείας Darwin Microfluidics (Παρίσι, Γαλλία), η οποία προσφέρεται για τη χρήση της ως μικροδιάταξη οργάνου σε ψηφίδα, και γενικότερα, για την τριδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων και ιστών, επιτρέποντας τη διεξαγωγή πειραμάτων υπό συνθήκες δυναμικής ροής. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο επίπεδα πολυανθρακικού (polycarbonate - PC), με διαμορφωμένους κυλινδρικούς μικροθαλάμους, που διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω ενός ημιδιαπερατού

κυκλικού και κυψελοειδούς πλαισίου κυτταροκαλλιέργειας (culture patch) από διακρυλική πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (Polyethylene glycol diacrylate – PEGDA), που υποστηρίζει ένα πλέγμα νανοϊνών ζελατίνης, επικαλυμένο με κολλαγόνο και λαμινίνη προς βελτίωση της καλλιέργειας των κυττάρων. Κάθε επίπεδο διαθέτει τέσσερις ενσωματωμένους μαγνήτες για αναστρέψιμη μηχανική σφράγιση, και επικολλημένο ένα λεπτό ελαστομερές υμένιο πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS), ώστε να εξασφαλίζεται καλύτερη σφράγιση (μέχρι και 8 kPa). Ειδικότερα το πάνω επίπεδο φέρει τέσσερις εσοχές για την εισαγωγή Luer προσαρμογών, που ανά ζευγάρι κατοπτρικά καταλήγουν στον ίδιο μικροθάλαμο. Το παρακάτω Σχήμα 2.12a παρουσιάζει τα δύο επίπεδα PC της μικροδιάταξης προς καλύτερη κατανόηση. Επιπλέον, σε περίπου τα $\frac{3}{4}$ της περιφέρειας κάθε μικροθαλάμου, και ξεκινώντας από την πλευρά της εισόδου του καθενός, υπάρχουν πέντε εφαπτόμενες κυψελίδες, που εξυπηρετούν στην πλήρη διαβροχή του μικροθαλάμου από το εκάστοτε εισερχόμενο υγρό. Πιο συγκεκριμένα, κάθε επίπεδο πολυ(ανθρακικού εστέρα) είναι διαστάσεων (μήκος x πλάτος x πάχος) 55 mm x 25 mm x 3 mm, και κάθε σχηματιζόμενος μικροθάλαμος διαμέτρου 6 mm και βάθους 0.5 mm. Το πλάτος των μικροαναλιών είναι 1 mm, με βάθος 0.5 mm, αντίστοιχο των μικροθαλάμων. Ως προς το πλαίσιο κυτταροκαλλιέργειας (Σχήμα 2.12b), είναι διαμέτρου 13 mm, πάχους 0.2 mm και πορωσιμότητας 60 – 80%. Διαθέτει ένα πλέγμα από εξαγωνικές κυψέλες ως υποστηρικτική μήτρα για το δίκτυο των νανοϊνών. Οι νανοΐνες έχουν διάμετρο 100 - 500 nm και πάχος μικρότερο του 1 μm , και την επίστρωση κολλαγόνου/λαμινίνης πάχος 100 – 200 nm.

Η μικροδιάταξη είναι τοποθετημένη πάνω σε ειδική συσκευή συγκράτησης (chip holder) από σκληρό αλουμίνιο για σφράγιση σε υψηλές πιέσεις (μέχρι και 100 kPa) με τέσσερις ενσωματωμένες βίδες. Στο Σχήμα 2.12c φαίνεται η μικροδιάταξη προσαρμοσμένη στο chip holder.



Σχήμα 2. 12. Εμπορική μικροδιάταξη της Darwin Microfluidics για τη 3D καλλιέργεια κυττάρων. α) Άνω και κάτω επίπεδα πολυανθρακικού (PC) που φέρουν κυλινδρικούς μικροθαλάμους διάμετρου 6 mm, κυψελίδες για την ομοιόμορφη διανομή των υγρών, και 4 μαγνήτες για τη σφράγιση της διάταξης. Στο άνω επίπεδο διακρίνονται επιπλέον 4 εσοχές για την ενσωμάτωση Luer προσαρμογών. β) Πλαίσιο κυτταροκαλλιέργειας (culture patch) από διακρυλική πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEGDA), και σε σειριακή μεγέθυνση το πλέγμα εξαγωγικών κυψελών που υποστηρίζει το δίκτυο νανοϊών, οι οποίες δεν ξεπερνούν σε διάμετρο τα 0.5 mm [1]. γ) Φωτογραφία της εμπορικής διάταξης ενσωματωμένης στο chip holder, και με τοποθετημένους τους Luer προσαρμογείς για τη σύνδεση κατάλληλων σωληνίσκων.

2.4 Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων

2.4.1 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων (UC-MSCs & BM-MSCs)

Στη διατριβή χρησιμοποιούνται MSCs προερχόμενα από τον ομφάλιο λώρο (Umbilical Cord MSCs - UC-MSCs), ενώ επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αναγνωριστικό πείραμα καλλιέργειας MSCs προερχόμενων από το μυελό των οστών ενηλίκων (Bone Marrow MSCs - BM-MSCs), υγιών και ασθενών με ΣΕΛ (Κεφάλαιο 7). Παρακάτω καταγράφεται η διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας και για τις δύο περιπτώσεις προέλευσης των MSCs, όπως πραγματοποιείται από Δρ. Μαρία Γρηγορίου, στις εγκαταστάσεις του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A).

- UC-MSCs

Αποτελούν δωρεά της «Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος» (Ελ.Τ.Οπ.Α, Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α, Αθήνα, Ελλάδα), η οποία πραγματοποιεί την απομόνωση και την καλλιέργεια μέχρι το κυτταρικό πέρασμα 1. Τα κύτταρα ψύχονται μέχρι τη χρήση τους με μέσο κατάψυξης (90% FBS, 10% DMSO), όπου συνήθως μία φλάσκα T75 τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο erpendorf 1.5 mL, και μετέπειτα διατήρηση στους -80°C.

Σε ένα φιαλίδιο falcon 15 mL τοποθετείται το περιεχόμενο του erpendorf (κύτταρα με DMSO) και πληρώνεται με θρεπτικό υλικό αMEM (τροποποίηση “άλφα” του θρεπτικού υλικού Eagle’s Minimum Essential Medium – MEM), εμπλουτισμένο με 20% βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum – FBS) και 1% L-γλουταμίνη. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 1200 rpm, για 7 min στους 25°C, αφαίρεση του υπερκείμενου και εκ νέου τοποθέτηση των MSCs με αραιώση 1/100 σε φλάσκα T75 με 5 – 10 mL (ακριβής όγκος καθοριζόμενος από την εκάστοτε εταιρεία) (κυτταρικό πέρασμα 2) . Συνήθως, αν τα MSCs συλλέχθηκαν με κυτταρική συρροή 80 – 90%, διαθέτουν επιφανειακή πυκνότητα 2 000 – 3 000 cells/cm² στη φλάσκα.

Για την απομόνωσή τους τα MSCs σημάνθηκαν με συζευγμένα αντισώματα: : CD105 (323205/43A3), CD73 (344005/AD2), CD90 (328123/5E10), CD45 (368508/2D1), CD34 (343606/561), CD11b (301330/ICRF44), CD19 (21270193S/ LT19), HLA-DR (21388993/ LT-DR)[2].

- BM-MSCs

Δείγματα μυελού των οστών αναρροφώνται από υγιή άτομα και ασθενή με ΣΕΛ μετά τη συγκατάθεσή τους. Επιλέγεται η αναρρόφηση των δειγμάτων, καθώς επιτρέπει την απομόνωση και των HSCs (CD34⁺). Ως προς τους ασθενείς, η κατάστασή τους αξιολογήθηκε και πιστοποιήθηκε από εξειδικευμένο γιατρό, ενώ όλοι ικανοποιούσαν τα αναθεωρημένα κριτήρια του Αμερικάνικου Κολλεγίου Ρευματολογίας 1999 για την ταξινόμηση του ΣΕΛ. Ενδεικτικά, ορισμένα κριτήρια αποκλεισμού περιελάμβαναν την πρωινή λήψη ανοσοκατασταλτικής θεραπείας, την εγκυμοσύνη, την ύπαρξη συνοδούς αυτοφλεγμονώδους ή ρευματικής νόσου, και την ενεργή κακοήθεια.

Τα δείγματα του μυελού των οστών ενηλίκων συλλέγονται σε φιαλίδια επικαλυμμένα με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylene diamine tetraacetic acid – EDTA). Η ροή από τη στήλη απομόνωσης των CD34⁺ τροφοδοτείται με θρεπτικό υλικό α-MEM, που περιέχει πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 20% FBS (απενεργοποιημένο με θερμότητα) και 1% L-γλουταμίνη, σε φλάσκες T17 ή T75, αναλόγως του πλήθους των κυττάρων (ημέρα 0). Την επόμενη μέρα (ημέρα 1 – κυτταρικό πέρασμα 0), αποβάλλεται το θρεπτικό υλικό με όλα τα μη προσκολλημένα MSCs, πραγματοποιείται έκπλυση με αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffered saline – PBS) 1 – 2 φορές, και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, αν χρειαστεί, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Όταν τα MSCs φθάσουν σε συρροή 80 - 90% (περίπου 4 – 6 ημέρες), συλλέγονται χρησιμοποιώντας 1x τρυψίνη για 5 – 7 min, στους 37°C. Η δράση της τρυψίνης διακόπτεται με χρήση θρεπτικού υλικού, και ακολουθεί φυγοκέντριση στα 1200 rpm, για 7 min στους 25°C. Τα MSCs τοποθετούνται εκ νέου σε φλάσκες (κυτταρικό πέρασμα 1) ή ψύχονται σε φιαλίδιο με μέσο κατάψυξης (90% FBS, 10% DMSO) και συντηρούνται στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Τα υπόλοιπα στάδια κυτταρικών περασμάτων, είναι ίδια με εκείνα για τα UC-MSCs (βλ. παραπάνω).

2.4.2 Απομόνωση και καλλιέργεια αιμοποιητικών προγονικών βλαστοκυττάρων (HSPCs)

Τα HSPCs (CD34⁺) απομονώθηκαν από τα ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα μυελού των οστών (bone marrow mononuclear cells/BMMCs) (δείγματα ενηλίκων) με μαγνητικά σφαιρίδια (StemCell Technologies, 18056). Τα CD34⁺ καλλιεργούνται σε επίπεδα πιάτα 96 φρεατίων με θρεπτικό υλικό StemSpan™ H3000

(Stem Cell Technologies, 09850), 10 ng/mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco, 15140), εμπλουτισμένο με τις κυτταροκίνες: TPO (Immunotools, 11344863), (1/400) SCF (Immunotools, 11343323), και Flt3-Ligand (Immunotools, 11343303). Διατηρούνται εντός επωαστήρα, παρέχει κατάλληλη υγρασία, θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂.

2.5 Χαρακτηρισμός ανάπτυξης κυττάρων

2.5.1 Μικροσκοπία φθορισμού – Οπτική μικροσκοπία

Η μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί σημαντικό εργαλείο απεικόνισης σε πολλούς κλάδους, μεταξύ των οποίων, στις βιολογικές επιστήμες και τη βιοϊατρική, λόγω των πλεονεκτημάτων της σε σχέση με την οπτική μικροσκοπία. Συγκεκριμένα, παρέχει εξαιρετική ευαισθησία ανίχνευσης, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης φυσιολογικών διεργασιών με υψηλή χρονική και χωρική ανάλυση, ταυτόχρονης απεικόνισης πολλαπλών σημάτων, εντοπισμού πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων μεμονομένων μορίων, αλλά και ανίχνευσης παθοβιολογικών διεργασιών σε καταστάσεις ασθένειας.

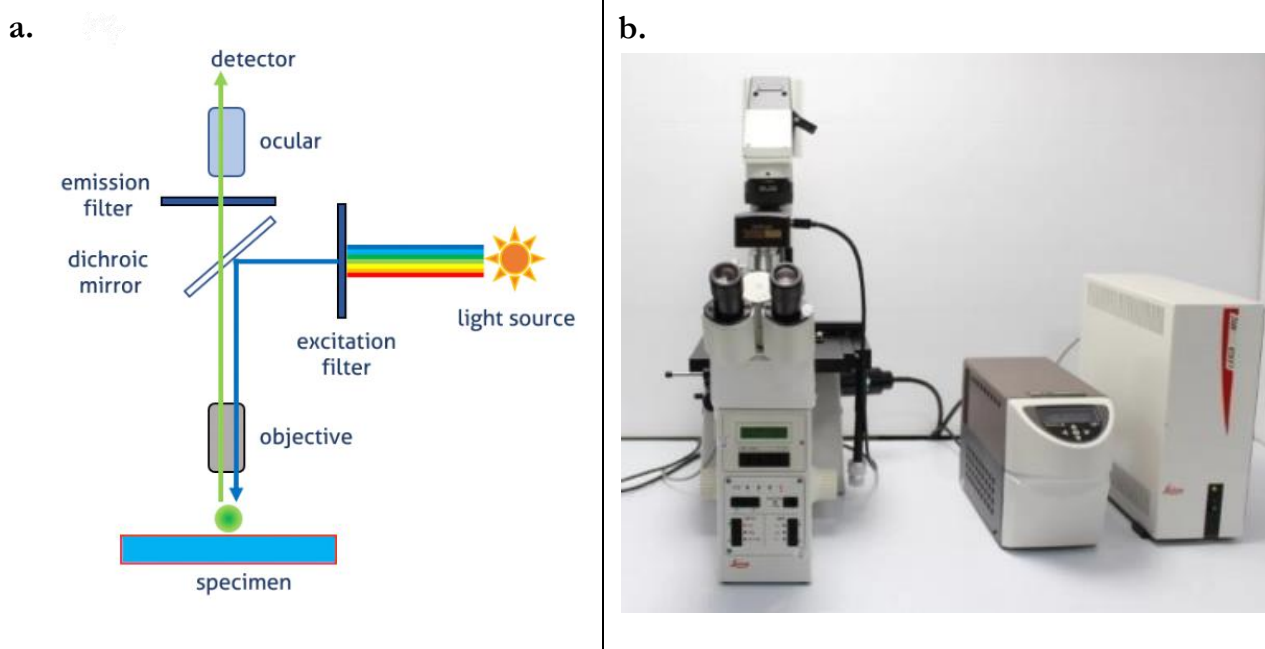
Η μικροσκοπία φθορισμού βασίζεται στο φυσικό φαινόμενο του φθορισμού, δηλαδή της εκπομπής ακτινοβολίας από το δείγμα (οργανικό είτε ανόργανο), κατά την ακτινοβόλησή του με φως συγκεκριμένης ζώνης μηκών κύματος, η οποία ανιχνεύεται ως ορατό φως. Ορισμένα δείγματα είναι από τη φύση τους φθορίζοντα, όπως είναι η χλωροφύλλη και κάποια έλαια, αλλά τα περισσότερα χρειάζεται να επισημανθούν με φθορίζουσες ουσίες, ώστε να καταστούν ανιχνεύσιμα.

Ένα μικροσκόπιο φθορισμού αποτελείται από μια φωτεινή πηγή (λάμπα ξένου ή υδραργύρου, lasers ή LEDs), ένα φίλτρο διέγερσης (excitation filter), ένα διχρωϊκό καθρέφτη (dichroic mirror/beamsplitter), και ένα φίλτρο εκπομπής (emission filter) (Σχήμα 2.13a). Τα φίλτρα και ο διχρωϊκός καθρέφτης συνάδουν με τα χαρακτηριστικά φασματικής διέγερσης και εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας του, το δείγμα αρχικά ακτινοβολείται με την επιθυμητή ζώνη μηκών κύματος, που έχει ως αποτέλεσμα τα ηλεκτρόνια των ατόμων του δείγματος να διεγείρονται σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, τα οποία αποδιεγείρονται εκπέμπουν ακτινοβολία. Ακολούθως, ο διχρωϊκός καθρέφτης επιτρέπει τη διέλευση μόνο των μηκών κύματος που είναι μεγαλύτερα της ακτινοβολίας διέγερσης, ανακλώντας προς τα πίσω τα μικρότερα μήκη κύματος. Το φίλτρο εκπομπής μετέπειτα επιτρέπει τη διέλευση μόνο της ακτινοβολίας του εκπαιδόμενου φθορισμού. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι η ακτινοβολία φθορισμού είναι σημαντικά ασθενέστερη της ακτινοβολίας εκπομπής, όπως υποδηλώνεται από τη μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, γεγονός που οφείλεται στην απώλεια ενέργειας των ηλεκτρονίων κατά τη μετάπτωσή τους από τη διεγερμένη στη θεμελιώδη κατάσταση. Η μετατόπιση αυτή στα μήκη κύματος, είναι γνωστή ως μετατόπιση Stokes, και όσο μεγαλύτερης έντασης είναι, τόσο ευκολότερος είναι ο διαχωρισμός των ακτινοβολιών διέγερσης και εκπομπής.

Ειδικότερα ο ανοσοφθορισμός είναι η πιο κοινή εφαρμογή της μικροσκοπίας φθορισμού στην κυτταρική βιολογία. Χρησιμοποιεί αντισώματα στα οποία προσδένεται κάποιο φθορίζον μόριο. Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που προσδένονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα μόρια-στόχους, όπως για παράδειγμα, τα αντιγόνα. Στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν λιποφιλικές καρβοκυανίνες, που είναι χρωστικές κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες διαχέονται εφαιπτομενικά στην πλασματική μεμβράνη, καταλήγοντας τελικά στη χρώση ολόκληρου του κυττάρου. Για τη χρώση των MSCs χρησιμοποιήθηκε η λιποφιλική πράσινη χρωστική Vybrant™ DiO (Invitrogen™), και για τα HSCs αντίστοιχη κόκκινη-πορτοκαλί χρωστική Vybrant™ DiI (Invitrogen™). Για την απεικόνιση των σημασμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο Leica DM IRE2 της εταιρείας Leica Microsystems (Σχήμα 2.13b), που βρίσκεται στις

εγκαταστάσεις του I.I.B.E.A.A. Η διαθέσιμη πηγή φωτός φθορισμού είναι ένα αλογονίδιο μετάλλου, με διάρκεια ζωής της λάμπας περισσότερο από 2 000 h.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ίδιο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε συστηματικά για την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (brightfield) των κυττάρων εντός των μικρορευστονικών διατάξεων.



Σχήμα 2. 13. α) Βασικά εξαρτήματα και αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας φθορισμού, β) Το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο Leica DM IRE2 (Leica Microsystems) στις εγκαταστάσεις του I.I.B.E.A.A., που χρησιμοποιήθηκε για οπτική παρατήρηση, και παρατήρηση φθορισμού των κυττάρων στις μικρορευστονικές διατάξεις.

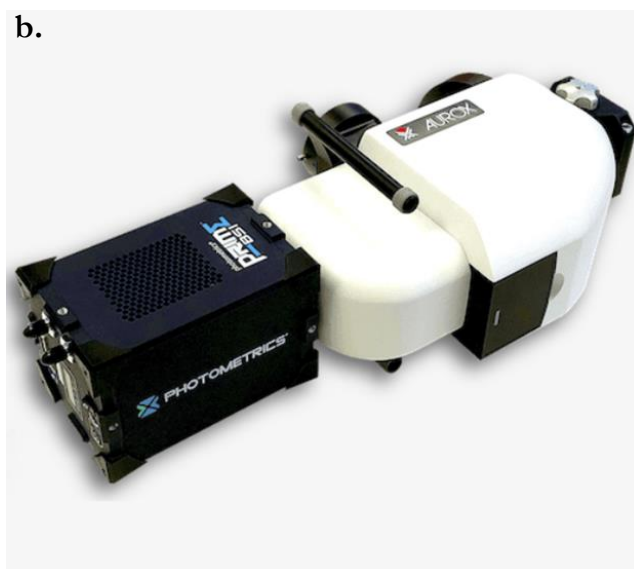
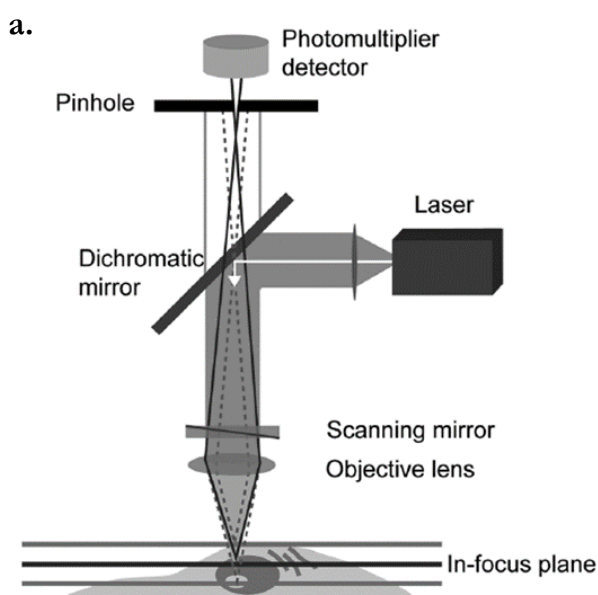
2.5.2 Συνεστιακό μικροσκόπιο

Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι ένα εξειδικευμένο είδος της τυπικής μικροσκοπίας φθορισμού (αποκαλούμενη επίσης μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου - widefield fluorescence microscopy), η οποία μέσω μιας σημειακής πηγής φωτός, παρέχει τη δυνατότητα απομόνωσης της ακτινοβολίας εκτός εστίασης, δημιουργώντας έτσι εικόνες υψηλής ανάλυσης με την 3D ανακατασκευή των διαδοχικών οπτικών τομών. Η βασική αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας στηρίζεται στο ότι οι δέσμες ακτινοβολίας και ανίχνευσης εστιάζονται στο ίδιο σημείο περιορισμένης περίθλασης, το οποίο μετακινείται πάνω από το δείγμα για να δημιουργηθεί η πλήρης εικόνα στον ανιχνευτή. Παρ' όλο δηλαδή που ακτινοβολείται ολόκληρο το οπτικό πεδίο, οτιδήποτε εκτός του εστιακού επιπέδου συνεισφέρει ελάχιστα στην τελική εικόνα, μειώνοντας το «θόρυβο» που παρατηρείται στην τυπική μικροσκοπία φωτός, κι αντί αυτού, λαμβάνοντας οπτικές τομές.

Ειδικότερα, ένα συνεστιακό μικροσκόπιο αποτελείται κυρίως από την πηγή φωτός (συνήθως laser), διχρωμικό καθρέπτη, φίλτρα φθορισμού και επιλογής μήκους κύματος, αντικειμενικούς φακούς, υψηλής ευαισθησίας ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστής – photomultiplier/PMT), και διάφραγμα (pinhole) στο επίπεδο σχηματισμού του ειδώλου. Συνοπτικά, όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 2.14α, το φως από την πηγή laser ευθυγραμμίζεται και διοχετεύεται σε ένα μεταβλητό διχρωμικό καθρέπτη, από όπου ανακλάται στον

αντικειμενικό φακό, και εστιάζεται σε ένα σημείο του δείγματος. Οι καθρέπτες σάρωσης σαρώνουν τη δέσμη διέγερσης σημείο-προς-σημείο πάνω στο δείγμα για να δημιουργήσουν την εικόνα. Στη συνέχεια, ο εκπεμπόμενος φθορισμός επιστρέφει μέσω του αντικειμενικού φακού και του διχρωμικού καθρέφτη, για να ανιχνευτεί από το φωτοπολλαπλασιαστή. Το διάφραγμα στο επίπεδο της συζευγμένης εικόνας στο εστιακό σημείο του δείγματος χρησιμεύει για την απόρριψη της ακτινοβολίας εκτός εστίασης, η οποία με αυτό τον τρόπο δε συλλαμβάνεται από τον ανιχνευτή. Η συνεχής ροή φωτονίων που δέχεται ο φωτοπολλαπλασιαστής μεταφράζεται σε μεταβολές ηλεκτρικής τάσης, οι οποίες μέσω υπολογιστή μετατρέπονται σε ψηφιακό σήμα στην οθόνη. Η τελική εικόνα του συνεστιακού μικροσκοπίου δεν είναι εμφανής στο μικροσκόπιο, παρά μόνο στην οθόνη του υπολογιστή.

Για την παρατήρηση των MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών με μεγαλύτερη ακρίβεια και διαστρωματική απεικόνιση, χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο Aurox Clarity Laser Free Confocal (Aurox LFC) (Σχήμα 2.14b), με πηγή φωτός LED ή αλογονίδιο μετάλλου, που ελέγχεται υπολογιστικά μέσω του συνοδού λογισμικού Aurox Visionary. Το μικροσκόπιο βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.



Σχήμα 2. 14. Βασικά μέρη ενός συνεστιακού μικροσκοπίου, που περιλαμβάνουν την πηγή φωτός (συνήθως laser), το διχρωμικό καθρέπτη, τον αντικειμενικό φακό, τον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστής – photomultiplier/PMT), και διάφραγμα (pinhole), b) Το συνεστιακό μικροσκόπιο Aurox Clarity Laser Free Confocal (Aurox LFC) για την παρατήρηση κυττάρων στις εγκαταστάσεις του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.

2.5.3 Άλλα χρησιμοποιηθέντα όργανα για την καλλιέργεια κυττάρων

Για την ανάπτυξη και το χαρακτηρισμό των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα παρακάτω όργανα:

1. Επωαστήρας Forma™ Steri-Cycle™ CO₂ Incubator της Thermo Scientific™ χωρητικότητας 184 L, με ενσωματωμένο φίλτρο αέρα HEPA για την αποφυγή μολύνσεων. Χρησιμοποιήθηκε για την επώαση κυττάρων σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, παροχής CO₂ και υγρασίας.

2. Αεριζόμενος εργαστηριακός χώρος εργασίας Nuair NU-437-400 Class II, Biological Safety Cabinet, που χρησιμοποιήθηκε για τον ασφαλή χειρισμό και προετοιμασία κυτταροκαλλιιεργειών, καθώς και για την εισαγωγή των κυττάρων στις μικρορρευστονικές διατάξεις.

3. Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer, μια αντικειμενοφόρος που χρησιμοποιήθηκε για τον αριθμητικό υπολογισμό του πλήθους των κυττάρων, και κατ'επέκταση της συγκέντρωσής τους.

2.6 Πρωτόκολλα καλλιέργειας MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα

2.6.1 Πρωτόκολλο καλλιέργειας MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών υπό ροή

Για τη μικροδιάταξη ενεργούς τροφοδοσίας, η προετοιμασία ξεκινάει από την προηγούμενη ημέρα, στα πλαίσια της προσπάθειας περιορισμού δημιουργίας φυσαλίδων.

Την προηγούμενη ημέρα:

- Τοποθέτηση θρεπτικού υλικού σε δύο φυαλίδια τροφοδοσίας (≈ 20 mL το καθένα), προς αποφυγή αναταράξεων την ημέρα του πειράματος. Το ένα θα χρησιμοποιηθεί για την ενεργό τροφοδοσία της μικροδιάταξης, και το άλλο για την υδροφιλοποίηση του σωληνίσκου σιλικόνης. Συντήρησή τους μέχρι τη χρήση στους 2 – 4°C.

Την ίδια ημέρα:

1. Αποστείρωση της μικροδιάταξης, της περισταλτικής αντλίας (μαζί με τις πλακέτες breadboard και Arduino) της συνδεσμολογίας (σωληνίσκοι σιλικόνης και προσαρμογείς 3D εκτύπωσης), της συσκευής συγκράτησης, του δίσκου PMMA, και των υπόλοιπων εργαλείων/εξαρθημάτων (λαβίδες, ακρορύγχια πιπετών, φιλμ πολυολεφίνης) στην εστία UV για 30 min.

2. Αφαίρεση από τη συντήρηση των φυαλιδίων με το θρεπτικό υλικό, ώστε να μεταβούν σε RT.

2. Τοποθέτηση της μικροδιάταξης στη συσκευή συγκράτησης (PMMA), καθώς και των προσαρμογέων για τον κάθε μικροθάλαμο.

3. Πλήρωση του μικροθαλάμου καλλιέργειας (κάτω μικροθάλαμος) και ακολούθως, του μικροθαλάμου τροφοδοσίας (άνω μικροθάλαμος) με διάλυμα βόειου κολλαγόνου τύπου I, μέσω των αντίστοιχων προσαρμογέων. Προσεκτική αφαίρεση των προσαρμογέων από τη μικροδιάταξη, κάλυψη με φιλμ πολυολεφίνης (30 x 25 mm²) του άνω επιπέδου της συσκευής συγκράτησης, και τοποθέτηση εντός επωαστήρα (θερμοκρασίας 37°C) για 30 min. Έκπλυση των προσαρμογέων αμέσως μετά με θρεπτικό υλικό απουσία FBS, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα. Παράλληλα, ο σωληνίσκος σιλικόνης που συνδέεται στο φυαλίδιο τροφοδοσίας, τοποθετείται εντός του δεύτερου φυαλιδίου με θρεπτικό υλικό, όπου και παραμένει για περίπου 1 h ώστε να υδροφιλοποιηθεί.

4. Έκπλυση του κολλαγόνου με θρεπτικό υλικό απουσία FBS (x2), αρχικά από τον άνω μικροθάλαμο τροφοδοσίας και μετά από τον κάτω μικροθάλαμο καλλιέργειας.

5. Είσοδος πλήρους θρεπτικού υλικού στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας και των κυττάρων στο μικροθάλαμο καλλιέργειας. Αφαίρεση των προσαρμογέων και εκ νέου σφράγιση των εισόδων-εξόδων της συσκευής συγκράτησης με φιλμ πολυολεφίνης. Τοποθέτηση της μικροδιάταξης στον επωαστήρα και παραμονή για περίπου 2 – 3 h, για να επιτραπεί η προσκόλληση των κυττάρων (MSCs). Επιπλέον, τοποθετείται το φυαλίδιο τροφοδοσίας εντός του επωαστήρα, για αντίστοιχο χρόνο, προς ομαλή μετάβαση στους 37°C, και αποφυγή απότομων θερμοκρασιακών μεταβολών που αυξάνουν την πιθανότητα δημιουργίας φυσαλίδων.

6. Στήσιμο της περισταλτικής αντλίας, των πλακετών της breadboard και Arduino στην εστία UV, και εξωτερική σύνδεσή τους με υπολογιστή. Σύνδεση της μικροδιάταξης με την αντλία και τα φυαλίδια τροφοδοσίας και αποβλήτων, και τοποθέτησή τους στο δίσκο PMMA. Ως φυαλίδιο τροφοδοσίας χρησιμοποιήθηκε εκείνο που είχε παραμείνει στον επωαστήρα, και ο υδροφιλοποιημένος σωληνίσκος σιλκόνης για τη σύνδεσή του με την αντλία. Ακολούθησε εφαρμογή υψηλής ροής για περίπου 1 – 2 min στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας για την απομάκρυνση μικροσκοπικών φυσαλίδων που τυχόν δημιουργήθηκαν κατά την παραμονή της διάταξης στον επωαστήρα.

7. Αποσύνδεση του υπολογιστή και των πλακετών, και μεταφορά τους στην κορυφή του επωαστήρα, ενώ ο δίσκος PMMA με τη διάταξη, την αντλία και τα φυαλίδια μεταφέρονται στο εσωτερικό του επωαστήρα. Σύνδεση της αντλίας με τον υπολογιστή και εκ νέου σύντομη εφαρμογή υψηλής ροής για την απομάκρυνση μικροφυσαλίδων.

8. Ορισμός της επιθυμητής ροής τροφοδοσίας ($\approx 13 \mu\text{L}/\text{min}$) και παραμονή overnight.

Για την παρατήρηση του μικροθαλάμου καλλιέργειας, πραγματοποιείται αποσύνδεση της μικροδιάταξης από την αντλία, αφαίρεσή της από τη συσκευή συγκράτησης και κάλυψη των οπών της με φιλμ πολυολεφίνης. Μετά την παρατήρηση, επαναλαμβάνεται η διαδικασία σύνδεσης της διάταξης με την αντλία στην εστία UV και η μεταφορά της μετά στον επωαστήρα (βήματα 6 – 8). Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού του φυαλιδίου πραγματοποιείται καθημερινά.

2.6.2 Πρωτόκολλο καλλιέργειας MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας

Για την καλλιέργεια MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Αποστείρωση της μικροδιάταξης και των χρησιμοποιούμενων εργαλείων και εξαρτημάτων (λαβίδες, συσκευή συγκράτησης (chip holder), ακρορύγχια πιπετών, φιλμ πολυολεφίνης) στην εστία UV για 30 min.

2. Τοποθέτηση της μικροδιάταξης στη συσκευή συγκράτησης πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA), και σφράγιση της με τις βίδες, οι οποίες δε βιδώνονται σφιχτά προς αποφυγή δημιουργίας μεγάλων διαφορών πίεσης στη διάταξη. Η συσκευή συγκράτησης PMMA τοποθετείται ώστε να περιορίσει την εξάτμιση του κολλαγόνου μέσω της μικροδιάταξης PDMS. Οι φερόμενες οπές εισόδου-εξόδου στη συσκευή συγκράτησης καλύπτονται με φιλμ πολυολεφίνης.

3. Πλήρωση του μικροθαλάμου καλλιέργειας με διάλυμα βόειου κολλαγόνου τύπου I και τοποθέτηση της μικροδιάταξης εντός επωαστήρα θερμοκρασίας 37°C για 30 min.

4. Αφαίρεση της μικροδιάταξης από τη συσκευή συγκράτησης και έκπλυση του διαλύματος κολλαγόνου (x2) με θρεπτικό υλικό απουσία βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS).
5. Είσοδος των κυττάρων στον μικροθάλαμο καλλιέργειας και κάλυψη της πάνω πλευράς της μικροδιάταξης (γυαλί) με φιλμ πολυολεφίνης (30 x 25 mm²).
6. Πλήρωση του 35 mm – τρυβλίου καλλιέργειας με θρεπτικό υλικό (πλήρες) και βύθιση της μικροδιάταξης και τοποθέτησή της στον επωαστήρα κατάλληλων συνθηκών (37°C, 5% CO₂).

Για την οπτική παρατήρηση, η μικροδιάταξη τοποθετούταν ανάποδα, με την πλευρά του γυαλιού προς τα κάτω, και παρέμενε εντός του γεμάτου με θρεπτικό υλικό τρυβλίου, προς αποφυγή στεγνώματος της μεμβράνης κατά την παρατήρηση, και συνεπαγόμενης δημιουργίας φυσαλίδων. Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται ανά 1 – 2 ημέρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ (BONE MARROW-ON-A-CHIP)

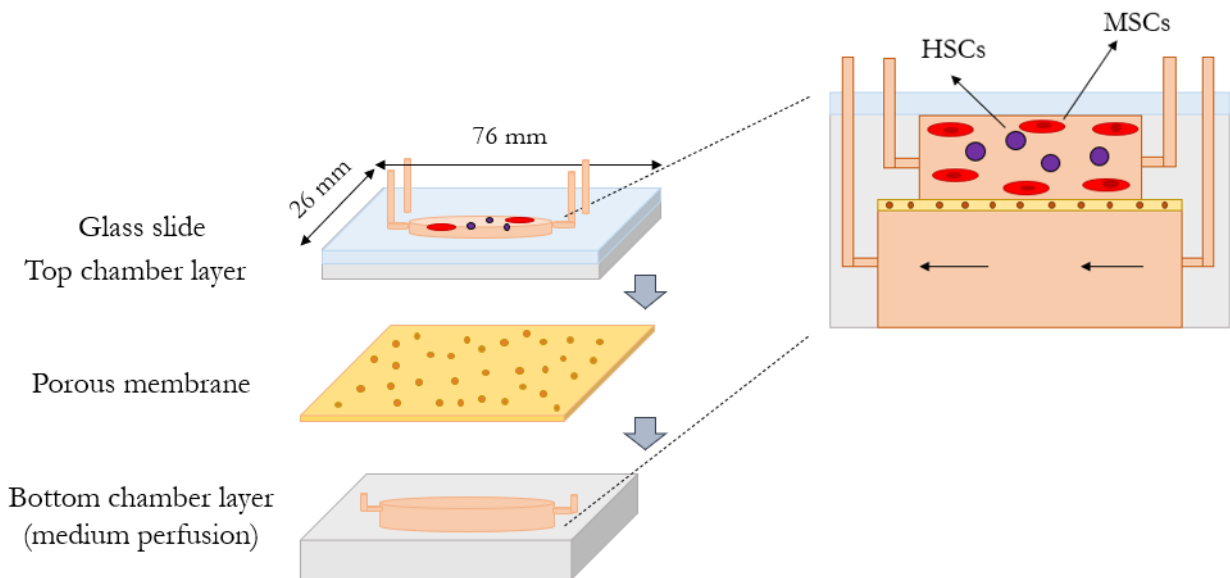
Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα κατασκευαστικά στάδια της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (*bone marrow-on-a-chip*). Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν το σχεδιασμό της μικροδιάταξης, την κατασκευή των εκμαγείων μικροθαλάμων και πορώδους μεμβράνης, την υλοποίηση των μικροθαλάμων και της μεμβράνης, και τέλος, τη σφράγιση και την κατασκευαστική ολοκλήρωση της μικροδιάταξης. Συστήνονται δύο αρχιτεκτονικές, μια 1^{ης} γενιάς και μία βελτιωμένη 2^{ης} γενιάς, η οποία και παγιώνεται για λόγους κατασκευαστικής ευκολίας και επαναληψιμότητας. Κατορθώνεται επιτυχής και επαναλήψιμη υλοποίηση όλων των σταδίων παρασκευής της μικροδιάταξης, μέχρι την τελική υλοποίησή της.

3.1 Αρχιτεκτονική της μικροδιάταξης μυελού των οστών

Το σχέδιο και η γεωμετρία της μικροδιάταξης καθορίστηκαν ώστε να ευνοείται κατασκευαστικά η προσομοίωση του *in vivo* μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών [1–3]. Παρουσιάζονται δύο αρχιτεκτονικές, η 1^{ης} γενιάς, που είναι η αρχικώς ορισθείσα, και η 2^{ης} γενιάς, που είναι και η τελικώς επιλεγόμενη. Και οι δύο αρχιτεκτονικές στηρίζονται στην ίδια λογική, δηλαδή στη δημιουργία δύο μικροθαλάμων, έναν για την καλλιέργεια κυττάρων, κι έναν για την τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό, με τη μεταξύ τους επικοινωνία να διασφαλίζεται μέσω παρεμβαλλόμενης πορώδους μεμβράνης. Πιο αναλυτικά, οι δύο αρχιτεκτονικές παρουσιάζονται παρακάτω.

i) Αρχιτεκτονική 1^{ης} γενιάς

Η αρχική αρχιτεκτονική της μικροδιάταξης, όπως διακρίνεται σε 3D ανεπτυγμένη μορφή στο Σχήμα 3.1, περιλαμβάνει δύο επίπεδα πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS), που φιλοξενούν τον ανώτερο μικροθάλαμο καλλιέργειας κυττάρων, ο οποίος επικοινωνεί με τον κατώτερο μικροθάλαμο τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού μέσω της πορώδους μεμβράνης. Όλη η διάταξη σφραγίζεται από πάνω με γυαλί μικροσκοπίου που επιτρέπει την παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο. Τόσο ο ανώτερος όσο και ο κατώτερος είναι μικροθάλαμοι κυλινδρικού σχήματος. Η δημιουργία της περιαγγειακής αιματοποιητικής περιοχής του μυελού των οστών αναμένεται να πραγματοποιηθεί στον ανώτερο μικροθάλαμο, όπου θα προηγηθεί η καλλιέργεια των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) για να διαμορφώσουν την απαραίτητη υποστηρικτική μήτρα πριν την τοποθέτηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCs).



Σχήμα 3. 1. Ανεπτυγμένη 3D άποψη της αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip/BmoC). Στον άνω μικροθάλαμο PDMS πραγματοποιείται η καλλιέργεια κυττάρων (MSCs και HSCs), στον κάτω μικροθάλαμο PDMS η τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό, με τη μεταξύ τους επικοινωνία να διασφαλίζεται μέσω παρεμβαλλόμενης πορώδους μεμβράνης. Η διάταξη σφραγίζεται εκ των άνω με γυαλί. Σε μεγέθυνση μία διατομή της μικροδιάταξης, όπου διακρίνεται και η επικοινωνία με το περιβάλλον μέσω των ροϊκών διεπαφών.

Πιο συγκεκριμένα, ο μικροθάλαμος καλλιέργειας είναι διαστάσεων (διάμετρος x ύψος) 9 mm x 0.2 mm, ενώ αντίστοιχα ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας 11 mm x 0.3 mm. Αντιδιαμετρικά του κάθε μικροθαλάμου υπάρχουν μικροκανάλια εισόδου και εξόδου, διαστάσεων (μήκος x πλάτος x ύψος) 5.5 mm x 1 mm x 0.2 mm για το μικροθάλαμο καλλιέργειας, και 4.5 mm x 1 mm x 0.3 mm για το μικροθάλαμο τροφοδοσίας. Ο συνολικός όγκος του μικροθαλάμου καλλιέργειας, θεωρητικά υπολογιζόμενος, είναι στα 12.7 – 13 μL , και του κάθε μικροκαναλιού 1.1 μL , αποδίδοντας ένα συνολικό όγκο για το μικροθάλαμο και τα δύο μικροκανάλια περίπου στα 15 μL . Αντίστοιχα, ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας έχει (θεωρητικά υπολογιζόμενο) όγκο 28.5 μL , και όγκο κάθε μικροκαναλιού 1.35 μL , με συνολικό όγκο στα 31.2 μL .

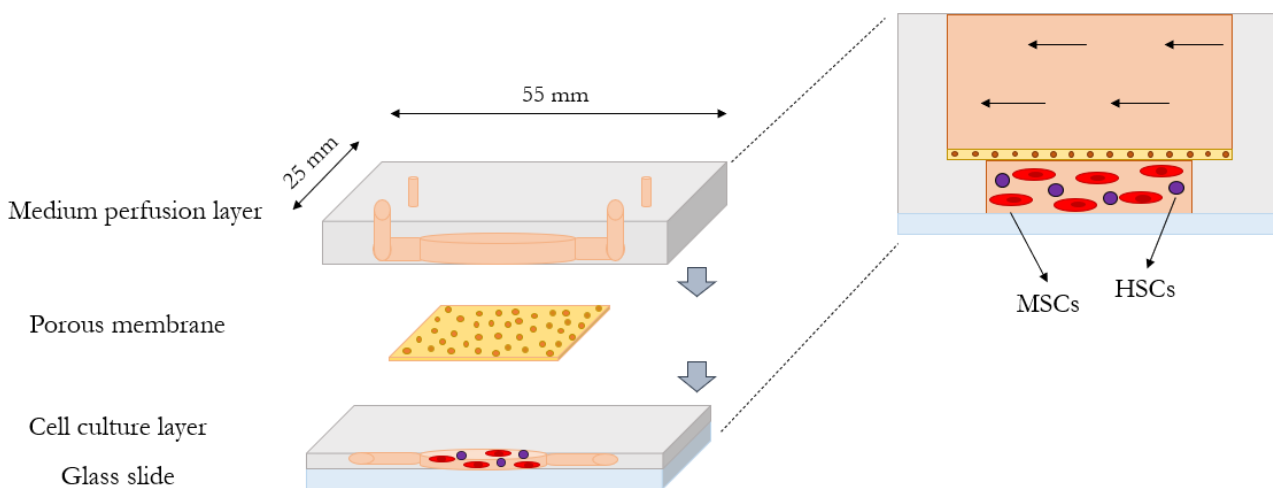
Οι λόγοι εγκατάλειψης της αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς αφορούν σε κατασκευαστικές δυσκολίες που προέκυψαν κατά την υλοποίηση της μικροδιάταξης. Συγκεκριμένα, το μικρό επιθυμητό ύψος των μικροθαλάμων, και ιδιαίτερα του μικροθαλάμου καλλιέργειας (0.2 mm), δυσχέραινε την επίτευξη ομοιόμορφου πάχους των επιπέδων μικροθαλάμων PDMS, καθώς και τον ακριβή έλεγχο του ύψους των μικροθαλάμων, με βάση την τεχνολογία κατασκευής τους, όπως θα εξηγηθεί λεπτομερώς παρακάτω. Επειδή ο όγκος του προπολυμερούς PDMS που εγχέονταν στις μήτρες των μικροθαλάμων κατά τη διαδικασία αντιγραφής μήτρας (replica molding) ήταν μικρός για να μπορέσει να καλύψει ομοιόμορφα το εκμαγείο με την επίδραση της βαρύτητας, συνέβαινε συχνά το εξαγόμενο επίπεδο PDMS να μην έχει ομοιόμορφο πάχος. Επίσης, λόγω του ότι το ύψος των μικροθαλάμων καθοριζόταν από τον εγχέομενο όγκο προπολυμερούς, το υψηλό ιξώδες του PDMS δυσχέραινε τον έλεγχο του απαιτούμενου όγκου προπολυμερούς, με αποτέλεσμα συχνά το ύψος των μικροθαλάμων να είναι μεγαλύτερο από το θεωρητικά οριζόμενο. Προέκυψε έτσι, η ανάγκη αύξησης του ύψους των μικροθαλάμων. Επιπλέον, η τοποθέτηση του μικροθαλάμου καλλιέργειας στην κορυφή της

μικροδιάταξης και το αναγκαστικό κλείσιμό του με γυαλί για την παρατήρηση, απαιτούσε τη διάνοιξη οπών στο γυαλί για την τοποθέτηση προσαρμογέων και σωληνίσκων. Το γυαλί, ως σκληρό υλικό, ήταν δύσκολο να διανοιχθεί, επομένως η διάταξη άλλαξε για λόγους ευκολίας.

ii) Αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς

Η αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς, προς εξάλειψη των προαναφερόμενων δυσκολιών, αύξησε το ύψος των μικροθαλάμων για καλύτερη ομοιομορφία πάχους των επιπέδων PDMS, και έλεγχο του ύψους των μικροθαλάμων. Ακόμη, αντί του γυαλιού επιλέχθηκε το PDMS για τη δημιουργία των ροϊκών διεπαφών, ως υλικό που μπορεί εύκολα να διανοιχθεί. Ως αποτέλεσμα, μεταβλήθηκε η σχετική θέση των δύο μικροθαλάμων, και ο μικροθάλαμος καλλιέργειας τοποθετήθηκε κάτω.

Πιο συγκεκριμένα, η βελτιωμένη αρχιτεκτονική περιλαμβάνει αντίστοιχα δυο επίπεδα PDMS, όπου στο ανώτερο βρίσκεται ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας και στο κατώτερο ο μικροθάλαμος καλλιέργειας, με τη μεταξύ τους επικοινωνία να επιτυγχάνεται μέσω της πορώδους μεμβράνης. Η όλη διάταξη σφραγίζεται από κάτω με γυαλί μικροσκοπίου, από όπου γίνεται και η παρατήρηση των κυττάρων. Στο Σχήμα 3.2 φαίνεται σε ανάπτυξη 3D σχέδιο της νέας αρχιτεκτονικής. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μείωση της διαμέτρου των μικροθαλάμων, με ταυτόχρονη αύξηση στο ύψος τους, έτσι ώστε να διατηρηθεί παρόμοιος ο συνολικός τους όγκος. Συγκεκριμένα, η διάμετρος του μικροθαλάμου καλλιέργειας είναι 6 mm, και αντίστοιχα του μικροθαλάμου τροφοδοσίας 8 mm, ενώ και για τους δύο το ύψος τους είναι 0.5 mm.



Σχήμα 3. 2. Ανεπτυγμένη 3D άποψη της τελικώς επιλεγόμενης αρχιτεκτονικής 2^{ης} γενιάς της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (bone marrow-on-a-chip/BmoC). Η σχετική θέση των μικροθαλάμων αντιστράφηκε σε σχέση με την αρχιτεκτονική 1^{ης} γενιάς, με την καλλιέργεια των κυττάρων (MSCs και HSCs) να πραγματοποιείται στον κάτω μικροθάλαμο PDMS, και την τροφοδοσία στον άνω. Η μεταξύ τους επικοινωνία συνεχίζει να εξασφαλίζεται μέσω πορώδους μεμβράνης, ενώ ο κάτω μικροθάλαμος σφραγίζεται με γυαλί, με τη σύνδεση των ροϊκών διεπαφών να πραγματοποιείται μέσω του άνω μικροθαλάμου PDMS. Σε μεγέθυνση μια διατομή της μικροδιάταξης.

3.2 Σχεδιασμός και κατασκευή των εκμαγείων των μικροθαλάμων της μικροδιάταξης

Η κατασκευή των εκμαγείων είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των επιθυμητών δομών στους μικροθαλάμους PDMS της μικροδιάταξης. Έχοντας καθορίσει τη γεωμετρία κάθε μικροθαλάμου, το επόμενο στάδιο είναι να αποδοθεί το σχέδιο CAD (Computer-Aided Design) των εκμαγείων τους με χρήση κατάλληλου λογισμικού σχεδίασης προκειμένου να υλοποιηθούν. Και για τις δύο αρχιτεκτονικές της μικροδιάταξης, δοκιμάστηκαν συνολικά δύο διαφορετικές μέθοδοι για την κατασκευή των εκμαγείων, υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC - Computerized Numerical Control Micromachining) και τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing).

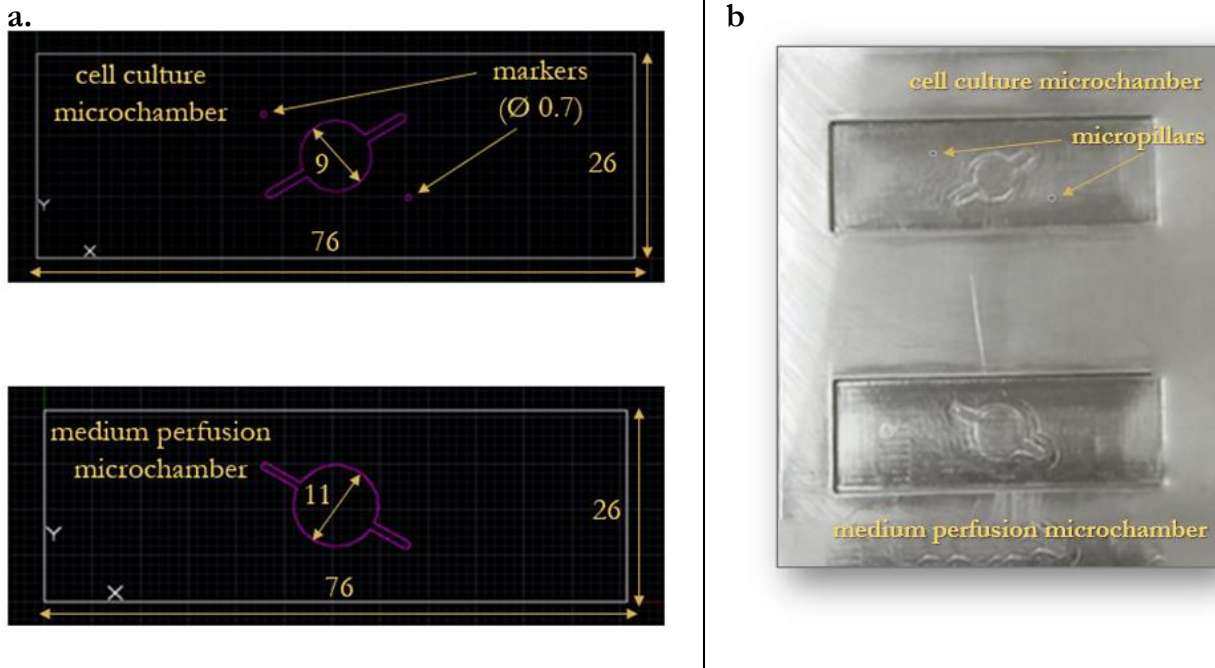
i) Αρχιτεκτονική 1^{ης} γενιάς

Για την αρχιτεκτονική 1^{ης} γενιάς, χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC), δοκιμάζοντας δύο διαφορετικά υλικά υποστρώματα, αλουμινίου και πολυ(τετραφθοροαιθυλενίου) (poly(tetrafluoroethylene) PTFE – εμπορική ονομασία Teflon). Το κάθε υπόστρωμα διέθετε το δικό του σχέδιο.

Για το υπόστρωμα αλουμινίου, το 2D σχέδιο των μικροθαλάμων, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3a. Η συνολική σχεδιαστική επιφάνεια κάθε επιπέδου μικροθαλάμων είναι 76 mm x 26 mm, ενώ επιπλέον, τα μικροκανάλια των δύο μικροθαλάμων διαθέτουν κατοπτρική συμμετρία ως προς άξονα στη διεύθυνση x (αντίστοιχα και στην y). Τέλος, στο επίπεδο του μικροθαλάμου καλλιέργειας έχουν προστεθεί δύο κύκλοι-σημάδια διαμέτρου 0.7 mm, που συμπέφτουν με τις άκρες των μικροκαναλιών εισόδου και εξόδου του μικροθαλάμου τροφοδοσίας, ώστε να σηματοδοτηθούν τα σημεία διάνοιξης οπών στο γυαλί προς πρόσβαση στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το σύστημα προτυποποίησης LPKF ProtoMat S63 και με τη βοήθεια του λογισμικού LPKF CircuitPro για την ανάγνωση των παραπάνω σχεδίων, τα εκμαγεία των μικροθαλάμων εντυπώθηκαν σε κοινό υπόστρωμα αλουμινίου πάχους 5 mm, απεικονιζόμενα στο Σχήμα 3.3b. Ο μικροθάλαμος καλλιέργειας φέρει κυλινδρικές μικροκολώνες διαμέτρου 0.7 mm, που προέρχονται από τους κύκλους-σημάδια στο σχέδιό του. Τόσο ο μικροθάλαμος, όσο και τα μικροκανάλια του μαζί με τις μικροκολώνες εξέχουν 1 mm, όπως αντίστοιχα και οι δομές του μικροθαλάμου τροφοδοσίας με τα μικροκανάλια του, ενώ η συνολική επιφάνεια των εκμαγείων είναι 76 mm x 26 mm, με βάθος 1 mm. Καθώς το ύψος των μικροθαλάμων των εκμαγείων (1 mm) είναι μεγαλύτερο από το επιθυμητό ύψος 0.2 mm και 0.3 mm, για το μικροθάλαμο καλλιέργειας και τροφοδοσίας, αντίστοιχα, το τελικό ύψος των μικροθαλάμων PDMS καθορίζεται από τον εγγερόμενο όγκο προπολυμερούς PDMS.

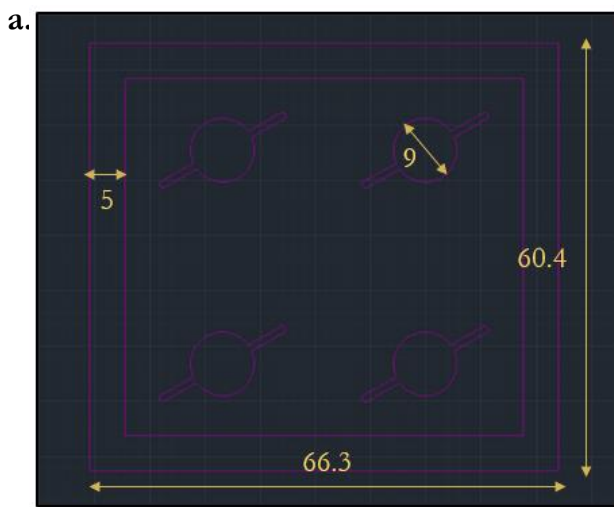
Τα εκμαγεία που προέκυψαν διέθεταν αμελητέα τραχύτητα, όπως προέκυψε από μετέπειτα έλεγχο της συγκολλητικής ικανότητας των εξαγόμενων επιπέδων PDMS (βλ. Παράγραφο 3.3). Όμως, λόγω του μικρού επιθυμητού ύψους των μικροθαλάμων (0.2 και 0.3 mm) και του υψηλού ιξώδους του PDMS, όπως προαναφέρθηκε, ήταν δύσκολος ο ακριβής προσδιορισμός του τελικού πάχους των επιπέδων PDMS και του ύψους των ίδιων των μικροθαλάμων.



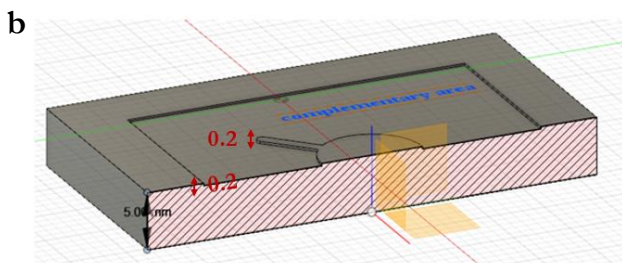
Σχήμα 3. 3. a) 2D σχέδιο CAD των μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας με θρεπτικό υλικό της μικροδιάταξης αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς, όπου όλες οι διαστάσεις αποδίδονται σε mm. b) Φωτογραφία υποστρώματος αλουμινίου, κοινού για τα εκμαγεία των δύο μικροθαλάμων, όπως προέκυψε με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC).

Προχωρώντας στο υπόστρωμα PTFE, προτιμήθηκε η σχηματοποίηση τεσσάρων εκμαγείων μικροθαλάμων καλλιέργειας στο ίδιο υπόστρωμα πάχους 5 mm για λόγους επιτάχυνσης της παραγωγικότητας της κατασκευής. Στο Σχήμα 3.4a απεικονίζεται το σχέδιο CAD για όλο το υπόστρωμα ορθογώνιου σχήματος διαστάσεων 60.4 mm x 66.3 mm, που περιβάλλεται από ένα πλαίσιο πλάτους 5 mm (αφήνοντας εσωτερικά επιφάνεια 50.4 mm x 56.3 mm). Κάθε μικροθάλαμος καλλιέργειας μαζί με τα μικροανάλια του διατήρησε τις προαναφερόμενες διαστάσεις. Για καλύτερο έλεγχο του πάχους των επιπέδων μικροθαλάμων PDMS, το ύψος του πλαισίου των εκμαγείων ορίστηκε να είναι ίδιο με το ύψος των μικροθαλάμων, δηλαδή 0.2 mm. Προς καλύτερη κατανόηση, στο Σχήμα 3.4b παρουσιάζεται 3D σχέδιο της τομής ενός μικροθαλάμου καλλιέργειας, όπου φαίνεται το κοινό ύψος του μικροθαλάμου με το πλαίσιο.

Στο Σχήμα 3.4c, φαίνονται τα εκμαγεία των μικροθαλάμων καλλιέργειας στο κοινό υπόστρωμα PTFE. Δοκιμαστική χρήση των εκμαγείων είχε ως αποτέλεσμα κατά τη θέρμανσή τους στους 100°C να παρουσιάσουν εμφανή καμπύλωση, ενώ λόγω του μικρού συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας του PTFE ($\approx 0.3 \text{ W/m}\cdot\text{K}$) [4] σε σχέση με το αλουμίνιο (88 – 251 $\text{W/m}\cdot\text{K}$ αναλόγως του κράματος αλουμινίου) [5] αυξήθηκε ο απαιτούμενος χρόνος για τον πολυμερισμό του PDMS, κατ' ελάχιστο 50 min. Επιπλέον, η μείωση του ύψους του πλαισίου των εκμαγείων στα 0.2 mm, ώστε να συμπίπτει με το ύψος των μικροθαλάμων, συνέβαλε σε καλύτερο έλεγχο του εγχεόμενου όγκου προπολυμερούς PDMS και συνεπώς, του πάχους των επιπέδων PDMS. Παρ' όλα αυτά όμως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το πάχος αυτό δε διέθετε την επιθυμητή ομοιομορφία.



c.



Σχήμα 3. 4. a) 2D σχέδιο CAD τεσσάρων αντιγράφων μικροθαλάμων καλλιέργειας της μικροδιάταξης αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς σε κοινό υπόστρωμα. b) 3D σχέδιο μίας διατομής του εκμαγείου του μικροθαλάμου καλλιέργειας, όπου διακρίνεται το κοινό ύψος του μικροθαλάμου με το πλαίσιο προς έλεγχο του ύψους του μικροθαλάμου PDMS. Όλες οι διαστάσεις είναι σε mm. c) Κοινό υπόστρωμα πολυ(τετραφθοροαιθυλενίου) (PTFE) με εκμαγεία τεσσάρων μικροθαλάμων καλλιέργειας, όπως προέκυψε με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC).

ii) Αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς

Στα πλαίσια της αρχιτεκτονικής 2^{ης} γενιάς, δοκιμάστηκε αρχικά η μέθοδος της 3D εκτύπωσης για την κατασκευή των εκμαγείων μικροθαλάμων, χρησιμοποιώντας τη ρητίνη Standard White FLGPWH04 λόγω της μικρής τραχύτητας των αντικειμένων που κατασκευάζονται. Στο Σχήμα 3.5a-d παρουσιάζονται τα 3D σχέδια των μικροθαλάμων και τα εκμαγεία που προέκυψαν.

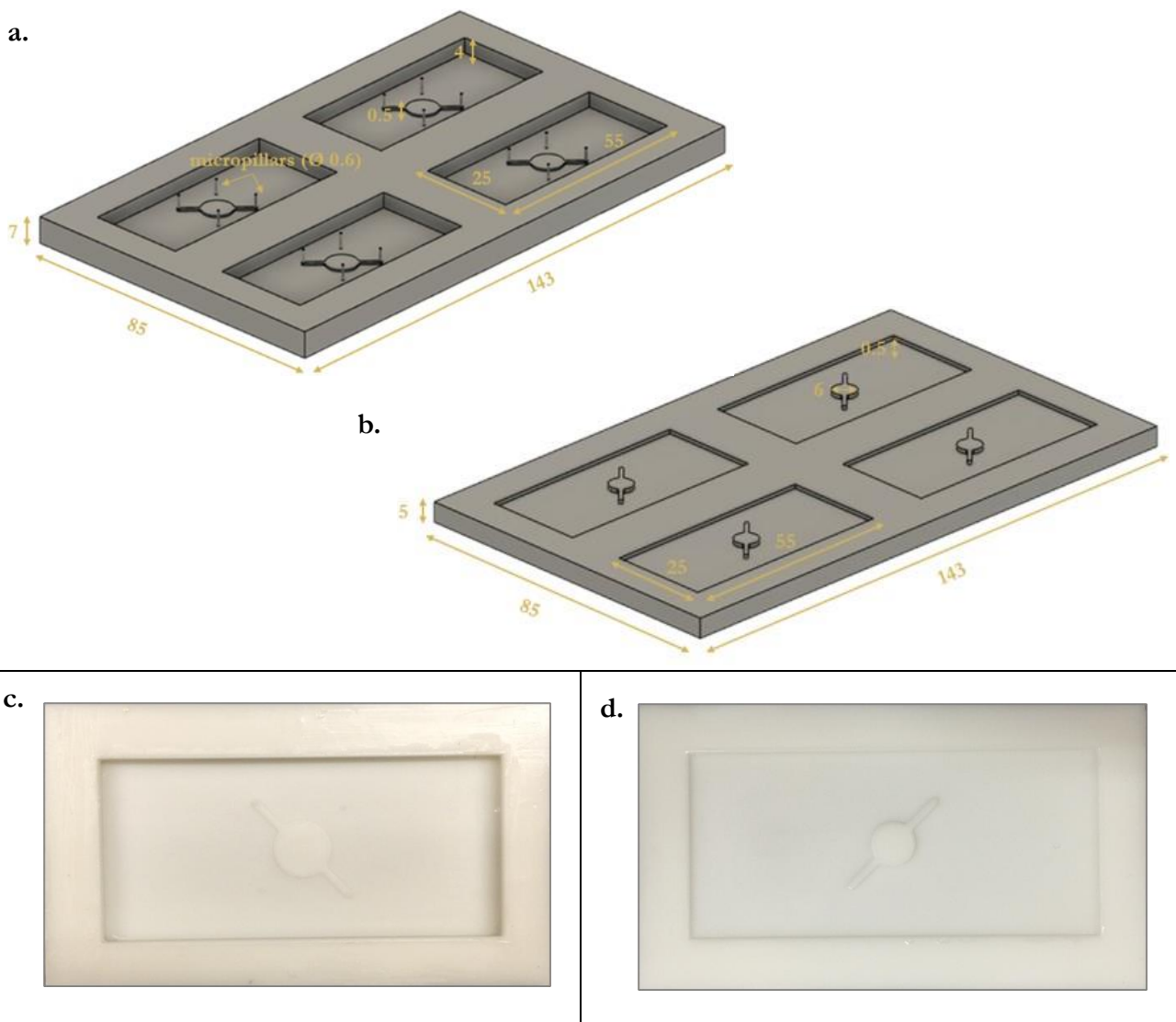
Όπως παρατηρείται στα Σχήματα 3.5a και 3.5b, σε συμφωνία με τις βελτιώσεις της νέας αρχιτεκτονικής, το ύψος κάθε μικροθαλάμου ήταν 0.5 mm. Το ύψος πλαισίου των εκμαγείων ορίστηκε ίσο με το τελικό πάχος επιπέδου PDMS, προς καλύτερο έλεγχό του. Έτσι, το πλαίσιο του εκμαγείου του μικροθαλάμου καλλιέργειας βρίσκεται στα 0.5 mm, και του μικροθαλάμου τροφοδοσίας στα 4 mm. Η αύξηση στο πάχος του επιπέδου PDMS μικροθαλάμου τροφοδοσίας υπαγορεύεται από την ανάγκη μηχανικής σταθερότητας, καθώς μέσω αυτού πραγματοποιείται η επικοινωνία με τη μικροδιάταξη. Επιπλέον, περιορίστηκε το μήκος των εκμαγείων σε 55 mm, διατηρώντας σταθερό το πλάτος τους στα 25 mm, προς ευκολία χειρισμού μικρότερης επιφάνειας

μικροθαλάμων PDMS. Για τον κάθε μικροθάλαμο, κατασκευάστηκαν τέσσερα εικμαγεία τοποθετημένα σε κοινό υπόστρωμα διαστάσεων 143 mm x 85 mm και ύψους 5 mm και 7 mm, για τον μικροθάλαμο καλλιέργειας και τροφοδοσίας, αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα, τα αντιδιαμετρικά μικροκάναλια εισόδου και εξόδου έχουν διαστάσεις (μήκος x πλάτος x ύψος) 5.5 mm x 1 mm x 0.5 mm για το μικροθάλαμο καλλιέργειας, και 4.5 mm x 1 mm x 0.5 mm για το μικροθάλαμο τροφοδοσίας. Στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, προστέθηκαν μικροκολώνες στις άκρες των μικροκαναλιών εισόδου και εξόδου του, διαμέτρου 0.6 mm και ύψους 4 mm, σε θέσεις που συμπίπτουν με τις άκρες των μικροκαναλιών εισόδου και εξόδου του μικροθαλάμου καλλιέργειας, για τη διάνοιξη οπών στα επίπεδα PDMS. Ο όγκος του μικροθαλάμου καλλιέργειας είναι 14.1 μL και του κάθε μικροκαναλιού 2.8 μL , αποδίδοντας συνολικό όγκο μικροθαλάμου μαζί με τα δύο μικροκάναλια 19.6 μL . Αντίστοιχα, για το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, ο όγκος του είναι 25.1 μL και του κάθε μικροκαναλιού του 2.2 μL , καταλήγοντας σε συνολικό όγκο 29.5 μL .

Στα Σχήματα 3.5c και 3.5d, παρουσιάζονται τα εικμαγεία που προέκυψαν μετά τη 3D εκτύπωση. Να σημειωθεί ότι πριν τη χρήση τους, εκτέθηκαν σε UV ακτινοβολία και θερμάνθηκαν στους 80°C κατά τη διάρκεια της νύχτας, προκειμένου να εξασφαλιστεί καλός πολυμερισμός της ρητίνης. Για τον περιορισμό της καμπύλωσης στα υποστρώματα κατά τη θέρμανση, κάθε υπόστρωμα επιμερίστηκε στα τέσσερα συνιστώμενα εικμαγεία, περιορίζοντας έτσι την επιφάνεια και το βαθμό καμπύλωσης. Παρά τα μέτρα αυτά, μετέπειτα θέρμανση του προπολυμερούς PDMS στα εικμαγεία οδήγησε σε αδυναμία αποκόλλησης του PDMS από τα εικμαγεία των μικροθαλάμων καλλιέργειας, πιθανώς λόγω υπολειμμάτων της ρητίνης που εμπόδισαν την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του PDMS. Προς αντιμετώπιση αυτού, εναποτέθηκε λεπτό στρώμα φθοράνθρακα χαμηλής επιφανειακής ενέργειας μέσω πλάσματος αερίου τριφθορομεθανίου (trifluoromethane - CHF_3) που διευκόλυνε την αποκόλληση του PDMS. Εκτός αυτών, στα εικμαγεία των μικροθαλάμων τροφοδοσίας παρατηρήθηκε σταδιακή αποκόλληση των κυλινδρικών μικροκολώνων μετά από λίγες μόνο χρήσεις. Η απουσία αυτή των μικροκολώνων είναι ορατή στο Σχήμα 3.5c.

Σε δοκιμή συγκόλλησης των εξαγόμενων επιπέδων PDMS με άλλα δείγματα PDMS, καθώς και με το γυαλί μετά από αμοιβαία έκθεσή τους σε πλάσμα αέρα, τα επίπεδα συγκολλήθηκαν μεταξύ τους επιτυχώς.



Σχήμα 3. 5. 3D σχέδια CAD τεσσάρων αντιγράφων εκμαγείων α) μικροθαλάμων τροφοδοσίας και β) μικροθαλάμων καλλιέργειας στο ίδιο υπόστρωμα για τη μικροδιάταξη αρχιτεκτονικής 2^{ης} γενιάς. Όλες οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. Υλοποίηση των εκμαγείων γ) μικροθαλάμων τροφοδοσίας και δ) μικροθαλάμων καλλιέργειας με τη μέθοδο της 3D εκτύπωσης και τη ρητίνη Standard White FLGPWH04 χαμηλής τραχύτητας. Στο εκμαγείο μικροθαλάμου τροφοδοσίας (c) παρατηρείται πως έχουν διαρρηχθεί οι μικροκολώνες μετά από τη χρήση του.

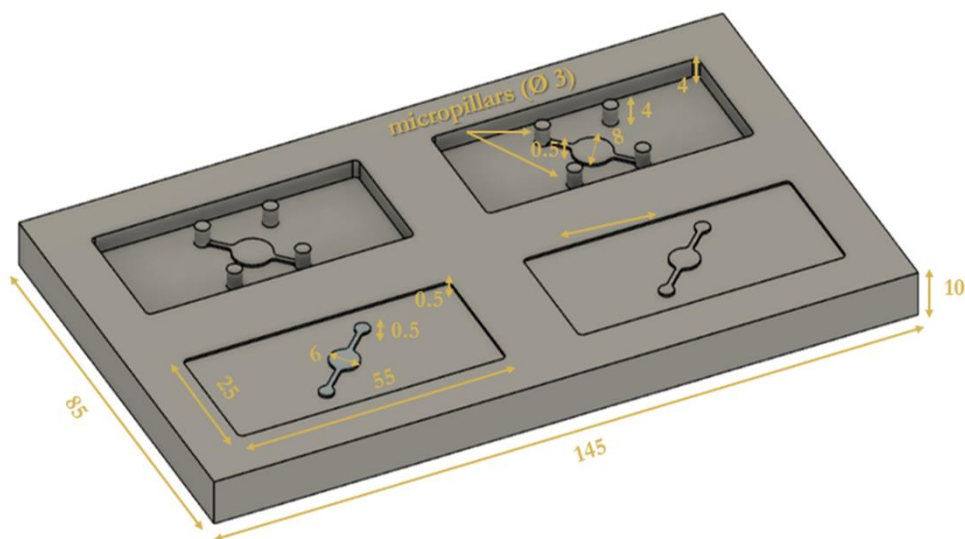
Με χρήση υπολογιστικά ελεγχόμενης μικρομηχανικής CNC, δοκιμάστηκε τέλος, η κατασκευή των εκμαγείων σε αλουμίνιο. Σε κοινό υπόστρωμα διαστάσεων 145 mm x 85 mm x 10 mm κατασκευάστηκαν δύο αντίγραφα για κάθε είδος μικροθαλάμου. Τα 3D σχέδια των εκμαγείων, και η υλοποίησή τους στο αλουμίνιο παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.6.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.6a, οι διαστάσεις κάθε εκμαγείου παράμειναν ίδιες, όπως αντίστοιχα και των μικροθαλάμων μαζί με τα μικροκανάλια τους, με τη μόνη διαφοροποίηση να εντοπίζεται στη διάμετρο των κυλινδρικών μικροκολώνων, η οποία αυξήθηκε στα 3 mm, υπαγορευόμενη από τη διάμετρο των προσαρμογών που επιλέχθηκαν (βλ. Παρ. 3.9.2). Στα εκμαγεία των μικροθαλάμων καλλιέργειας, οι μικροκολώνες διαθέτουν ύψος 0.5 mm, ενώ στους μικροθαλάμους τροφοδοσίας 4 mm, με τελικό όγκο 3.5 μL και 28.3 μL , αντίστοιχα. Για όγκο μικροθαλάμου καλλιέργειας 14.1 μL , και τροφοδοσίας 25.1 μL , με προσθήκη των όγκων των δύο μικροκαναλιών τους, καταλήγουν σε 26.6 μL και 86.1 μL , αντίστοιχα.

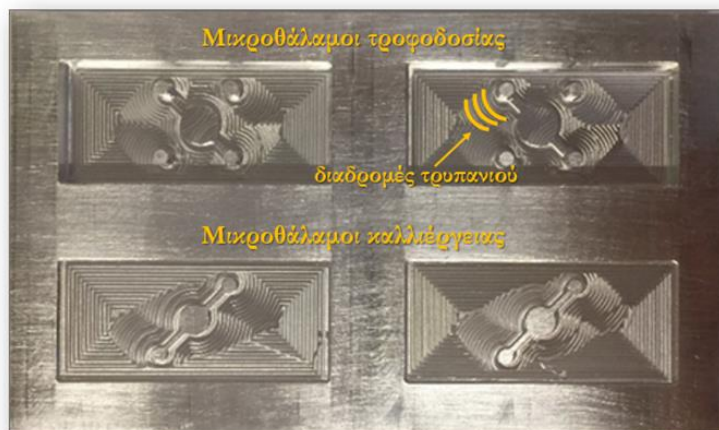
Στο Σχήμα 3.6b παρουσιάζονται τα εκμαγεία των δύο ειδών μικροθαλάμων στο κοινό υπόστρωμα. Το αλουμίνιο ως υλικό μεγάλης ακαμψίας διατήρησε άθικτες τις κυλινδρικές μικροκολώνες. Στα εκμαγεία διακρίνεται εμφανής τραχύτητα δια γυμνού οφθαλμού, που προκύπτει από τις διαδρομές του τρυπανιού (Σχήμα 3.6b), η οποία δεν επηρέασε τη συγκολλητική ικανότητα των επιπέδων PDMS, όπως αναλύεται στην Παράγραφο 3.3.

Από το σύνολο των δοκιμασμένων εκμαγείων, προκύπτει ότι το αλουμίνιο πλεονεκτεί των υπολοίπων, καθώς δεν απαιτεί προγενέστερη κατεργασία πριν τη χρήση του, εμφανίζει τη μέγιστη ακαμψία και έχει το μεγαλύτερο συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας, περιορίζοντας στο ελάχιστο δυνατό το χρόνο θέρμανσης. Έτσι, και για τις δύο αρχιτεκτονικές, επιλέχθηκε η χρήση των εκμαγείων αλουμινίου για την κατασκευή των μικροθαλάμων PDMS.

a.



b.



Σχήμα 3. 6. a) 3D σχέδιο CAD των μικροθαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας σε κοινό υπόστρωμα, με δύο αντίγραφα για κάθε είδος μικροθαλάμου για τη μικροδιάταξη 2^{ης} γενιάς. Οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. b) Κατασκευή των εκμαγείων μικροθαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας σε υπόστρωμα αλουμινίου με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC). Διακρίνονται δια γυμνού οφθαλμού οι διαδρομές του τρυπανιού κατά την κατασκευή των εκμαγείων, οι οποίες όμως δεν επηρεάζουν την ικανότητα συγκόλλησης των μικροθαλάμων PDMS.

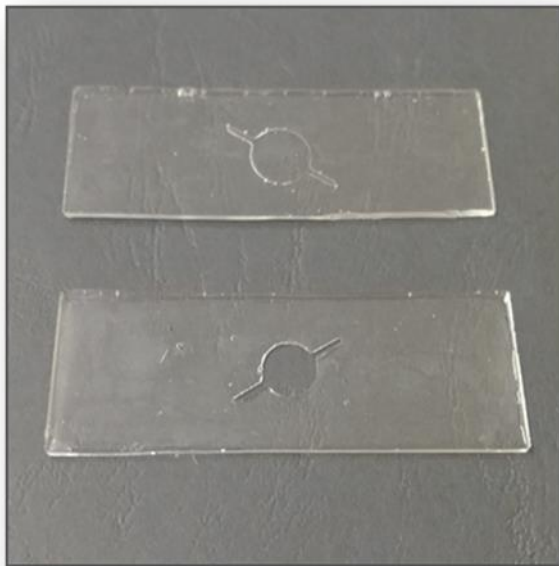
3.3 Κατασκευή μικροθαλάμων πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης)

Η κατασκευή των μικροθαλάμων PDMS πραγματοποιήθηκε με την τεχνική αντιγραφής μήτρας (replica molding/REM) [6,7], η οποία παρουσιάζεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1. Συνοπτικά, μίγμα προπολυμερούς PDMS σε αναλογία όγκου 10:1 (βάση:διασταυρωτής) εγχέεται στο αντίστοιχο εκμαγείο και θερμαίνεται στους

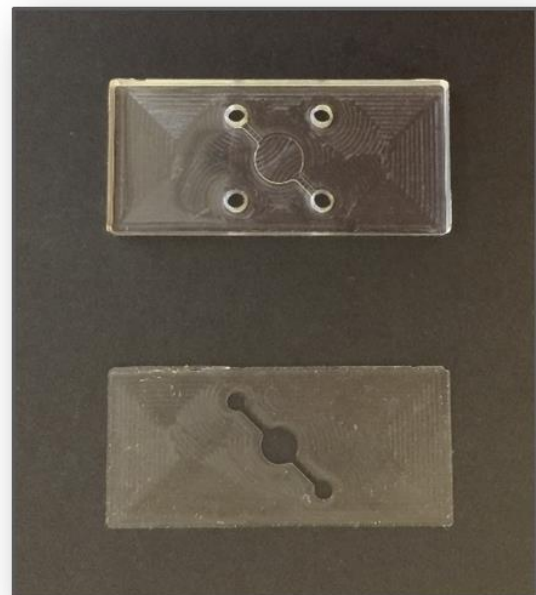
100°C για 35 – 40 min [8]. Προκύπτουν έτσι, σχηματοποιημένοι μικροθάλαμοι, που φέρουν τις συμπληρωματικές δομές των εκμαγείων τους. Στο Σχήμα 3.7, παρουσιάζονται τα επίπεδα μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας, προερχόμενα από τα εκμαγεία αλουμινίου για την κάθε αρχιτεκτονική.

Οι μικροθάλαμοι PDMS απομακρύνονται με ευκολία από τα εκμαγεία τους, χωρίς να προαπαιτείται χημική αδρανοποίηση της επιφάνειας του αλουμινίου. Επιπλέον, ειδικότερα οι μικροθάλαμοι PDMS της αρχιτεκτονικής 2^{ης} γενιάς παρουσιάζουν εμφανή τοπογραφία δια γυμνού οφθαλμού, που γίνεται αντιληπτή ως θολότητα, και οφείλεται στις χαρασσομένες διαδρομές του τρυπανιού στα εκμαγεία. Δοκιμή συγκόλλησης των μικροθαλάμων PDMS, τόσο με το PDMS, όσο και με το γυαλί μετά από κατεργασία σε πλάσμα αέρα, ανέδειξε άψογη και άμεση μεταξύ τους συγκόλληση, αποδεικνύοντας ότι η υπάρχουσα τοπογραφία είναι αμελητέα.

a.



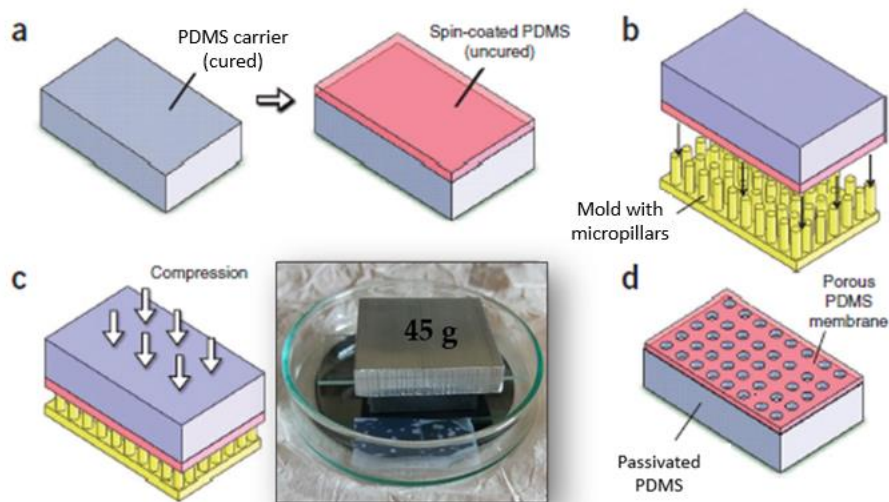
b.



Σχήμα 3. 7. Μικροθάλαμοι PDMS τροφοδοσίας (πάνω) και καλλιέργειας (κάτω) για τη μικροδιάταξη αρχιτεκτονικής a) 1^{ης} και b) 2^{ης} γενιάς, όπως προέκυψαν από τα αντίστοιχα εκμαγεία τους αλουμινίου με την τεχνική αντιγραφής μήτρας (replica molding).

3.4 Κατασκευή πορώδους μεμβράνης πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης)

Για την κατασκευή της πορώδους μεμβράνης PDMS, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που εισήχθη από τους Huh et al. [9]. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη συμπίεση ενός φορέα PDMS διαχειρίσιμου πάχους, που φέρει λεπτή επίστρωση PDMS του επιθυμητού πάχους μεμβράνης, έναντι ενός εκμαγείου με συστοιχίες μικροκολώνων για τη διάνοιξη οπών στο PDMS, με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πορώδους μεμβράνης. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.8.



Σχήμα 3. 8. Σχηματική απόδοση των σταδίων κατασκευής πορώδους μεμβράνης PDMS. Μετά την επιστροφή προπολυμερούς PDMS στο φορέα του (στάδιο a), το σύνολό τους αναστρέφεται στο εκμαγείο με τις μικροκολώνες (στάδιο b) και συμπιέζεται σύμφωνα με την εναπόθεση αλουμινίου βάρους 45 g (φωτογραφία σε προσθήκη) (στάδιο c). Μετά από θέρμανση, ο φορέας με το επισκληρωμένο PDMS αφαιρούνται από το εκμαγείο προς δημιουργία πορώδους μεμβράνης PDMS (στάδιο d) (τροποποίηση από τους Huh et al. [9]).

Πιο αναλυτικά, προπολυμερές PDMS επιστρώνεται δια περιστροφής στο επιθυμητό πάχος μεμβράνης πάνω σε επισκληρωμένο φορέα PDMS αναλογίας 15:1, διαστάσεων $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ και πάχους 5 mm (στάδιο a). Ακολούθως, ο επιστρωμένος με PDMS φορέας αναστρέφεται πάνω στο μικροδομημένο εκμαγείο (στάδιο b) και μεταλλικό βάρος 45 g (αλουμινένια πλάκα) εναποτίθεται πάνω στη στοιβία (στάδιο c), ώστε να εξασφαλιστεί η σύμμορφη επαφή με το εκμαγείο και η διείσδυση των μικροκολώνων του στο επιστρωμένο προπολυμερές. Στη συνέχεια, όλη η στοιβία τοποθετείται εντός φούρνου για τη σκλήρυνση του προπολυμερούς, μετά την ολοκλήρωση της οποίας, ο φορέας μαζί με το επισκληρωμένο πλέον PDMS απομακρύνεται από το εκμαγείο. Η διαδικασία αυτή καταλήγει στη δημιουργία της πορώδους μεμβράνης PDMS (στάδιο d), παραμένουσας πάνω στο φορέα της.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι τόσο ο φορέας, όσο και το εκμαγείο είναι αναγκαίο να έχουν αδρανοποιηθεί χημικά, όπως εξηγείται λεπτομερώς παρακάτω. Συγκεκριμένα, ως προς το φορέα, ώστε μετά το τέλος της διαδικασίας δημιουργίας της μεμβράνης, να είναι εφικτή η αποκόλληση της μεμβράνης από αυτόν κατά τη συγκόλληση με το επίπεδο του μικροθαλάμου καλλιέργειας. Αντίστοιχα, ως προς το εκμαγείο, ώστε κατά τη διαδικασία παραγωγής της μεμβράνης, να μπορεί να απομακρυνθεί ο φορέας μαζί με την επιστρωμένη μεμβράνη. Το κρίσιμο σημείο για τον επιτυχή σχηματισμό της μεμβράνης PDMS έγκειται στη λογική ότι η χημική αδρανοποίηση του φορέα θα πρέπει να είναι ασθενέστερη σε σχέση με εκείνη του εκμαγείου, ώστε κατά το στάδιο της απομάκρυνσης του φορέα από το εκμαγείο, η μεμβράνη να απομακρυνθεί από το εκμαγείο και να παραμείνει στο φορέα. Παράλληλα βέβαια, η αδρανοποίηση του φορέα θα πρέπει να είναι και επαρκής ώστε να απομακρυνθεί η μεμβράνη στο επόμενο στάδιο της συγκόλλησης με το μικροθάλαμο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι βάσει του πρωτοκόλλου των Huh et al. [9], συστήνεται η πορώδης μεμβράνη PDMS να είναι πάχους 10 μm και αναλογίας 10:1, ενώ ως προς τη θερμοκρασία σκλήρυνσής της στο φούρνο,

προτείνονται οι 60°C για 1 h. Πρόκειται για τις συνθήκες που αρχικά ακολουθήθηκαν και στην παρούσα διατριβή, αλλά όμως στην πορεία τροποποιήθηκαν, όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω, λόγω κατασκευαστικών δυσκολιών, που αφορούσαν κύρια στη μηχανική αντοχή της μεμβράνης.

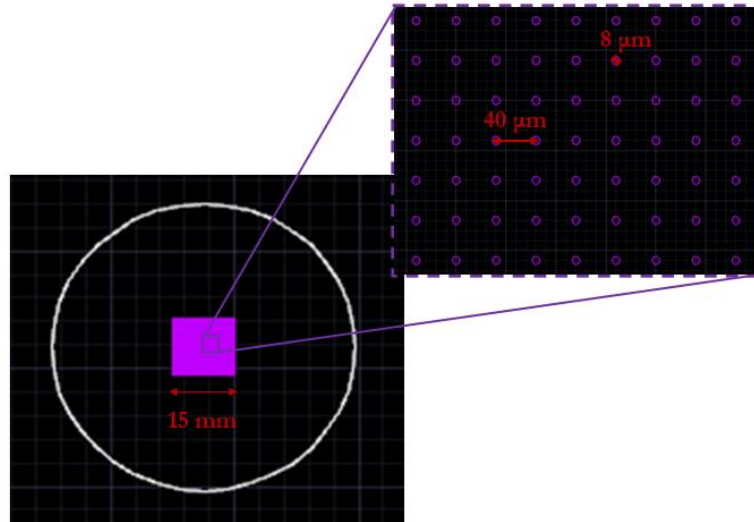
3.4.1 Σχεδιασμός εκμαγείων της πορώδους μεμβράνης

Ο προσδιορισμός του σχεδίου της πορώδους μεμβράνης πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ικανοποιείται ο διττός ρόλος της, δηλαδή η εγκατάσταση των κυττάρων και η τροφοδοσία μέσω διάχυσης του θρεπτικού υλικού από το μικροθάλαμο τροφοδοσίας στο μικροθάλαμο καλλιέργειας [3,9]. Αρχικά, το πάχος της θα πρέπει να είναι σχετικά μικρό ώστε να περιορίζεται το μήκος διάχυσης των θρεπτικών συστατικών, και συνάμα επαρκώς μεγάλο ώστε να μη δυσχεραίνεται η κατασκευαστική της διαδικασία. Στο πλαίσιο αυτό, θεσπίστηκε αρχικώς οριζόμενο πάχος 10 μm . Επιπλέον, δεδομένου ότι το μέγεθος των MSCs (σε κατάσταση πρόσφυσης σε επιφάνεια) είναι στα 10 – 12 μm , οι πόροι της μεμβράνης θα πρέπει να είναι μικρότεροι από τα MSCs, και παράλληλα μεγαλύτεροι από τα πρωτεϊνικά θρεπτικά συστατικά, που δεν ξεπερνούν το 1 μm , ώστε να εξασφαλίζεται η διάχυσή τους χωρίς να διακινδυνεύεται η παραμονή των MSCs στη μεμβράνη. Έτσι, το μέγεθος των πόρων της δε θα ξεπερνά τα 12 μm , ενώ η μεταξύ τους από κέντρο σε κέντρο απόσταση θα είναι 40 μm , ώστε να προσφέρει επαρκή επιφάνεια ώστε τα MSCs να εγκατασταθούν και να αναπτυχθούν ελεύθερα σε ιστό.

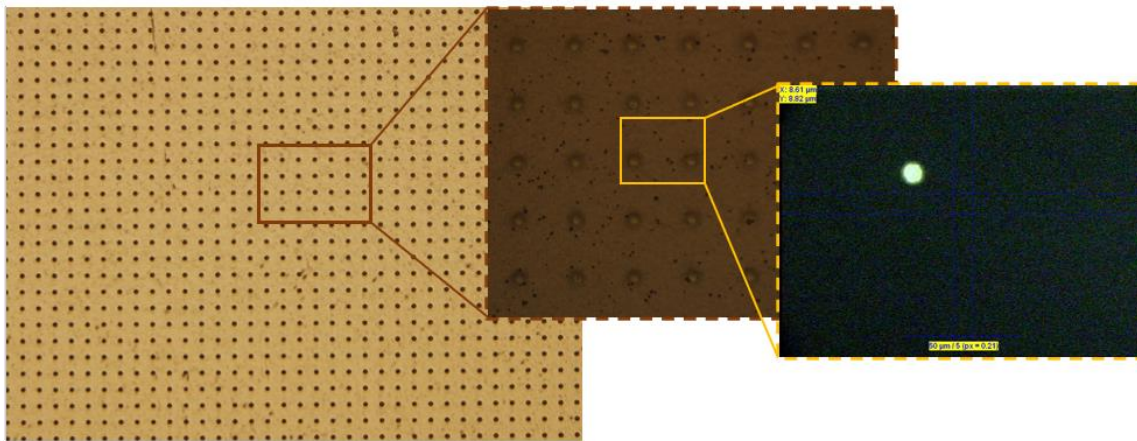
Στο Σχήμα 3.9α παρουσιάζεται το σχέδιο CAD (λογισμικό σχεδίασης AutoCAD) της φωτολιθογραφικής μάσκας για την πορώδη μεμβράνη, βάσει των επιλεγόμενων διαστάσεων. Είναι τετραγωνικά διατεταγμένη συστοιχία κύκλων διαμέτρου 8 μm και με διάκεντρο 40 μm . Η συνολική της επιφάνεια είναι 15 mm x 15 mm, ενώ βρίσκεται στο κέντρο ενός κύκλου διαμέτρου 76 mm, ίσης με εκείνης ενός 3'' δισκίου πυριτίου (Si), προς διευκόλυνση ευθυγράμμισης κατά τη φωτολιθογραφία.

Το σχέδιο μετατράπηκε αρχικά σε μάσκα διαφάνειας (film photomask) με χρήση φωτοσχεδιαστή καθοδηγούμενου με laser (laser photoplotting), εικόνες μικροσκοπίου της οποίας παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.9b (μεγεθύνσεις 10x και 100x). Παρατηρώντας τις, και σε συνδυασμό με τη φωτογραφία (Σχήμα 3.9b, 2^η εικόνα σε μεγέθυνση) που στάλθηκε από τον κατασκευαστή (Selba S.A.) διακρίνεται ότι οι οπές δεν αποτελούν τέλειους κύκλους, όπως ήταν στο αρχικό σχέδιο CAD, αλλά περισσότερο πολυγωνικές δομές, λόγω του ότι η ονομαστική διάμετρος των 8 μm αποτελούσε το κατώτατο όριο λειτουργίας του φωτοσχεδιαστή. Μάλιστα, σύμφωνα και με την ενδεικτική οπή της φωτογραφίας του κατασκευαστή, η μέση διάμετρος των οπών υπολογίζεται στα $8.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

a.



b.



Σχήμα 3. 9. a) 2D σχέδιο CAD της φωτολιθογραφικής μάσκας για το εικμαγείο της πορώδους μεμβράνης, που αποτελεί μια τετράγωνη συστοιχία μικροκολώνων πλευράς 15 mm, αποτελούμενη από μικροκολώνες ονομαστικής διαμέτρου 8 μm και με μεταξύ τους διάκεντρο 40 μm , όπως διακρίνεται από την εικόνα σε μεγέθυνση. b) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x της μάσκας διαφάνειας. Σειριακά σε μεγέθυνση παρουσιάζονται εικόνα 100x της διαφάνειας, και εικόνα του κατασκευαστή (Selba S.A.), από όπου προκύπτει μέση διάμετρος οπών $8.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

3.4.2 Κατασκευή εκμαγείων πορώδους μεμβράνης

3.4.2.1 Μεταφορά μάσκας διαφάνειας σε γυαλί quartz

Στα πλαίσια κατασκευής μιας φωτολιθογραφικής μάσκας περισσότερο ανθεκτικής, που θα παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλών χρήσεων, και με βελτιωμένη οπτική διαφάνεια, πραγματοποιήθηκε μεταφορά της μάσκας διαφάνειας σε γυαλί quartz. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά φωτολιθογραφία θετικού τόνου με



χρήση φωτοευαίσθητης ρητίνης AZ, όπου ως μάσκα χρησιμοποιείται η διαφάνεια, και ως υπόστρωμα επιχρωμιωμένο γυαλί quartz, για τη μεταφορά αυτούσιων των δομών της. Πραγματοποιήθηκε αρχικά μεταφορά μίας διαφάνειας, και αργότερα δύο διαφανειών στην ίδια μάσκα, προς επιτάχυνση της διαδικασίας παραγωγής της μεμβράνης.

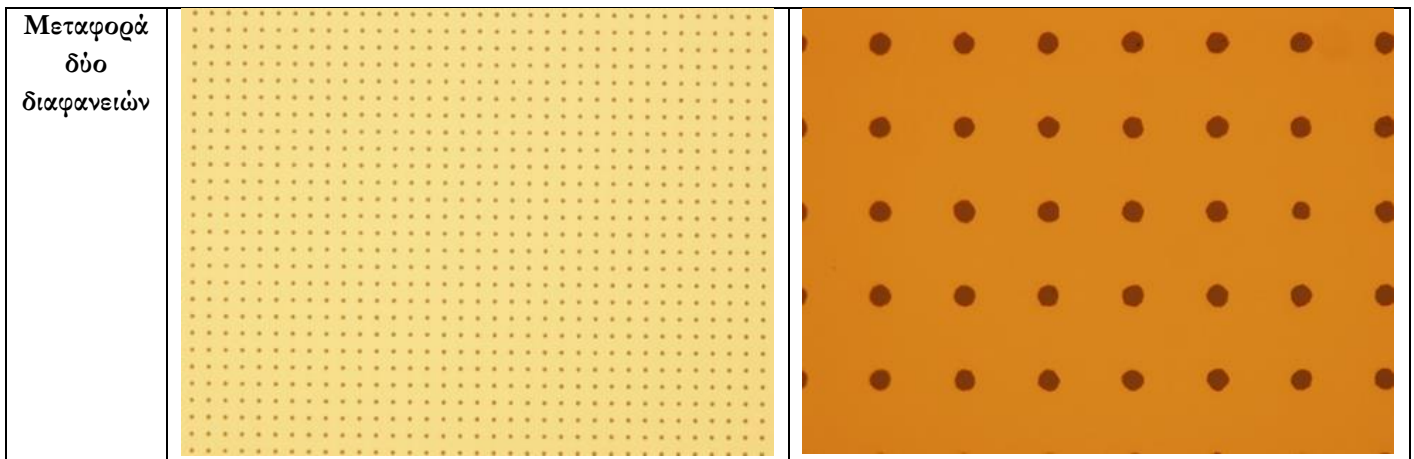
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν κοινή και στις δύο διεργασίες. Ειδικότερα, ξεκινάει με φωτολιθογραφία θετικού τόνου με χρήση φωτοευαίσθητου AZ, ακολουθούμενη από υγρή εγχάραξη χρωμίου στις εκτεθειμένες περιοχές, όπου το γυαλί εμβαπτίζεται σε λουτρό εγχάρακτη νιτρικού δημητρικού αμωνίου (ceric ammonium nitrate $[\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$) για χρόνο 4 - 5 min. Τέλος, γίνεται απομάκρυνση της εναπομένουσας ρητίνης από τις θέσεις των οπών. Στον Πίνακα 3.1 απεικονίζονται φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου (μεγεθύνσεων 10x και 50x) από τις φωτολιθογραφικές μάσκες σε γυαλί και από τις δύο διεργασίες.

Στη φωτολιθογραφική μάσκα προερχόμενη από τη μία διαφάνεια, η μέση διάμετρος των οπών ύστερα από μετρήσεις σε διάφορες περιοχές της, προέκυψε $6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$, μειωμένη κατά $2.4 \mu\text{m}$ σε σχέση με τη μέση διάμετρό τους στη διαφάνεια, ενώ εντοπίζονται οπές που δε διανοίχθηκαν καθόλου, αφήνοντας κενά σημεία στη μάσκα. Τα φαινόμενα αυτά αποδίδονται κυρίως στο ότι ο χρόνος έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικρότερος από το βέλτιστο. Παρατηρείται ακόμη ότι οι περιμετρικές προεκβολές στις οπές μεταφέρθηκαν από τη διαφάνεια στη φωτολιθογραφική μάσκα, όπου λόγω της μείωσης της μέσης διαμέτρου των οπών, παρουσιάζεται πιο έντονη η ασυμμετρία τους, αποκλίνοντας περισσότερο από το κυκλικό σχήμα.

Μετρήσεις της διαμέτρου των οπών στη μάσκα από τις δύο διαφάνειες, απέδωσε μέση τιμή $9.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$, αυξημένη κατά $1 \mu\text{m}$ σε σχέση με τη μέση διάμετρο των οπών της διαφάνειας. Η αύξηση αυτή οφείλεται σε υπερέκθεση της quartz μάσκας (χρόνος έκθεσης 30 s, για ισχύ λάμπας UV $4.5 - 5.5 \text{ mW/cm}^2$), η οποία όμως έχει ως αποτέλεσμα να είναι βελτιωμένη σε σχέση με τη γενέτειρά της διαφάνεια, όπως φαίνεται από το εξομαλυμένο περίγραμμα των οπών, που προσεγγίζει μια περισσότερο κυκλική μορφή. Η μάσκα αυτή είναι καλύτερη και σε σχέση με την προηγούμενη, όπου η απουσία υπερέκθεσης οδήγησε σε μεταφορά των ανωμαλιών στο περίγραμμα των οπών στο quartz.

Πίνακας 3. 1. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x και 50x των φωτολιθογραφικών μασκών quartz που προέκυψαν κατά τη μεταφορά μίας και δύο διαφανειών. Η μάσκα από τις δύο διαφάνειες παρουσιάζει περισσότερο εξομαλυμένο κυκλικό περίγραμμα και λόγω υπερέκθεσης δε μεταφέρει τις ασυμμετρίες της γενέτειρας διαφάνειας.

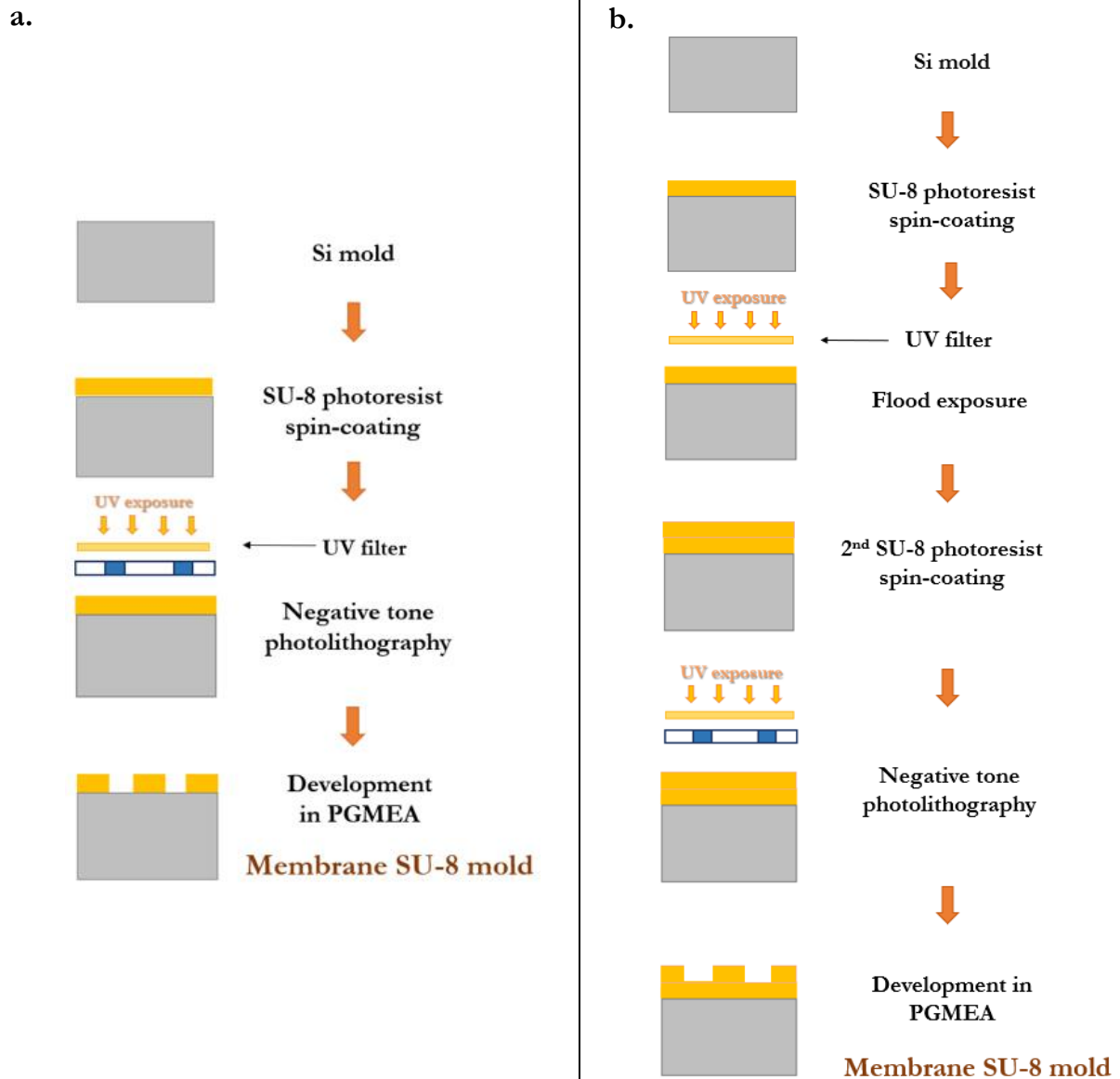
Μεγέθυνση	10x	50x
Μεταφορά μίας διαφάνειας		



3.4.2.2 Κατασκευή και αξιολόγηση εκμαγείων μεμβράνης με χρήση λιθογραφίας φωτοευαίσθητου SU-8

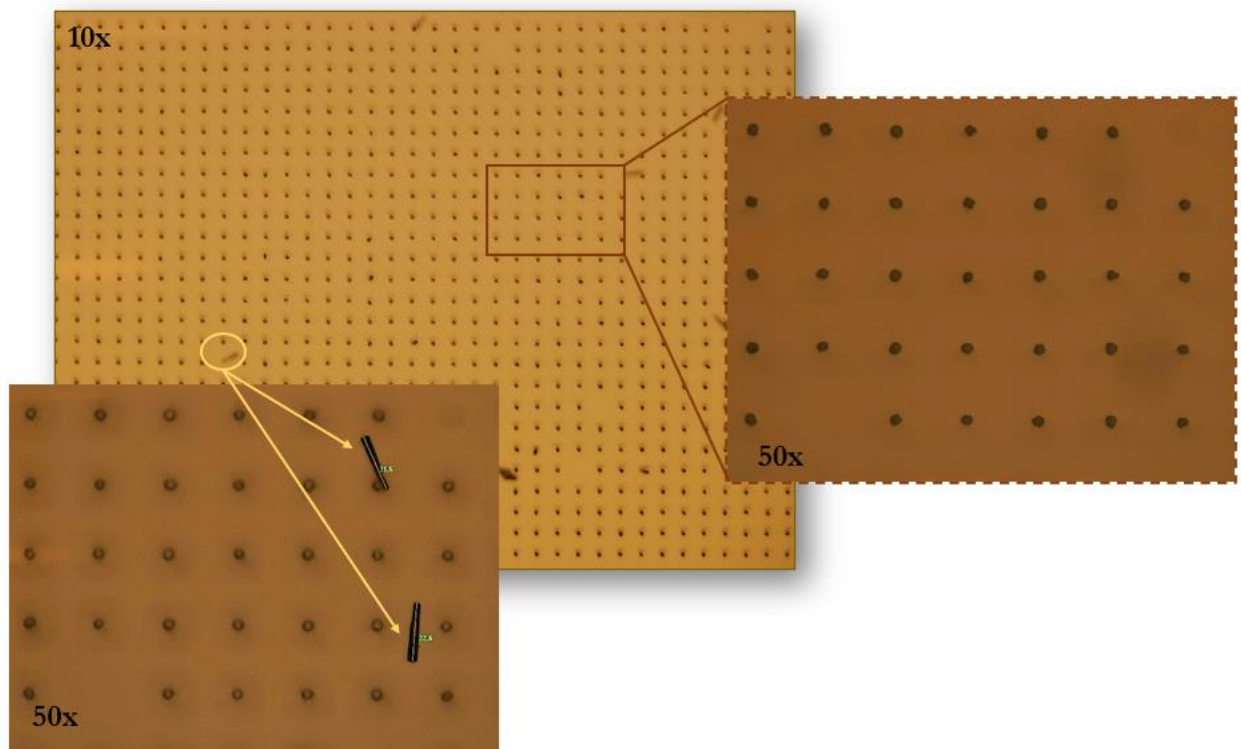
Δοκιμάστηκε η κατασκευή εκμαγείων της πορώδους μεμβράνης με λιθογραφία με χρήση του φωτοευαίσθητου αρνητικού τόνου SU-8. Για τη δημιουργία μικροκολώνων SU-8 πάνω σε υπόστρωμα Si, η διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στο Σχήμα 3.10a, και περιλαμβάνει αρχικά την εναπόθεση δια περιστροφής της ρητίνης σε 3'' δισκίδιο Si σε στροφές 1 300 rpm ώστε να επιτευχθεί πάχος προσεγγιστικά στα 30 μm. Η επιλογή του πάχους αυτού στηρίζεται στη λογική το ύψος των μικροκολώνων να είναι μεγαλύτερο του πάχους της μεμβράνης, ώστε να μπορούν να τη διαπεράσουν για τη δημιουργία οπών-πόρων. Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση αρχικά στους 65°C για 1 min και αμέσως μετά στους 95°C για 4 min. Πραγματοποιείται στη συνέχεια έκθεση του φωτοευαίσθητου σε ακτινοβολία UV μέσω της μάσκας (προερχόμενης από τη μία διαφάνεια) και με παρεμβαλλόμενο φίλτρο UV για 13 min (ισχύς λάμπας UV 6 mW/cm²). Η χρήση του φίλτρου περιορίζει την απορρόφηση της ρητίνης στην i-line (365 nm), αποκόβοντας μήκη κύματος της υπεριώδους μικρότερα από 350 nm στα οποία η ρητίνη παρουσιάζει υψηλή απορρόφηση. Ακολουθεί μετέπειτα θέρμανση αντίστοιχα σε δύο στάδια και στους ίδιους χρόνους, στους 65°C και μετά στους 95°C, Με εμβάπτιση σε εμφανιστή οξικού μεθυλαιθέρα της προπυλενογλυκόλης (propylene glycol monomethyl ether acetate - PGMEA) για χρόνο 4 min απομακρύνονται οι ανέκθετες περιοχές, ενώ τέλος, η ρητίνη σκληραίνεται με θέρμανση στους 160°C για 15 min.

Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, για τη βελτίωση της πρόσφυσης των μικροκολώνων SU-8 στο υπόστρωμα, δοκιμάστηκε επιπλέον η παραγωγή του εκμαγείου με λιθογραφία διπλής επίστρωσης φωτοευαίσθητου SU-8, με την πρώτη επίστρωση να λειτουργεί ως υπόστρωμα πάνω στο οποίο κατά τη δεύτερη επίστρωση θα αναπτυχθούν οι μικροκολώνες, ενώ και οι δύο θα είναι περίπου ίδιου πάχους (30 μm). Η διαδικασία φαίνεται βηματικά στο Σχήμα 3.10b. Αναλυτικά, η πρώτη επίστρωση SU-8 προέκυψε με την ίδια δόση έκθεσης σε σχέση με τη λιθογραφία μονής επίστρωσης, δηλαδή για χρόνο έκθεσης 17 min (ισχύς λάμπας UV 5 mW/cm²), με χρήση του φίλτρου UV και απουσία μάσκας (flood exposure). Η δεύτερη επίστρωση προέκυψε για διπλάσια δόση, που αντιστοιχεί σε χρόνο έκθεσης 34 min, καθώς η απουσία ανακλαστικού υποστρώματος, όπως συνέβαινε με το δισκίδιο Si, απαιτεί διπλασιασμό του χρόνου έκθεσης προς επαρκή έκθεση σε όλο το πάχος της επίστρωσης. Διατηρήθηκαν οι ίδιοι χρόνοι θέρμανσης (ελεγχόμενη θέρμανση στους 65°C για 1 min και στους 95°C για 4 min), και ο χρόνος εμφάνισης σε PGMEA ήταν στα 3 min



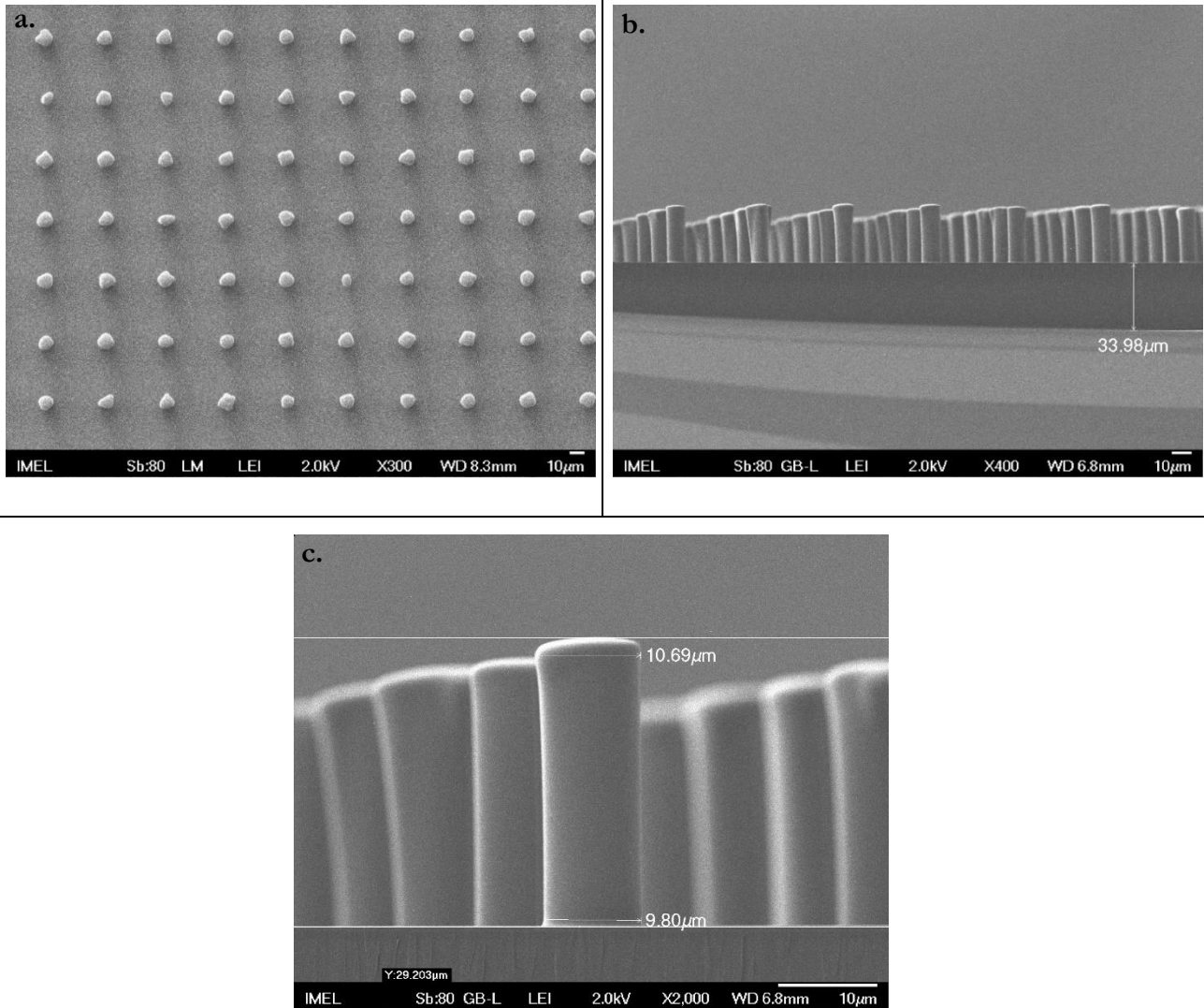
Σχήμα 3. 10. Σχηματική απόδοση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή εικμαγείου πορώδους μεμβράνης με λιθογραφία με χρήση του αρνητικού φωτοευαίσθητου SU-8 a) μονής και b) διπλής επίστρωσης.

Ξεικινώντας με το εικμαγείο της μονής επίστρωσης SU-8, στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες οπτικού μικροσκοπίου, μεγέθυνσης 10x, και 50x. Διακρίνεται ότι το σχήμα των μικροκολώνων προσομοιάζει αρκετά εκείνο των δομών της μάσκας (βλ. Πίνακα 3.1, από μεταφορά μίας διαφάνειας), με εμφανείς της περιμετρικές ασυμμετρίες. Επιπλέον, εντοπίστηκαν ορισμένα κενά στη συστοιχία, που κατά κύριο λόγο οφείλονται σε απουσία κολώνων λόγω αποκόλλησης, αλλά και σε μικρότερο βαθμό, σε αντίστοιχα κενά στη γενέτειρα μάσκα. Η μέση διάμετρος των κολώνων υπολογίστηκε $6.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, σε πολύ καλή προσέγγιση με την αντίστοιχη διάμετρο των δομών της μάσκας ($6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$). Ακόμη, από τις αποκολλημένες μικροκολώνες, ήταν δυνατή η μέτρηση του ύψους τους, που δίνει μια μέση τιμή $32.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$.



Σχήμα 3. 11. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x και 50x των μικροκολώνων SU-8 μονής επίστρωσης σε υπόστρωμα Si. Οι μικροκολώνες έχουν σχήμα παρεμφερές της γενέτειρας μάσκας, ενώ εντοπίζονται αρκετές αποκολλημένες. Οι διαστάσεις τους είναι μέση διάμετρος $6.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ και μέσο ύψος $32.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$.

Το εικαγείο που προέκυψε από διπλή επίστρωση SU-8 παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο SEM, με αντιπροσωπευτικές εικόνες στο Σχήμα 3.12. Η μέση διάμετρος των κολώνων υπολογίστηκε στα $10.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$, που διαφέρει σημαντικά, κατά $4.2 \mu\text{m}$ (Σχήμα 3.12a), σε σχέση με την αντίστοιχη των δομών στη μάσκα ($6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$). Η υπερέκθεση ενδεχομένως να οφείλεται στην αλλαγή του μετρητικού οργάνου ισχύος της λάμπας UV, το οποίο δεν έχει ίδια βαθμονόμηση με το προηγούμενο, με αποτέλεσμα να δίνει μικρότερες τιμές. Λόγω όμως της υπερέκθεσης, ο αριθμός των κολώνων που έχουν αποκολληθεί είναι σημαντικά μειωμένος. Παρατήρηση υπό 90° , επιβεβαίωσε ότι το πάχος της πρώτης επίστρωσης είναι περίπου στα $34 \mu\text{m}$ (Σχήμα 3.12b), και των κολώνων στα $29 \mu\text{m}$. Τέλος, εντοπίστηκε ελαφρώς αρνητικό προφίλ των κολώνων (Σχήμα 3.12c), με τη μέση διάμετρό τους στη βάση τους να είναι $9.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$, μειωμένη κατά $1 \mu\text{m}$ σε σχέση με εκείνη της κορυφής τους.



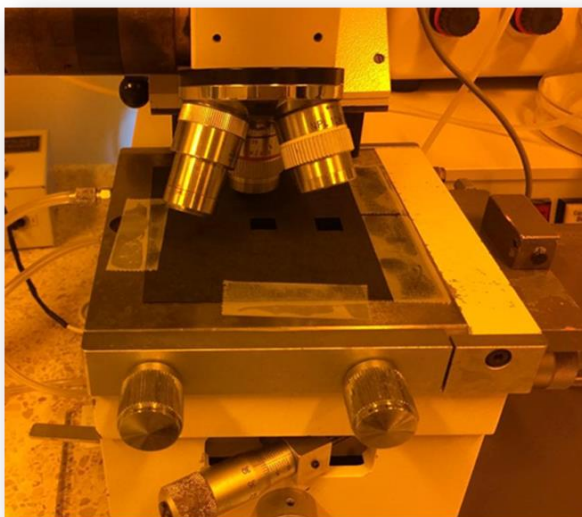
Σχήμα 3. 12. Εικόνες SEM του εκμαγείου από διπλή επίστρωση SU-8. Οι μικροκολώνες SU-8 λόγω υπερέκθεσης εμφανίζουν αυξημένη διάμετρο σε σχέση με τη μάσκα (a), παρ'ότι παρουσιάζουν καλή πρόσφυση στην πρώτη επίστρωση SU-8 πάχους περίπου 34 μm (b), και εμφανίζουν ελαφρώς αρνητικό προφίλ σε συνολικό ύψος περίπου 29 μm (c).

Συνολικά, η μέθοδος της λιθογραφίας διπλής επίστρωσης SU-8, αν και απέδωσε περισσότερο σταθερές μικροκολώνες λόγω υπερέκθεσης και καλής πρόσφυσης πάνω στο επίπεδο SU-8, αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα και κοπιώδη διαδικασία κατασκευής εκμαγείου για την πορώδη μεμβράνη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.10b. Συνεπώς, αναζητήθηκε η εύρεση μιας πιο απλής και διαδομένης διαδικασίας για την κατασκευή των μικροκολώνων.

3.4.2.3 Κατασκευή και αξιολόγηση εκμαγείων πυριτίου (Si) για τη μεμβράνη

Στρεφόμενοι σε περισσότερο σιληρά υλικά, επιλέχθηκε το εκμαγείο για την πορώδη μεμβράνη να είναι κατασκευασμένο από Si. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη μάσκα από τη μία διαφάνεια, αλλά και με

με τη μάσκα από τις δύο διαφάνειες. Μάλιστα, με τη μάσκα των δύο διαφανειών, επιχειρήθηκε περιορισμός της επιφάνειας των εκμαγείων, με στόχο την αντίστοιχη μείωση της επιφάνειας της μεμβράνης σε $10 \times 10 \text{ mm}^2$, από την αρχικά προσδιοριζόμενη $15 \times 15 \text{ mm}^2$. Η επιλογή αυτή, εκτός του ότι συμβάλλει στην ενίσχυση της μηχανικής αντοχής της μεμβράνης, είναι συμβατή με την αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς της μικροδιάταξης, που περιλαμβάνει μειωμένες διαμέτρους των μικροθαλάμων (6 mm και 8 mm, για το μικροθάλαμο καλλιέργειας και τροφοδοσίας, αντίστοιχα). Έτσι, προς μείωση της επιφάνειας των εκμαγείων, κατά την έκθεση σε UV, τοποθετήθηκε μαύρο χαρτόνι στη μάσκα, που άφηγε ακάλυπτες μόνο δύο τετραγωνικές περιοχές $10 \times 10 \text{ mm}^2$ κεντραρισμένες στα αντίστοιχα δύο σχέδια της μάσκας (Σχήμα 3.13).



Σχήμα 3. 13. Φωτογραφία που απεικονίζει την κάλυψη της φωτολιθογραφικής μάσκας με μαύρο χαρτόνι δύο ακάλυπτων τετραγωνικών περιοχών, ευθυγραμμισμένων με τα σχέδια της μάσκας, προς περιορισμό της επιφάνειας των εκμαγείων της μεμβράνης σε $10 \times 10 \text{ mm}^2$.

Η διαδικασία κατασκευής ήταν κοινή και για τις δύο διεργασίες, και παρουσιάζεται βηματικά στο Σχήμα 3.14a. Περιλαμβάνει εν συντομία αρχικά την εκτέλεση φωτολιθογραφίας αρνητικού τόνου με χρήση ρητίνης AZ4562, για τη μεταφορά της συστοιχίας μικροδομών της μάσκας, ακολουθούμενη από εγχάραξη του πυριτίου με υψηλής πυκνότητας πλάσμα με τη διεργασία Bosch ενός μείγματος αερίων $\text{SF}_6/\text{C}_4\text{F}_8$ για τη δημιουργία των μικροκολώνων πυριτίου. Κατά τη διεργασία Bosch, η ρητίνη λειτουργεί ως «μάσκα», προστατεύοντας τις περιοχές του δισιδίου που καλύπτει, ενώ εγχάρασσονται οι εκτεθειμένες.

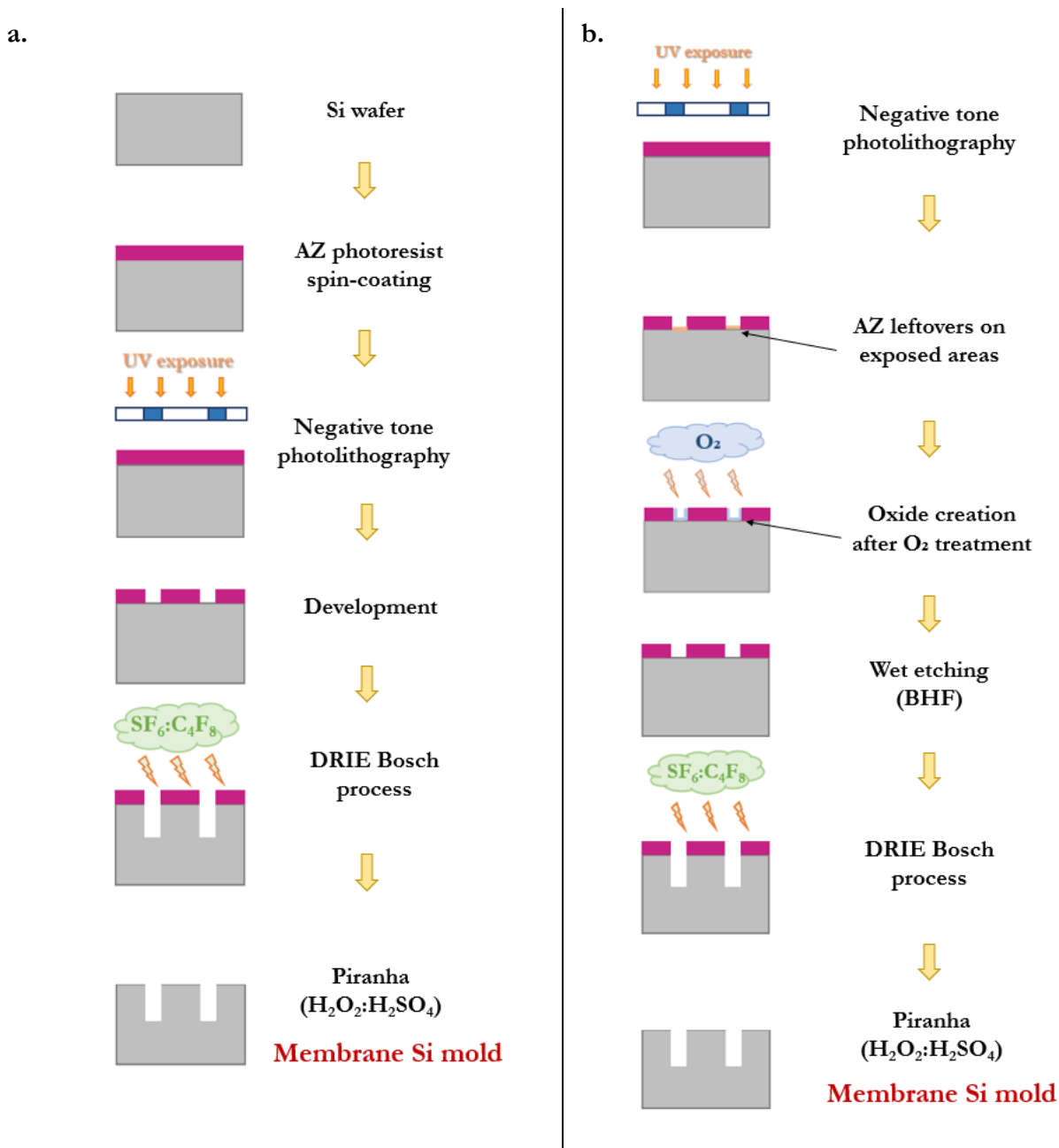
Πιο αναλυτικά, ξεκινώντας με τη λιθογραφία, 3'' δισκίο Si επιστρώθηκε δια περιστροφής με το φωτοευαίσθητο AZ4562 (3 000 rpm για 30 s, αποδίδοντας πάχος περίπου $1.64 \mu\text{m}$), θερμάνθηκε στους 110°C για 1.5 min, και στη συνέχεια εκτέθηκε μέσω της μάσκας της μεμβράνης σε ακτινοβολία UV, και συγκεκριμένα για 12 s με τη μάσκα της μίας διαφάνειας, και 8 s, για τη μάσκα των δύο διαφανειών. Να σημειωθεί εδώ, ότι ο συνήθης χρόνος έκθεσης για το συγκεκριμένο πάχος επιστρώσης φωτοευαίσθητου είναι 3 s, ενώ στην περίπτωση μας επιλέχθηκε το δισκίο να υπερεκτεθεί σε χρόνο τετραπλάσιο, καθώς όπως αποδείχθηκε και με τη λιθογραφία διπλής επιστρώσης SU-8, η υπερέκθεση συμβάλλει στην άμβλυση των περιμετρικών προεκβολών στις παραγόμενες μικροκολώνες, προερχόμενων από τη γενέτειρα μάσκα. Ακολουθεί θέρμανση στους 120°C για 1.5 min, επιπλέον έκθεση απουσία μάσκας για 4 min, και εμβάπτιση

στον εμφανιστή AZ726MIF για 1 min. Η λιθογραφία ολοκληρώνεται με την τελική θέρμανση προς σκλήρυνση της ρητίνης στους 120°C για 15 min.

Το δισκίδιο προερχόμενο από τη μάσκα μιας διαφάνειας στη συνέχεια εγχάραθηκε με τη διεργασία βαθιάς εγχάραξης με ενεργά ιόντα (Deep Reactive Ion Etching – DRIE) Bosch στον αντιδραστήρα πλάσματος MET (Micromachining Etch Tool) επαγωγικής σύζευξης (ICP), χρησιμοποιώντας ως εγχαρακτικό αέριο εξαφθοριούχο θείο (SF_6) και ως αέριο παθητικοποίησης οκταφθοροκυκλοβουτάνιο (C_4F_8), σε συνθήκες που έχουν αναφερθεί προηγουμένως [10]. Για το δισκίδιο προερχόμενο από τη μάσκα δύο διαφανειών, πριν τη διεργασία Bosch, μεσολάβησαν επιπλέον στάδια κατεργασίας, που απεικονίζονται στο Σχήμα 3.14b. Συγκεκριμένα, μετά τη λιθογραφία AZ, λόγω μέτρησης στο ελλειψόμετρο (J.A. Woollam Co) λεπτού υμενίου υπολειμμάτων AZ πάχους περίπου 20 nm (συναντάται κυρίως σε λιθογραφίες αρνητικού τόνου λόγω διπλών εκθέσεων), έγινε εγχάραξη του με πλάσμα οξυγόνου για την απομάκρυνσή του σε συνθήκες ισχύος 1900 W, τάσης πόλωσης -250 V, θερμοκρασία 0 °C, πίεση 0.75 Pa, ροή O_2 100 sccm και χρόνο 15 s στον αντιδραστήρα επαγωγικής σύζευξης (ICP). Ως αποτέλεσμα της εγχάραξης O_2 , μετρήθηκε μέσο πάχος οξειδίου SiO_2 48.3 ± 1.8 nm, η ύπαρξη του οποίου εμποδίζει τη διεργασία Bosch. Έτσι, το εκμαγείο υποβλήθηκε σε υγρή εγχάραξη του οξειδίου, εμβαπτιζόμενο σε ρυθμιστικό διάλυμα υδροφθορικού οξέως (buffered hydrofluoric acid – BHF) για 1 min (ρυθμός εγχάραξης οξειδίου 70 – 80 nm/min). Μετέπειτα μέτρηση εναπομείνοντος οξειδίου έδωσε πάχος μόλις 1.33 ± 0.04 nm, που μπορεί να αποδοθεί σε φυσικό στρώμα οξειδίου (native oxide).

Προχωρώντας στη διεργασία Bosch και για τα δύο δισκίδια, διεξήχθη σε συνθήκες ισχύος 1800 W, τάση πόλωσης -70 V, θερμοκρασία 15 °C, πίεση 40 mTorr, ροή αερίων 171 sccm SF_6 / 115 sccm C_4F_8 , και με βήματα χρονισμού 7s/3s, αντίστοιχα. Για το δισκίδιο της μάσκας μιας διαφάνειας, ο ρυθμός εγχάραξης ήταν περίπου 2,4 $\mu\text{m}/\text{min}$, και ο συνολικός χρόνος διεργασίας 10 min, ενώ για το δισκίδιο από τη μάσκα δύο διαφανειών, ο ρυθμός εγχάραξης 2 $\mu\text{m}/\text{min}$, και ο συνολικός χρόνος 13 min.

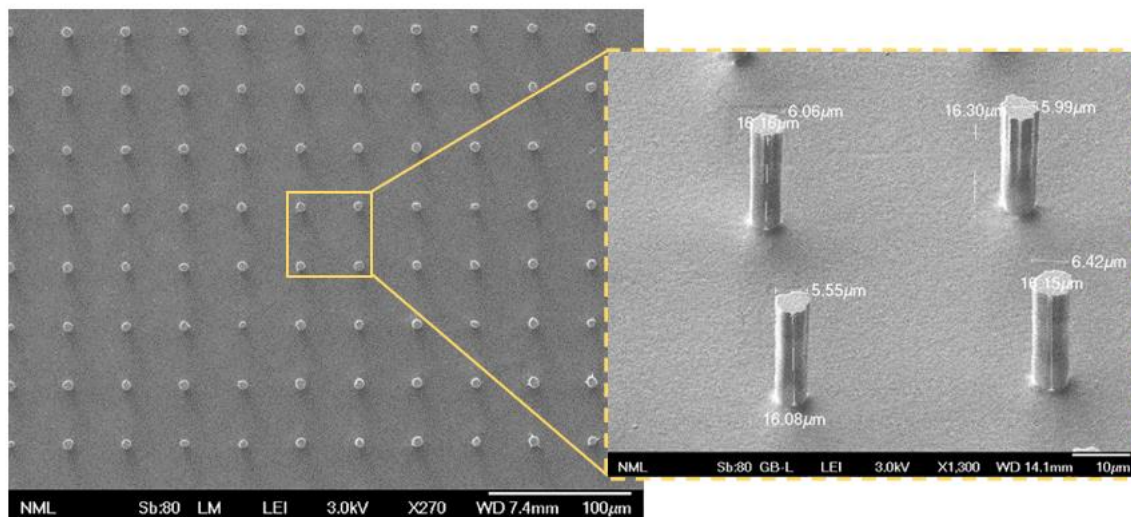
Τέλος, για να αφαιρεθεί η ρητίνη, το δισκίδιο τοποθετήθηκε σε διάλυμα ακετόνης και στη συνέχεια σε διάλυμα ισοπροπανόλης σε λουτρό υπερήχων για 10 min για τον κάθε διαλύτη, και ύστερα εμβαπτίστηκε σε διάλυμα piranha υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) : θειικού οξέος (H_2SO_4) με αναλογία 1:1, προς αφαίρεση των οργανικών υπολειμμάτων για χρόνο περίπου 15 min.



Σχήμα 3. 14. α) Σχηματική απόδοση των σταδίων κατασκευής εικαγείου Si πορώδους μεμβράνης με χρήση φωτολιθογραφικής μάσκας προερχόμενης από μία και δύο διαφάνειες. Η διαδικασία περιλαμβάνει κυρίως λιθογραφία αρνητικού τόνου (με φωτοευαίσθητο AZ) και τη διεργασία Bosch βαθιάς εγχάραξης με ενεργά ιόντα. β) Κατά τη χρήση της μάσκας από δύο διαφάνειες, προστέθηκαν επιπλέον κατασκευαστικά στάδια μετά τη λιθογραφία αρνητικού τόνου, που αφορούσαν σε απομάκρυνση των υπολειμμάτων ρητίνης AZ και μετέπειτα του σχηματιζόμενου οξειδίου, πριν την εκκίνηση της διεργασίας Bosch.

Στο Σχήμα 3.15 παρουσιάζονται εικόνες SEM του εικαγείου Si που προέκυψε μετά το τέλος των διεργασιών με χρήση της μάσκας μίας διαφάνειας. Η εκ των άνω προς τα κάτω (top-down) εικόνα των παραγόμενων μικροκολώνων Si βρίσκεται σε συμφωνία με εκείνη της μάσκας. Συγκεκριμένα, η μέση διάμετρος τους υπολογίζεται $6.1 \pm 0.1 \mu m$, ενώ είναι αμελητέα η απουσία μικροκολώνων. Σε παρατήρηση υπό 45° , είναι

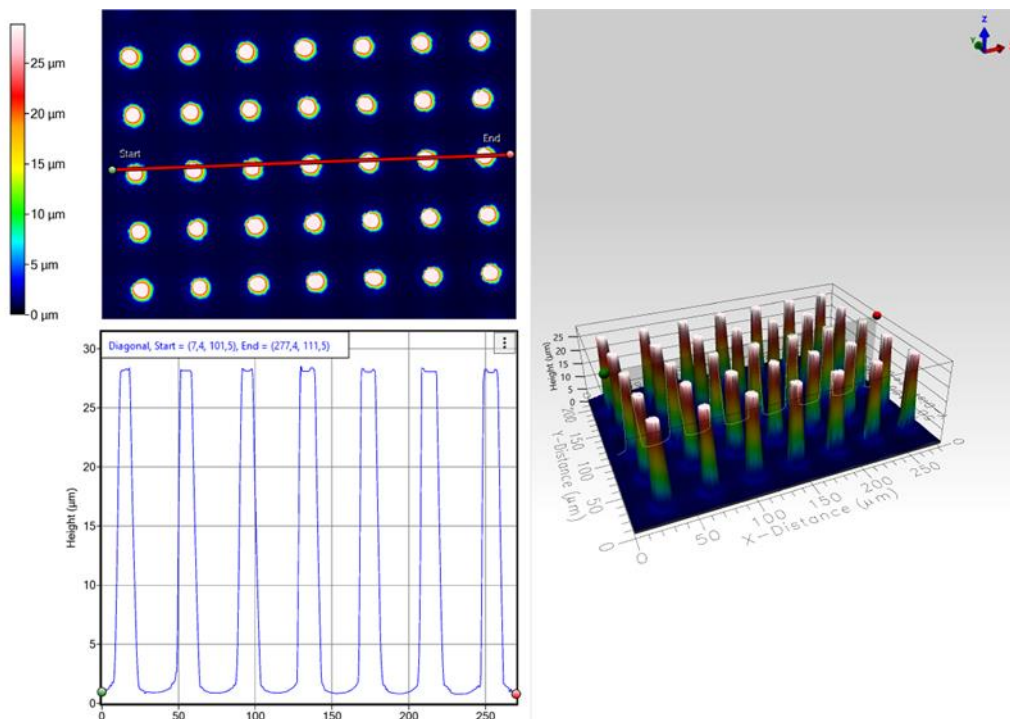
εμφανές ότι το προφίλ των μικροκολώνων είναι κάθετο, ενδεικτικό του ότι η εγχάραξη Bosch ήταν επιτυχώς ανισοτροπική, ενώ το μέσο ύψος των μικροκολώνων ύστερα από διόρθωση της γωνίας παρατήρησης ($d_{\text{actual}}=d_{\text{apparent}}/\sin 45^\circ$), προέκυψε $22.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$. Μάλιστα, το μέσο ύψος των μικροκολώνων Si συμβαδίζει με το ρυθμό εγχάραξης ($\approx 2,4 \mu\text{m}/\text{min}$) για το συνολικό χρόνο διεργασίας των 10 min.



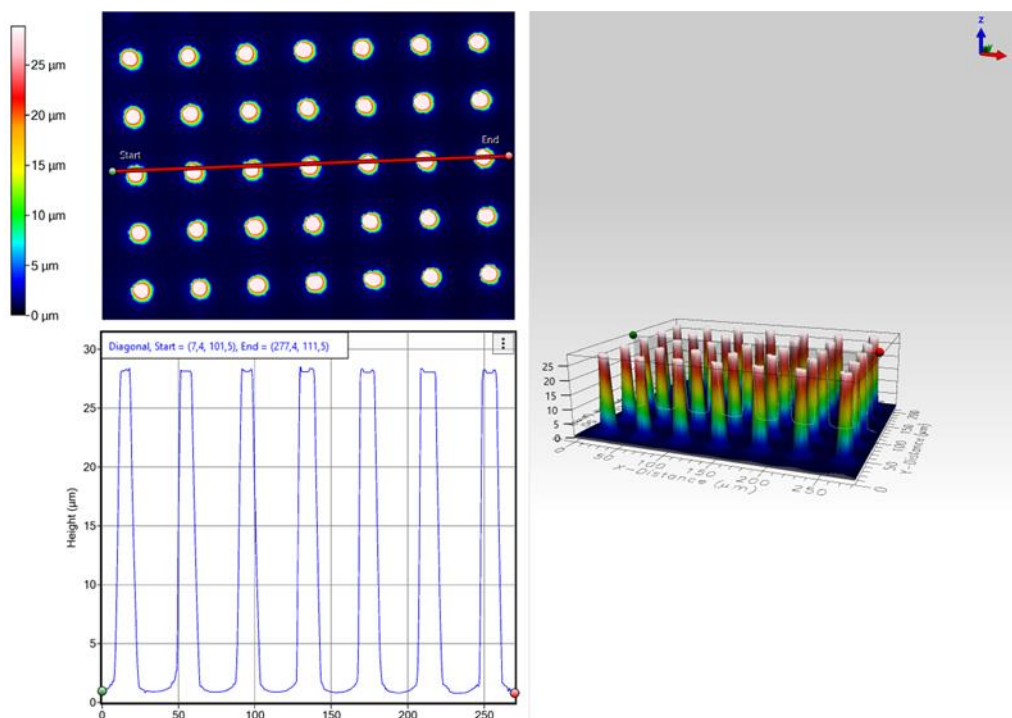
Σχήμα 3. 15. Εικόνες SEM του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης από τη μάσκα μίας διαφάνειας. Παρουσιάζεται κάτοψη του εκμαγείου με εμφανή την ομοιότητα του σχεδίου των μικροκολώνων με τις δομές της μάσκας, και με αμελητέα απουσία μικροκολώνων. Σε μεγέθυνση εικόνα υπό 45° , από όπου υπολογίζεται πραγματικό μέσο ύψος μικροκολώνων $22.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

Ως προς τα εκμαγεία Si από τη μάσκα δύο διαφανειών, στο Σχήμα 3.16 που ακολουθεί, παρουσιάζονται εικόνες από το οπτικό προφιλόμετρο Profilm3D®, όπου διακρίνεται η τοπογραφία και το προφίλ κατά μήκος μίας γραμμής του εκμαγείου σε δύο χαρακτηριστικές περιοχές του μετά το τέλος της διεργασίας Bosch. Προκύπτει ελαφρώς θετικό προφίλ μικροκολώνων, καθώς και μέσο ύψος τους περίπου $27 \mu\text{m}$, από τα οποία αν αφαιρεθεί το πάχος της ρητίνης AZ ($\approx 1.64 \mu\text{m}$) καταλήγει σε τελικό ύψος περίπου στα $25 \mu\text{m}$.

a.



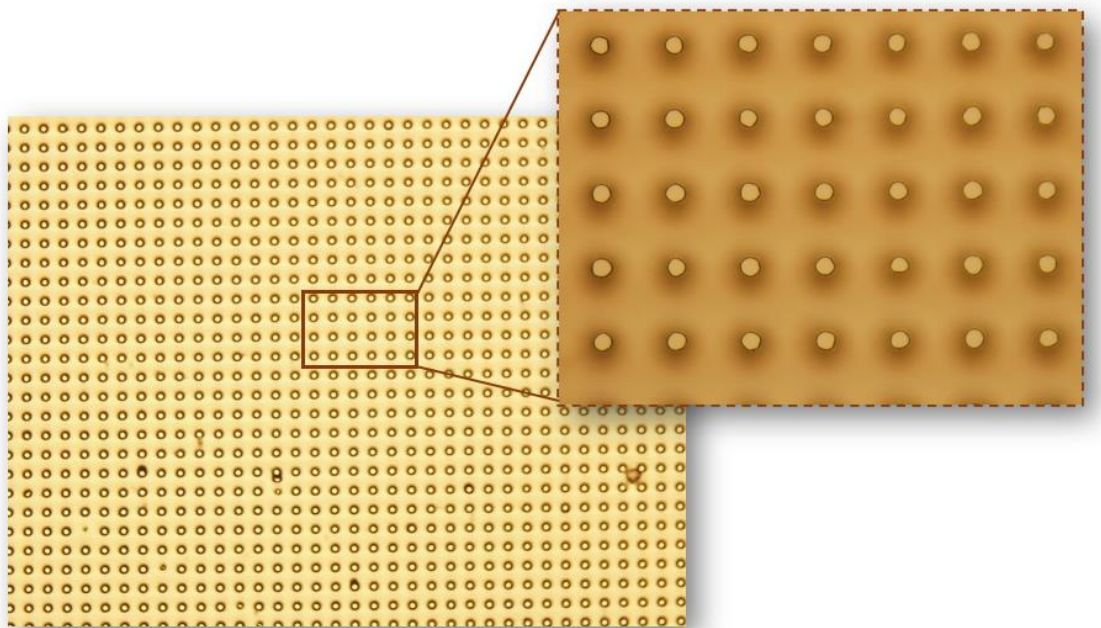
b.



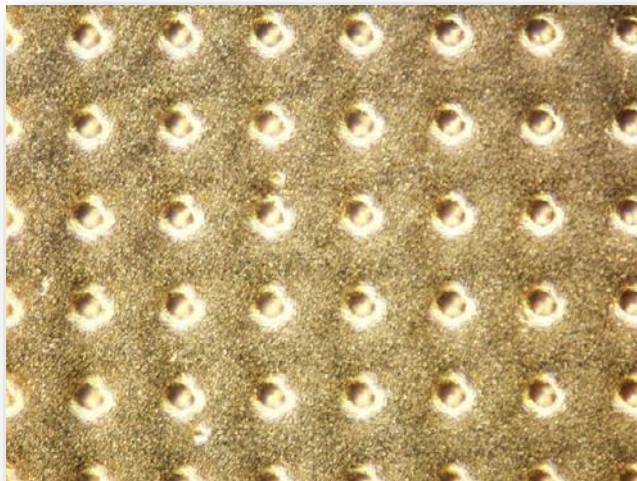
Σχήμα 3. 16. Εικόνες οπτικού προφιλόμετρου Profilm3D® του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης από τη μάζα δύο διαφανειών μετά το τέλος της διεργασίας Bosch, από δύο διαφορετικές περιοχές (a και b). Διακρίνεται θετικό προφίλ και μέσο ύψος μικροκολώνων 27 μm (συμπεριλαμβανομένης της ρητίνης AZ).

Ακολούθησε επιπλέον παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (Σχήμα 3.17) μετά το τέλος της διεργασίας (μετά την εμβάπτιση σε διάλυμα piranha). Από την εικόνα μεγέθυνσης 10x, αμελητέο ποσοστό μικροκολώνων φαίνεται να απουσιάζει από το εκμαγείο, ενώ η ύπαρξη ελαφριάς σκίασης περιμετρικά των μικροκολώνων, εμφανής και για μεγέθυνση 50x, μαρτυρά θετικό προφίλ μικροκολώνων (Σχήμα 3.17a). Εστίαση στη βάση του εκμαγείου (Σχήμα 3.17b) παραμένοντας σε μεγέθυνση 50x αναδεικνύει τη δημιουργία μικρο-τραχύτητας, αιτιολογούμενη από την ανάπτυξη στρώματος φυσικού οξειδίου SiO_2 πριν την έναρξη της διεργασίας Bosch. Η μέση διάμετρος των μικροκολώνων $9.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$, είναι σε συμφωνία με την αντίστοιχη των οπών της μάσκας ($9.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$). Τέλος, το ύψος των μικροκολώνων με μετατόπιση του επίπεδου εστίασης υπολογίστηκε $25 - 27 \mu\text{m}$, σε σύμπτωση με την αντίστοιχη μέτρηση στο οπτικό προφιλόμετρο. Συμπερασματικά, η μεγαλύτερη ακαμψία και σταθερότητα των μικροκολώνων των εκμαγείων Si, σε σχέση με τις αντίστοιχες μικροκολώνες SU-8, καθιστά προτιμητέα τη χρήση τους. Σε αυτό θα πρέπει να προστεθεί το γεγονός ότι η διαδικασία παρασκευής των εκμαγείων Si είναι λιγότερο χρονοβόρα και κοπιώδης συγκριτικά με εκείνη για τα εκμαγεία μικροκολώνων SU-8.

a.



b.



Σχήμα 3. 17. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης από τη μάσκα δύο διαφανειών μετά το τέλος της διαδικασίας κατασκευής του. α) Εικόνα 10x, και σε μεγέθυνση εικόνα 50x, που απεικονίζουν την ομαλότητα του περιγράμματος των μικροκολώνων, σε συμφωνία με τη μάσκα προέλευσης, και την ύπαρξη σκίασης, ένδειξη παρουσίας θετικού προφίλ. β) Εικόνα 50x εστιασμένη στη βάση του εκμαγείου που αποδεικνύει τη δημιουργία τραχύτητας.

3.4.2.4 Παρασκευή πορώδους μεμβράνης PDMS

3.4.2.4.1 Συνδυασμοί σχετικής χημικής αδρανοποίησης εκμαγείου και φορέα της μεμβράνης

Όπως αναλύθηκε στην αρχή της Παραγράφου 3.4, για την κατασκευή της πορώδους μεμβράνης είναι σημαντική η εύρεση κατάλληλου συνδυασμού σχετικής χημικής αδρανοποίησης του εκμαγείου και του φορέα PDMS. Σε αυτή την κατεύθυνση, πραγματοποιήθηκε σύντομη μελέτη των ιδιοτήτων διαβροχής των διαθέσιμων υδρόφοβων υμενίων, μετρώντας τις γωνίες επαφής τους σε υπόστρωμα δισκιδίου Si, ενώ επιπρόσθετα μετρήθηκε το προκύπτον πάχος τους σε ελλειψόμετρο (J.A. Woollam Co). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν υμένια από απόθεση με πλάσμα αερίου C_4F_8 σε συνθήκες 5.25 Pa, 900 W, 25 sccm, 0°C, 0 bias, 1 min στον αντιδραστήρα πλάσματος επαγωγικής σύζευξης (ICP), καθώς και αερίου CHF_3 για 50 mTorr, 50 sccm, 50 W, 6 min στον αντιδραστήρα δραστηκών ιόντων RIE, και τέλος, από δια περιστροφής επίστρωση εμπορικού Teflon σε 7 000 rpm, 1 500 rpm/s, $t = 30$ s. Οι μετρήσεις των γωνιών επαφής έγιναν σε σχέση με δισκίδιο αναφοράς Si ύστερα από υγρή εγχάραξη piranha, το οποίο έδωσε γωνία επαφής 35° – 39°. Ο παρακάτω Πίνακας 3.2 συνοψίζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων που προέκυψαν. Όπως είναι εμφανές, το υμένιο από εμπορικό Teflon παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό υδροφοβικότητας, με τα υμένια από πλάσμα C_4F_8 , και εν συνεχεία από πλάσμα CHF_3 να ακολουθούν.

Πίνακας 3. 2. Μετρήσεις στατικής γωνίας επαφής ($^{\circ}$) και πάχους (nm) τριών ειδών υδρόφοβων υμενίων σε υπόστρωμα Si, και συγκεκριμένα, φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου οκταφθοροκυκλοβουτάνιο (C_4F_8) και από πλάσμα αερίου τριφθορομεθανίου (CHF_3), καθώς και εμπορικό Teflon.

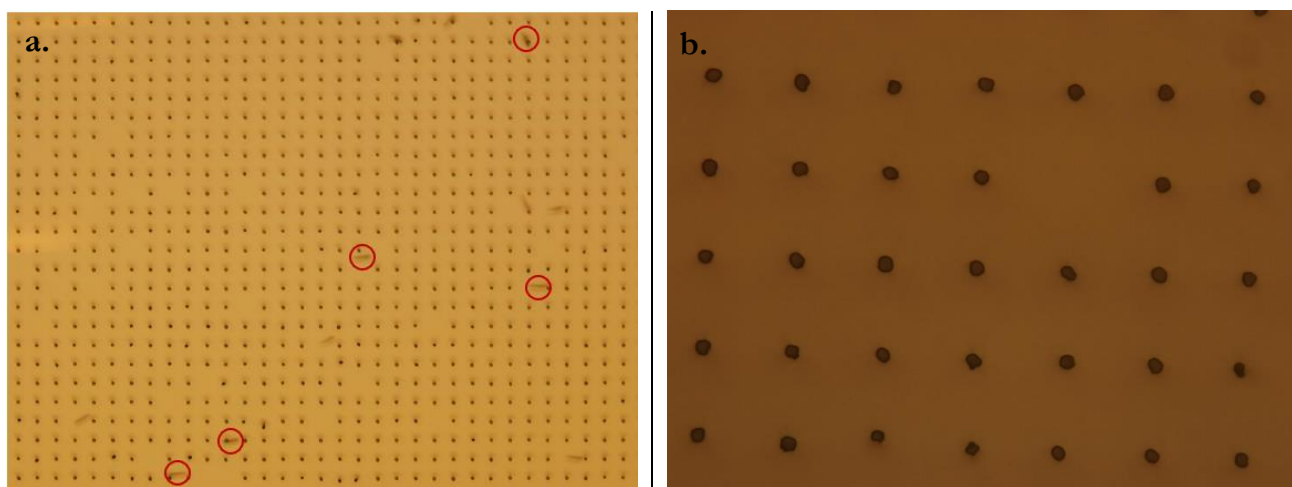
Υδρόφοβο υμένιο	Στατική γωνία επαφής ($^{\circ}$)	Πάχος (nm)
Απόθεση από πλάσμα C_4F_8	105.6 ± 1.2	33.5
Απόθεση από πλάσμα CHF_3	97.6 ± 1.3	40.7 ± 0.4
Εμπορικό Teflon	121 ± 2	116.2 ± 6

Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας στην κατασκευή της, είναι η ενισχυμένη μηχανική αντοχή της. Λαμβάνοντας επομένως υπόψη τα παραπάνω, παρουσιάζονται οι συνδυασμοί που δοκιμάστηκαν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ως προς την επιτυχή κατασκευή μεμβράνης, οι οποίοι διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες: i) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου – Απουσία αδρανοποίησης στο φορέα PDMS, ii) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου με C_4F_8 – Χημική αδρανοποίηση του φορέα με Teflon, iii) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου με C_4F_8 – Χημική αδρανοποίηση του φορέα με CHF_3 , και τέλος, iv) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου με C_4F_8 – Χημική αδρανοποίηση του φορέα με CHF_3 και επιπλέον ενίσχυση μηχανικής αντοχής της μεμβράνης.

Να σημειωθεί ότι, ως προς τα χρησιμοποιούμενα εκμαγεία, το εκμαγείο μικροκολώνων SU-8 προερχόταν από μονής επίστρωσης λιθογραφία SU-8, και τα εκμαγεία Si προέκυψαν από τη μάσκα δύο διαφανειών. Επιπρόσθετα, το υδρόφοβο υμένιο εμπορικού Teflon, παράχθηκε με διάλυση (1% w/w) συμπολυμερούς πολυ[4,5-διφθορο-2,2-δις(τριφθορομεθυλο)-1,3-διοξολο-συν-τετραφθοροαιθυλενίου (poly[4,5-difluoro-2,2-bis(trifluoromethyl)-1,3-dioxole-co-tetrafluoroethylene) PTFE AF 1600 (65 mol %) σε υπερφθοριωμένο διαλύτη Fluorinert™ FC-770. Η επίστρωσή του έγινε σε στροφές 7 000 rpm, επιτάχυνση 1 500 rpm/s και χρόνο $t = 30$ s, και μετά θερμάνθηκε στους $95^{\circ}C$ για 15 min. Τέλος, όπου χρειάστηκε ενεργοποίηση με πλάσμα O_2 προγενέστερα της αδρανοποίησης, πραγματοποιήθηκε είτε στον αντιδραστήρα ICP σε συνθήκες 1 900 W, 1.33 Pa, 0 bias, για 30 s, είτε στον αντιδραστήρα RIE σε συνθήκες 100 mTorr, 100 W, 100 sccm και 1 min.

i) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου – Απουσία αδρανοποίησης στο φορέα PDMS

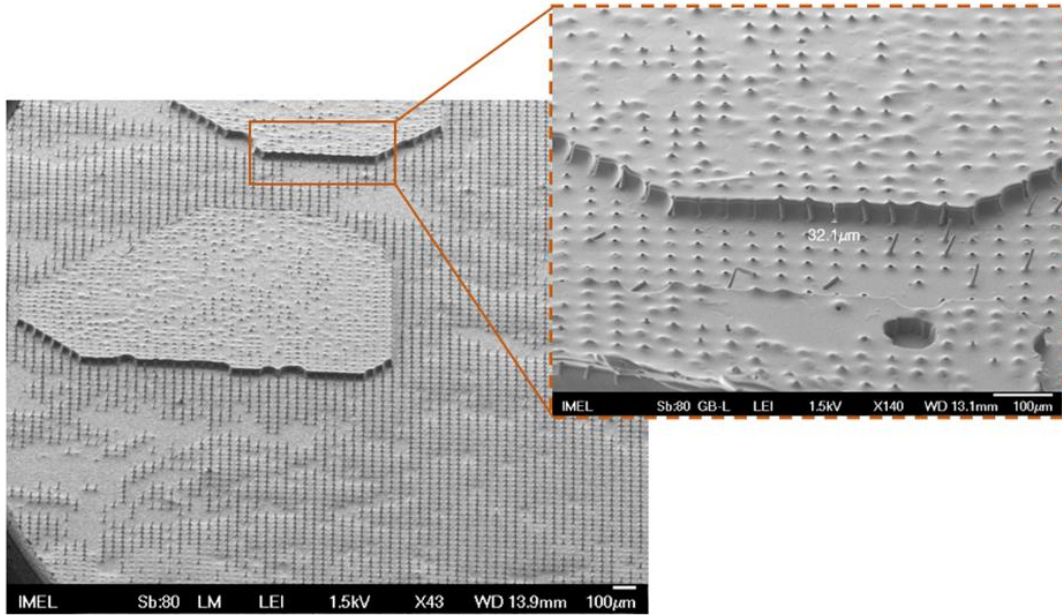
Χρησιμοποιήθηκε εκμαγείο μικροκολώνων SU-8 με μέση διάμετρο 6.1 ± 0.1 μm , όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.18, στο οποίο εντοπίζονται αρκετές αποιολλημένες μικροκολώνες, μέσου ύψους 33.1 ± 0.2 μm , φαινόμενο ήδη γνωστό από την Παράγραφο 3.4.2.2. Στο εκμαγείο εναποτέθηκε υδρόφοβο υμένιο C_4F_8 , ενώ νωρίτερα είχε προηγηθεί ενεργοποίηση των μικροκολώνων με πλάσμα οξυγόνου (O_2) σε συνθήκες 1 900 W, 1.33 Pa, 0 bias, για 30 s. Στο φορέα της μεμβράνης PDMS δεν πραγματοποιήθηκε χημική αδρανοποίηση.



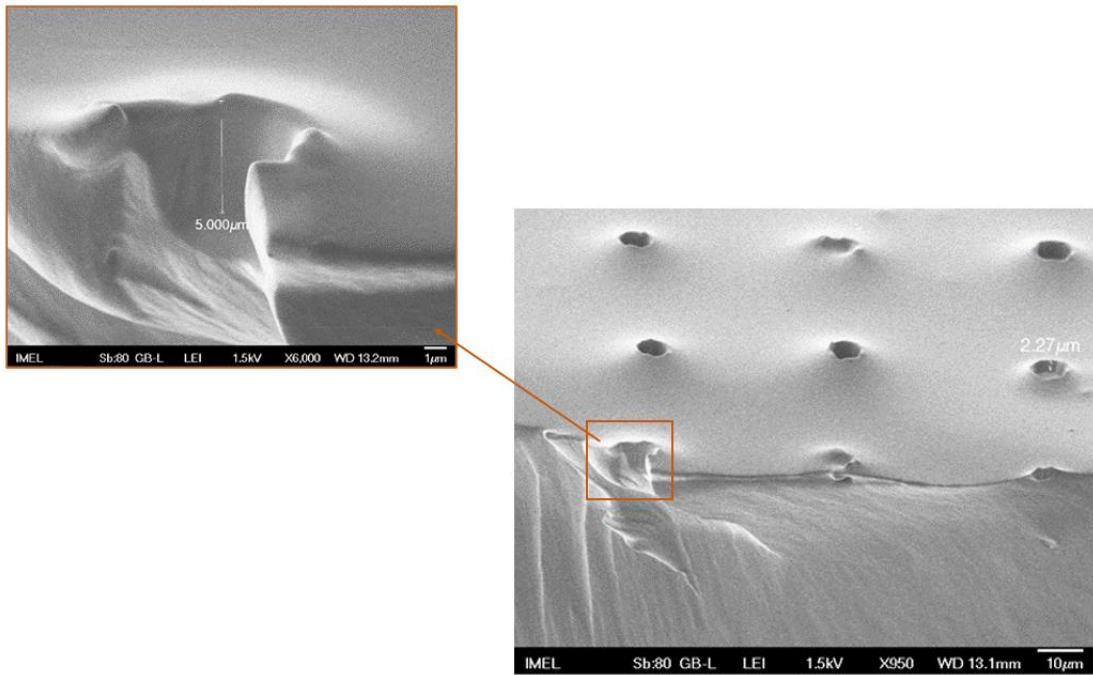
Σχήμα 3. 18. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης a) 10x και b) 50x εκμαγείου μικροκολώνων SU-8 (μονής επίστρωσης) πριν τη χρήση του για την κατασκευή πορώδους μεμβράνης. Είναι εμφανής η αποκόλληση μικροκολώνων και στις δύο εικόνες, ορισμένες από τις οποίες σημειώνονται ενδεικτικά με κόκκινα κυκλάκια στην εικόνα (α).

Ολοκλήρωση της διαδικασίας κατασκευής της μεμβράνης, είχε ως αποτέλεσμα κατά την απομάκρυνση του φορέα της μεμβράνης από το εκμαγείο, εκτεταμένες περιοχές της να παραμείνουν στο εκμαγείο. Προς περισσότερο ενδελεχή παρατήρηση, ο φορέας μαζί με την εναπομείνασα μεμβράνη παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο SEM (Σχήμα 3.19). Όπως είναι εμφανές από τις εικόνες μεγέθυνσης 43x και 140x (Σχήμα 3.19a), η μεγαλύτερη επιφάνεια της μεμβράνης έχει αποσπαστεί αφήνοντας μια λεπτότερη στρώση αυτής πάνω στο φορέα. Η στρώση αυτή έχει κυμαινόμενο πραγματικό πάχος $d_{\text{actual}} = 2 - 4.3 \mu\text{m}$, για τα φαινόμενα πάχη $d_{\text{apparent}} = 2.3 - 5 \mu\text{m}$ παρατήρησης υπό κλίση 60° ($\eta\mu 60^\circ = \frac{d_{\text{actual}}}{d_{\text{apparent}}}$), όπως φαίνεται από τα αποτυπώματα που έχουν αφήσει οι μικροκολώνες (Σχήμα 3.19b), με τις υπόλοιπες στρώσεις της μεμβράνης να έχουν παραμείνει στο εκμαγείο. Επίσης, διακρίνεται ότι η συντριπτική πλειονότητα των μικροκολώνων έχει αποκολληθεί από το εκμαγείο και βρίσκεται στη μεμβράνη. Μάλιστα, από το Σχήμα 3.19a (μεγέθυνση 140x) διακρίνεται ότι στις περιοχές όπου η μεμβράνη είναι άθικτη, το πάχος της είναι στα $d_{\text{apparent}} = 32.1 \mu\text{m}$, που αντιστοιχεί σε πραγματικό πάχος $d_{\text{actual}} = 27.8 \mu\text{m}$, πολύ κοντινό στο ύψος των μικροκολώνων ($33.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$), αν ληφθεί υπόψη και το ότι οι μικροκολώνες παρουσιάζονται να έχουν μια κλίση που μειώνει το φαινόμενο ύψος τους. Αυτό σημαίνει ότι, πέραν του ότι τελικά το πάχος της μεμβράνης δεν είναι $10 \mu\text{m}$, ολόκληρες οι μικροκολώνες έχουν εισχωρήσει στη μεμβράνη και έχουν αποκολληθεί από τη βάση τους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ελλιπή πρόσφυση των SU-8 μικροκολώνων στο εκμαγείο Si, που οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στις διαφορετικές ιδιότητες των δύο αυτών υλικών. Η αποτυχία επιτυχούς παρασκευής πορώδους μεμβράνης PDMS, επικυρώνει την επιλογή εκμαγείου Si για τη μεμβράνη.

a.



b.

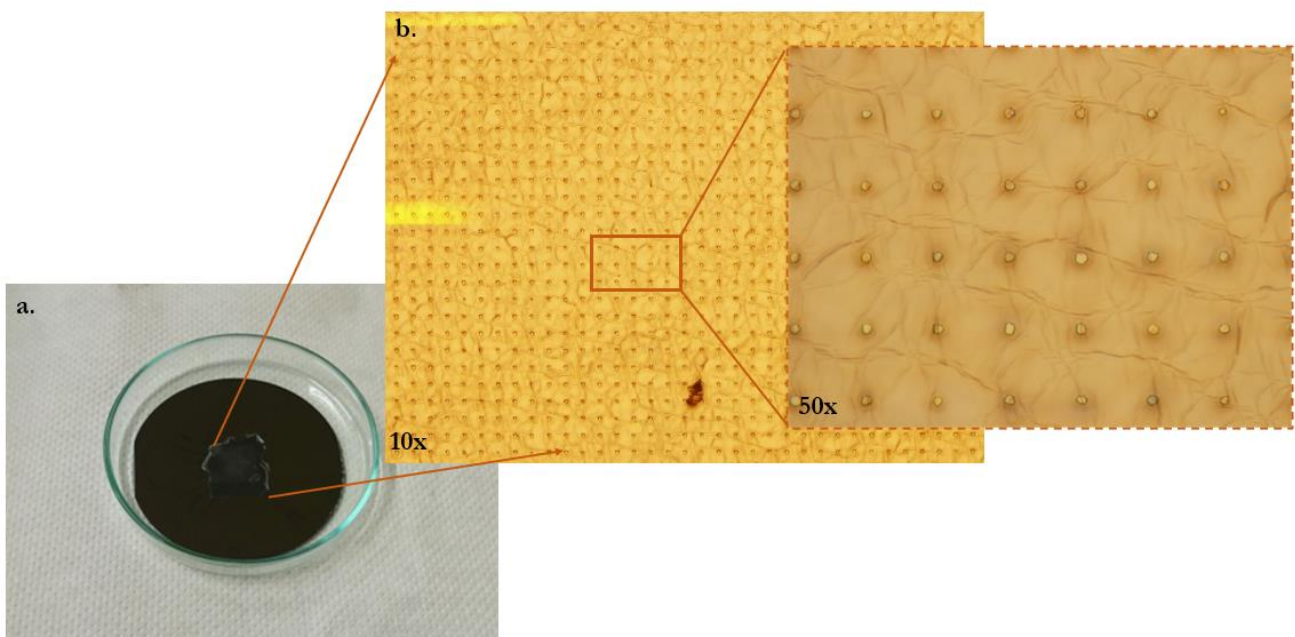


Σχήμα 3. 19. Εικόνες SEM υπό κλίση 60° του φορέα μαζί με τη μεμβράνη PDMS μετά την απομάκρυνσή τους από το εκμαγείο μικροκολώνων SU-8. a) Η μεγαλύτερη επιφάνεια της μεμβράνης έχει αποκοπεί από το φορέα, με μία παραμένουσα λεπτή στρώση της σε αυτόν, ενώ πολλές μικροκολώνες έχουν αποκολληθεί από το εκμαγείο. Σε μεγέθυνση περιοχή της μεμβράνης που έχει παραμείνει άθικτη στο φορέα, από όπου επιβεβαιώνεται η μερική απόσπαση της μεμβράνης και η αποκόλληση των μικροκολώνων. b) Από τα αποτυπώματα των μικροκολώνων υπολογίζεται ότι το πραγματικό πάχος της μεμβράνης που παρέμεινε στο φορέα δεν ξεπερνάει τα 2 – 4.3 μm.

ii) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου με C_4F_8 – Χημική αδρανοποίηση του φορέα με Teflon

Χρησιμοποιήθηκε εκμαγείο Si, το οποίο αδρανοποιήθηκε με απόθεση υμενίου από πλάσμα C_4F_8 . Ως προς το φορέα της μεμβράνης, ενεργοποιήθηκε με πλάσμα O_2 (αντιδραστήρας RIE) πριν την επιστροφή εμπορικού Teflon προς βελτίωση της πρόσφυσης του υδρόφοβου υμενίου. Επιπλέον, κατά τη διαδικασία παρασκευής της μεμβράνης, μετά το στάδιο c (βλ. Σχήμα 3.8), όπου δηλαδή έχει αναστραφεί ο φορέας πάνω στο εκμαγείο και στη στοιβία έχει τοποθετηθεί κατάλληλο βάρος, η μεμβράνη παρέμεινε να σκληρυνθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h.

Στο τέλος της διεργασίας, κατά την απομάκρυνση του φορέα, η μεμβράνη είχε παραμείνει ολόκληρη και άθικτη πάνω στο εκμαγείο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η μεμβράνη δεν ήταν επαρκώς σκληρή, γεγονός που οφείλεται στην απουσία θέρμανσής της. Στο Σχήμα 3.20, διακρίνεται η μακροσκοπική εικόνα της μεμβράνης πάνω στο εκμαγείο, καθώς και εικόνες μικροσκοπίου του εκμαγείου με τη μεμβράνη πάνω σε αυτό (μεγεθύνσεις 10x και 50x).



Σχήμα 3. 20. a) Φωτογραφία εξ'ολοκλήρου παραμονής της μεμβράνης στο εκμαγείο Si, που είχε προγενέστερα υδροφοβοποιηθεί με την έκθεσή του σε πλάσμα αερίου φθοράνθρακα C_4F_8 , με το φορέα της μεμβράνης να έχει επιστραφεί με εμπορικό Teflon. b) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 10x, και σε μεγέθυνση εικόνα 50x, της μεμβράνης πάνω στο εκμαγείο.

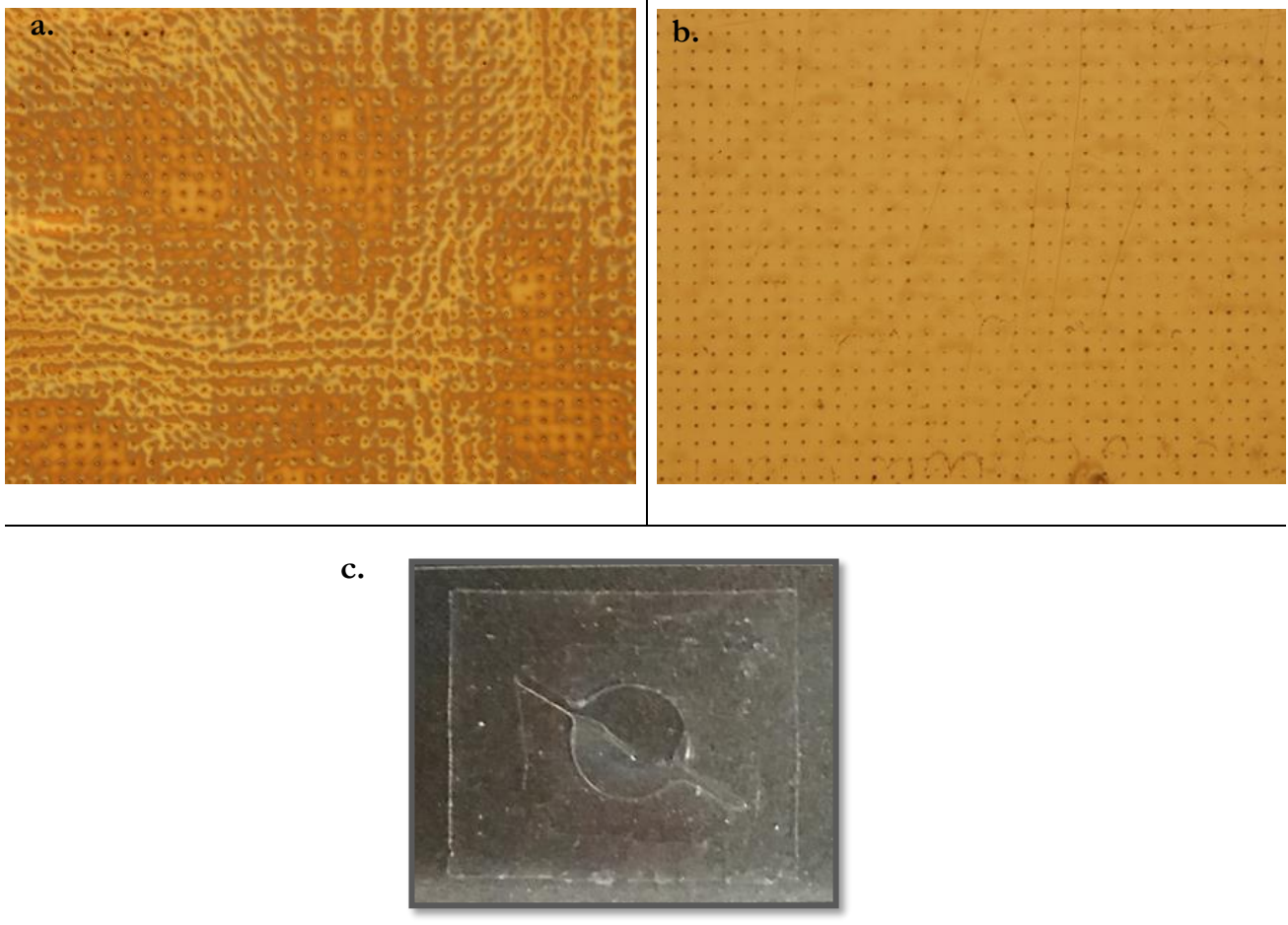
Σύμφωνα και με τον Πίνακα 3.2, λόγω του ότι το υμένιο από εμπορικό Teflon είναι το περισσότερο υδροφοβό σε σχέση με τα υπόλοιπα, αιτιολογείται η προτίμηση της μεμβράνης να αποκολληθεί από το φορέα που έφερε την επίστρωση Teflon, σε σχέση με το εκμαγείο που είχε εναποτεθεί με το υμένιο φθοράνθρακα C_4F_8 . Συμπεραίνεται επομένως, ότι για να υπάρξει προτίμηση αποκόλλησης από το εκμαγείο σε σχέση με το φορέα, θα πρέπει ο τελευταίος να υδροφοβοποιηθεί σε μικρότερο βαθμό.

iii) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου με C_4F_8 – Χημική αδρανοποίηση του φορέα με CHF_3

Στο εκμαγείο Si διατηρήθηκε η υδροφοβοποίησή του με υμένιο από πλάσμα C_4F_8 , ενώ στο φορέα πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση O_2 (αντιδραστήρας RIE), ακολουθούμενη από απόθεση υμενίου από πλάσμα CHF_3 , στοχεύοντας σε μικρότερη υδροφοβοποίηση του φορέα σε σχέση με το εκμαγείο σε συμφωνία και με το πρωτόκολλο κατασκευής της μεμβράνης (βλ. Παράγραφο 3.4). Επιπλέον, για να βελτιωθεί η μηχανική αντοχή της μεμβράνης, παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h, και στη συνέχεια θερμάνθηκε στους $70^\circ C$ για 4 h.

Σε αυτή την περίπτωση, η μεμβράνη απομακρύνθηκε επιτυχώς από το εκμαγείο παραμένοντας στο φορέα (στάδιο c). Στο Σχήμα 3.21 διακρίνεται το εκμαγείο (Σχήμα 3.21a) και ο φορέας μαζί με τη μεμβράνη μετά την απομάκρυνσή της από το εκμαγείο (Σχήμα 3.21b). Να σημειωθεί εδώ, ότι οι χρωματικές διαφοροποιήσεις στο εκμαγείο οφείλονται σε διαφορετικά πάχη της επίστρωσης του υμενίου Teflon. Επειδή όμως, όπως θα αποδειχθεί παρακάτω, η επίστρωσή του δεν είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση της μεμβράνης, δεν αναφέρεται ως στάδιο της αδρανοποίησης του εκμαγείου.

Προχωρώντας στη συνέχεια στο στάδιο της συγκόλλησής της με το μικροθαλάμο καλλιέργειας, η μεμβράνη συγκολλήθηκε με την περιοχή περιμετρικά του μικροθαλάμου, ενώ το υπόλοιπο τμήμα της που θα έπρεπε να καλύπτει την κενή περιοχή του μικροθαλάμου, παρέμεινε κατά το μεγαλύτερο ποσοστό ($\approx 60\%$) στο φορέα (Σχήμα 3.21c), λόγω του ότι δεν ερχόταν σε επαφή με κάποια επιφάνεια. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την έλλειψη μηχανικής αντοχής της μεμβράνης, καθώς ενώ ο φορέας είναι επαρκώς υδροφοβοποιημένος για να τον εγκαταλείψει, δεν είναι επαρκώς μηχανικά σταθερή ώστε να μπορέσει να συμπαρασύρει το τμήμα της εκείνο που δεν έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του μικροθαλάμου καλλιέργειας. Συμπερασματικά, η υδροφοβοποίηση του εκμαγείου και του φορέα, και μάλιστα ο σχετικός βαθμός υδροφοβικότητάς τους ήταν ικανοποιητικοί. Απαιτείται όμως, να ενισχυθεί η μηχανική αντοχή της μεμβράνης.



Σχήμα 3. 21. a) Εκμαγείο Si, που έχει εναποτεθεί με υμένιο φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C_4F_8 , μετά την πλήρη απομάκρυνση της μεμβράνης από αυτό. b) Ο φορέας επικαλυμένος με υμένιο από πλάσμα CHF_3 , με τη μεμβράνη να έχει παραμείνει άθικτη σε αυτόν. c) Τμηματική συγκόλληση της μεμβράνης με το μικροθάλαμο καλλιέργειας, με σημαντικό ποσοστό αυτής ($\approx 60\%$) να μην απομακρύνεται από το φορέα, λόγω ανεπαρκούς μηχανικής της αντοχής.

iv) Χημική αδρανοποίηση του εκμαγείου με C_4F_8 – Χημική αδρανοποίηση του φορέα με CHF_3 και επιπλέον ενίσχυση μηχανικής αντοχής της μεμβράνης

Οι συνθήκες υδροφοβοποίησης του φορέα διατηρήθηκαν ως είχαν, δηλαδή απόθεση από αέριο C_4F_8 στο εκμαγείο, και από αέριο CHF_3 στο φορέα.

Στα πλαίσια ενίσχυσης της μηχανικής αντοχής της μεμβράνης, δοκιμάστηκε να διπλασιαστεί το πάχος της περίπου στα 20 μm , επιστρώνοντάς τη στο φορέα σε στροφές 3 500 rpm, επιτάχυνση 1 500 rpm/s και για χρόνο 30 s. Επιπλέον, αυξήθηκε το ποσοστό του διασταυρωτή στο προπολυμερές PDMS της μεμβράνης δίνοντας αναλογία 3:1 (βάσης:διασταυρωτή), ενώ μειώθηκε ο αρχικός χρόνος παραμονής της σε θερμοκρασία δωματίου στα 30 – 40 min, αυξάνοντας παράλληλα τη θερμοκρασία και το χρόνο της μετέπειτα θέρμανσής της στους 100°C για περίπου 2.5 h, σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η ακαμψία και το μέτρο ελαστικότητας του Young [11,12]. Τέλος, η δοκιμή συγκόλλησης της μεμβράνης με το μικροθάλαμο καλλιέργειας,

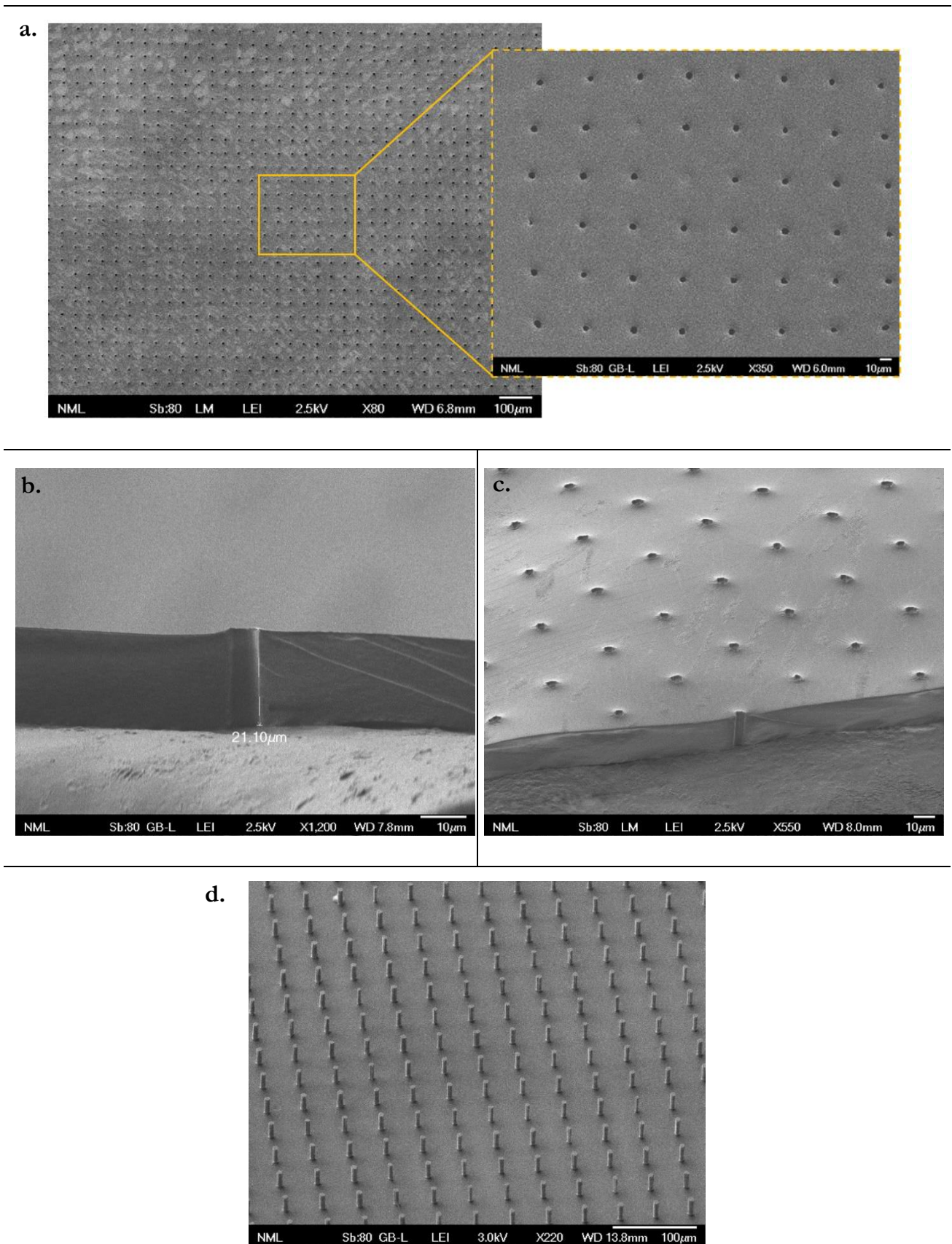
πραγματοποιήθηκε περίπου 24 h μετά την κατασκευή της, επιτρέποντας τη βέβαιη σκλήρυνση και των δύο επιπέδων.

Προέκυψε επαρκώς μηχανικά σταθερή μεμβράνη, η οποία αποκολλήθηκε πλήρως από το εκμαγείο, παρέμεινε άθικτη στο φορέα, ολοκληρώνοντας το στάδιο d του πρωτοκόλλου κατασκευής της, και μετέπειτα συγκολλήθηκε ολόκληρη με το μικροθάλαμο καλλιέργειας.

Πραγματοποιήθηκε παρατήρηση σε μικροσκόπιο SEM της μεμβράνης μετά τη συγκόλλησή της με το μικροθάλαμο, ώστε να ελεγχθεί πρωτίστως η διάνοιξη οπών καθ' όλο το πάχος της μεμβράνης (Σχήμα 3.22). Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η πίσω πλευρά της μεμβράνης που βρισκόταν σε επαφή με το φορέα. Παρατήρηση εκ των άνω προς τα κάτω (top-down) (Σχήμα 3.22a, μεγεθύνσεις 80x και 350x), επιβεβαίωσε τη διάνοιξη οπών και τη δημιουργία πορώδους μεμβράνης, με ένα ποσοστό περίπου 95% αυτών να είναι πλήρως διανοιγμένες. Να σημειωθεί εδώ ότι κάποιοι πόροι δεν είναι διάτρητοι λόγω απουσίας μικροκολώνων στο ίδιο το εκμαγείο, με σημαντικό μερίδιο αυτών, αξίζει να υπενθυμιστεί, να προέρχεται από την έλλειψη αντίστοιχων οπών στη γενέτειρα λιθογραφική μάσκα (Παράγραφος 3.4.2.1, Πίνακας 3.1 από μεταφορά μίας διαφάνειας). Για μια πιο άμεση οπτικοποίηση της διάνοιξης των πόρων, στην εικόνα υπό κλίση 90° (Σχήμα 3.22b) διακρίνεται το προφίλ της μεμβράνης, όπου είναι εμφανές πως οι μικροκολώνες έχουν διαπεράσει όλο το πάχος της μεμβράνης, το οποίο μάλιστα μετράται στα 21.1 μm, πολύ κοντά στο αρχικά επιθυμητό των 20 μm. Παράλληλα, η καθετότητα των τοιχωμάτων των οπών, επιβεβαιώνει την καθετότητα των μικροκολώνων του εκμαγείου.

Η μέση διάμετρος των πόρων υπολογίστηκε 6.1 ± 0.2 μm, σε συμφωνία με τη μέση διάμετρο των μικροκολώνων του εκμαγείου (6.1 ± 0.1 μm). Η παρουσία ετεροχρωμιών στο Σχήμα 3.22a (μεγέθυνση 80x), διακρινόμενες ευκρινέστερα στην εικόνα κλίσης 60° του Σχήματος 3.22c, οφείλεται σε υπολείμματα του υδρόφοβου υμενίου CHF₃ στο φορέα, τα οποία παρέμειναν και στη μεμβράνη, καθώς παρατηρείται η πλευρά της σε επαφή με το φορέα. Τα υπολείμματα αυτά, όπως θα αποδειχθεί σε επόμενες παραγράφους (βλ. Παράγραφο 3.7), μετά από κατεργασία σε πλάσμα οξυγόνου, δεν παρεμποδίζουν τη συγκόλληση της μεμβράνης με το δεύτερο μικροθάλαμο, το μικροθάλαμο τροφοδοσίας.

Τέλος, στα πλαίσια αύξησης της παραγωγικότητας της μεθόδου κατασκευής της μεμβράνης, είναι σημαντική η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του εκμαγείου Si. Για το λόγο αυτό, παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο SEM το ίδιο το εκμαγείο μετά το τέλος της διεργασίας δημιουργίας της μεμβράνης, το οποίο έχει στο σύνολό του χρησιμοποιηθεί 8 φορές μαζί με την τελευταία επιτυχή προσπάθεια. Όπως διακρίνεται από την εικόνα υπό κλίση 45° του Σχήματος 3.22d, το εκμαγείο έχει παραμείνει άθικτο, διατηρώντας την ακαμψία των μικροκολώνων του, χωρίς κάποια να έχει αποκολληθεί. Συνεπώς, η κατασκευή ενός εκμαγείου Si δίνει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης για τουλάχιστον 8 φορές.



Σχήμα 3. 22. (a - c) Εικόνες SEM της πορώδους μεμβράνης PDMS που προέκυψε από εκμαγείο Si από την πλευρά σε επαφή με το φορέα της. α) Η πλειονότητα των πόρων έχουν διανοιχθεί κατά ένα ποσοστό 95%, όπως φαίνεται από

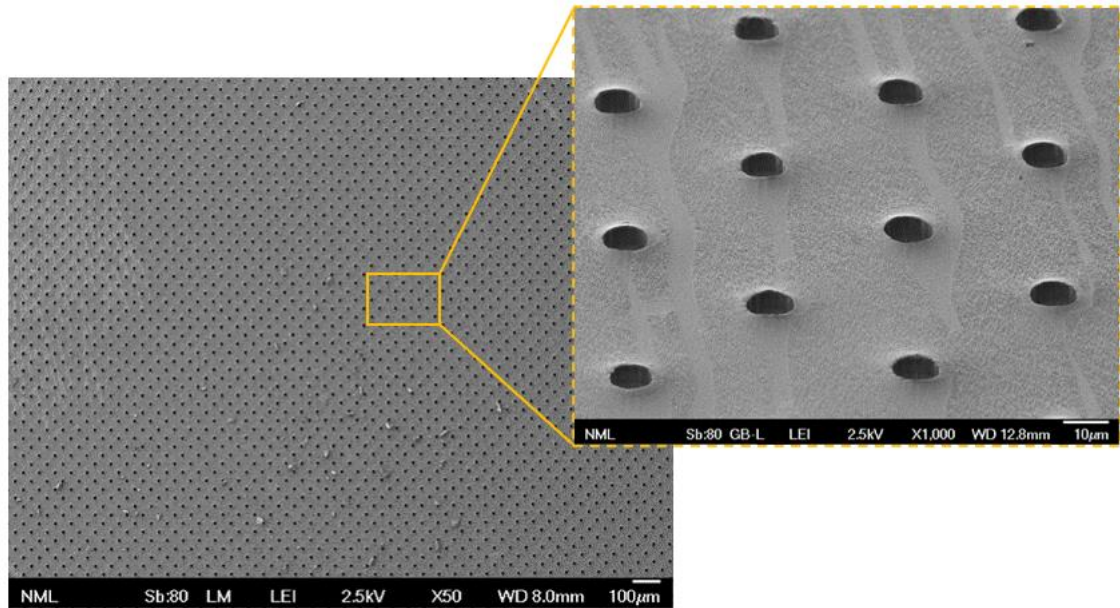
την εικόνα 80x και 350x σε μεγέθυνση. b) Εικόνα προφίλ (υπό 90°) της μεμβράνης, που επιβεβαιώνει τη διάνοιξη των οπών σε όλο το πάχος της μεμβράνης των περίπου 21 μm . c) Οι εικονιζόμενες ετεροχρωμίες είναι υπολείμματα του υμενίου CHF_3 , τα οποία από το φορέα της μεμβράνης μεταφέρθηκαν και σε αυτή. d) Εικόνα SEM υπό 45° του εκμαγείου Si μετά από 8 χρήσεις του, όπου παρουσιάζεται άθικτο, αποδεικνύοντας την ικανότητα επαναχρησιμοποίησής του.

3.4.2.4.2 Επαναληψιμότητα κατασκευής πορώδους μεμβράνης

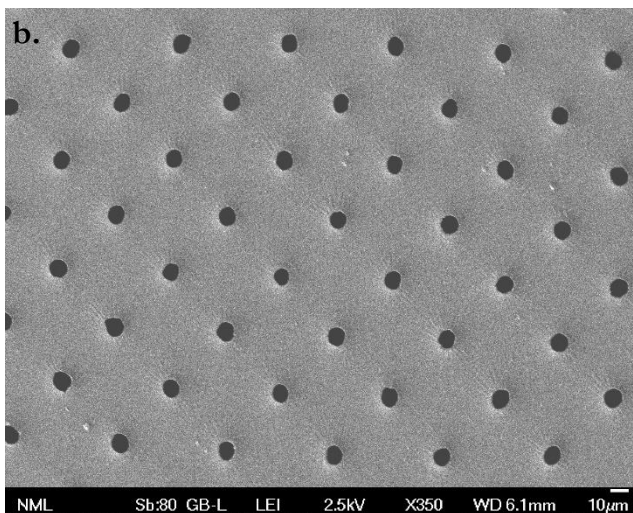
Έχοντας καταλήξει στον κατάλληλο συνδυασμό σχετικής υδροφοβοποίησης του εκμαγείου Si και του φορέα PDMS, καθώς και στις συνθήκες ενίσχυσης της μηχανικής αντοχής της μεμβράνης, δοκιμάστηκε εκ νέου εφαρμογή τους με το εκμαγείο από τη μάζα δύο διαφανειών επιφάνειας $10 \times 10 \text{ mm}^2$.

Η κατασκευή πορώδους μεμβράνης ήταν και πάλι επιτυχής, όπως επιβεβαιώθηκε και από εξέταση σε μικροσκόπιο SEM (Σχήμα 3.23) μετά τη συγκόλλησή της με το μικροθάλαμο καλλιέργειας και από την πλευρά σε επαφή με το φορέα. Συγκεκριμένα, εκ των άνω προς τα κάτω (top-down) παρατήρηση (Σχήμα 3.23a, μεγέθυνση 50x) απέδειξε διάνοιξη των οπών σε ποσοστό σχεδόν 100%, γεγονός που επιβεβαιώνεται και με παρατήρηση υπό κλίση 60° (Σχήμα 3.23a, μεγέθυνση 1 000x), όπου διακρίνεται η ύπαρξη βάρους στο εσωτερικό των οπών. Η μέση διάμετρος των οπών, υπολογιζόμενη από εικόνες μεγέθυνσης 350x (Σχήμα 3.23b) σε διάφορες περιοχές προέκυψε $10.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$, μεγαλύτερη από την αντίστοιχη διάμετρο μικροκολώνων του εκμαγείου $9.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$, μετρημένη σε οπτικό μικροσκόπιο. Η διαφοροποίηση αυτή των $\approx 0.5 \mu\text{m}$ αποτελεί ακόμη μία επιβεβαίωση της δημιουργίας θετικού προφίλ μικροκολώνων. Συγκεκριμένα, στο εκμαγείο μετρήθηκε η διάμετρος των μικροκολώνων στην κορυφή τους, οπότε και ήταν μικρότερη, ενώ η μεμβράνη λόγω μικρότερου πάχους της ($\approx 20 \mu\text{m}$) σε σχέση με το ύψος των μικροκολώνων ($\approx 25-27 \mu\text{m}$), εισχώρησε σε χαμηλότερα ύψη μικροκολώνων, όπου λόγω θετικού προφίλ η διάμετρος τους ήταν μεγαλύτερη, οπότε και προέκυψαν οπές μεγαλύτερης διαμέτρου. Ακόμη, διακρίνονται ετεροχρωμίες στις εικόνες του Σχήματος 3.23c και του Σχήματος 3.23a (μεγέθυνσης 1 000x) υπό κλίση 60°, οφειλόμενες σε υπολείμματα του υδρόφοβου υμενίου CHF_3 στο φορέα, όπως είχε αντίστοιχα συμβεί και στην προηγούμενη κατασκευή μεμβράνης.

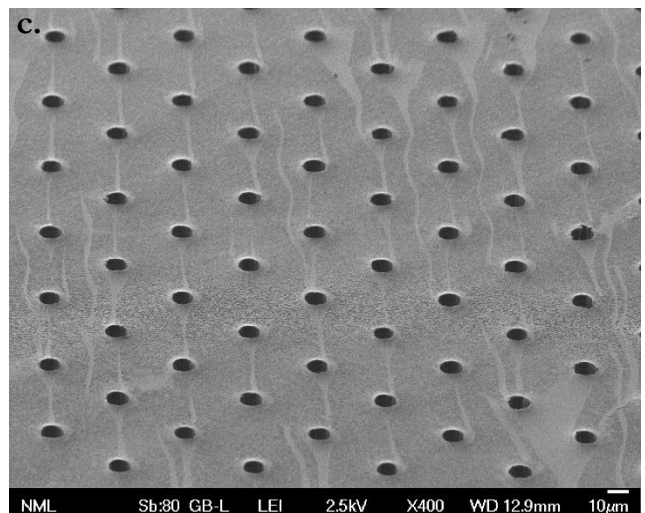
a.



b.

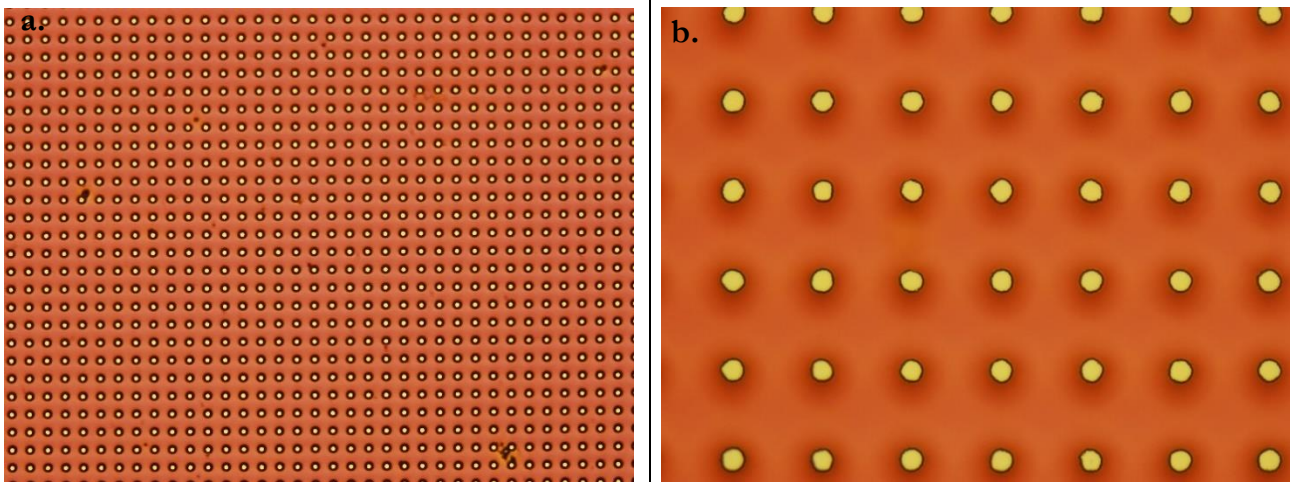


c.



Σχήμα 3. 23. Εικόνες SEM της πορώδους μεμβράνης PDMS από το εκμαγείο Si που προέκυψε από τη μάσκα δύο διαφανειών, όπως λήφθηκαν από την από την πλευρά σε επαφή με το φορέα της. α) Εικόνα 50x και σε μεγέθυνση εικόνα 1 000x υπό 60°, όπου διακρίνεται σχεδόν 100% διάνοιξη των πόρων. β) Εικόνα 350x, όπου η μέση διάμετρος $10.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ των οπών είναι αυξημένη κατά 0.5 μm σε σχέση με τη διάμετρο των μικροκολώνων, λόγω θετικού τους προφίλ. γ) Εικόνα 400x υπό 60°, όπου διακρίνονται ετεροχρωμίες λόγω υπολειμμάτων υμενίου από πλάσμα CHF_3 .

Τέλος, προκειμένου να ελεγχθεί η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του εκμαγείου, παρατηρήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο μετά την απομάκρυνση της μεμβράνης. Όπως είναι εμφανές στις εικόνες μεγέθυνσης 10x και 50x του Σχήματος 3.24, αρχικά δε διακρίνεται κάποιο υπόλειμμα της μεμβράνης, ως απόδειξη πλήρους απομάκρυνσης της. Επιπλέον, το εκμαγείο δεν έχει υποστεί καμία απώλεια μικροκολώνων και είναι πλήρως λειτουργικό προς επαναχρησιμοποίηση. Η χρωματική διαφοροποίηση που παρατηρείται προέκυψε μετά την έκθεσή του σε πλάσμα αερίου C_4F_8 .



Σχήμα 3. 24. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου του εκμαγείου Si πορώδους μεμβράνης μετά την απομάκρυνσή της σε μεγέθυνση a) 10x και b) 50x. Δε διακρίνεται θραύση μικροκολώνων, και το εκμαγείο δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί.

Συμπερασματικά, καταφέροντας εκ νέου την κατασκευή πορώδους μεμβράνης PDMS, αποδεικνύεται η επαναληψιμότητα της διαδικασίας παραγωγής της, η οποία αφορά τόσο τις συνθήκες σχετικής υδροφοβοποίησης εκμαγείου και φορέα, όσο και την ίδια τη μεμβράνη (πάχος και αναλογία PDMS), καθώς και τα στάδια που ακολουθήθηκαν για τη θέρμανση και τη συγκόλλησή της. Ακόμη, αποδείχθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των εκμαγείων Si και στις δύο περιπτώσεις επιτυχούς κατασκευής της μεμβράνης, καθώς παρέμειναν άθικτα ακόμη και μετά από πολλαπλές χρήσεις. Παρά τον απαιτητικό χαρακτήρα κατασκευής της μεμβράνης PDMS, η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των εκμαγείων της, επιταχύνει σημαντικά την παραγωγική διαδικασία.

3.5 Άμεση κατασκευή πορώδους μεμβράνης με εγχάραξη με laser (laser ablation)

Διερευνήθηκαν στη συνέχεια περισσότερο απλουστευμένες και γρήγορες μέθοδοι για την άμεση κατασκευή πορώδους μεμβράνης μέσω εγχάραξης με laser. Δοκιμάστηκαν δύο υποστρώματα ως υλικά της μεμβράνης, το PDMS και το εμπορικό Therm-X® IT-7270K. Το PDMS επιστρώθηκε δια περιστροφής σε πάχος περίπου 10 μm πάνω σε γυαλί μικροσκοπίου διαστάσεων 2.5 x 2.5 cm². Αντίστοιχα, το Therm-X® IT-7270K είναι ταινία Kapton® (DuPont™), συνολικού πάχους 90 μm, και κόπηκε σε διαστάσεις 4 mm x 12.8 mm. Περισσότερες λεπτομέρειες για τις συνθήκες παρασκευής της λεπτής επίστρωσης PDMS, καθώς και για την εμπορική ταινία Therm-X® IT-7270K αναφέρονται στο Παράρτημα I.

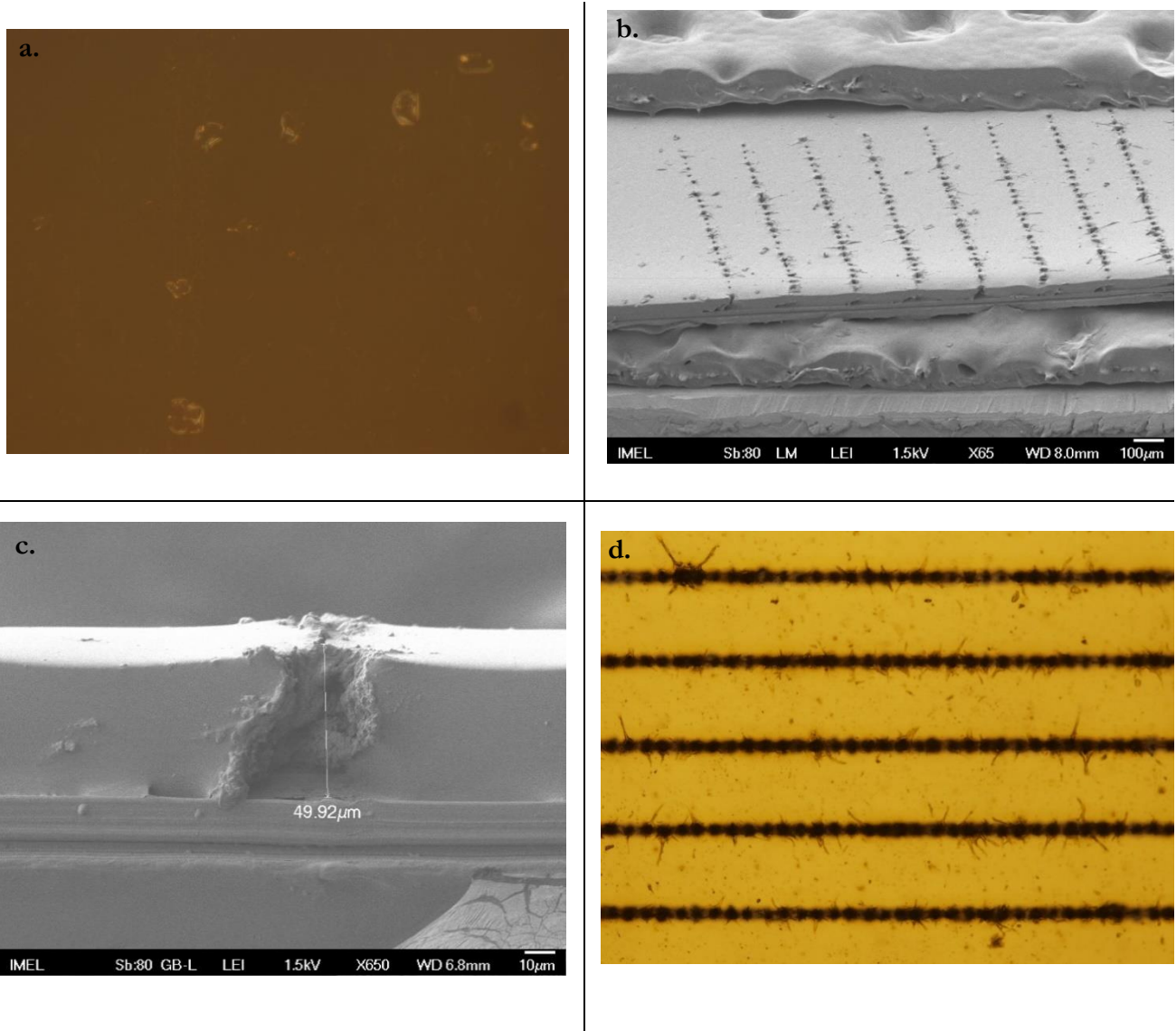
Η εγχάραξη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Δρ. Ιωάννη Θεοδωράκου από την ομάδα Μικροεπεξεργασίας Υλικών και Διατάξεων με Λείζερ (ΜΥΔΛ), στις εγκαταστάσεις της Σ.Ε.Μ.Φ.Ε., Ε.Μ.Π, με επικεφαλής την Καθηγήτρια Ιωάννα Ζεργιώτη και με αξιοποίηση του συστήματος παλμικού laser Galvo. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία στα 532 nm, ρεύμα 36 A, ταχύτητα σάρωσης 2 m/s, και συχνότητα 50 kHz. Για την εγχάραξη του PDMS χρησιμοποιήθηκε λειτουργία ενός παλμού, πλάτους 1.2 μs και ενέργειας 2 -3 J/cm², ενώ για την εγχάραξη της ταινίας Kapton® επιχειρήθηκαν τρεις τρόποι

λειτουργίας, ο πρώτος με χρήση ενός παλμού ανά σημείο στόχευσης, ο δεύτερος με χρήση πολλαπλών παλμών ανά σημείο, και ο τρίτος με χρήση πολλαπλών σαρώσεων περνώντας από τα ίδια σημεία.

Η απόπειρα εγχάραξης με laser του PDMS δεν απέδωσε, λόγω περιορισμών του ίδιου του υλικού, που είναι εγγενώς διαπερατό σε μεγάλο φάσμα της ακτινοβολίας (εγγύς υπεριώδες έως εγγύς υπέρυθρο), οι οποίοι δεν ήταν δυνατόν να αρθούν λόγω χρήσης ενός παλμού μικρής ροής ενέργειας ($2 - 3 \text{ J/cm}^2$), και μικρού πάχους PDMS, επιβαλλόμενου από την ίδια τη φύση της λειτουργίας της μεμβράνης. Χαρακτηριστικά στο Σχήμα 3.25a, απεικονίζεται εικόνα οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 50x) του υμενίου PDMS μετά την αποκόλλησή του από το φορέα, όπου εντοπίζεται πλήρης απουσία οπών. Αναλυτικά, τα αποτελέσματα απόπειρας άμεσης κατασκευής και χαρακτηρισμού με εγχάραξη του PDMS μέσω laser, παρουσιάζονται στο Παράρτημα I.

Κατά την εγχάραξη του Kapton®, ο περισσότερο αποδοτικός τρόπος λειτουργίας ήταν η χρήση πολλαπλών σαρώσεων με ενέργεια σχετικά υψηλή, και συγκεκριμένα, για 10 σαρώσεις και επίπεδο πολωτή 310° . Στις συνθήκες αυτές διανοίχθηκαν οπές βάθους μέχρι και $50 \mu\text{m}$ σε σύνολο $90 \mu\text{m}$ της ταινίας. Προκλήθηκαν όμως έντονες θερμικές αλλοιώσεις του υλικού, ενώ επιπλέον, οι οπές δεν είχαν κάθετα τοιχώματα. Στο Σχήμα 3.25b παρατίθεται εικόνα SEM, που παρουσιάζει τη διάνοιξη οπών στην επιφάνεια, φθάνοντας μέχρι βάθους περίπου $50 \mu\text{m}$ (Σχήμα 3.25c), καθώς και εικόνα οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 50x) (Σχήμα 3.25d), που καταδεικνύει το μέγεθος των θερμικών αλλοιώσεων. Στο Παράρτημα I αναλύονται και οι υπόλοιποι τρόποι άμεσης κατασκευής μεμβράνης με laser και συγκρίνονται μεταξύ τους. Σε κάθε περίπτωση όμως, η μέση ελάχιστη διάμετρος οπών ($\approx 24 \mu\text{m}$) που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της εγχάραξης είναι μεγαλύτερη της επιθυμητής (μέγιστο $12 \mu\text{m}$), καθώς ξεπερνά το μέσο μέγεθος MSCs $10 - 12 \mu\text{m}$.

Συμπερασματικά, η εγχάραξη με laser, τουλάχιστον του συγκεκριμένου μήκους κύματος, δεν μπορεί να αποδώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα άμεσης κατασκευής πορώδους μεμβράνης σε πολυμερικά υποστρώματα.



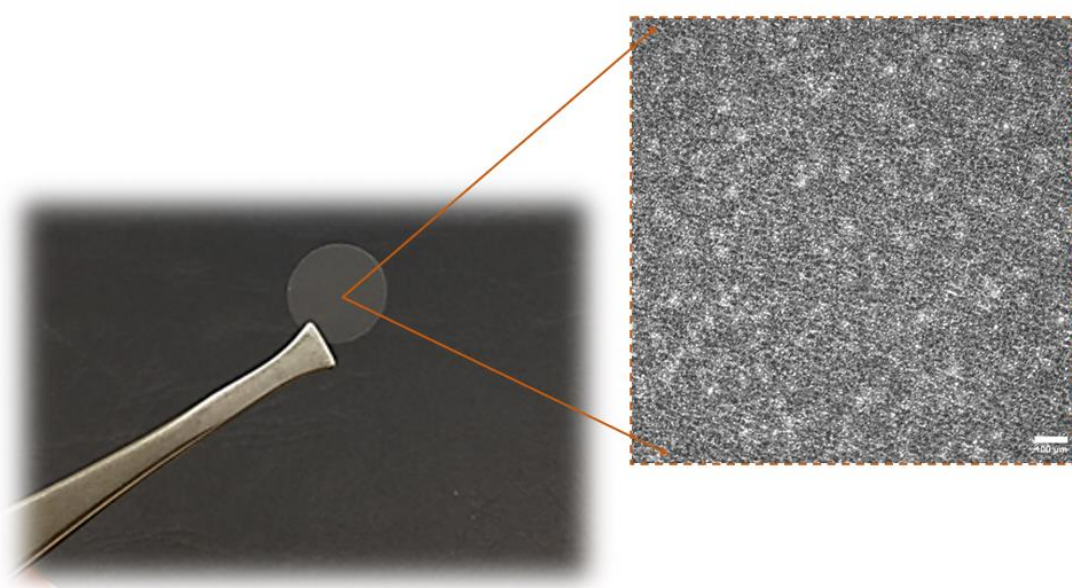
Σχήμα 3. 25. Απόπειρες άμεσης κατασκευής πορώδους μεμβράνης με εγχάραξη laser σε πολυμερικά υποστρώματα, a) PDMS και b – d) εμπορικό Therm-X® IT-7270K (Karton®). a) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 50x που αποδεικνύει την αποτυχία διάνοιξης οπών στο υμένιο PDMS πάχους 10 μm με χρήση χαμηλής ροής ενέργειας (2 – 3 J/cm²) ενός παλμού. b) Εικόνα SEM που αποδεικνύει τη διάτρηση οπών στην επιφάνεια του Karton® συνολικού πάχους 90 μm με χρήση 10 σαρώσεων και επίπεδο πολωτή 310°. c) Εικόνα SEM, όπου διακρίνεται πως το βάθος των οπών στο Karton® δεν ξεπερνά τα 50 μm. d) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 50x με τις θερμικές αλλοιώσεις στην επιφάνεια του Karton®.

3.6 Εμπορική πορώδης μεμβράνη πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET)

Λόγω της αποδεδειγμένης πολυπλοκότητας κατασκευής πορώδους μεμβράνης PDMS, δοκιμάστηκε ως εναλλακτική η ενσωμάτωση εμπορικής πορώδους μεμβράνης στη μικροδιάταξη. Πρόκειται για τις μεμβράνες πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) (Σχήμα 3.26), αγορασμένες από την it4ip S.A., οι οποίες είναι κυλινδρικοί πορώδεις δίσκοι, κατασκευασμένοι με ακτινοβόληση με σωματίδια υψηλής ενέργειας προς χάραξη πορειών, που αργότερα διανοίγονται με χημική εγχάραξη δημιουργώντας πόρους (track-etching

technology). Είναι διαμέτρου 13 mm, πάχους 12 μm , και με μέγεθος πόρων 0.4 μm παράλληλα διατεταγμένων σε μια πυκνότητα 4×10^6 πόροι/ cm^2 . Είναι μίας χρήσης και ανήκουν στην κατηγορία ipCELLCULTURE™, προορισμένη για την καλλιέργεια κυττάρων λόγω ειδικής επιφανειακής επεξεργασίας από τον κατασκευαστή που ευνοεί την ανάπτυξη κυττάρων. Αν και διαφανείς με γυμνό μάτι, κατά την παρατήρηση σε μικροσκόπιο εμφανίζουν σημαντικό θόρυβο υποβάθρου, όπως είναι εμφανές στο Σχήμα 3.26 (εικόνα οπτικού μικροσκοπίου σε μεγέθυνση 10x).

Πριν την ενσωμάτωσή τους στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών, κόπηκαν περιμετρικά σε διάμετρο ≈ 11 mm, καθώς μια διαφορά 3 mm σε σχέση με τη διάμετρο του μικροθαλάμου τροφοδοσίας, είναι επαρκής ώστε να διασφαλιστεί η περιφερειακή συγκράτησή τους. Τέλος, η δοκιμή συγκόλλησή τους με PDMS, μετά από αμοιβαία ενεργοποίησή τους σε πλάσμα αέρα, δεν ήταν εφικτή.

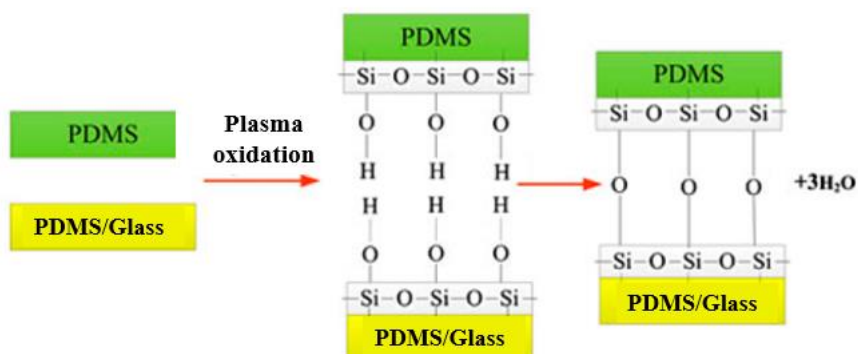


Σχήμα 3. 26. Εμπορική πορώδης μεμβράνη πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) και σε μεγέθυνση εικόνα οπτικού μικροσκοπίου 10x, όπου διακρίνεται το πολύπλοκο, τυχαίας οργάνωσης δίκτυο πόρων της.

3.7 Υλοποίηση της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα

Για να ολοκληρωθεί κατασκευαστικά η μικροδιάταξη, χρειάζεται τα συνιστώσα επίπεδά της να συγκολληθούν μεταξύ τους προς σφράγιση της. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιείται οξείδωση των επιπέδων PDMS καθώς και του γυαλιού σε πλάσμα αέρα προς ενεργοποίησή τους, με την έκθεση σε πλάσμα αέρα να προκαλεί αποδεδειγμένα επιφανειακή οξείδωση [13]. Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται στον αντιδραστήρα χαμηλής πίεσης Covance multi-system στις συνήθεις συνθήκες (βλ. Κεφάλαιο 2). Με αυτό τον τρόπο, στην επιφάνεια του PDMS τα μεθύλια ($-\text{CH}_3$) αντικαθίστανται από υδροξύλια ($-\text{OH}$) [14,15], ενώ στην επιφάνεια του γυαλιού διαρρηγνύονται οι δεσμοί $\text{O} - \text{OH}$, ελευθερώνοντας αντίστοιχα υδροξύλια ($-\text{OH}$) [16], με αποτέλεσμα και

στις δύο επιφάνειες να σχηματίζονται σιλανόλες (Si – OH) [14,17]. Αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους, τα επίπεδα PDMS έρχονται σε σύμμορφη επαφή είτε μεταξύ τους είτε με το γυαλί, με αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις τη δημιουργία δεσμού σιλοξάνης (Si – O – Si) με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου νερού (H₂O) [18,19]. Ο δεσμός σιλοξάνης (Si – O – Si) είναι ομοιοπολικός και εξασφαλίζει ισχυρή, μη αναστρέψιμη συγκόλληση των δύο επιπέδων [19]. Στο Σχήμα 3.27 που ακολουθεί απεικονίζεται η διαδικασία συγκόλλησης μεταξύ διαδοχικών επιπέδων PDMS – PDMS ή PDMS – γυαλί.

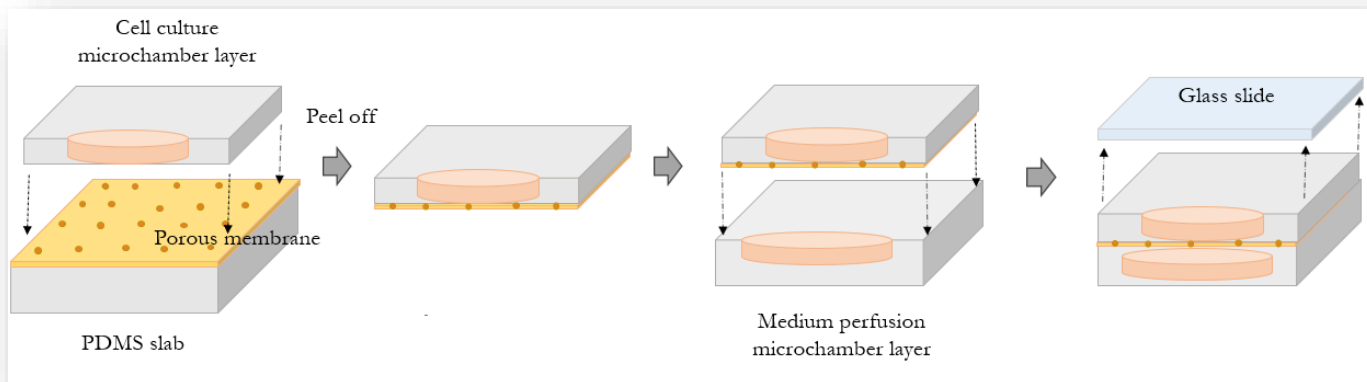


Σχήμα 3. 27. Σχηματική απεικόνιση συγκόλλησης επιπέδων PDMS με τον εαυτό τους ή με το γυαλί. Προηγείται αμοιβαία έκθεση σε πλάσμα προς οξείδωση της επιφάνειας των δύο επιπέδων και δημιουργία ενεργών ομάδων σιλανόλης (Si – OH). Μετέπειτα σύμμορφη επαφή των δύο επιπέδων οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συγκόλληση με τη δημιουργία δεσμών σιλοξάνης (Si – O – Si) (τροποποίηση των Xiong et al. 2014 [17]).

Η διαδικασία συγκόλλησης παρουσιάζει μικρές διαφοροποιήσεις αναλόγως του αν ενσωματώνεται η κατασκευασμένη πορώδης μεμβράνη PDMS ή εμπορική μεμβράνη PET. Σε κάθε περίπτωση όμως, είναι σειριακή και στηρίζεται στη λογική ότι τα λιγότερο εύκαμπτα υλικά συγκολλώνται στο τέλος.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται μεμβράνη PDMS η διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα 3.28, όπου φαίνεται ότι προηγείται η συγκόλλησή της με το επίπεδο του μικροθαλάμου καλλιέργειας. Στο στάδιο αυτό, η μεμβράνη βρίσκεται πάνω στο φορέα της, όπως έχει παραμείνει μετά το τέλος της κατασκευής της (βλ. Σχήμα 3.8, στάδιο d), και ο μόνος τρόπος να απομακρυνθεί από αυτόν είναι έμμεσα μέσω συγκόλλησής της με το μικροθάλαμο καλλιέργειας. Στη συνέχεια, η συνένωση μεμβράνη-μικροθάλαμος καλλιέργειας συγκολλάται με το επίπεδο του μικροθαλάμου τροφοδοσίας, και τέλος, το σύνολό τους με το γυαλί.

Κατ' αντιστοιχία, όταν ενσωματώνεται εμπορική μεμβράνη PET, συγκολλώνται μεταξύ τους τα επίπεδα PDMS των μικροθαλάμων μετά την ενεργοποίησή τους, συγκρατώντας στο ενδιάμεσο τη μεμβράνη. Η συγκόλληση μεταξύ των δύο επιπέδων περιφερειακά της μεμβράνης είναι επαρκής ώστε να εξασφαλίζεται η σφράγιση της μικροδιάταξης. Το σύνολο των τριών επιπέδων συγκολλάται στο τέλος με το γυαλί.



Σχήμα 3. 28. Σχηματική απόδοση των σταδίων συγκόλλησης των επιπέδων της μικροδιάταξης για την περίπτωση ενσωμάτωσης πορώδους μεμβράνης PDMS. Προηγείται η συγκόλληση της μεμβράνης με το μικροθάλαμο καλλιέργειας, του συνόλου τους με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, και τέλος, η σφράγιση με το γυαλί.

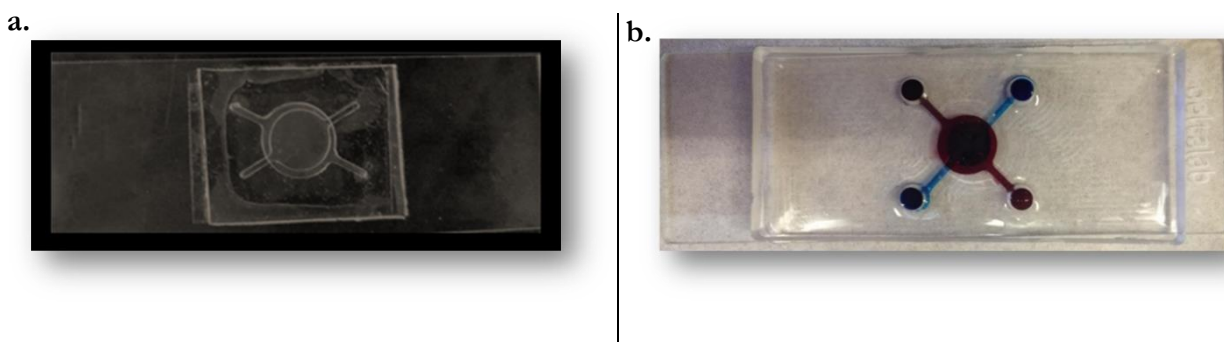
Σε κάθε στάδιο της συγκόλλησης, είναι σημαντική η σωστή ευθυγράμμιση των επιπέδων μεταξύ τους, η οποία πραγματοποιείται με προσεκτική χειρωνακτική καθοδήγηση. Το πρώτο στάδιο ευθυγράμμισης αφορά στη σωστή τοποθέτηση της μεμβράνης, η οποία θα πρέπει να καλύψει όλο το μικροθάλαμο καλλιέργειας. Τα υπόλοιπα στάδια διαφοροποιούνται αναλόγως της αρχιτεκτονικής 1^{ης} ή 2^{ης} γενιάς της μικροδιάταξης.

Έτσι, στην αρχιτεκτονική 1^{ης} γενιάς, οι οπές στο επίπεδο του μικροθαλάμου καλλιέργειας πρέπει να συμπέσουν με την είσοδο και έξοδο του μικροθαλάμου τροφοδοσίας στις οποίες αντιστοιχούν. Οι οπές στο μικροθάλαμο καλλιέργειας έχουν προέλθει από τις μικροκολώνες που φέρει το ίδιο το εκμαγείο του, διευκολύνοντας έτσι την ευθυγράμμιση των δύο μικροθαλάμων. Ακολούθως, θα πρέπει να ευθυγραμμιστεί το υπερκείμενο γυαλί με το μικροθάλαμο καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, στο γυαλί έχουν διανοιχθεί τέσσερις οπές διαμέτρου περίπου 0.7 mm με χρήση εργαλείου Dremel, που αντιστοιχούν στην είσοδο και έξοδο κάθε μικροθαλάμου. Η διάνοιξη των οπών αυτών είναι απαραίτητη για την επικοινωνία με τη μικροδιάταξη, καθώς μέσω αυτών συνδέονται κατάλληλοι προσαρμογείς για την είσοδο/έξοδο υγρών. Συνεπώς, θα πρέπει οι δύο οπές του γυαλιού να ευθυγραμμιστούν με τις οπές στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, που αντιστοιχούν στην είσοδο και έξοδο του μικροθαλάμου τροφοδοσίας, και οι άλλες δύο με την είσοδο και έξοδο του ίδιου του μικροθαλάμου καλλιέργειας.

Στην αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς, η διαδικασία της ευθυγράμμισης είναι περισσότερο απλοποιημένη, καθώς η επικοινωνία με τη μικροδιάταξη δε γίνεται μέσω του γυαλιού, αλλά μέσω του επιπέδου του μικροθαλάμου τροφοδοσίας. Ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας φέρει οπές που αντιστοιχούν στην είσοδο και έξοδο του μικροθαλάμου καλλιέργειας, οι οποίες και πάλι έχουν προέλθει από τις μικροκολώνες του εκμαγείου του. Έτσι, απαιτείται μόνο ευθυγράμμιση των οπών στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας με την είσοδο και έξοδο του μικροθαλάμου καλλιέργειας. Η μετέπειτα συγκόλληση του γυαλιού με το μικροθάλαμο καλλιέργειας δεν απαιτεί κάποια ευθυγράμμιση.

Με την πραγματοποίηση των σταδίων συγκόλλησης και ευθυγράμμισης, ολοκληρώνεται η κατασκευαστική διαδικασία της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα. Στο Σχήμα 3.29 παρουσιάζονται μακροσκοπικές εικόνες των μικροδιάταξεων που προέκυψαν και για τις δύο αρχιτεκτονικές. Να σημειωθεί πως η μικροδιάταξη αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς (Σχήμα 3.29a) απεικονίζεται ανεστραμμένη, με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, το

μικροθάλαμο μεγαλύτερης διαμέτρου, να βρίσκεται πάνω από το μικροθάλαμο καλλιέργειας. Στη μικροδιάταξη 2^{ης} γενιάς (Σχήμα 3.29b), οι δύο μικροθάλαμοι έχουν διαβραχεί με χρωστικές διαφορετικού χρώματος προς καλύτερη οπτικοποίηση, όπου συγκεκριμένα, με κόκκινο απεικονίζεται ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας και με μπλε ο μικροθάλαμος καλλιέργειας. Αξίζει να τονιστεί, ότι η κατασκευή των μικροδιατάξεων είναι πλήρως επαναλήψιμη.



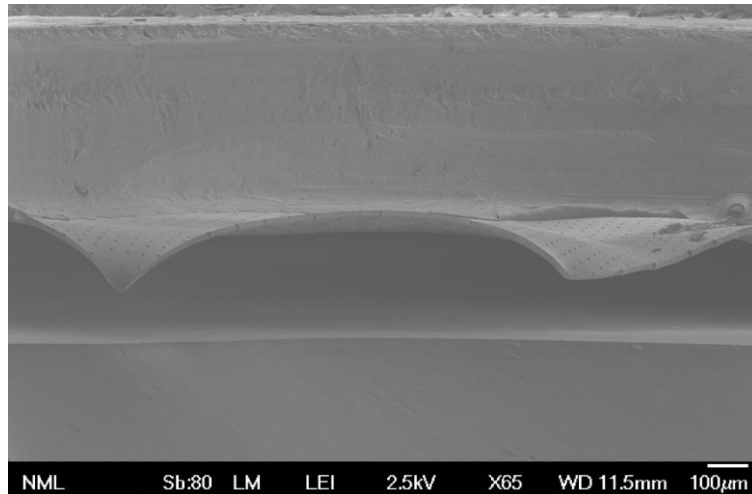
Σχήμα 3. 29. Φωτογραφίες κατασκευαστικά ολοκληρωμένων μικροδιατάξεων μυελού των οστών σε ψηφίδα αρχιτεκτονικής a) 1^{ης} και b) 2^{ης} γενιάς. Η μικροδιάταξη 1^{ης} γενιάς είναι αντεστραμμένη με το γυαλί από κάτω και η 2^{ης} γενιάς διαβρεγμένη και χρωστικές διαφορετικού χρώματος προς διευκόλυνση παρατήρησης.

3.8 Χαρακτηρισμός της μικροδιάταξης μυελού των οστών

Προς επιβεβαίωση της επιτυχούς κατασκευαστικής ολοκλήρωσης της μικροδιάταξης μυελού των οστών, πραγματοποιήθηκε παρατήρησή της σε μικροσκόπιο SEM. Στο Σχήμα 3.30 παρατίθεται εικόνα SEM (υπό κλίση 90°) μιας διατομής της μικροδιάταξης (1^{ης} γενιάς), η οποία έχει ενσωματωμένη την πορώδη μεμβράνη PDMS. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται οι δύο μικροθάλαμοι και στο ενδιάμεσό τους η μεμβράνη PDMS, ενώ όπως φαίνεται, η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας να βρίσκεται από πάνω. Η μεμβράνη παρουσιάζει μια καμπύλωση που οφείλεται στην αναγκαστική τομή της μικροδιάταξης ώστε να παρατηρηθεί.

Μέτρηση του ύψους κάθε μικροθαλάμου έδωσε 418.3 μm και 304.3 μm για το μικροθάλαμο τροφοδοσίας και καλλιέργειας, αντίστοιχα, δηλαδή περίπου 100 μm υψηλότερους μικροθαλάμους σε σχέση με τα προσδιοριζόμενα ύψη της αρχικής αρχιτεκτονικής που ήταν 300 μm και 200 μm , αντίστοιχα. Έτσι, αποδεικνύεται η δυσκολία ελέγχου του ύψους των μικροθαλάμων, όπως αυτή έχει ήδη αναφερθεί στην Παράγραφο 3.1 στους λόγους εγκατάλειψης της αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς. Η επιλογή περιοριστικών και δύσκολων κατασκευαστικά μεγεθών όπως εδώ το ύψος των μικροθαλάμων, αιτιολογεί την ανακατεύθυνση προς την αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς.

Παρ' όλα αυτά, επιβεβαιώνεται η καθ' όλα κατασκευή όλων των επιπέδων της μικροδιάταξης και η επιτυχής της υλοποίησης.



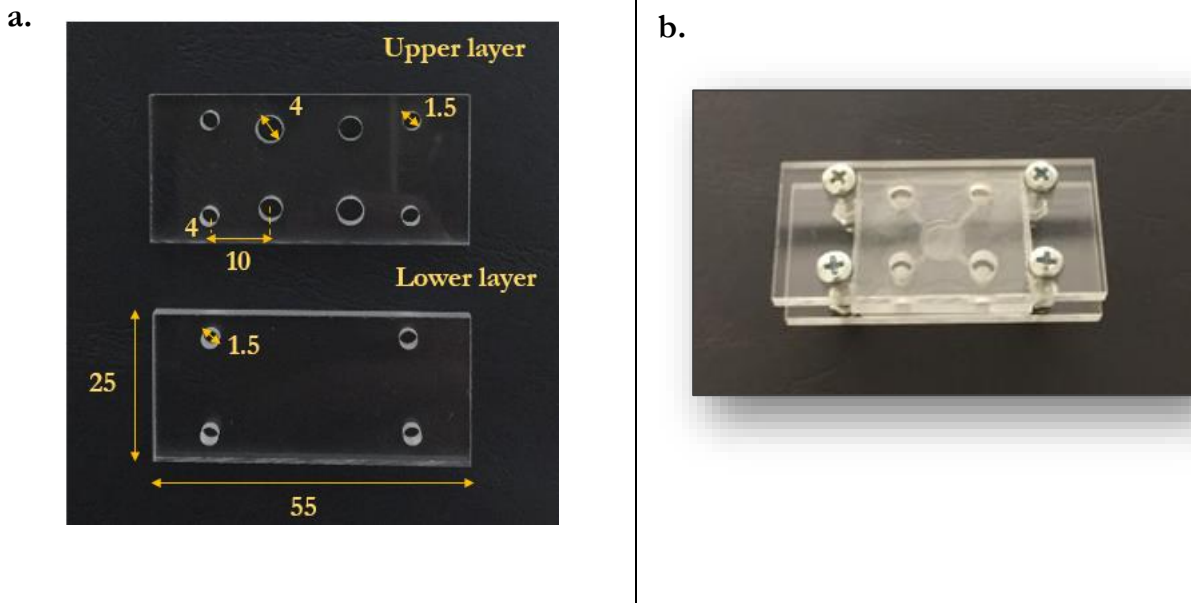
Σχήμα 3. 30. Εικόνα SEM (υπό 90°) διατομής της μικροδιάταξης μυελού των οστών (αρχιτεκτονικής 1^{ης} γενιάς) με ενσωματωμένη πορώδη μεμβράνη PDMS, που επιβεβαιώνει την κατασκευαστική της ολοκλήρωση. Πάνω βρίσκεται ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας και κάτω ο μικροθάλαμος καλλιέργειας με τη μεμβράνη στο ενδιάμεσο.

3.9 Ενσωμάτωση εξαρτημάτων στη μικροδιάταξη μυελού των οστών

3.9.1 Συσκευή συγκράτησης (chip holder) πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA)

Κατασκευάστηκε συσκευή συγκράτησης (chip holder) της μικροδιάταξης (αρχιτεκτονικής 2^{ης} γενιάς) προς περιορισμό φαινομένου διαπερατότητας ατμών μέσω του PDMS, που ενισχύει τη δημιουργία φυσαλίδων στους μικροθαλάμους, όπως θα αποδειχθεί στο Κεφάλαιο 5. Ειδικότερα, αποτελείται από δύο επίπεδα πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA), διαστάσεων το καθένα 55 mm x 25 mm x 3.5 mm (μήκος x πλάτος x ύψος) που καλύπτουν την πάνω και κάτω πλευρά της μικροδιάταξης. Το πάνω επίπεδο, σε επαφή με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, φέρει τέσσερις οπές διαμέτρου 4 mm ευθυγραμμισμένες με την είσοδο και έξοδο του κάθε μικροθαλάμου. Και τα δύο επίπεδα διαθέτουν τέσσερις οπές για τη διέλευση βιδών που σταθεροποιούν τη διάταξη. Οι οπές αυτές είναι διαμέτρου ≈ 1.5 mm, και απέχουν 10 mm από το κέντρο των οπών για τους μικροθαλάμους (άξονας x) και 4 mm από την άκρη της εγγύτερης πλευράς (άξονας y) (Σχήμα 3.31a). Η συσκευή συγκράτησης κατασκευάστηκε στο Μηχανουργείο του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Προκειμένου να είναι δυνατή η ενσωμάτωση της μικροδιάταξης στα οριζόμενα περιθώρια από τις βίδες του chip holder, χρειάστηκε να περιοριστούν οι διαστάσεις των συνιστώντων επιπέδων του. Έτσι, τα επίπεδά των μικροθαλάμων καθώς και του γυαλιού κόπηκαν σε διαστάσεις 30 mm x 25 mm. Στο Σχήμα 3.31b παρουσιάζεται επίσης, η μικροδιάταξη συγκρατούμενη μέσα στο chip holder.

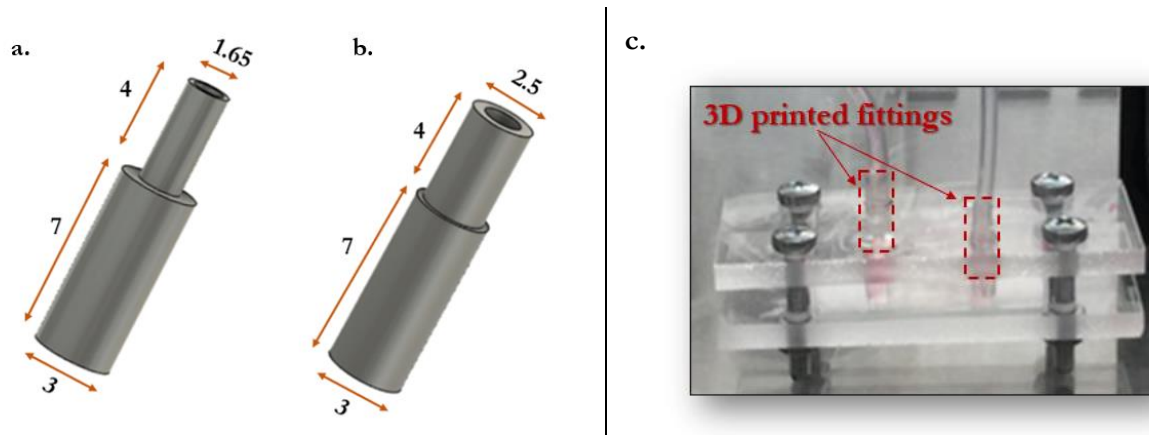


Σχήμα 3. 31. a) Επίπεδα (άνω και κάτω) της συσκευής συγκράτησης πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) της μικροδιάταξης μυελού των οστών. Όλες οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm. b) Φωτογραφία της συσκευής συγκράτησης PMMA με ενσωματωμένη τη μικροδιάταξη μυελού των οστών.

3.9.2 Κατασκευή προσαρμογών μικροκαναλιών εισόδου-εξόδου με χρήση τριδιάστατης εκτύπωσης (3D printing)

Κατασκευάστηκαν ειδικοί προσαρμογείς (fittings) εισόδου και εξόδου για το μικροθάλαμο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης βελτιωμένης αρχιτεκτονικής, ώστε να είναι δυνατή η σύνδεσή του με κατάλληλα σωληνάκια. Η κατασκευή τους πραγματοποιήθηκε σε 3D εκτυπωτή Form 3+ της Formlabs με χρήση ρητίνης High Temp V2 (FLHTAM02) στις εγκαταστάσεις του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Κάθε προσαρμογέα αποτελείται από δύο ομόκεντρους κύλινδρους σε επαφή διαφορετικής διαμέτρου και ύψους. Και στους δύο προσαρμογείς, ο ένας κύλινδρος έχει ύψος 7 mm και διάμετρο 3 mm, και ο άλλος ύψος 4 mm. Στον προσαρμογέα εισόδου ο χαμηλότερος κύλινδρος έχει εξωτερική διάμετρο 1.65 mm, ενώ στον εξόδου 2.5 mm. Επιπλέον, η εσωτερική διάμετρος των ομόκεντρων κυλίνδρων είναι 1.2 mm και 1.5 mm, για τον προσαρμογέα εισόδου και εξόδου, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 3.32a και 3.32b φαίνεται το 3D σχέδιο CAD σε Fusion 360 του προσαρμογέα εισόδου, και εξόδου, αντίστοιχα, με υποδεικνυόμενες τις διαστάσεις τους, και στο Σχήμα 3.32c οι αντίστοιχοι προσαρμογείς μετά την υλοποίησή τους ενσωματωμένοι στη μικροδιάταξη.

Να σημειωθεί εδώ, ότι ο κύλινδρος μεγαλύτερης διαμέτρου εισάγεται στους υποδοχείς/οπές του μικροθαλάμου τροφοδοσίας (είσοδος και έξοδος κάθε μικροθαλάμου), οπότε και διαθέτει την ίδια διάμετρο σε κάθε προσαρμογέα, ενώ εκείνος με τη μικρότερη διάμετρο συνδέεται με σωληνάκι εισόδου ή εξόδου, προσαρμόζοντας ανάλογα τη διάστασή του.



Σχήμα 3. 32. 3D σχέδιο CAD των προσαρμογών α) εισόδου β) εξόδου, κατασκευασμένων με 3D εκτύπωση για τη μικροδιάταξη μυελού των οστών. Όλες οι διαστάσεις είναι σε mm, και αναγράφονται μόνο οι εξωτερικές διαμέτροι για κάθε προσαρμογή. γ) Φωτογραφία της μικροδιάταξης τοποθετημένης στη συσκευή συγκράτησης, με ενσωματωμένους τους προσαρμογείς.

3.10 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάστηκαν αναλυτικά τα στάδια κατασκευής της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα. Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν αρχικά το σχεδιασμό της μικροδιάταξης, συνεχίζουν με την κατασκευή των εκμαγείων για κάθε επίπεδο του (μικροθάλαμοι και μεμβράνη), την ακόλουθη υλοποίησή τους, και τέλος τη σειριακή τους συγκόλληση που ολοκληρώνει κατασκευαστικά τη μικροδιάταξη. Παρουσιάζονται δύο αρχιτεκτονικές της μικροδιάταξης, μια 1^{ης} γενιάς που αποτελεί την αρχικά προσδιοριζόμενη, και μια 2^{ης} γενιάς, αποτέλεσμα βελτιώσεων.

Ο σχεδιασμός της μικροδιάταξης πραγματοποιήθηκε σε αρμονία με τη μικροφυσιολογία και τη λειτουργία του μυελού των οστών. Η αρχή λειτουργίας της μικροδιάταξης στηρίζεται στην ύπαρξη δύο κυλινδρικών μικροθαλάμων PDMS, έναν για την καλλιέργεια κυττάρων κι έναν για την τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό, οι οποίοι επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω πορώδους μεμβράνης. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, με την καλλιέργεια των MSCs να προηγείται εκείνης των HSCs. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιείται από το γυαλί, το οποίο σφραγίζει το μικροθάλαμο καλλιέργειας.

Οι δύο αρχιτεκτονικές διαφοροποιούνται ως προς τη διάρθρωση των επιπέδων της μικροδιάταξης, και συγκεκριμένα, στη διαφορετική σχετική θέση των μικροθαλάμων του. Έτσι, στην αρχιτεκτονική 1^{ης} γενιάς, ο μικροθάλαμος καλλιέργειας βρίσκεται πάνω από το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, με τα κύτταρα να αναπτύσσονται επομένως πάνω στη μεμβράνη, ενώ στην αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς ο μικροθάλαμος καλλιέργειας βρίσκεται από κάτω, με τα κύτταρα να αναπτύσσονται στο γυαλί. Επιπλέον διαφοροποιήσεις αφορούν στις διαστάσεις των μικροθαλάμων, που στην αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς μειώθηκε η διάμετρος τους κατά 3 mm, αυξάνοντας παράλληλα το ύψος τους στα 0.5 mm.

Για την κατασκευή των εκμαγείων των μικροθαλάμων, από το σύνολο των υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν (Teflon, ρητίνες για 3D εκτύπωση, αλουμίνιο) το αλουμίνιο αναδείχτηκε ως το περισσότερο αρμοστό, με εφαρμοζόμενη μέθοδο σχηματοποίησης την υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική CNC. Οι βασικοί λόγοι υπεροχής του αποδείχτηκαν ότι είναι η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και ακαμψία, που εξασφαλίζουν το πλεονέκτημα της αέναης επαναχρησιμοποίησης, καθώς και ο υψηλότερος συντελεστής του θερμικής

αγωγιμότητας που περιορίζει το χρόνο σκλήρυνσης του PDMS στον ελάχιστο δυνατό, ενισχύοντας έτσι τη διαδικασία παραγωγής τους.

Για την κατασκευή πορώδους μεμβράνης PDMS, το εκμαγείο της καθιερώθηκε σε υπόστρωμα πυριτίου Si, που απέδωσε περισσότερο ανθεκτικές και άκαμπτες μικροκολώνες, με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης. Η επιλογή κατάλληλης σχετικής υδροφοβοποίησης εκμαγείου Si και φορέα μεμβράνης, σε συνδυασμό με την ενίσχυση της μηχανικής αντοχής της μεμβράνης, οδήγησε σε επιτυχή κατασκευή της μεμβράνης. Η διαδικασία παρασκευής της μεμβράνης είναι επαναλήψιμη, όπως αποδείχτηκε και με την εκ νέου κατασκευή της σε μειωμένες διαστάσεις ($10 \times 10 \text{ mm}^2$), σύμφωνα με τις επιταγές της αρχιτεκτονικής 2^{ης} γενιάς.

Συμπερασματικά, η αρχιτεκτονική 2^{ης} γενιάς της μικροδιάταξης μυελού των οστών παγιώνεται, επωφελούμενη μεγαλύτερης κατασκευαστικής αξιοπιστίας, ως απόρροια της ελευθερίας στην υλοποίηση των μικροθαλάμων με την αύξηση του ύψους τους. Έτσι, κάθε κατασκευαστικό του στάδιο κατορθώνει να είναι πλήρως επαναλήψιμο. Ωστόσο για την πορώδη μεμβράνη, προς επιτάχυνση της κατασκευαστικής διαδικασίας, προτείνεται εναλλακτικά η εμπορική λύση της μεμβράνης PET. Η αρχιτεκτονική αυτή επιλέγεται για το εγχείρημα δημιουργίας και συντήρησης της περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής του μυελού των οστών, όπως θα παρουσιαστεί στο Κεφάλαιο 7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΩΝ ΘΑΛΑΜΩΝ ΠΟΛΥ(ΔΙΜΕΘΥΛΟΣΙΛΟΞΑΝΗΣ) ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΕΡΑ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στο κεφάλαιο αυτό προτείνεται η προκατεργασία με πλάσμα αέρα της επιφάνειας PDMS πριν την επικάλυψή της με κολλαγόνο ώστε να καταστεί υδρόφιλη και να ενσωματωθεί σε μικρορρευστονικούς θαλάμους PDMS προς ανάπτυξη κυττάρων. Η μέθοδος αυτή αποδεικνύει αρχικά την αποτελεσματικότητά της στην ακινητοποίηση κολλαγόνου, ενώ κατορθώνει να σχηματίσει ένα σταθερό στρώμα PDMS – κολλαγόνου για 7 ημέρες σε ξηρό περιβάλλον. Τέλος, μικροθάλαμοι PDMS προκατεργασμένοι με πλάσμα και επικαλυμμένοι με κολλαγόνο χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια MSCs αναδεικνύοντας την επιτυχία της μεθόδου να ενισχύσει και να συντηρήσει μακροπρόθεσμα την ανάπτυξη κυττάρων.

4.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι μικρορρευστονικές διατάξεις έχουν κερδίσει τη θέση τους στη βιοϊατρική έρευνα, αξιοποιώντας όλα τα πλεονεκτήματα της σμίκρυνσης [1]. Το PDMS έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην κατασκευή μικρορρευστονικών συσκευών [2], από μικροεργαστήρια σε ψηφίδα (lab-on-a-chip) μέχρι σε μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα (organ-on-a-chip), ως ένα υλικό που κατορθώνει να συγκεντρώσει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων, όπως η βιοσυμβατότητα, η ταχεία κατασκευή πρωτοτύπων (rapid prototyping), η ευκολία στη χρήση, η οικονομική αποδοτικότητα, η ευελιξία, η οπτική διαφάνεια και η αδιαπερατότητα σε υγρά [3,4]. Ωστόσο, παρά τα μοναδικά χαρακτηριστικά του, το PDMS είναι εγγενώς υδρόφοβο, γεγονός αποτρεπτικό για την κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό [5]. Έχει αποδειχθεί ότι οι επιφανειακές ιδιότητες του υποστρώματος επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την προσκόλληση των κυττάρων, η οποία διαδραματίζει κίριο ρόλο σε βιολογικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ο σχηματισμός ιστού [6,7], καθιστώντας υψίστης σημασίας την τροποποίηση της διαβρεξιμότητας της επιφάνειας του PDMS. Μεταξύ μιας ποικιλίας μεθόδων για τη βελτίωση της υδροφιλικότητας του PDMS, όπως η οξειδωσή του με υπεριώδη ακτινοβολία [8-10] ή με κατεργασία πλάσματος [11-13], η χημική απόθεση από ατμό [14,15], η εναπόθεση στρώμα προς στρώμα (layer-by-layer deposition) [16] και ο «εμβολιασμός» πολυμερών (polymer grafting) [17,18], η ακινητοποίηση πρωτεΐνης στην επιφάνεια του έχει ξεχωρίσει, ειδικά σε εφαρμογές που σχετίζονται με την κυτταρική καλλιέργεια και ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, όταν χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix - ECM), όπως το κολλαγόνο ή η φμπρονεκτίνη, προάγουν σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση, καθώς προσομοιάζουν το φυσικό εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον και με αυτό τον τρόπο, υποστηρίζουν τη λειτουργικότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [21-24,25]. Η ακινητοποίηση πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων της φυσικής προσρόφησης και της ομοιοπολικής σύνδεσης της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του PDMS, και με τις δύο να εφαρμόζονται σε μικρορρευστονικές διατάξεις από PDMS.

Η φυσική προσρόφηση μιας πρωτεΐνης της εξωκυττάριας μήτρας (πρωτεΐνη ECM) έχει χρησιμοποιηθεί ως μια απλή μέθοδος για τη βελτίωση της κυτταρικής προσκόλλησης σε υποστρώματα PDMS [26-28]. Στον τομέα των μικρορρευστονικών, έχει εφαρμοστεί μόνο μέχρι και τις αρχικές μελέτες πάνω στις μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα [29,30]. Η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών αυτών διέπεται από ασθενείς ηλεκτροστατικές, van der Waals και υδρόφοβες δυνάμεις [31], οι οποίες είναι επιρρεπείς στην αποδέσμευση της πρωτεΐνης στο θρεπτικό υλικό, γεγονός που διακινδυνεύει την ομοιομορφία της κυτταρικής εξάπλωσης

μακροπρόθεσμα [32]. Ειδικότερα, τα κύτταρα είτε αποκολλώνται είτε σχηματίζουν άνιση στρωμάτωση, δημιουργώντας χαλαρά προσκολλημένα συσσωματώματα όταν επιτυγχάνεται συρροή [5].

Προκειμένου να επιτευχθεί ισχυρότερη πρόσδεση μεταξύ των πρωτεϊνών ECM και των επιφανειών PDMS, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μεταξύ τους ομοιοπολική σύνδεση με την ενσωμάτωση διαμεσολαβητών, όπως για παράδειγμα το (3-αμινοπροπυλ) τριαιθοξυσιλάνιο ((3-aminopropyl)triethoxysilane - APTES) [22,33], γνωστών για την ικανότητά τους να ακινητοποιούν το κολλαγόνο και άλλες πρωτεΐνες [34]. Μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις, μετά τη σιλανοποίηση APTES της επιφάνειας, χρησιμοποιείται ένας πρόσθετος παράγοντας διασύνδεσης, που προσδένεται άμεσα με το κολλαγόνο, είτε μια ομοδιλειτουργική αλδεΐδη, όπως η γλουταραλδεΐδη (glutaraldehyde - GA) [32,35], είτε ένας φωτοδραστικός παράγοντας [36]. Αυτές οι μελέτες, σε αντίθεση με τις μεθόδους φυσικής προσρόφησης, δημιουργούν μια σταθερή επίστρωση κολλαγόνου, ισχυρά αγκυρωμένη στην επιφάνεια, η οποία είναι κατάλληλη για μακροπρόθεσμη κυτταρική καλλιέργεια. Ωστόσο, όλες αυτές οι τεχνικές είναι χρονοβόρες και κοπιαστικές διαδικασίες, που απαιτούν επιτυχή χειρισμό τουλάχιστον δύο σταδίων χημικής τροποποίησης πριν από την επίστρωση κολλαγόνου.

Αντιμετωπίζοντας τις προαναφερθείσες αδυναμίες, η οξείδωση της επιφάνειας PDMS με κατεργασία πλάσματος εμφανίζεται ως μια απλή και αποτελεσματική μέθοδος για να καταστήσει την επιφάνεια PDMS υδρόφιλη [13,37], ώστε να ενισχύσει την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών. Η υδροφιλοποίηση του PDMS αποδίδεται κυρίως στη δημιουργία λειτουργικών υδροξυλομάδων (-OH) στην επιφάνεια [38-40]. Επιπλέον, οι ρίζες άνθρακα που παράγονται μετά την αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από την πολυμερική αλυσίδα του PDMS, σχηματίζουν καρβονυλικές (-C=O) και καρβοξυλικές (-COOH) λειτουργικές ομάδες συνδυαζόμενες με τις ρίζες του οξυγόνου στο πλάσμα ή μετά από την έκθεσή τους στην ατμόσφαιρα [39]. Οι περισσότερες μελέτες σχετιζόμενες με την υδροφιλοποίηση του PDMS χρησιμοποιούν πλάσμα χαμηλής πίεσης, και κυρίως πλάσμα οξυγόνου [39], αλλά και αέρα [41,42] ή αζώτου [38], ενώ ανερχόμενη είναι η χρήση πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης [43-45].

Παρά τις ανησυχίες σχετικά με τη βραχυπρόθεσμη υδροφιλικότητα του PDMS [19], υπάρχουν μελέτες όπου δοκιμή αντοχής σε εφελκυσμό (T-peel test) σε επιφάνειες PDMS επικαλυμένες με κολλαγόνο (ή με οποιαδήποτε πρωτεΐνη ECM) λίγο μετά την κατεργασία πλάσματος, επικυρώνει την επιτυχή ακινητοποίηση της πρωτεΐνης [38, 39]. Με την κατεργασία πλάσματος της επιφάνειας PDMS σχηματίζονται λειτουργικές ομάδες που επιτρέπουν τη διεπιφανειακή αλληλεπίδραση με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου [39]. Οι υδροξυλο-, αμινο- και καρβονυλο-ομάδες του κολλαγόνου αλληλεπιδρούν με τις υδροξυλικές και καρβοξυλικές ομάδες του κατεργασμένου με πλάσμα PDMS μέσω αυστηρά διατεταγμένων δεσμών υδρογόνου [38,39], σχηματίζοντας έτσι ένα σταθερό στρώμα PDMS-κολλαγόνου.

Εκτός αυτών, επιφάνειες PDMS που έχουν προκατεργαστεί με πλάσμα και επικαλυφθεί με πρωτεΐνη ECM, έχουν επίσης εξεταστεί ως προς την ικανότητά τους να υποστηρίξουν καλλιέργεια κυττάρων μακροπρόθεσμα [46-49]. Τα κύτταρα επέδειξαν βελτιωμένη προσκόλληση και πολλαπλασιασμό στα κατεργασμένα δείγματα PDMS, που μελετήθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα, κυμαινόμενα από 2 ημέρες [46] έως ακόμη και 3 εβδομάδες [48].

Αν και η προκατεργασία πλάσματος έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ενεργοποίηση ανοιχτών επιφανειών PDMS πριν από την επικάλυψη πρωτεΐνης ECM για βελτιωμένη κυτταρική καλλιέργεια, παραμένει ασαφές από τις υπάρχουσες μελέτες εάν είναι ωφέλιμη ή πώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια μικρορευστονική συσκευή PDMS. Στην πραγματικότητα, στα περισσότερα μικρορευστονικά συστήματα, από τριδιάστατες μικρορευστονικές διατάξεις [50,51] έως μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα [29], αντί για διάλυμα κολλαγόνου χρησιμοποιείται γέλη κολλαγόνου. Πιο αναλυτικά, η γέλη κολλαγόνου λειτουργεί ως τριδιάστατη υποστηρικτική μήτρα για την ανάπτυξη των κυττάρων και τη δημιουργία ιστού, και δεν απαιτεί προγενέστερη

επιφανειακή ενεργοποίηση της επιφάνειας PDMS, σε αντίθεση με το διάλυμα κολλαγόνου, το οποίο εφαρμόζεται ως μια διδιάστατη επίστρωση που επικαλύπτει το εσωτερικό της μικρορρευστονικής διατάξεως.

Ορμώμενοι από την απλότητα και την αναγκαιότητα της κατεργασίας με πλάσμα, συστήνεται η χρήση του ως το μοναδικό στάδιο επεξεργασίας πριν την επίστρωση του εσωτερικού των μικρορρευστονικών διατάξεων PDMS με κολλαγόνο, με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητά του να υποστηρίξει τη μακροπρόθεσμη και βιώσιμη ανάπτυξη κυττάρων. Η εν λόγω μελέτη είναι μία από τις λίγες [33,52] που είναι προσαρμοσμένη σε μικρορρευστονικές διατάξεις PDMS για την πρόσδεση κολλαγόνου, ανάμεσα όχι μόνο σε όσες χρησιμοποιούν προκατεργασία πλάσματος, αλλά και άλλες μεθόδους επιφανειακής τροποποίησης πριν την επίστρωση κολλαγόνου.

Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιείται αρχικά μια μελέτη για την εύρεση της κατάλληλης μεθόδου κατεργασίας με πλάσμα του εσωτερικού των μικροθαλάμων καλλιέργειας, συγκρίνοντας την κατεργασία με πλάσμα αέρα υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης, με την *in situ* κατεργασία με ατμοσφαιρικό πλάσμα. Στην πρώτη περίπτωση το πλάσμα αέρα χρησιμοποιείται για την απευθείας ενεργοποίηση των ανοιχτών επιφανειών του μικροθαλάμου πριν το στάδιο της συγκόλλησης, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, το ατμοσφαιρικό πλάσμα δημιουργείται εντός του μικροθαλάμου, αφού έχει πλέον σφραγιστεί. Οι δύο μέθοδοι ελέγχονται ως προς την υδροφιλοποίηση και την κλιματιστική γήρανση της επιφάνειας PDMS, μέσω χαρακτηρισμού χημικής σύστασης με φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS), και μέσω μέτρησης της ταχύτητας τριχοειδούς άντλησης σε μικροκανάλια PDMS μέχρι και την 7^η ημέρα. Και οι δύο μέθοδοι αποδείχτηκε ότι επιφέρουν οξείδωση της επιφάνειας PDMS, επιβεβαιώνοντας την υπάρχουσα βιβλιογραφία [43,53]. Όμως, λόγω του ότι το σύστημα κατεργασίας με ατμοσφαιρικό πλάσμα δε διαθέτει ευχέρεια χειρισμού για το μη ειδικό, προτιμάται η χρήση πλάσματος αέρα χαμηλής πίεσης πριν την επικάλυψη με κολλαγόνο, ως μια εύκολη και άμεση μέθοδος ενεργοποίησης της επιφάνειας PDMS.

Σε αυτή τη λογική, καταδεικνύεται αρχικά, ότι οι προκατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS ακινητοποιούν ομοιόμορφα το κολλαγόνο, μετά από μέτρηση στατικών γωνιών επαφής, οι οποίες μάλιστα προέκυψαν οι χαμηλότερες καταγεγραμμένες στη βιβλιογραφία. Συνεχίζοντας, μελετώνται δύο διαφορετικοί τρόποι κατεργασίας με πλάσμα αέρα προσαρμοσμένοι στις μικρορρευστονικές διατάξεις, η μέσω διάχυσης και η απευθείας ενεργοποίησης, ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην πρόσδεση και την ομοιομορφία κολλαγόνου. Επιπλέον παράμετροι όπως η χρονική καθυστέρηση πριν από την επίστρωση κολλαγόνου ελέγχονται επίσης για την επίδρασή τους στη δέσμευση κολλαγόνου. Στη διερεύνηση δημιουργίας ενός σταθερού στρώματος PDMS – κολλαγόνου μακροπρόθεσμα, σημειώνεται η μεγαλύτερη αναφερόμενη υδροφιλικότητα μετά από επικάλυψη κολλαγόνου σε κατάσταση ξηρασίας για 7 ημέρες από την κατεργασία πλάσματος.

Τέλος, η ανάπτυξη κυττάρων μελετάται στο εσωτερικό μικρορρευστονικών διατάξεων με ενσωματωμένη την προτεινόμενη μέθοδο, γεγονός αρκετά σπάνιο στις υπάρχουσες μελέτες. Ειδικότερα, σε μικρορρευστονικούς θαλάμους (μικροθαλάμους), προκατεργασμένους με πλάσμα αέρα πριν την επικάλυψή τους με κολλαγόνο, καλλιεργούνται μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchymal stem cells - MSCs) για 5 ημέρες, ώστε να αξιολογηθεί αν η ενεργοποίηση πλάσματος καταφέρει να ενισχύσει και να διατηρήσει μακροπρόθεσμα την ανάπτυξη κυττάρων. Υπολογίζεται η επιφανειακή κάλυψη MSCs στους μικροθαλάμους ως μέσο ποσοτικοποίησης της βιωσιμότητας και της εξάπλωσής τους, αποδίδοντας την 5^η ημέρα το υψηλότερο καταγεγραμμένο ποσοστό. Τα MSCs είναι πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, γνωστά για τη μοναδική ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε πολλαπλές μεσεγχυματικές σειρές [54], γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα στους τομείς της μηχανικής των ιστών και της αναγεννητικής ιατρικής [55]. Να σημειωθεί εδώ, ότι η προτεινόμενη μέθοδος κατεργασίας της επιφάνειας PDMS του συγκεκριμένου κεφαλαίου, εφαρμόζεται στο Κεφάλαιο 7 στη μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα (BMoC) για την *in vitro* ανάπτυξη μικροσκοπικού οργανοειδούς μυελού των οστών.

4.2 Πειραματικό μέρος

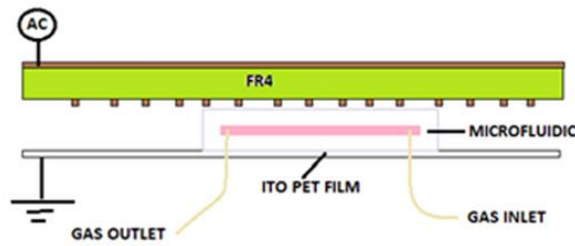
4.2.1 Υλικά

Το ελαστομερές πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη) - PDMS (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, Midland, MI) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση του κολλαγόνου και την κατασκευή των μικροθαλάμων και των μικροκαναλιών. Το τολουόλιο (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) επιλέχθηκε για την 80% διάλυση του PDMS, ενώ το διάλυμα βόειου κολλαγόνου τύπου I (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Γερμανία) για την τροποποίηση των επιφανειών PDMS. Για την καλλιέργεια των MSCs χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό MEM α (τροποποίηση “άλφα” του θρεπτικού υλικού Eagle’s Minimum Essential Medium – MEM, Gibco/22571–020), που περιέχει 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco/ 15, 140–122), συμπληρωμένο με 20% βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum - FBS, Gibco/10270–106) και 1% L-γλουταμίνη (Gibco/25030), όλα αγορασμένα από την Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση του κολλαγόνου δε διαθέτει βόειο εμβρυϊκό ορό (FBS). Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffered Saline - PBS, Gibco/18912014), καθώς και τρυψίνη (trypsin-EDTA, Gibco/15400-054), που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή των κυττάρων, αγοράστηκαν επίσης από την Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

4.2.2 Επιφανειακή τροποποίηση

Όλες οι επιφάνειες PDMS που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν αναμειγνύοντας τη βάση με το διασταυρωτή σε μια αναλογία όγκων 10:1, και ακόλουθη θέρμανση στους 100°C για 40 min. Λεπτό στρώμα διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) αναπτύχθηκε θερμικά σε υπόστρωμα πυριτίου (Si).

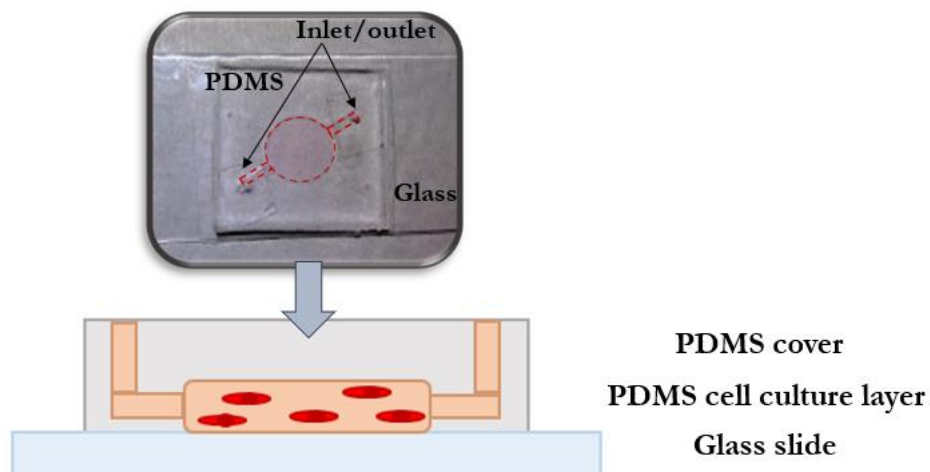
Ατμοσφαιρικό πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για την κατεργασία μικροθαλάμων στα πλαίσια της ανάλυσης XPS, καθώς και μικροκαναλιών PDMS για τη μελέτη της γήρανσης. Στο Σχήμα 4.1 αποδίδεται σχηματικά μια διατομή της συσκευής ατμοσφαιρικού πλάσματος με ενσωματωμένη την εκάστοτε μικρορευστονική διάταξη. Συγκεκριμένα, η συσκευή διαθέτει δύο παράλληλα ηλεκτρόδια, με το άνω να χρησιμοποιείται για την παροχή υψηλής εναλλασσόμενης τάσης, και το κάτω να χρησιμοποιείται για τη γείωση του συστήματος, ενώ στο ενδιάμεσο τοποθετείται η μικροδιάταξη, η οποία λειτουργεί ως διηλεκτρικό. Πιο αναλυτικά, το άνω ηλεκτρόδιο είναι υπόστρωμα πλακέτας τυπωμένου κυκλώματος PCB (Printed Circuit Board) πολλαπλών στρώσεων, αποτελούμενο από μία στρώση χαλκού πάχους 80 μm , ένα διηλεκτρικό FR-4 πάχους 1 mm, και άλλη μια στρώση πλέγματος χαλκού 80 μm . Το κάτω ηλεκτρόδιο είναι μια εύκαμπτη επιφάνεια πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET), που φέρει επίστρωση από οξείδιο του ινδίου και του κασσίτερου ITO (Indium Tin Oxide), το οποίο είναι ημιαγωγός τύπου n υψηλής αγωγιμότητας. Στην επιφάνεια PET διανοίγονται οπές ευθυγραμμισμένες με την είσοδο και την έξοδο της μικροδιάταξης, από όπου εισέρχεται το επιθυμητό αέριο, και στη συγκεκριμένη περίπτωση το ήλιο (He), για τη δημιουργία πλάσματος. Ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια, η διάταξη είναι τοποθετημένη σε κατάλληλα κατασκευασμένη συσκευή συγκράτησης (chip holder), που αφήνει ακάλυπτη μόνο την επιφάνεια του μικροθαλάμου ή του μικροκαναλιού αντίστοιχα, ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επίστρωση ITO. Η συσκευή σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε από το Δρ. Άγγελο Ζένιου.



Σχήμα 4. 1. Σχηματική αναπαράσταση διατομής της συσκευής ατμοσφαιρικού πλάσματος, αποτελούμενης από δύο ηλεκτρόδια, με ενσωματωμένο στο ενδιάμεσο το μικροθάλαμο. Η συσκευή κατασκευάστηκε από το Δρ. Άγγελο Ζένιου.

Όλες οι διεργασίες ενεργοποίησης PDMS στα πλαίσια της μελέτης για την κατάλληλη επιφανειακή τροποποίηση πριν την επικάλυψη με κολλαγόνο, υλοποιήθηκαν με πλάσμα αέρα στον αντιδραστήρα χαμηλής πίεσης Covance multi-system (βλ. Κεφάλαιο 2) σε συνθήκες ισχύος 100 W, πίεσης 5×10^{-2} Torr (8.27×10^{-1} Torr μετά την εισαγωγή αερίου), ροής αέρα 50 sccm και χρόνο 1 min.

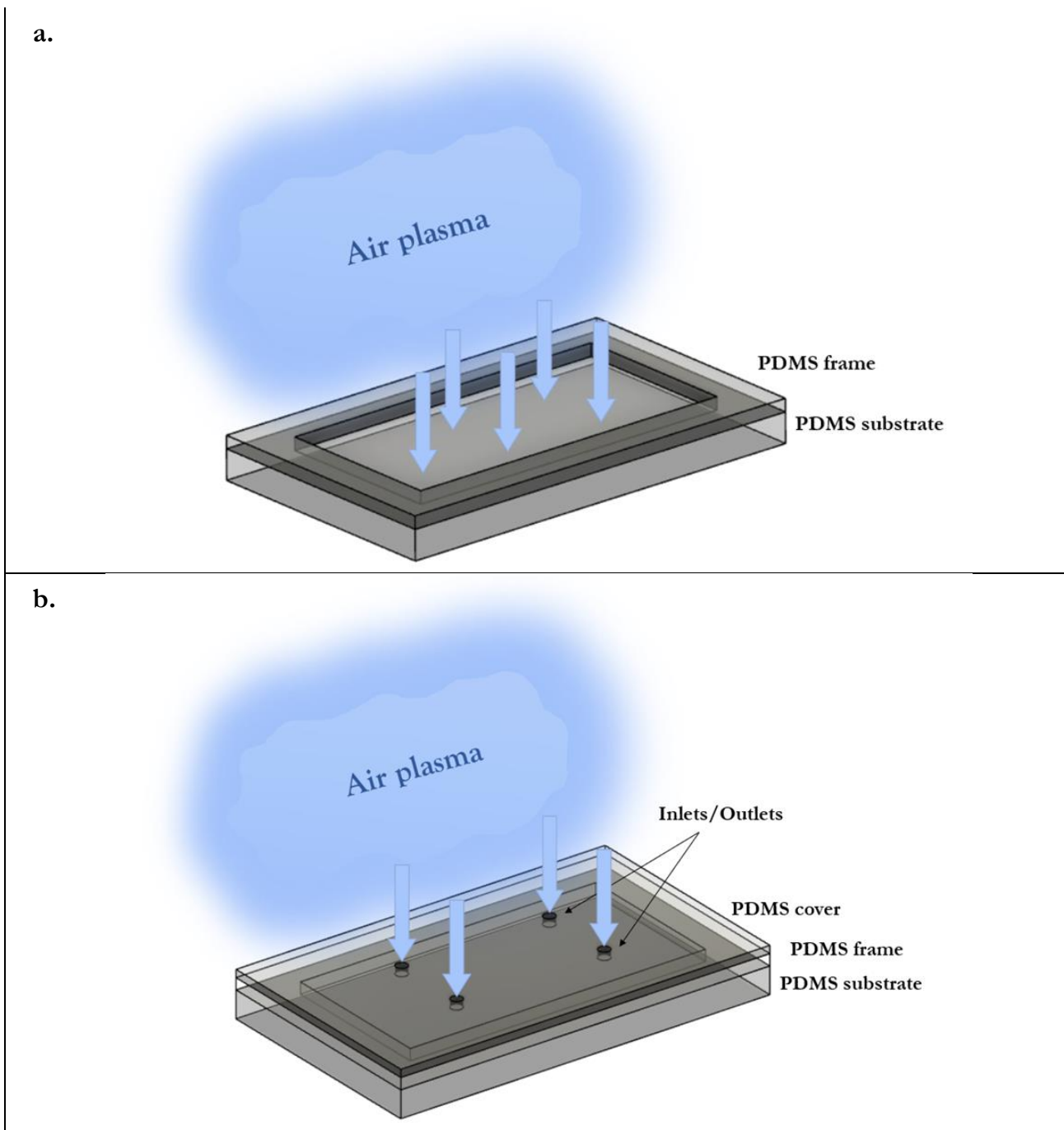
Η ενεργοποίηση με πλάσμα αέρα στις μικροδιατάξεις, και εν προκειμένω στους μικροθαλάμους καλλιέργειας, ενσωματώνεται κατά την απευθείας έκθεση στο πλάσμα του επιπέδου του μικροθαλάμου καλλιέργειας και του γυαλιού στο στάδιο της μεταξύ τους συγκόλλησης. Οι μικροθάλαμοι, όπως έχει περιγραφεί [56], αποτελούνται από το επίπεδο PDMS του μικροθαλάμου καλλιέργειας, συγκολλημένο στις δύο πλευρές του με ένα επίπεδο PDMS πάχους 3 mm κι ένα γυαλί μικροσκοπίου, εσωκλείοντας όγκο περίπου 30 μ L. Χαρακτηριστική μακροσκοπική εικόνα του μικροθαλάμου καλλιέργειας με MSCs, συνοδευόμενη από σχηματική αναπαράσταση μιας διατομής του, παρατίθεται στο Σχήμα 4.2.



Σχήμα 4. 2. Φωτογραφία και σχηματική απόδοση διατομής του 3D μικροθαλάμου PDMS γεμάτου με MSCs. Ο μικροθάλαμος σχηματίζεται με τη συγκόλληση PDMS πάχους 3 mm και γυαλιού στις δύο πλευρές του.

Πιο αναλυτικά, για τη διερεύνηση της ακινητοποίησης του κολλαγόνου μετά την απευθείας ενεργοποίηση σε πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν ανοιχτές επιφάνειες PDMS κατεργασμένες στο πλάσμα, οι οποίες μελετήθηκαν σε σχέση με ακατέργαστες. Συγκεκριμένα, οι επιφάνειες ήταν τεσσάρων ειδών, με τρία αντίγραφα για την καθεμία: (i) ακατέργαστες, (ii) ακατέργαστες, επιστρωμένες με κολλαγόνο, (iii) κατεργασμένες με πλάσμα, χωρίς κολλαγόνο, και (iv) κατεργασμένες με πλάσμα, με κολλαγόνο. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι επιφάνειες περιλείονταν με ένα λεπτό πλαίσιο PDMS, που δεν ξεπερνούσε τα 0.5 mm σε ύψος, δημιουργώντας έτσι ένα παραλληλόγραμμο πηγάδι επιφάνειας 3.5 – 4 cm². Ειδικότερα οι ακατέργαστες επιφάνειες καλύπτονταν επιπλέον με γυαλί μικροσκοπίου μετά την εναπόθεση κολλαγόνου, ώστε να εξαναγκαστεί η επαφή του με την υδρόφοβη επιφάνεια PDMS.

Εκτός όμως της απευθείας έκθεσης σε πλάσμα αέρα, εξετάστηκε ένας επιπλέον τρόπος κατεργασίας, η μέσω διάχυσης ενεργοποίηση, ως εναλλακτικός τρόπος ενεργοποίησης των μικρορευστονικών διατάξεων. Έτσι, ενώ η απευθείας ενεργοποίηση εντάσσεται στο στάδιο της συγκόλλησης, η μέσω διάχυσης συντελείται με τη μεταφορά πλάσματος μέσω της εισόδου και εξόδου της διάταξης. Οι δύο τρόποι διερευνήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην ενεργοποίηση της επιφάνειας PDMS για την ακινητοποίηση κολλαγόνου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα παραλληλόγραμμα πηγάδια και για τους δύο τρόπους, όπου ιδιαίτερα στη μέσω διάχυσης ενεργοποίηση, καλύφθηκαν επιπρόσθετα με ένα επίπεδο PDMS με 4 οπές, αντιπροσωπευτικές των εισόδων/εξόδων της διάταξης, και στην περίπτωσή μας, του μικροθαλάμου. Στο Σχήμα 4.3 αναπαρίστανται σχηματικά οι δύο τρόποι ενεργοποίησης με πλάσμα αέρα των πηγαδιών. Και οι δύο τρόποι εξέτασαν το χρόνο πριν την επίστρωση κολλαγόνου ως μεταβλητή, και συγκεκριμένα 1 h και 2 h, ενώ συγκεκριμένα για τη μέσω διάχυσης εξετάστηκε επιπλέον η παράμετρος του μήκους διάχυσης, καλύπτοντας το πηγάδι με επίπεδο PDMS πάχους 1 mm και 3 mm. Στην απευθείας ενεργοποίηση, μετά την επίστρωση κολλαγόνου, τα πηγάδια καλύφθηκαν με γυαλί μικροσκοπίου προς εξασφάλιση πλήρους επιφανειακής κάλυψης με κολλαγόνο.



Σχήμα 4. 3. Σχηματική αναπαράσταση των δύο τρόπων ενεργοποίησης με πλάσμα αέρα των παραλληλόγραμμων πηγαδιών PDMS, αποτελούμενων από ένα υπόστρωμα PDMS επικαλυμένο με λεπτό πλαίσιο PDMS (≈ 0.5 mm). a) Απευθείας έκθεση στο πλάσμα του εσωτερικού του πηγαδιού PDMS. b) Μέσω διάχυσης κατεργασία πλάσματος του εσωτερικού του πηγαδιού μέσω των 4 διανοιγμένων οπών στο επιπλέον επίπεδο PDMS – κάλυμμα του πηγαδιού.

Η σταθερότητα της επιφανειακής τροποποίησης των κατεργασμένων σε πλάσμα αέρα επιφανειών PDMS (απευθείας ενεργοποίηση) και των λεπτών στρωμάτων SiO_2 μετά την επικάλυψή τους με κολλαγόνο, ελέγχθηκε

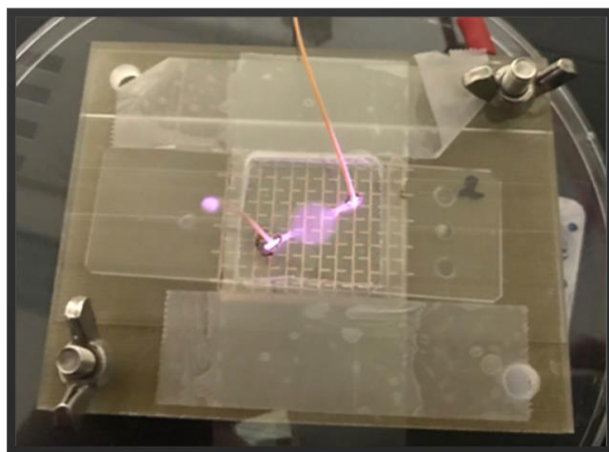
για χρονικό διάστημα 7 ημερών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σχέση με αντίστοιχες κατεργασμένες σε πλάσμα PDMS και SiO₂ επιφάνειες χωρίς την επικάλυψη κολλαγόνου, ενώ για κάθε είδος επιφάνειας χρησιμοποιήθηκαν 2 αντίγραφα. Δεδομένου ότι το SiO₂ αποτελεί κατά 73.7% το βασικό συστατικό του γυαλιού, οι επιφάνειες PDMS και SiO₂ προσεγγίζουν σημαντικά το εσωτερικό του μικροθαλάμου καλλιέργειας, αποτελούμενο από PDMS και γυαλί.

4.2.3 Χαρακτηρισμός επιφανειών και λεπτών στρωμάτων

4.2.3.1 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η ταυτοποίηση της χημικής σύστασης των μικροθαλάμων PDMS που κατεργάστηκαν σε ατμοσφαιρικό πλάσμα και πλάσμα αέρα πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy - XPS) (βλ. Κεφάλαιο 2). Συγκεκριμένα, οι μικροθάλαμοι καλλιέργειας PDMS, κόπηκαν προγενέστερα κατά μήκος του επιπέδου του μικροθαλάμου, αποκαλύπτοντας έτσι το εσωτερικό τους προς ανάλυση. Ο κατεργασμένος σε πλάσμα αέρα μικροθάλαμος είχε εκτεθεί απευθείας στο πλάσμα αέρα κατά το στάδιο της συγκόλλησης. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν την ίδια μέρα της κατεργασίας με πλάσμα - ατμοσφαιρικό ή αέρα (day 0), και επιπλέον για το ατμοσφαιρικό, την 1^η (day 1), ενώ ως αναφορά χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστο PDMS. Όλες οι επιφάνειες κόπηκαν σε διαστάσεις 1 x 1 cm² προς διευκόλυνση των μετρήσεων. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις XPS πραγματοποιήθηκαν στη διάταξη SPECS Phoibos100, εφοδιασμένη με μονοχρωματική πηγή **Al Kα** ακτίνων X στα 1486.6 eV και ομόκεντρο ημισφαιρικό αναλυτή. Το φασματόμετρο βαθμονομήθηκε χρησιμοποιώντας δείγματα αργύρου, χαλκού και χρυσού, με τις θέσεις κορυφής των Ag3d_{5/2}, Cu2p_{3/2} και Au4f_{7/2} να καθορίζονται στα 368,3 eV, 932,7 eV και 84 eV, αντίστοιχα. Τα φάσματα XPS συλλέχθηκαν υπό γωνία $\theta_m=38^\circ$, και με ενέργεια διέλευσης 7 eV. Όλες οι μετρήσεις και αναλύσεις XPS πραγματοποιήθηκαν από τη Δρ. Ευαγγελία Ξενογιαννοπούλου στο εργαστήριο του Ερευνητή Α' Αθανάσιου Δημουλά.

Στο ατμοσφαιρικό πλάσμα οι μικροθάλαμοι κατεργάστηκαν σε συνθήκες τάσης 2 kV, ρεύματος 7.8 mA (ισχύς 15.6 W), συχνότητας 140 kHz, ροής He 650 sccm και για χρόνο 5 min. Ενδεικτικά, στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται η *in situ* δημιουργία πλάσματος εντός του μικροθαλάμου, τοποθετημένου στη συσκευή ατμοσφαιρικού πλάσματος. Στο πλάσμα αέρα οι μικροθάλαμοι ενεργοποιήθηκαν στον αντιδραστήρα Covance multi-system στις συνθήκες συνθήκες που αναφέρονται στην Παράγραφο 4.2.2.



Σχήμα 4. 4. Φωτογραφία της συσκευής ατμοσφαιρικού πλάσματος με ενσωματωμένο το μικροθάλαμο, όπου απεικονίζεται η *in situ* δημιουργία πλάσματος στο εσωτερικό του μικροθαλάμου.

4.2.3.2 Μελέτη κλιματιστικής γήρανσης PDMS

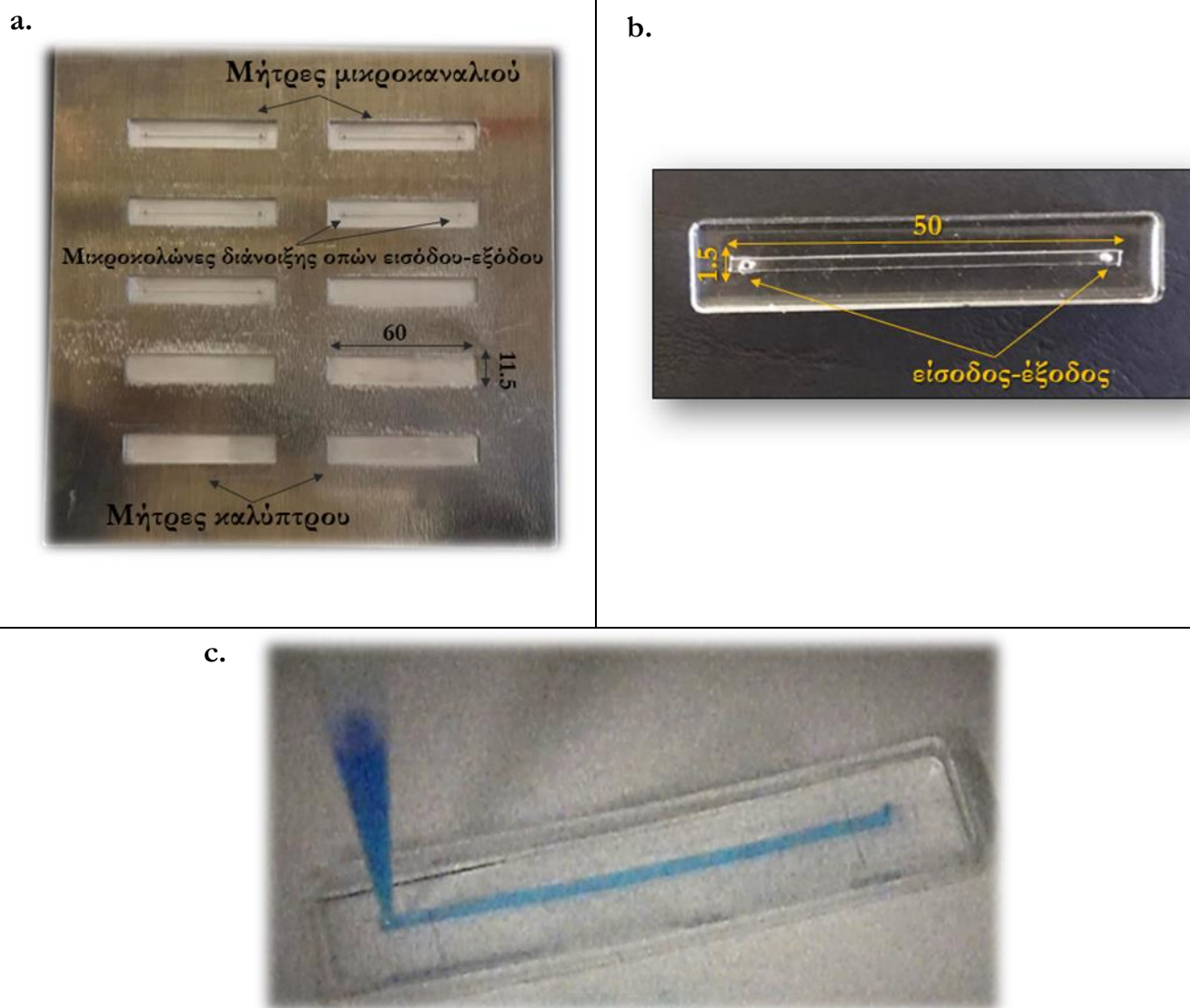
Ως γνωστόν, το PDMS είναι επιρρεπές στην κλιματιστική γήρανση, παρουσιάζοντας βραχυπρόθεσμη υδροφιλικότητα μετά την κατεργασία του στο πλάσμα [19]. Σε αυτό το πλαίσιο, διερευνάται η διάρκεια της υδροφιλοποίησης του μετά την έκθεση σε πλάσμα, με τον υπολογισμό της ταχύτητας τριχοειδούς άντλησης του νερού μέσα από μικροκανάλια PDMS. Στη μελέτη αυτή, συγκρίνονται μεταξύ τους οι δύο μέθοδοι κατεργασίας με πλάσμα, η *in situ* κατεργασία με ατμοσφαιρικό πλάσμα στο εσωτερικό των μικροκαναλιών, και η απευθείας ενεργοποίηση με πλάσμα αέρα υπό χαμηλή πίεση.

Τα μικροκανάλια PDMS που χρησιμοποιήθηκαν, αποτελούνται από δύο επίπεδα, όπου το ένα φέρει σχηματισμένο το μικροκάνάλι και το δεύτερο χρησιμοποιείται για να το καλύπτει. Τα επίπεδα αυτά προέκυψαν μέσω της διαδικασίας αντιγραφής μήτρας (replica molding), μετά από έγχυση του προπολυμερούς PDMS σε κοινή μήτρα αλουμινίου, κατασκευασμένη με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC - Computerized Numerical Control Micromachining). Η μήτρα αλουμινίου φέρει επιμέρους μήτρες και για τα δύο επίπεδα του μικροκαναλιού, δίνοντας τη δυνατότητα παρασκευής πέντε στο σύνολό τους μικροκανάλια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.5a. Πιο συγκεκριμένα, κάθε επίπεδο PDMS είναι διαστάσεων $60 \times 11.5 \text{ mm}^2$, και ύψους 3 mm και 2 mm, για το επίπεδο με το μικροκάνάλι και για το κάλυμμά του, αντίστοιχα. Το ίδιο το μικροκάνάλι έχει διαστάσεις (μήκος x πλάτος x βάθος) $50 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$, με συνολικό όγκο περίπου 38 μL , και δύο οπές διαμέτρου 0.7 mm για την είσοδο και την έξοδό του, σύμφωνα και με το Σχήμα 4.5b.

Τα μικροκανάλια κατεργάστηκαν σε ατμοσφαιρικό πλάσμα σε συνθήκες τάσης 2 kV, ρεύματος 14.5 mA (ισχύς 29 W), συχνότητας 140 kHz, ροής He 600 sccm και χρόνου 2 min. Όσα μικροκανάλια ενεργοποιήθηκαν σε πλάσμα αέρα, εκτέθηκαν σε αυτό κατά τη συγκόλλησή τους, στις συνθήκες που αναφέρονται στην Παράγραφο 4.2.2. Εκτός των κατεργασμένων μικροκαναλιών, ενσωματώθηκαν ως αναφορά μικροκανάλια που είχαν συγκολληθεί δύο εβδομάδες πριν χρήση τους, επιδρώντας στην υδροφιλικότητά τους. Η γήρανση των καναλιών εξετάστηκε μέχρι και 7 ημέρες, και συγκεκριμένα, υπολογίζοντας την ταχύτητα τριχοειδούς άντλησης την ίδια μέρα της κατεργασίας σε πλάσμα (day 0), και ακολούθως, την 1^η, 2^η, 3^η, 6^η και 7^η μετά την κατεργασία.

Για την εύρεση της ταχύτητας ροής, στην είσοδο του μικροκαναλιού τοποθετείται ρύγχος πιπέτας με χρωματισμένο μπλε απιονισμένο νερό (προς ευκολία απεικόνισης), το οποίο μέσω τριχοειδών δυνάμεων

εισέρχεται και κινείται μέσα στο κανάλι. Στο Σχήμα 4.5c εμφανίζεται στιγμιότυπο από την πειραματική διαδικασία. Πραγματοποιήθηκε παράλληλη καταγραφή σε βίντεο, για κάθε μικροκανάλι και για κάθε ημέρα ξεχωριστά. Τα βίντεο αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Tracker 5.1.5, όπου χρησιμοποιώντας ως αναφορά μια σταθερή διάσταση, τα 11.5 mm πλάτος των καναλιών, προσδιορίστηκε η απόσταση που διανύεται σε συγκεκριμένο χρόνο, αποδίδοντας έτσι την ταχύτητα ροής μέσα σε κάθε κανάλι. Εκτιμάται συστηματικό σφάλμα ταχύτητας λόγω βαθμονόμησης μήκους στα $\pm 3 - 4$ mm/s.



Σχήμα 4. 5. Μελέτη γήρανσης PDMS. a) Μήτρα αλουμινίου για την κατασκευή των μικροκαναλιών PDMS. Περιλαμβάνει σύνολο 10 επιμέρους μήτρες, 5 για τα μικροκανάλια, και 5 για το κάλυμμα των μικροκαναλιών. Κάθε επιμέρους μήτρα έχει διαστάσεις 60 x 11.5 mm², ενώ οι μήτρες των μικροκαναλιών φέρουν επιπλέον δύο μικροκολώνες διαμέτρου 0.7 mm για τη διάνοιξη οπών εισόδου-εξόδου στο μικροκανάλι. b) Μικροκανάλι PDMS διαστάσεων 50 x 1.5 mm², με δύο οπές εισόδου-εξόδου. c) Φωτογραφία στιγμιότυπου πειραματικής διαδικασίας, με το ρύγχος της πιπέτας στην είσοδο του μικροκαναλιού για τη μετακίνηση μέσω τριχοειδών δυνάμεων προς την έξοδο. Οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm.

4.2.3.3 Μέτρηση γωνιών επαφής

Οι ιδιότητες διαβροχής των επιφανειών και των λεπτών επιστρώσεων ποσοτικοποιήθηκαν με μετρήσεις στατικής γωνίας επαφής νερού (Water Static Contact Angle – WSCA) στο σύστημα DSA30 Drop Shape Analyzer (βλ. Κεφάλαιο 2). Συνοπτικά, σταγόνα 2 μL απιονισμένου νερού εναποτίθεται στην επιφάνεια και η στατική γωνία εξάγεται βάσει μοντέλου επαπτομενικής προσαρμογής. Κάθε μέτρηση συνοδεύεται από συστηματικό σφάλμα 2°. Οι γωνίες επαφής που παρουσιάζονται στο εν λόγω κεφάλαιο είναι οι μέσες τιμές τουλάχιστον τριών μετρήσεων σε διαφορετικά σημεία της κάθε επιφάνειας, ακολουθούμενες από το \pm τυπικό τους σφάλμα.

4.2.3.4 Φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός

Το πάχος της λεπτής επίστρωσης κολλαγόνου τύπου I μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (White Light Reflectance Spectroscopy - WLRS), μια μη καταστρεπτική οπτική μέθοδο υψηλής ακριβείας. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της, το πειραματικό φάσμα ανάκλασης από την επιφάνεια μέτρησης προσεγγίζεται με το θεωρητικό φάσμα που προκύπτει από τη σχετική εξίσωση συμβολής, δίνοντας έτσι ακριβείς μετρήσεις πάχους. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε ένα εργαλείο FR-pRo UV/NIR (ThetaMetris SA, Αθήνα, Ελλάδα), το οποίο λειτουργεί στη φασματική περιοχή 200 - 1100 nm, και είναι εξοπλισμένο με μία πηγή φωτός δευτερίου/βολφραμίου, ένα μικροσκοπικό φασματόμετρο υψηλής ανάλυσης και με κατάλληλο ανιχνευτή ανάκλασης [57].

Προς διευκόλυνση των μετρήσεων, το πάχος του κολλαγόνου μετρήθηκε σε υποστρώματα πυριτίου (Si), που είτε ήταν επιστρωμένα δια περιστροφής με 80% διαλυμένο σε τολουόλιο PDMS για το σχηματισμό μιας λεπτής στρώσης PDMS, είτε έφεραν λεπτό στρώμα διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2), θερμικά ανεπτυγμένο. Μετρώντας στα λεπτά στρώματα PDMS και SiO_2 , προσεγγίζεται σημαντικά το πραγματικό πάχος της επίστρωσης κολλαγόνου στο εσωτερικό των μικροθαλάμων καλλιέργειας.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τις επιφάνειες PDMS, το πάχος του κολλαγόνου μετρήθηκε σε κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες, σε σύγκριση με ακατέργαστες. Το πάχος της στρώσης PDMS στα υποστρώματα Si μετρήθηκε πριν και μετά την επικάλυψη κολλαγόνου, με την εξαγόμενη διαφορά τους να είναι ίση με το πάχος της επίστρωσης κολλαγόνου. Δύο τεταρτημόρια ενός 4" δισκιδίου Si χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για τις επιφάνειες PDMS που υποβλήθηκαν σε πλάσμα αέρα, ενώ ένα τεταρτημόριο για τις ακατέργαστες. Σε κάθε τεταρτημόριο, σημειώθηκαν 8 περιοχές και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 6 μετρήσεις πριν και μετά την επίστρωση με κολλαγόνο, με τις εξαγόμενες μεταβολές πριν και μετά να προκύπτουν από κάθε περιοχή ξεχωριστά. Το πάχος του κολλαγόνου λαμβάνεται ως η μέση τιμή όλων των (πριν και μετά) μεταβολών στις τιμές πάχους, συνοδευόμενη από το τυπικό της σφάλμα.

Αντίστοιχα, για την εκτίμηση του πάχους του κολλαγόνου στο υπόστρωμα που μοιάζει με γυαλί, χρησιμοποιήθηκε ένα τεταρτημόριο 4" δισκιδίου Si, που έφερε το θερμικά ανεπτυγμένο λεπτό στρώμα SiO_2 . Λήφθηκαν τουλάχιστον 16 μετρήσεις πριν και μετά την επίστρωση κολλαγόνου, με το πάχος του κολλαγόνου να προκύπτει ως η μεταβολή των τιμών του μέσου πάχους (πριν και μετά).

4.2.4 Επιφανειακή τροποποίηση με κολλαγόνο τύπου I

Κολλαγόνο τύπου I χρησιμοποιήθηκε σε ανοιχτές επιφάνειες PDMS και στα λεπτά στρώματα SiO_2 για τη μελέτη της ακινητοποίησής του και τη μέτρηση του πάχους του, καθώς και στο εσωτερικό των μικροθαλάμων

καλλιέργειας για τη διερεύνηση της ανάπτυξης MSCs. Οι ανοιχτές επιφάνειες καλύφθηκαν με επαρκή ποσότητα ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης κάλυψή τους, ενώ οι μικροθάλαμοι γέμισαν ώστε να καλύπτεται όλος ο όγκος τους ($\approx 30 \mu\text{L}$). Σε κάθε περίπτωση, το κολλαγόνο επώαστηκε στους 25°C για 2 h, και στη συνέχεια εκπλύθηκε δύο φορές με θρεπτικό υλικό, απουσία βόειου εμβρυϊκού ορού, με την εξαίρεση των μετρήσεων πάχους κολλαγόνου, όπου οι επιφάνειες PDMS και SiO_2 εκπλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Να σημειωθεί εδώ, ότι σε όλες τις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες PDMS, η επίστρωση με κολλαγόνο πραγματοποιήθηκε 2 h μετά την έκθεσή τους στο πλάσμα. Ακολούθως, οι ανοιχτές επιφάνειες στεγνώθηκαν με πεπιεσμένο αέρα, ενώ στους μικροθαλάμους έγινε η εισαγωγή των MSCs.

4.2.5 Καλλιέργεια και χαρακτηρισμός MSCs εντός μικροθαλάμων

Για να διερευνηθεί κατά πόσο η κατεργασία με πλάσμα μπορεί να συντηρήσει μακροπρόθεσμα την καλλιέργεια κυττάρων σε μικροευστονικές διατάξεις, χρησιμοποιήθηκαν μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα ομφάλιου λώρου (Umbilical Cord MSCs - UC-MSCs), τα οποία δωρήθηκαν από την «Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος» (Ελ.Τ.Οπ.Α, Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α, Αθήνα, Ελλάδα), η οποία πραγματοποίησε την απομόνωση. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας των MSCs σε φλάσκες παρουσιάζεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2. Η καλλιέργεια των MSCs πραγματοποιήθηκε σε κατεργασμένους με πλάσμα αέρα και επικαλυμένους με κολλαγόνο μικροθαλάμους καλλιέργειας. Υπενθυμίζεται ότι οι μικροθάλαμοι ενεργοποιήθηκαν με απευθείας έκθεση στο πλάσμα αέρα κατά το στάδιο της συγκόλλησης, 2 h μετά την οποία ακολούθησε η επίστρωσή τους με κολλαγόνο. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με μη ενεργοποιημένους και απουσία κολλαγόνου μικροθαλάμους, οι οποίοι είχαν συγκολληθεί τουλάχιστον ένα μήνα πριν τη χρήση τους, στερώντας τους έτσι τις υδρόφιλες ιδιότητές τους. Δύο αντίγραφα χρησιμοποιήθηκαν για κάθε είδος μικροθαλάμου για λόγους επαναληψιμότητας, που στο σύνολό τους εκτέθηκαν σε ακτινοβολία UV για 30 min. Ακολούθησε η είσοδος των MSCs αρχικής συγκέντρωσης $2.7 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ στους μικροθαλάμους, τα οποία επώαστηκαν σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας με 5% CO_2 και θερμοκρασία 37°C . Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 24 h μέχρι το τέλος του πειράματος στις 5 ημέρες. Η παρατήρηση των MSCs στους μικροθαλάμους πραγματοποιούνταν καθημερινά με το ανεστραμμένο μικροσκόπιο Leica DM IRE2 στις εγκαταστάσεις του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.

Ως μια μέθοδος ποσοτικοποίησης του βαθμού εξάπλωσης των MSCs στους μικροθαλάμους, η επιφανειακή τους κάλυψη με στρωματικό ιστό μετρήθηκε με χρησιμοποιώντας ανάλυση εικόνας. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο φιλτραρίσματος τυπικής απόκλισης προσδιορίστηκε η επιφάνεια κάλυψης με ιστό για αντιπροσωπευτικές ημέρες ανάπτυξης, δηλαδή την ημέρα 1, 3 και 5, και εκφράστηκε ως ποσοστό της συνολικής επιφάνειας του μικροθαλάμου.

4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.3.1 Ανάλυση φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η στοιχειομετρική ανάλυση XPS όλων των επιφανειών PDMS, κατεργασμένων και μη, ανέδειξε την παρουσία άνθρακα, οξυγόνου και πυριτίου, όπως ήταν αναμενόμενο. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται το ατομικό ποσοστό (atomic percentage – at.%) των στοιχείων αυτών για κάθε δείγμα και ημέρα (για το ατμοσφαιρικό πλάσμα), υπολογισμένο από το εμβαδόν κάτω από κάθε στοιχειακή κορυφή, και διορθωμένο από τον ελάχιστο συντελεστή ατομικής ευαισθησίας της κάθε περιοχής. Βάσει της στοιχειομετρίας του PDMS

$((C_2H_6SiO)_n)$, αναμενόταν τα ατομικά ποσοστά στο ακατέργαστο PDMS να είναι 50% C, 25% O, και 25% Si [58], ενώ μετρήθηκαν 43.8%, 35.6% και 20.6%, αντίστοιχα. Η εν λόγω αύξηση στη συγκέντρωση του οξυγόνου μπορεί να αποδοθεί σε ήπια οξειδωση της ακατέργαστης επιφάνειας λόγω έκθεσης στην ατμόσφαιρα, ή ακόμη και σε σφάλματα στους εμπειρικούς συντελεστές ευαισθησίας. Σε κάθε περίπτωση όμως, οι κατεργασμένες σε πλάσμα επιφάνειες εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά οξυγόνου.

Συγκεκριμένα, την day 0, η κατεργασμένη σε πλάσμα αέρα εμφανίζει σημαντικά αυξημένο ποσοστό οξυγόνου (48.8%) και αντίστοιχα μειωμένο ποσοστό άνθρακα (29.6%), ενώ όπως αναμενόταν, το ποσοστό του πυριτίου, έχει παραμείνει σχετικά σταθερό (21.6%) σε σχέση με το ακατέργαστο PDMS. Την ίδια ημέρα, η κατεργασμένη σε ατμοσφαιρικό πλάσμα παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στο ποσοστό του οξυγόνου (53.6%) σε σχέση με την κατεργασμένη σε πλάσμα αέρα, και ελαφρώς μικρότερο ποσοστό άνθρακα (24.6%), με το πυρίτιο να παραμένει πρακτικά το ίδιο (21.8%). Προχωρώντας στην day 1 για το ατμοσφαιρικό πλάσμα, τα ποσοστά των στοιχείων δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές μεταβολές σε σχέση με την day 0, εμφανίζοντας τιμές οξυγόνου 53.4%, άνθρακα 22.6% και πυριτίου 24%.

Συνολικά, από τη στοιχειομετρική ανάλυση, προκύπτει ότι το ατμοσφαιρικό πλάσμα αποδίδει μεγαλύτερη οξειδωση σε σχέση με το πλάσμα αέρα, χωρίς όμως να σημειώνεται σημαντική αύξηση, καθώς την day 0 το ποσοστό το οξυγόνου στο ατμοσφαιρικό (53.6%) σε σχέση με το πλάσμα αέρα (48.8%) δεν ξεπερνά το 5%. Επιπλέον, ως αρχικό συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί ότι με την κατεργασία σε ατμοσφαιρικό πλάσμα, η στοιχειομετρία του PDMS παραμένει η ίδια, με την οξειδωσή του να διατηρείται την επόμενη μέρα.

Πίνακας 4. 1. Ποσοτική ανάλυση XPS ατομικών ποσοστών (at.%) PDMS, ακατέργαστου και κατεργασμένου σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό, την ημέρα της κατεργασίας (day 0) και την επομένη (day 1) για το ατμοσφαιρικό.

Ημέρα	Επιφάνεια PDMS	at.%		
		C	O	Si
day 0	Ακατέργαστη	43.8	35.6	20.6
	Πλάσμα αέρα	29.6	48.8	21.6
	Ατμοσφαιρικό πλάσμα	24.6	53.6	21.8
day 1	Ατμοσφαιρικό πλάσμα	22.6	53.4	24.0

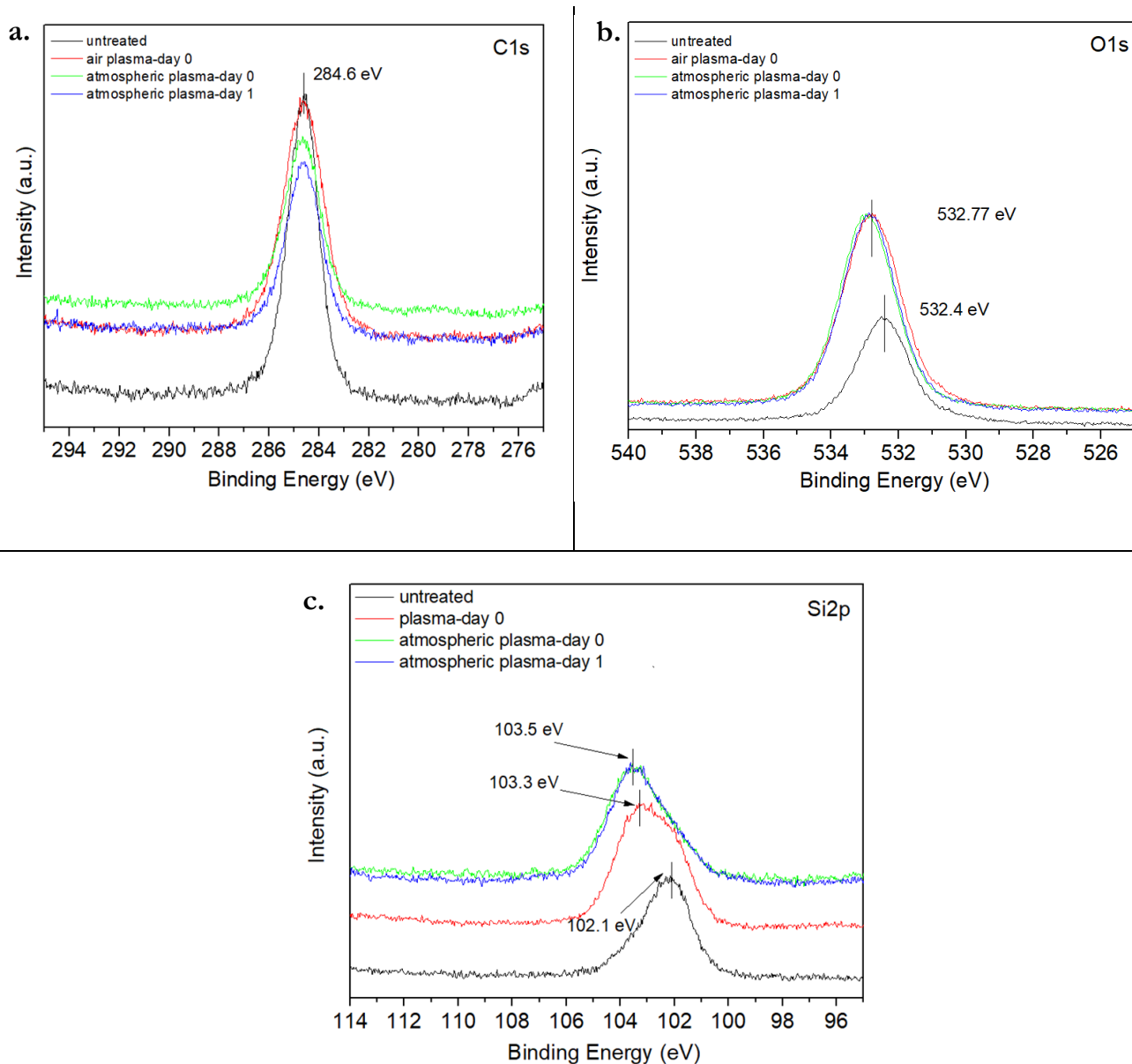
Προς λεπτομερέστερη ανάλυση, το Σχήμα 4.6 παρουσιάζει τα φάσματα XPS των περιοχών C1s, O1s και Si2p για την ακατέργαστη και τις κατεργασμένες επιφάνειες PDMS σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό. Λόγω στατικής φόρτισης των δειγμάτων, οι ενέργειες δέσμευσης όλων των φασμάτων διορθώθηκαν σε σχέση με μία σταθερή κορυφή, το σήμα C1s για υδρογονάνθρακες, που βρίσκεται στα 284,6 eV (Σχήμα 4.6a) [59]. Η κορυφή των 284,6 eV, που αντιστοιχεί στην ομάδα άνθρακα του μεθυλίου ($-CH_3$) είναι κυρίαρχη τόσο στο ακατέργαστο, όσο και στα κατεργασμένα δείγματα, ως συστατικό του PDMS. Όμως, στα κατεργασμένα δείγματα με πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό την day 0, εμφανίζεται μικρή πλάτυνση της κορυφής, καθώς και επιμέρους υψηλότερες ενέργειες δέσμευσης, που συνδέονται με την ύπαρξη οξειδωμένου άνθρακα στα 285.5 eV, φθάνοντας και σε υψηλότερες ενέργειες στα 290 eV, που αντιστοιχούν στον καρβοξυλικό άνθρακα [60]. Την day 1 της κατεργασίας με ατμοσφαιρικό, η πλάτυνση της κορυφής παρουσιάζει μικρή αύξηση, όπως αντίστοιχα και η παρουσία οξειδωμένου άνθρακα. Ενδέχεται η αύξηση αυτή στην οξειδωση του άνθρακα να

οφείλεται στην επιπλέον παραμονή του δείγματος στην ατμόσφαιρα για μία ημέρα και την ένωση σπασμένων δεσμών οξυγόνου με τον άνθρακα.

Για την περιοχή O1s (Σχήμα 4.6b), η κορυφή μετατοπίζεται από τα 532.4 eV του ακατέργαστου PDMS, περίπου στα 532.8 eV στα κατεργασμένα PDMS και για τα δύο είδη πλάσματος και τις δύο ημέρες. Γενικώς, οι μετατοπίσεις των κορυφών στην ενέργεια δέσμωσης των φωτοηλεκτρονίων είναι ενδεικτικές διαφορετικών ενεργειακών καταστάσεων του ίδιου στοιχείου, αποκαλύπτοντας την ύπαρξη άλλων χημικών ενώσεων του ίδιου στοιχείου. Σε αυτό το πλαίσιο, η θέση κορυφής των 532,8 eV πιθανότατα αντιπροσωπεύει την ύπαρξη SiO₂ [61]. Επιπλέον, η διεύρυνση της κορυφής για τα κατεργασμένα PDMS, υποδηλώνει επίσης μια αύξηση στις χημικές καταστάσεις του οξυγόνου, που υποδεικνύει την παρουσία άλλων ενώσεων, που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί [60]. Να σημειωθεί ότι το ατμοσφαιρικό πλάσμα εμφανίζει παρόμοια εικόνα φάσματος O1s και τις δύο ημέρες, που επιβεβαιώνει διατήρηση της οξειδωσης του PDMS.

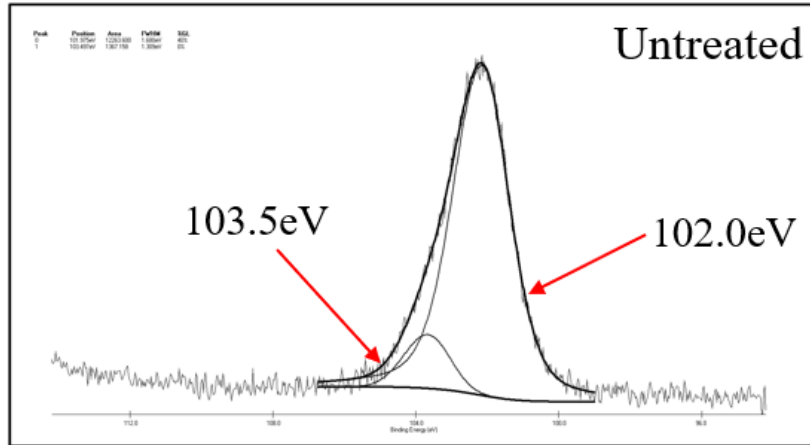
Παρ' όλα αυτά, το μεγαλύτερο ποσοστό οξειδωμένων ειδών στις κατεργασμένες επιφάνειες PDMS εντοπίζεται από την περιοχή Si2p (Σχήμα 4.6c). Το χαρακτηριστικό σήμα Si2p σπιν-τροχιάς στο ακατέργαστο PDMS εμφανίζεται στα 102.1 eV, το οποίο παρουσιάζεται μετατοπισμένο για το κατεργασμένο σε πλάσμα αέρα PDMS στα 103.3 eV, και στα 103.5 eV για το κατεργασμένο στο ατμοσφαιρικό και για τις δύο ημέρες (day 0, day 1). Ανάλυση της περιοχής Si2p για τα όλα τα δείγματα οδήγησε σε δύο συνιστώσες κορυφές, μια πρωταρχική στα 101.9 – 102.1 eV και μια δευτερεύουσα στα 103.3 – 103.6 eV, σε αντιστοιχία και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία [43,62]. Η πρωταρχική κορυφή αντιστοιχεί στην κορυφή Si, εγγενής της δομής του PDMS, και είναι ενδεικτική ένωσης του πυριτίου με μικρότερο αριθμό οξυγόνων (=Si(O)₁₋₂). Η δευτερεύουσα κορυφή αντιστοιχεί σε συστατικό SiO_x, δηλωτικό της ύπαρξης μιας κατάστασης που προσομοιάζει περισσότερο σε οξείδιο του πυριτίου, και υποδεικνύει την ένωση του πυριτίου με μεγαλύτερο αριθμό οξυγόνων (=Si(O)₃₋₄) [59].

Παρατηρώντας τα Σχήματα 4.7(a-d) είναι εμφανές ότι με την κατεργασία πλάσματος – αέρα και ατμοσφαιρικού - , η κορυφή Si μειώνεται σε ένταση και αντικαθίσταται από την κορυφή SiO_x, που αντίθετα αυξάνεται και αντιστοιχεί κυρίως σε συστατικό SiO₄ στα 103.3 eV για το πλάσμα αέρα, και στα 103.4 – 103.5 eV για το ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις δύο ημέρες. Στο πλάσμα αέρα η κορυφή SiO_x είναι μικρότερης έντασης και εμβαδού σε σχέση με το ατμοσφαιρικό πλάσμα και των δύο ημερών, γεγονός που σημαίνει μικρότερο σχηματισμό οξειδίου πυριτίου. Το ατμοσφαιρικό πλάσμα δεν εμφανίζει αξιοσημείωτη μεταβολή στην ένταση της κορυφής SiO_x, υποδεικνύοντας και πάλι διατήρηση της οξειδωσης του PDMS.

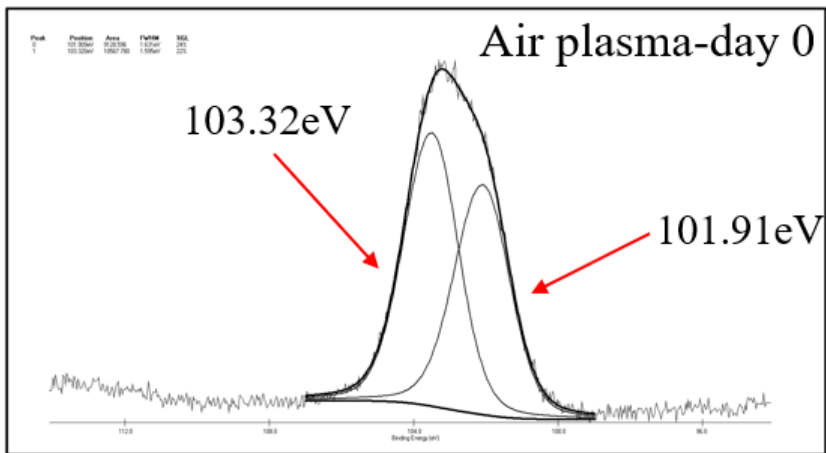


Σχήμα 4. 6. Φάσματα XPS των περιοχών C1s, O1s και Si2p για την ακατέργαστη επιφάνεια PDMS, την κατεργασμένη με πλάσμα αέρα και με ατμοσφαιρικό. a) Η κορυφή 284.6 eV, χαρακτηριστική της παρουσίας -CH₃, παρουσιάζεται διευρυμένη στις κατεργασμένες επιφάνειες, ενώ εντοπίζονται και επιμέρους υψηλότερες ενέργειες δέσμευσης (μέχρι τα 290 eV), που υποδεικνύουν την ύπαρξη οξειδωμένου άνθρακα. b) Οι κατεργασμένες επιφάνειες σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό εμφανίζουν κορυφή SiO₂ περίπου στα 532,8 eV, ως ένδειξη οξείδωσης της επιφάνειας PDMS. c) Μετατόπιση της κορυφής Si2p σπιν-τροχιάς από τα 102.1 eV στο ακατέργαστο PDMS, στα 103.3 eV για το κατεργασμένο σε πλάσμα αέρα, και στα 103.5 eV για το ατμοσφαιρικό την 1^η και 2^η ημέρα.

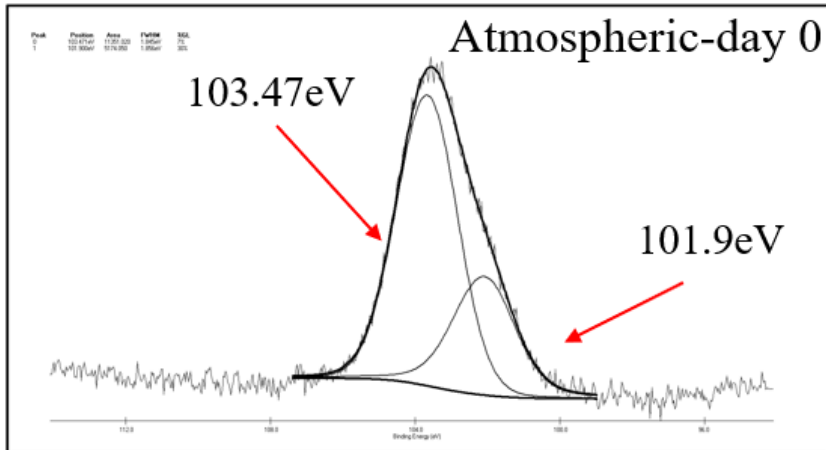
a.

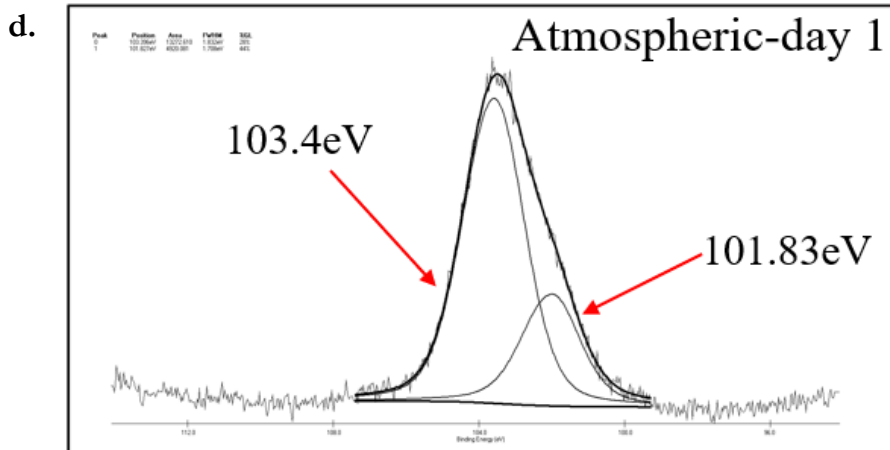


b.



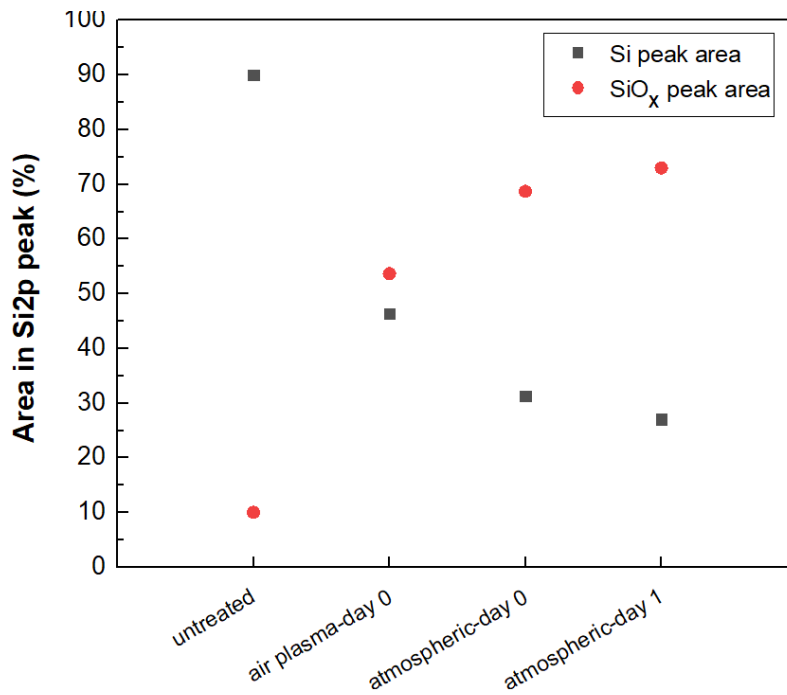
c.





Σχήμα 4. 7. Ανάλυση της περιοχής Si2p για a) την ακατέργαστη επιφάνεια PDMS, b) την κατεργασμένη με πλάσμα αέρα και c) την κατεργασμένη με ατμοσφαιρικό πλάσμα την 1^η και d) τη 2^η ημέρα, κατέληξε στην ύπαρξη δύο επιμέρους κορυφών, μία κύρια στα 101.9 – 102.1 eV, που αντιστοιχεί στην ένωση (=Si(O)₁₋₂), χαρακτηριστική του PDMS, και μια δευτερεύουσα στα 103.3 – 103.6 eV, ενδεικτική παρουσίας κυρίως SiO₄. Με την κατεργασία πλάσματος η δευτερεύουσα κορυφή αυξάνεται σε ένταση, με τη μεγαλύτερη ένταση να εντοπίζεται για κατεργασία στο ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις 2 ημέρες.

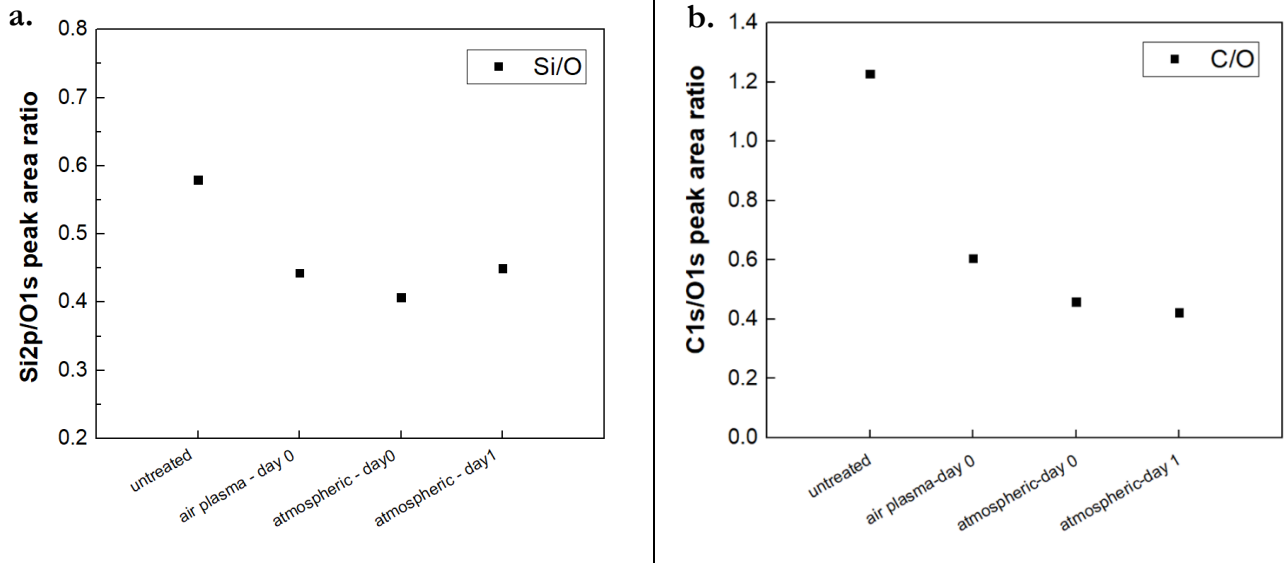
Προς ποσοτικοποίηση του ακριβούς ποσοστού συνεισφοράς κάθε κορυφής στην περιοχή Si2p, υπολογίζονται τα εμβαδά των δύο συνιστωσών κορυφών Si και SiO_x για όλα τα δείγματα. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 4.8, στο ακατέργαστο PDMS, η κορυφή Si κυριαρχεί κατά περίπου 90%, αφήνοντας ένα ποσοστό μόλις 10% για την κορυφή SiO_x. Στο πλάσμα αέρα, η συνεισφορά του οξειδίου SiO_x αυξάνεται στο 55%, ενώ την ίδια μέρα (day 0) στο ατμοσφαιρικό φθάνει στο 70%. Την επόμενη μέρα, η συνεισφορά του οξειδίου στο κατεργασμένο με ατμοσφαιρικό πλάσμα PDMS παραμένει σχεδόν σταθερή αγγίζοντας περίπου το 75%.



Σχήμα 4. 8. Ποσοστό συνεισφοράς συνιστωσών κορυφών Si και SiO_x της περιοχής Si2p για την ακατέργαστη και τις κατεργασμένες σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις 2 ημέρες επιφάνειες PDMS. Από 10% συνεισφορά της κορυφής SiO_x στο ακατέργαστο PDMS, αυξάνεται σε 55% για το πλάσμα αέρα, και 70% και 75% για το ατμοσφαιρικό την day 0 και day 1, αντίστοιχα.

Περαιτέρω, υπολογίζονται οι λόγοι εμβαδών Si/O και C/O των στοιχείων Si και C ως προς το O για τα ακατέργαστα και κατεργασμένα δείγματα PDMS (Σχήμα 4.9), όπου το εμβαδόν κάθε κορυφής διαιρείται με τον αντίστοιχο ατομικό συντελεστή ευαισθησίας (s.f.). Για παράδειγμα, ο λόγος Si/O υπολογίζεται ως εξής: $Si/O = (Si_{area}/Si_{s.f.}) / (O_{area}/O_{s.f.})$, ενώ οι ατομικοί συντελεστές ευαισθησίας κάθε στοιχείου είναι Si2p = 0.27, C1s = 0.25 και O1s = 0.66.

Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρούμε ότι οι λόγοι Si/O και C/O στα κατεργασμένα με πλάσμα δείγματα μειώνονται σε σχέση με τα ακατέργαστα, γεγονός που αποδεικνύει τη δημιουργία οξειδίου στην επιφάνειά τους. Συγκεκριμένα, εστιάζοντας στο λόγο Si/O, από το 0.6 για το ακατέργαστο PDMS, μειώνεται περίπου στο 0.45 για το κατεργασμένο σε πλάσμα αέρα, με σχεδόν ίδιες τιμές για το κατεργασμένο στο ατμοσφαιρικό και τις δύο ημέρες, με μικρή μείωση την ίδια μέρα (day 0) στο 0.4, και την επομένη επαναφορά στο 0.45. Ως προς το λόγο C/O, από το 1.2 για το ακατέργαστο, μειώνεται κατά 50% κατεβαίνοντας στο 0.6 για το κατεργασμένο σε πλάσμα αέρα, και με περισσότερο εμφανή μείωση για το κατεργασμένο στο ατμοσφαιρικό στο 0.5 την day 0 και 0.4 την day 1.

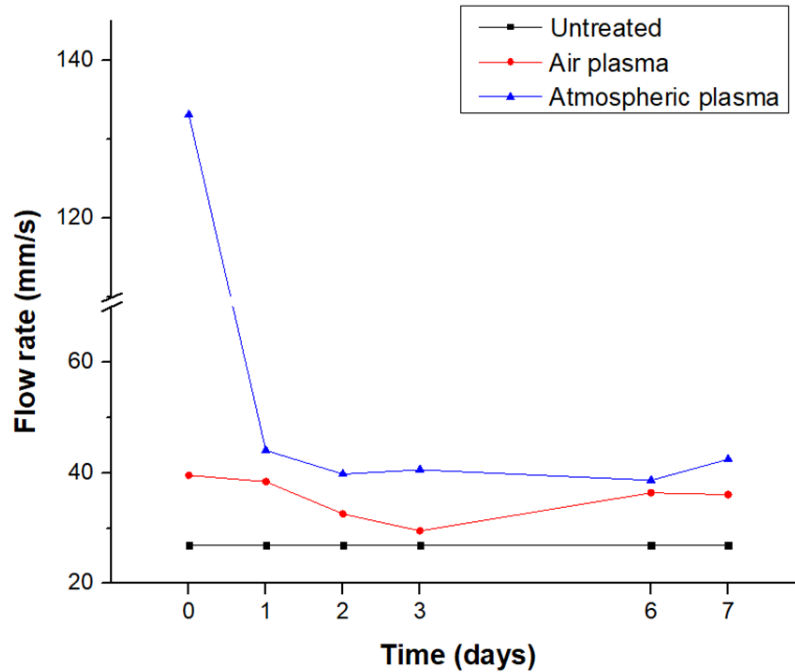


Σχήμα 4. 9. Λόγοι εμβαδών a) Si/O και b) C/O για την ακατέργαστη και τις κατεργασμένες σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα και τις 2 ημέρες επιφάνειες PDMS. Οι λόγοι μειώνονται στα κατεργασμένα δείγματα, αναδεικνύοντας την οξείδωσή τους.

Συμπερασματικά, είναι εμφανές τόσο από τα ατομικά ποσοστά των στοιχείων C, O, Si, όσο και από τα φάσματα των περιοχών C1s, O1s και Si2p ότι το πλάσμα αέρα προκαλεί οξείδωση της επιφάνειας του PDMS. Το ατμοσφαιρικό πλάσμα παρουσιάζεται να οξειδώνει σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το πλάσμα αέρα την επιφάνεια του PDMS, όπως φαίνεται κυρίως από τη στοιχειομετρία, αλλά και το φάσμα της περιοχής Si2p. Τέλος, από τη στοιχειομετρία και τα φάσματα των περιοχών O1s και Si2p προκύπτει ότι το ατμοσφαιρικό πλάσμα μπορεί να διατηρήσει σχεδόν ίδιο βαθμό οξείδωσης της επιφάνειας PDMS μέχρι και μία μέρα μετά την κατεργασία της.

4.3.2 Κλιματιστική γήρανση PDMS

Η γήρανση του PDMS μετά την κατεργασία του σε πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα σε σχέση με ακατέργαστο PDMS ποσοτικοποιήθηκε με μέτρηση της ταχύτητας τριχοειδούς άντλησης απιονισμένου νερού μέσα στα μικροκανάλια PDMS για τις ημέρες 0, 1, 2, 3, 6 και 7. Το διάγραμμα με τις ταχύτητες ροής που προέκυψαν με τη βοήθεια του λογισμικού Tracker 5.1.5 παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.10.



Σχήμα 4. 10. Ταχύτητα τριχοειδούς άντλησης απιονισμένου νερού στο εσωτερικό μικροκαναλιών PDMS, ακατέργαστου και κατεργασμένων με πλάσμα αέρα και ατμοσφαιρικό πλάσμα, μέχρι και την 7^η ημέρα. Όλες τις ημέρες οι ταχύτητες ροής στα κατεργασμένα κανάλια παραμένουν υψηλότερες εκείνης στο ακατέργαστο. Την day 0 διακρίνεται σημαντικά υψηλότερη ταχύτητα στο κατεργασμένο με ατμοσφαιρικό πλάσμα μικροκάναλι, με τη διαφορά να μειώνεται τις υπόλοιπες ημέρες.

Παρατηρώντας το διάγραμμα, το ακατέργαστο μικροκάναλι αναφοράς, παρατηρείται ότι έχει μια ταχύτητα ροής στα 26.9 mm/s, οφειλόμενη πιθανότατα σε κάποιες παραμένουσες υδρόφιλες ομάδες λόγω της ενεργοποίησής του σε πλάσμα αέρα κατά τη συγκόλλησή του περίπου δύο εβδομάδες πριν τη χρήση τους. Τα κατεργασμένα μικροκάναλια διατηρούν και για τα δύο είδη πλάσματος ταχύτητες ροής μεγαλύτερες από το μικροκάναλι αναφοράς. Αν συγκρίνουμε ειδικότερα μεταξύ τους τα δύο είδη πλάσματος, ουσιαστική διαφορά στην υδροφιλοποίησή τους παρατηρείται μόνο την ίδια μέρα της κατεργασίας των μικροκαναλιών (day 0), με το ατμοσφαιρικό πλάσμα να δίνει ταχύτητα ροής 133.12 mm/s, περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη από εκείνη με το πλάσμα αέρα στα 39.57 mm/s. Όμως από την επόμενη κιόλας μέρα της κατεργασίας, τα δύο είδη πλάσματος παρουσιάζουν παρόμοια υδροφιλικότητα, με ταχύτητες 44.05 mm/s και 38.41 mm/s, για το ατμοσφαιρικό και το πλάσμα αέρα, αντίστοιχα. Με το πέρασμα των ημερών, η μεταξύ τους διαφορά στις ταχύτητες μειώνεται περαιτέρω, αναφέροντας ενδεικτικά την 6^η ημέρα, με τιμές 38.65 mm/s για το ατμοσφαιρικό και 36.39 mm/s για το πλάσμα αέρα, και την 7^η ημέρα με ταχύτητες 42.47 mm/s και 36.06 mm/s για το ατμοσφαιρικό και το πλάσμα αέρα, αντίστοιχα. Να σημειωθεί πως τα μικροκάναλια με πλάσμα αέρα διατηρούν μια σχετικά σταθερή ταχύτητα μέχρι και την 7^η ημέρα, με μια μέση τιμή 36.6 ± 1.2 mm/s, αν εξαιρεθεί η 2^η ημέρα όπου η υπολογιζόμενη ταχύτητα 29.5 mm/s μπορεί να εξαιρεθεί και να αποδοθεί σε σφάλμα καταμέτρησης, όπως φαίνεται από την άνοδο της ταχύτητας τις επόμενες μέρες. Αντίστοιχα, τα μικροκάναλια με ατμοσφαιρικό πλάσμα, με εξαίρεση την υψηλή ταχύτητα της ημέρας κατεργασίας τους, τις υπόλοιπες ημέρες 1 – 7 διατηρούν επίσης σχετικά σταθερή ταχύτητα μέσης τιμής 41.1 ± 1.0 mm/s. Συνολικά, την επόμενη κιόλας ημέρα της κατεργασίας των μικροκαναλιών γίνεται εμφανής η γήρανση του PDMS και για τα δύο είδη πλάσματος, όπως ήταν αναμενόμενη λόγω της αναδιάταξης των ενεργών υδρόφιλων

ομάδων (σιλανόλες, καρβονύλια, κλπ.) [19]. Μεταξύ των ημερών 1 -7 και για τα δύο είδη πλάσματος παρατηρείται σχεδόν σταθερή υδροφιλικότητα, με μέση ταχύτητα 41.1 ± 1.0 mm/s για το ατμοσφαιρικό και 36.6 ± 1.2 mm/s για το πλάσμα αέρα. Οι μέσες αυτές τιμές δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, μόλις περίπου 4 mm/s υποδεικνύοντας παραμερή υδροφιλικότητα των μικροκαναλιών με τα δύο είδη πλάσματος από την 1^η ημέρα μετά την κατεργασία τους. Σε κάθε περίπτωση όμως, υπάρχει παραμένουσα υδροφιλικότητα στα μικροκανάλια μέχρι και την 7^η ημέρα και για τους δύο τρόπους κατεργασίας, καθώς οι ταχύτητες ροής είναι μεγαλύτερες από την ταχύτητα στο στο μικροκανάλι αναφοράς (26.9 mm/s).

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης XPS και της μελέτης της κλιματιστικής γήρανσης, το ατμοσφαιρικό πλάσμα εμφανίζεται να πλεονεκτεί σε σχέση με το πλάσμα αέρα ως προς το βαθμό οξείδωσης της επιφάνειας PDMS ιδιαίτερα την ίδια μέρα της κατεργασίας. Επιπλέον, ειδικότερα από τη στοιχειομετρική ανάλυση XPS, αλλά και τα φάσματα O1s και Si2p, προκύπτει ότι διατηρεί παραμερή βαθμό οξείδωσης και την επόμενη ημέρα της κατεργασίας, δίνοντας πιθανώς τη δυνατότητα εισαγωγής MSCs στους μικροθαλάμους μέχρι και μία μέρα μετά. Παρ'όλα αυτά, η μελέτη γήρανσης, ως πιο ευαίσθητη στη φύση της επιφάνειας από το XPS, δείχνει άμεση απώλεια της υδροφιλικότητας την 1^η ημέρα μετά την κατεργασία και με τα δύο συστήματα. Όμως, το σύστημα κατεργασίας με ατμοσφαιρικό πλάσμα παρουσιάζει αντικειμενικές δυσκολίες χειρισμού για το μη ειδικό και περιορίζει την αυτονόμησή του με άμεσες συνέπειες στον όγκο παραγωγής υδροφιλοποιημένων μικροδιατάξεων.

Στον αντίποδα αυτού, η κατεργασία με πλάσμα αέρα είναι σημαντικά πιο απλή και αυτοματοποιημένη, δίνοντας μεγάλη ευχέρεια χρήσης. Επιπλέον, το πλάσμα αέρα, όπως προέκυψε από τη στοιχειομετρία και τα φάσματα XPS, και επιβεβαιώθηκε μετέπειτα από τη μέτρηση της ταχύτητας ροής μέσα σε μικροκανάλι, δημιουργεί οξείδιο πυριτίου SiO_x στην επιφάνεια του PDMS την ημέρα της κατεργασίας, το οποίο ικανοποιεί την απαίτηση υδροφιλοποίησης του PDMS πριν την επικάλυψη με κολλαγόνου. Συνεπώς, η επακόλουθη μελέτη για την ακινητοποίηση κολλαγόνου στο PDMS θα αφορά στην προγενέστερη κατεργασία του με πλάσμα αέρα.

4.3.3 Ακινητοποίηση κολλαγόνου σε κατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS

Η συνεισφορά της προκατεργασίας με πλάσμα αέρα στην πρόσδεση και ομοιομορφία επικάλυψης κολλαγόνου σε επιφάνειες PDMS εξετάστηκε μελετώντας επιφάνειες ακατέργαστες με κολλαγόνου, κατεργασμένες με πλάσμα χωρίς κολλαγόνου, και κατεργασμένες με πλάσμα και με κολλαγόνου. Όλες οι κατεργασμένες επιφάνειες, εκτέθηκαν απευθείας σε πλάσμα αέρα, ενώ ως αναφορά χρησιμοποιήθηκαν ακατέργαστες επιφάνειες. Η αξιολόγησή τους παραγματοποιήθηκε με χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων διαβροχής τους με μετρήσεις στατικής γωνίας επαφής νερού (WSCA), τα αποτελέσματα των οποίων συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.2.

Οι ακατέργαστες επιφάνειες παρουσίασαν την αναμενόμενη υδροφοβικότητα με γωνία επαφής $112.9^\circ \pm 0.2^\circ$. Οι επιφάνειες που είχαν επικαλυφθεί με κολλαγόνου χωρίς προκατεργασία, εμφάνισαν ανομοιογένεια στην κατανομή κολλαγόνου, σχηματίζοντας διακριτές περιοχές διαφορετικής διαβροξιμότητας, μια υδρόφιλη με μέση γωνία επαφής $74.4^\circ \pm 5.5^\circ$, και μια υδρόφοβη με $100.8^\circ \pm 1.9^\circ$. Οι κατεργασμένες με πλάσμα χωρίς κολλαγόνου επιφάνειες ήταν ομοιόμορφα υδρόφιλες, σημειώνοντας μέση γωνία επαφής $16.3^\circ \pm 1.3^\circ$. Τέλος, οι κατεργασμένες με πλάσμα και με κολλαγόνου επιφάνειες ήταν υπερυδρόφιλες, σε αντίθεση με εκείνες που είχαν απλώς επικαλυφθεί με κολλαγόνου χωρίς προκατεργασία πλάσματος, εμφανίζοντας ομοιόμορφα επιστρωμένο κολλαγόνου, με μέση γωνία επαφής $5.6^\circ \pm 1.4^\circ$, ακόμη χαμηλότερη και από τις επιφάνειες που είχαν μόνο εκτεθεί στο πλάσμα.

Από τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι η απουσία προκατεργασίας με πλάσμα οδηγεί σε ασθενή ακινητοποίηση κολλαγόνου και επιπλέον, δεν ευνοεί την ομοιόμορφη επίστρωσή του σε όλη την επιφάνεια. Συγκεκριμένα, ως προς την ανομοιομορφία, είναι αρκετά πιθανό το κολλαγόνο να συγκεντρώνεται σε σημεία πάνω στην επιφάνεια που έχουν κάποια ατέλεια ή σε περιοχές όπου εξαναγκάζεται να παραμείνει από το υπερκείμενο γυαλί μικροσκοπίου. Οι υδρόφοβες περιοχές παρουσιάζουν διαβρεξιμότητα παραπλήσια της εγγενούς υδροφοβικότητας του ακατέργαστου PDMS, με γωνίες επαφής $100.8^\circ \pm 1.9^\circ$ και $112.9^\circ \pm 0.2^\circ$, αντίστοιχα, με μόλις 12° διαφορά. Επιπλέον, ακόμη και οι υδρόφιλες περιοχές δε διαθέτουν αρκετά υψηλή επιφανειακή ενέργεια, με γωνία επαφής $74.4^\circ \pm 5.5^\circ$. Οι τιμές αυτές σε υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές μαρτυρούν ασθενή πρόσδεση κολλαγόνου στην επιφάνεια PDMS απουσία προκατεργασίας σε πλάσμα.

Η κατεργασία με πλάσμα των επιφανειών που δεν έχουν κολλαγόνο τις καθιστά υδρόφιλες, όπως ήταν αναμενόμενο. Ο σχηματισμός ενεργών ομάδων υδροξυλίων (-OH) και καρβοξυλίων (-COOH) κατά την έκθεση σε πλάσμα οδηγεί σε χαμηλές γωνίες επαφής σε όλη την επιφάνεια, με μέση τιμή $16.3^\circ \pm 1.3^\circ$.

Περαιτέρω επικάλυψη των κατεργασμένων επιφανειών με κολλαγόνο μειώνει περισσότερο τη μέση γωνία επαφής τους σε $5.6^\circ \pm 1.4^\circ$, σχεδόν δηλαδή κατά 11° , ως αποτέλεσμα της έντονης αλληλεπίδρασης του κολλαγόνου με το νερό [63]. Οι επιφάνειες αυτές, εκτός της ιδιαίτερως υψηλής επιφανειακής ενέργειας, εκδηλώνουν ομοιομορφία στην επικάλυψη του κολλαγόνου, αφού η μέση γωνία επαφής τους έχει προκύψει από πολλαπλές μετρήσεις σε διαφορετικά σημεία τριών διαφορετικών επιφανειών. Θα πρέπει να τονιστεί εδώ, ότι οι υπάρχουσες μελέτες, που πραγματοποιούν επίσης προκατεργασία με πλάσμα, δεν αναφέρουν γωνίες επαφής χαμηλότερες των 20° μετά την επικάλυψη με κολλαγόνο [48], δηλαδή τουλάχιστον 14° μεγαλύτερες. Μάλιστα, σε σύγκριση με μελέτες που χρησιμοποιούν άλλες μεθόδους προκατεργασίας εκτός του πλάσματος, οι γωνίες επαφής δεν κατεβαίνουν τις $25^\circ - 34^\circ$ [32,33], που είναι $19^\circ - 28^\circ$ μεγαλύτερες από την δική μας μέθοδο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οδηγούμαστε στο ασφαλές συμπέρασμα ότι η προκατεργασία με πλάσμα αέρα επιτυγχάνει κατάλληλη χημική τροποποίηση της επιφάνειας PDMS, απαραίτητη ώστε να ακινητοποιηθεί το κολλαγόνο. Ευνοεί επιπλέον την αρχική ακινητοποίηση του κολλαγόνου στην επιφάνεια, αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία οποιωνδήποτε ετερογενειών κατά την επικάλυψή του.

Πίνακας 4. 2: Διαβρεξιμότητα διαφορετικών επιφανειών PDMS, δηλαδή ακατέργαστες, επικαλυμένες με κολλαγόνο, και κατεργασμένες με πλάσμα αέρα, με και χωρίς επίστρωση κολλαγόνου. Η προκατεργασία πλάσματος πριν από την επικάλυψη κολλαγόνου είναι απαραίτητη για ομοιόμορφη ακινητοποίηση του κολλαγόνου. Τα δεδομένα εμφανίζονται ως μέσες γωνίες επαφής \pm τυπικό σφάλμα τους.

	Ακατέργαστο PDMS	Επικαλυμένο με κολλαγόνο PDMS		Κατεργασμένο με πλάσμα PDMS	Κατεργασμένο με πλάσμα και επικαλυμένο με κολλαγόνο PDMS
		Υδρόφιλη περιοχή	Υδρόφοβη περιοχή		
WSCA ($^\circ$)	112.9 ± 0.2	74.4 ± 5.5	100.8 ± 1.9	16.3 ± 1.3	5.6 ± 1.4

Με την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, αποδεικνύεται και ποσοτικά ότι το πλάσμα αέρα συγκρινόμενο με το ατμοσφαιρικό πλάσμα, επιφέρει επαρκή ενεργοποίηση της επιφάνειας PDMS για την πρόσδεση κολλαγόνου, και τη μετέπειτα εφαρμογή της μεθόδου σε μικρορευστονική διάταξη. Η επιπλέον οξείδωση που προσδίδει το ατμοσφαιρικό πλάσμα, ενδεχομένως να μην προσφέρει κάτι επιπλέον στη διαδικασία.

4.3.4 Τρόποι ενεργοποίησης μικροθαλάμων με πλάσμα αέρα

Έχοντας αποδείξει την αναγκαιότητα προκατεργασίας με πλάσμα πριν την επικάλυψη με κολλαγόνο, εκτός της απευθείας έκθεσης σε πλάσμα αέρα, εξετάζεται και η μέσω διάχυσης έκθεση, ως ένας ακόμη πιθανός τρόπος ενεργοποίησης επιφανειών PDMS ενσωματωμένων σε μικρορευστονικές διατάξεις. Για τη μελέτη χρησιμοποιούνται παραλληλόγραμμα πηγάδια PDMS, που χαρακτηρίζονται ως προς τη διαβρεξιμότητά τους. Εξετάζονται παράμετροι του χρόνου, και συγκεκριμένα 1 h και 2 h πριν την επίστρωση κολλαγόνου, καθώς και, στην περίπτωση της μέσω διάχυσης ενεργοποίησης, του μήκους διάχυσης, 1 mm ή 3 mm, κατ'αναλογία του 1- ή 3 mm - πάχους καλύμματος PDMS των πηγαδιών. Ο Πίνακας 4.3 καταγράφει τις προκύπτουσες μέσες τιμές γωνιών επαφής μαζί με το τυπικό τους σφάλμα.

Εστιάζοντας στη μέσω διάχυσης ενεργοποίηση, εντοπίζεται σημαντική ετερογένεια στη διαβρεξιμότητα των επιφανειών PDMS σε όλες τις περιπτώσεις, με υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές να είναι διακριτές ακόμη και δια γυμνού οφθαλμού. Ειδικότερα, στις επιφάνειες με 1 mm – πάχος καλύμματος PDMS, η υδρόφιλη περιοχή διέθετε μέση γωνία επαφής $30.3^\circ \pm 9.5^\circ$, 1 h πριν την επίστρωση κολλαγόνου, και $43.0^\circ \pm 9.3^\circ$, 2 h μετά την επίστρωση. Η υδρόφοβη περιοχή σημείωσε μέση γωνία επαφής $98.9^\circ \pm 1.5^\circ$ και $105.5^\circ \pm 1.6^\circ$, 1 και 2 h, αντίστοιχα, μετά το κολλαγόνο. Στις επιφάνειες με 3 mm – πάχος καλύμματος, η υδρόφιλη περιοχή 1 h μετά την ενεργοποίηση με πλάσμα παρουσίασε μέση τιμή $45.7^\circ \pm 1.0^\circ$, και $59.0^\circ \pm 5.6^\circ$, 2 h μετά το πλάσμα. Στην υδρόφοβη περιοχή μετρήθηκαν μέσες γωνίες επαφής $100.3^\circ \pm 4.0^\circ$ και $104.8^\circ \pm 2.5^\circ$, 1 και 2 h, αντίστοιχα μετά την ενεργοποίηση.

Σύμφωνα με τις παραπάνω μετρήσεις, είναι εμφανές ότι για το ίδιο μήκος διάχυσης, αυξάνοντας το χρονικό διάστημα πριν την επίστρωση κολλαγόνου από τη 1 h στις 2 h, υπάρχει μικρή αύξηση στη μέση γωνία επαφής. Δεν εκτιμάται όμως ως σημαντική, καθώς δεν ξεπερνά τις 6° στις υδρόφοβες περιοχές και τις 13° στις υδρόφιλες, και για τα δύο μήκη διάχυσης. Δεδομένης της ασταθούς υδροφιλικότητας του PDMS, αυξάνοντας το χρόνο μετά την έκθεση στο πλάσμα, οι αλυσίδες μικρότερου μοριακού βάρους διαχέονται από τον κυρίως όγκο του PDMS στη θερμοδυναμικά ασταθή του επιφάνεια [19], προκαλώντας απώλεια των επιφανειακά σχηματισμένων από το πλάσμα ενεργών ομάδων που δεσμεύουν το κολλαγόνο. Είναι επομένως πιθανό ότι αυτή η διαφορά της 1 h είναι ικανή να αιτιολογήσει μια μερική, μικρή ανάκτηση της υδροφοβικότητας του PDMS.

Όμως, το μήκος διάχυσης του πλάσματος επηρεάζει εμφανώς το βαθμό υδροφιλοποίησης των επιφανειών PDMS, όπως συμπεραίνεται συγκεκριμένα αν συγκριθούν μεταξύ τους οι γωνίες επαφής των υδρόφιλων περιοχών για τα δύο μήκη και για το ίδιο χρονικό διάστημα πριν την επίστρωση κολλαγόνου. Πράγματι, εντοπίζεται μια αύξηση 15.4° και 16° στη μέση γωνία επαφής των υδρόφιλων περιοχών, 1 h και 2 h, αντίστοιχα, πριν το κολλαγόνο, αυξανόμενου του μήκους διάχυσης από το 1 mm στα 3 mm. Είναι προφανές ότι με την αύξηση του μήκους διάχυσης, αυξάνεται η απόσταση που χρειάζεται να διαχυθεί το πλάσμα μέσω των ανοιχτών οπών, καταλήγοντας έτσι σε μικρότερο ποσοστό ενεργών ομάδων τελικά να φθάνουν στην επιφάνεια PDMS, και συνεπαγόμενα, σε μικρότερη έκταση της επιφάνειας τελικά να ενεργοποιείται.

Συγκρίνοντας τώρα μεταξύ τους τις υδρόφοβες περιοχές για τα διαφορετικά μήκη διάχυσης, παρουσιάζουν συγκρίσιμες μέσες γωνίες επαφής για τον ίδιο χρόνο πριν την επίστρωση κολλαγόνου, με διαφορές που δεν ξεπερνούν τη 1° , που εντάσσεται μέσα στα περιθώρια συστηματικού σφάλματος ($\pm 2^\circ$). Η κοινή διαβρεξιμότητα των υδρόφοβων περιοχών είναι αιτιολογημένη, καθώς υποδεικνύει ότι οι περιοχές αυτές, και για τα δύο μήκη διάχυσης, δεν έχουν ενεργοποιηθεί από το πλάσμα αέρα, και είναι επομένως αναμενόμενο να εμφανίζουν την ίδια γωνία επαφής. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται αν προσέξουμε τη μέση γωνία επαφής της υδρόφοβης περιοχής των ακατέργαστων και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS (βλ. Πίνακα 4.2, $100.8^\circ \pm 1.9^\circ$), η οποία ξεκάθαρα συμπίπτει με τις μέσες γωνίες επαφής των υδρόφοβων περιοχών και για

τα δύο μήκη διάχυσης ($105.5^\circ \pm 1.6^\circ$ και $104.8^\circ \pm 2.5^\circ$), 2 h πριν την επικάλυψη με κολλαγόνο σε όλες τις περιπτώσεις.

Όσον αφορά τις απευθείας ενεργοποιημένες στο πλάσμα επιφάνειες PDMS, δεν παρουσιάζουν καμία διαφοροποίηση στη διαβρεξιμότητά τους, για 1 h και 2 h πριν την επιστροφή με κολλαγόνο, και είναι σε όλη την επιφάνειά τους υπερυδροφίλες με μέσες γωνίες επαφής που δεν ξεπερνούν τις 8° . Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκαν μέσες τιμές των $7.2^\circ \pm 1.2^\circ$ και $5.6^\circ \pm 1.4^\circ$, 1h και 2 h πριν το κολλαγόνο, αντίστοιχα, ενδεικτικές πλήρους διαβροχής.

Σε αντίθεση με τη μέσω διάχυσης ενεργοποίηση, που οδήγησε σε αύξηση της γωνίας επαφής κυμαινόμενη από 6° έως 13° με την αύξηση του χρόνου πριν την επιστροφή κολλαγόνου, οι απευθείας ενεργοποιημένες επιφάνειες σημείωσαν σχεδόν ίσες γωνίες επαφής, με τη διαφορά τους να εντάσσεται στα πλαίσια του συστηματικού σφάλματος. Αυτό σημαίνει πως η απευθείας έκθεση των επιφανειών στο πλάσμα, δημιουργεί σημαντικό και επαρκές ποσοστό ενεργών ομάδων, ώστε αυτή η καθυστέρηση της 1 h πριν το κολλαγόνο, να μη συνεισφέρει στην ανάκτηση της υδροφοβικότητας του PDMS. Επομένως, παρόμοια ακινητοποίηση κολλαγόνου επιτυγχάνεται και στις δύο περιπτώσεις.

Συμπερασματικά, συγκρίνοντας τους δύο τρόπους προκατεργασίας των επιφανειών PDMS με πλάσμα αέρα, η απευθείας έκθεση εμφανώς πλεονεκτεί της μέσω διάχυσης. Το γεγονός αυτό αφορά όχι μόνο το βαθμό της υδροφιλοποίησης, άρα και της συνεπαγόμενης ακινητοποίησης κολλαγόνου, αλλά και την ομοιογένεια στην ενεργοποίηση του συνόλου της επιφάνειας, που αντίστοιχα μεταφράζεται σε ομοιόμορφη κατανομή κολλαγόνου. Πράγματι, ακόμη και στην περισσότερη ευνοϊκή περίπτωση της μέσω διάχυσης έκθεσης, δηλαδή για μήκος διάχυσης 1 mm και 1 h πριν την επιστροφή κολλαγόνου, η υπολογιζόμενη μέση γωνία επαφής $30.3^\circ \pm 9.5^\circ$ είναι τουλάχιστον $23^\circ - 24^\circ$ μεγαλύτερη από τις μέσες τιμές $7.2^\circ \pm 1.2^\circ$ και $5.6^\circ \pm 1.4^\circ$ των απευθείας εκτεθειμένων στο πλάσμα επιφανειών 1 h και 2 h , αντίστοιχα πριν το κολλαγόνο.

Έτσι, η απευθείας ενεργοποίηση των επιφανειών PDMS είναι ο προτεινόμενος τρόπος κατεργασίας που θα εφαρμοστεί για την υδροφιλοποίηση του εσωτερικού των μικροθαλάμων καλλιέργειας των MSCs. Εφόσον η ενεργοποίηση αυτή είναι ενσωματωμένη στο στάδιο της συγκόλλησης των μικροθαλάμων (βλ. 4.2.2), δεν απαιτείται περαιτέρω προκατεργασία. Επιπλέον, 2 h είναι ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να είναι πρακτικά εφικτή η εκκίνηση της διαδικασίας εισόδου MSCs στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής έρευνας, οπότε η εντός 2 h επιστροφή κολλαγόνου εμπίπτει στους χρόνους της εν λόγω μελέτης για τη διατήρηση της υδροφιλικότητας του PDMS.

Πίνακας 4. 3. Διαβρεξιμότητα κατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS, δοκιμασμένων για δύο τρόπους έκθεσης στο πλάσμα, μέσω διάχυσης και απευθείας, και για διαφορετικούς χρόνους, 1 h και 2 h πριν την επιστροφή κολλαγόνου, καθώς και για 1- και 3 mm – μήκος διάχυσης. Η απευθείας έκθεση στο πλάσμα προσφέρει καλύτερη ακινητοποίηση και ομοιομορφία κάλυψης κολλαγόνου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες γωνίες επαφής \pm τυπικό σφάλμα τους.

Γωνίες επαφής ($^\circ$) κατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS			
		Μέσω διάχυσης ενεργοποίηση	Απευθείας ενεργοποίηση
Μήκος διάχυσης (mm)	1	3	-

Χρόνος μετά την κατεργασία πλάσματος (h)	1	2	1	2	1	2
Υδροφιλή περιοχή	30.3 ± 9.5	43.0 ± 9.3	45.7 ± 1.0	59.0 ± 5.6	7.2 ± 1.2	5.6 ± 1.4
Υδροφοβή περιοχή	98.9 ± 1.5	105.5 ± 1.6	100.3 ± 4.0	104.8 ± 2.5	-	-

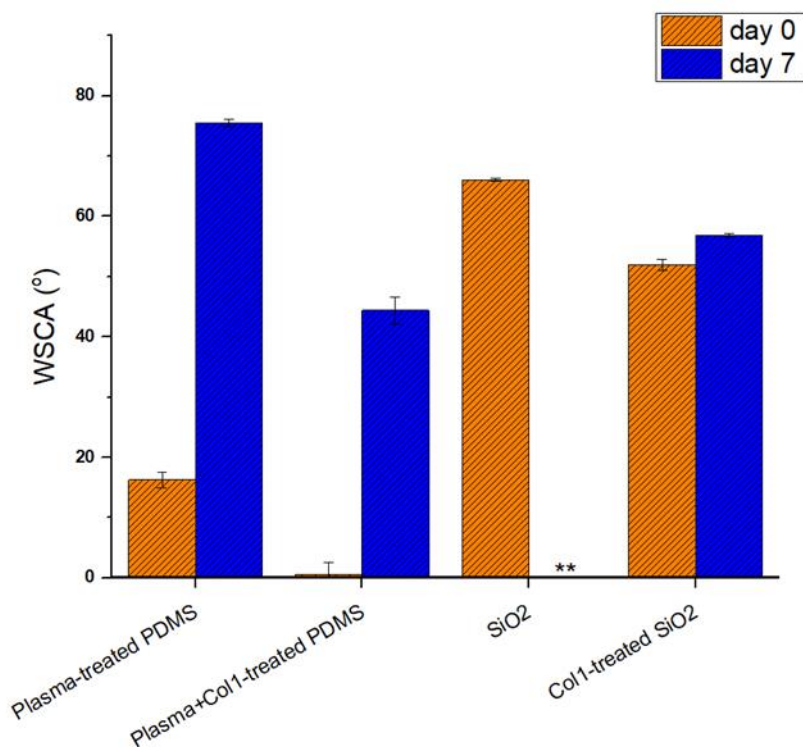
4.3.5 Μονιμοποίηση της επιφανειακής υδροφιλικότητας εσωτερικού μικροθαλάμων

Στην Παράγραφο αυτή, ελέγχεται η διατήρηση των ιδιοτήτων διαβροχής των κατεργασμένων σε πλάσμα επιφανειών PDMS και των λεπτών στρωμάτων διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) μετά την επικάλυψή τους με κολλαγόνο, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες επιφάνειες απουσία κολλαγόνου μέχρι την 7^η ημέρα. Η μελέτη πραγματοποιείται με μέτρηση γωνιών επαφής (Σχήμα 4.11) και στοχεύει στη διερεύνηση της διατήρησης της υδροφιλικότητας του εσωτερικού του μικροθαλάμου καλλιέργειας.

Την ημέρα της κατεργασίας (day 0, 2 h μετά την ολοκλήρωσή της), οι επιφάνειες που είχαν απλώς εκτεθεί στο πλάσμα αέρα σημείωσαν μέση γωνία επαφής $16.3^\circ \pm 1.3^\circ$, που αυξήθηκε στις $75.5^\circ \pm 0.6^\circ$ την 7^η ημέρα. Οι επιφάνειες που μετά την έκθεση στο πλάσμα επικαλύφθηκαν 2 h μετά με κολλαγόνο, εμφάνισαν πλήρη διαβροχή ($\rightarrow 0^\circ$), ενώ την 7^η ημέρα η μέση γωνία επαφής τους δεν ξεπέρασε τις $44.4^\circ \pm 2.2^\circ$. Εστιάζοντας στην 7^η ημέρα, είναι εμφανές ότι οι επιφάνειες που είχαν μόνο εκτεθεί στο πλάσμα παρουσίασαν ανάκτηση υδροφοβικότητας, σε αντίθεση με εκείνες που είχαν επιπρόσθετα επικαλυφθεί με κολλαγόνο, οι οποίες διατήρησαν σε μεγαλύτερο βαθμό την υδροφιλικότητά τους, με 31.1° χαμηλότερη μέση γωνία επαφής. Το Σχήμα 4.12 παρουσιάζει μια μακροσκοπική οπτικοποίηση της διαβρεξιμότητας των κατεργασμένων στο πλάσμα αέρα επιφανειών PDMS, με και χωρίς κολλαγόνο, με αντιπροσωπευτικές εικόνες για τις ημέρες 0 και 7, όπως λήφθηκαν από το σύστημα Drop Shape Analyzer.

Εκτιμάται ότι επικαλύπτοντας με κολλαγόνο τις επιφάνειες λίγο μετά την έκθεσή τους στο πλάσμα, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου και καρβοξυλίου των ενεργοποιημένων επιφανειών PDMS και των πολυπεπτιδικών αλυσίδων του κολλαγόνου, δεν επιτρέπουν τον επαναπροσανατολισμό των ομάδων σιλανόλης και καρβονυλίου στις επιφάνειες PDMS, και έτσι συνεισφέρουν σε καλύτερη διατήρηση της υδροφιλικότητάς τους. Έτσι, η ανάκτηση της υδροφοβικότητας του PDMS καθυστερεί κατά 31.1° την 7^η ημέρα, και η επιφάνεια συνεχίζει να παραμένει υδροφιλή σε ικανοποιητικό βαθμό. Ακόμη, συμπεραίνεται ότι με την προκατεργασία πλάσματος, εκτός της αρχικής αινητοποίησης του κολλαγόνου, που αποδείχθηκε στην Παράγραφο 4.3.3, ευνοείται και η σταθεροποίηση της πρόσδεσης κολλαγόνου μακροπρόθεσμα.

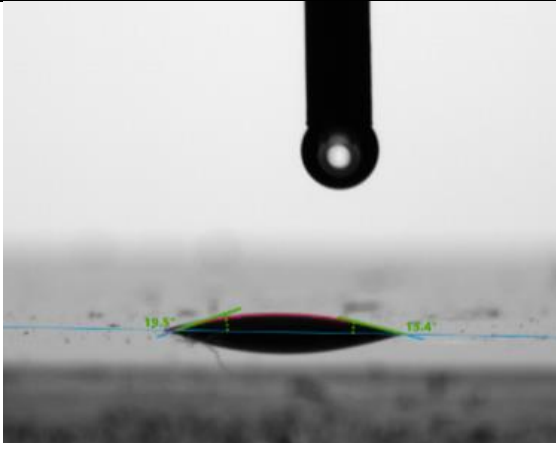

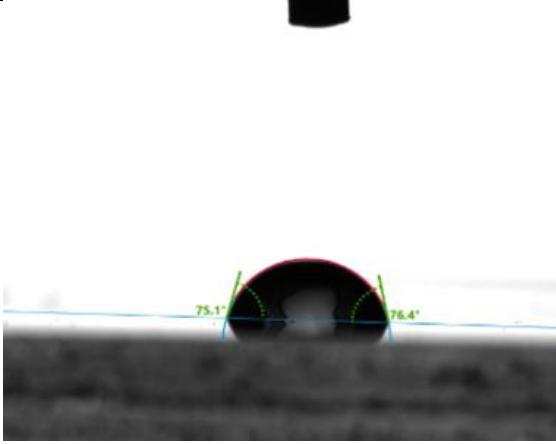

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι γωνίες επαφής των προκατεργασμένων σε πλάσμα αέρα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS την 7^η ημέρα, είναι οι χαμηλότερες που έχουν αναφερθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία σε κατάσταση ξηρασίας (dry state), σε σχέση με εκείνες από άλλες μεθόδους επιφανειακής τροποποίησης [33,35,46,47]. Μάλιστα, είναι χαρακτηριστικό ότι η καλύτερη περίπτωση από αυτές [48] δε σημειώνει γωνία επαφής χαμηλότερη από τις 50° την 7^η ημέρα από την προκατεργασία της.



Σχήμα 4. 11. Στατικές γωνίες επαφής νερού κατεργασμένων σε πλάσμα αέρα επιφανειών PDMS και λεπτών στρωμάτων SiO₂, με και χωρίς κολλαγόνο, σε κατάσταση ξηρασίας τις ημέρες 0 και 7. Η επικάλυψη με κολλαγόνο των κατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών PDMS και των στρωμάτων SiO₂ μονιμοποιεί την υδροφιλικότητά τους μέχρι και την 7^η ημέρα σε κατάσταση ξηρασίας, αποδεικνύοντας τη σταθεροποίηση της υδροφιλικότητας του εσωτερικού των μικροθαλάμων καλλιέργειας. ** Για τα στρώματα SiO₂, δεν είναι διαθέσιμη μέτρηση την 7^η ημέρα.

Όσον αφορά τις επιφάνειες SiO₂, εκείνες που δεν είχαν επικαλυφθεί με κολλαγόνο διέθεταν μέση γωνία επαφής $66.1^{\circ} \pm 0.3^{\circ}$ την ημέρα 0. Μετά την επικάλυψή τους με κολλαγόνο, μετρήθηκε μέση γωνία επαφής $52.0^{\circ} \pm 0.9^{\circ}$ την ημέρα 0, η οποία αυξήθηκε ελαφρώς στις $56.8^{\circ} \pm 0.3^{\circ}$ την 7^η ημέρα. Επικαλύπτοντας επομένως με κολλαγόνο τις επιφάνειες SiO₂, η γωνία επαφής τους μειώθηκε κατά 14°, ενώ επιπλέον κατόρθωσαν να διατηρήσουν σχεδόν σταθερή διαβροξιμότητα μέχρι την 7^η ημέρα, εμφανίζοντας μια μικρή άνοδο των 5° της γωνίας επαφής τους. Αντίστοιχα συνεπώς στις επιφάνειες SiO₂, όπως και στις προκατεργασμένες με πλάσμα, οι δημιουργούμενοι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου του SiO₂ και των αμιδίων του κολλαγόνου αποτρέπουν τη γήρανση της επιφάνειας, και συντηρούν την υδροφιλικότητά της.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι γωνίες επαφής μετρήθηκαν με τις επιφάνειες PDMS και SiO₂ να βρίσκονται σε κατάσταση ξηρασίας, σε αντίθεση με τις πραγματικές πειραματικές συνθήκες, όπου το εσωτερικό του μικροθαλάμου διατηρείται συνεχώς σε υγρή κατάσταση λόγω της διαβροχής του από το θρεπτικό υλικό, το οποίο επιπρόσθετα ανανεώνεται καθημερινά. Αναμένεται επομένως σε υγρή κατάσταση η υδροφοβοποίηση των προκατεργασμένων σε πλάσμα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS να επιβραδυνθεί περισσότερο, καθώς οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα του φρέσκου θρεπτικού υλικού μπορούν να προσδεθούν σε όποιες παραμένουσες ενεργές ομάδες στην επιφάνεια PDMS, πιθανότατα δυσχεραίνοντας την αναδιάταξή τους προς μεγαλύτερα βάθη. Το ίδιο ισχύει και για το επικαλυμμένο με κολλαγόνο γυαλί του μικροθαλάμου, όπου, κατ'αναλογία με τις επιφάνειες SiO₂, οι πρωτεΐνες του θρεπτικού υλικού θα προσδεθούν στην επιφάνειά του, επιμηκύνοντας την υδροφιλικότητά του. Επιτυγχάνεται επομένως, μονιμοποίηση της υδροφιλικότητας τους εσωτερικού των μικροθαλάμων καλλιέργειας μέχρι και την 7^η ημέρα.

Κατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS		
Χρόνος (ημέρες)	Χωρίς κολλαγόνο	Με κολλαγόνο
0		
7		

Σχήμα 4. 12. Στιγμιότυπα στατικών γωνιών επαφής νερού πάνω σε προκατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS, με και χωρίς κολλαγόνο την ημέρα της κατεργασίας (ημέρα 0) και την 7^η ημέρα. Η επικάλυψη των προκατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών PDMS με κολλαγόνο επιμηκύνει την υδροφιλικότητά τους, σημειώνοντας μέση γωνία επαφής $44.4^\circ \pm 2.2^\circ$ σε κατάσταση ξηρασίας την 7^η ημέρα.

4.3.6 Πάχος κολλαγόνου

Το πάχος του κολλαγόνου μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS) σε ενεργοποιημένες σε πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS, σε σύγκριση με ακατέργαστες, καθώς και σε λεπτά στρώματα SiO₂. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.4.

Στις ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες PDMS, το πάχος του κολλαγόνου μετρήθηκε 27.3 ± 7.0 nm, ενώ μηδενικού πάχους (-2 ± 13 nm) προσδιορίστηκε στις επιφάνειες που δεν είχαν προκατεργαστεί με πλάσμα. Στις επιφάνειες SiO₂ προέκυψε πάχος κολλαγόνου 3.4 ± 0.9 nm.

Ο εντοπισμός κολλαγόνου πάνω στις προκατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες PDMS και τις επιφάνειες SiO₂, καταδεικνύει τη συνάφεια του κολλαγόνου προς τις υδροφιλοποιημένες, οξυγονωμένες επιφάνειες. Ενεργές ομάδες στις προκατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες PDMS [39] και στις επιφάνειες SiO₂ [64] σχηματίζουν

ομάδες που περιέχουν υδροξύλια, οι οποίες αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα αμίδια του κολλαγόνου μέσω δεσμών υδρογόνου, πραγματοποιώντας έτσι πρόσδεση του κολλαγόνου.

Δεν ισχύει όμως το ίδιο για τις ακατέργαστες επιφάνειες PDMS, όπου ο μη εντοπισμός του κολλαγόνου μαρτυρά την αδυναμία του να προσδεθεί σε επιφάνειες που δεν έχουν υδροφιλοποιηθεί. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με την αρχική, βασική μας τοποθέτηση για την αναγκαιότητα προγενέστερης επιφανειακής τροποποίησης της επιφάνειας PDMS, και συγκεκριμένα με τη χρήση πλάσματος αέρα, ώστε να είναι δυνατή η ακινητοποίηση του κολλαγόνου, όπως αναλυτικά παρουσιάζεται στην Παράγραφο 4.3.3.

Πίνακας 4. 4. Μετρήσεις πάχους κολλαγόνου σε επιφάνειες PDMS, με και χωρίς προκατεργασία πλάσματος αέρα, και σε επιφάνειες SiO₂ χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS). Η υδροφιλοποίηση της επιφάνειας πριν την επικάλυψη με κολλαγόνο είναι απαραίτητη ώστε να υπάρξει ακινητοποίηση του κολλαγόνου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα.

	Επικαλυμένες με κολλαγόνο επιφάνειες PDMS		Επικαλυμένες με κολλαγόνο επιφάνειες SiO ₂
	Χωρίς κατεργασία	Κατεργασμένες σε πλάσμα	
Πάχος κολλαγόνου (nm)	-2 ± 13	27.3 ± 7.0	3.4 ± 0.9

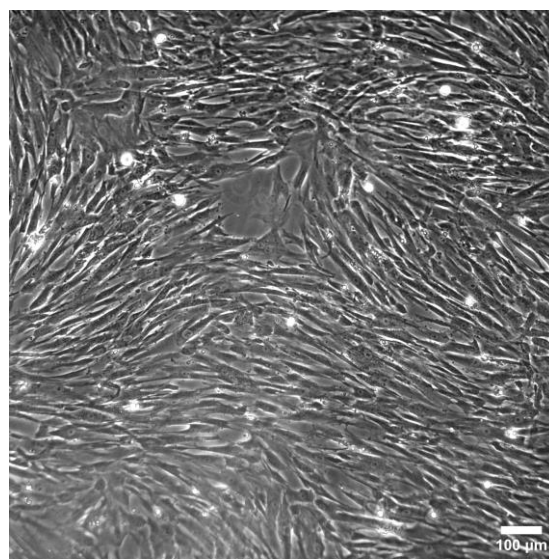
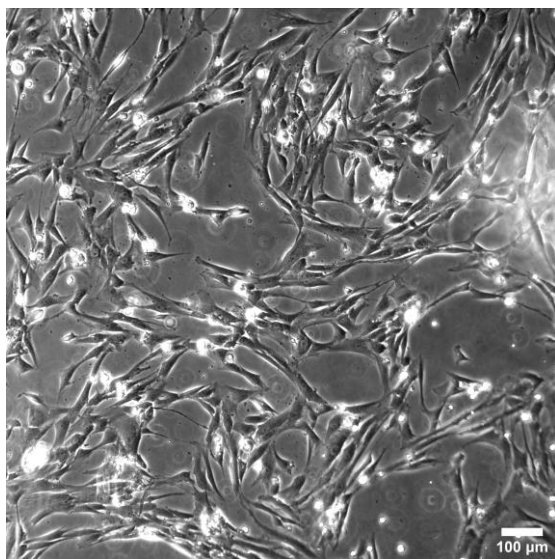
4.3.7 Προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων στο εσωτερικό μικροθαλάμων

Η βιοσυμβατότητα των προκατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS σε σύγκριση με ακατέργαστες και απουσία κολλαγόνου αξιολογήθηκε με την καλλιέργεια UC-MSCs στο εσωτερικό των μικροθαλάμων καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, MSCs συγκέντρωσης 2.7 x 10⁶ cells/mL καλλιεργήθηκαν υπό στατικές συνθήκες σε μικροθαλάμους 30 μL για 5 ημέρες. Προς συγκριτική μελέτη, η παρατήρησή τους πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο, με χαρακτηριστικές εικόνες της ανάπτυξής τους για τις ημέρες 1, 3 και 5 να παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.13 (μεγέθυνσης 10x) και από τα δύο είδη μικροθαλάμων. Επιπλέον, με ανάλυση εικόνας υπολογίστηκε το ποσοστό κάλυψης με στρωματικό ιστό του εσωτερικού των μικροθαλάμων για τις αντίστοιχες ημέρες (Σχήμα 4.14).

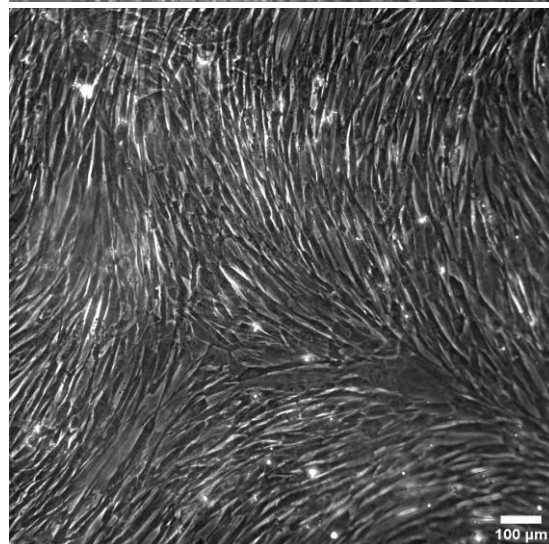
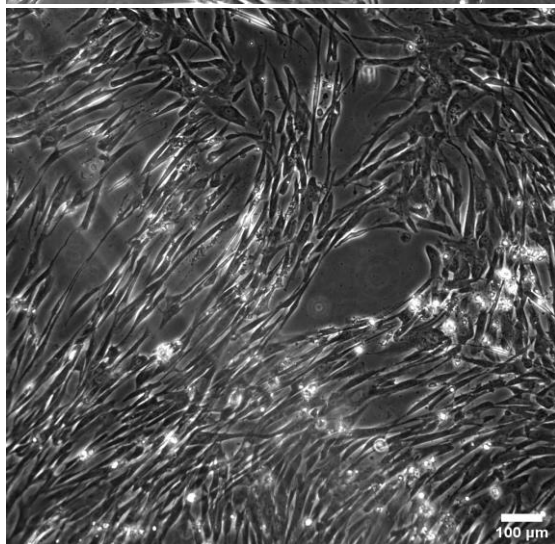
Ακατέργαστοι μικροθάλαμοι PDMS

Κατεργασμένοι με πλάσμα αέρα και
επικαλυμένοι με κολλαγόνο μικροθάλαμοι
PDMS

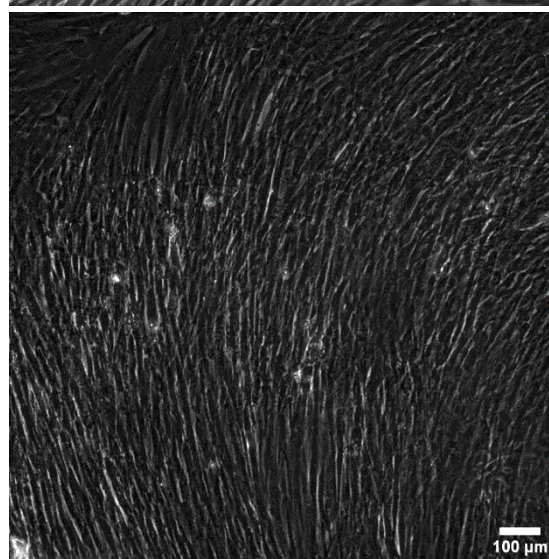
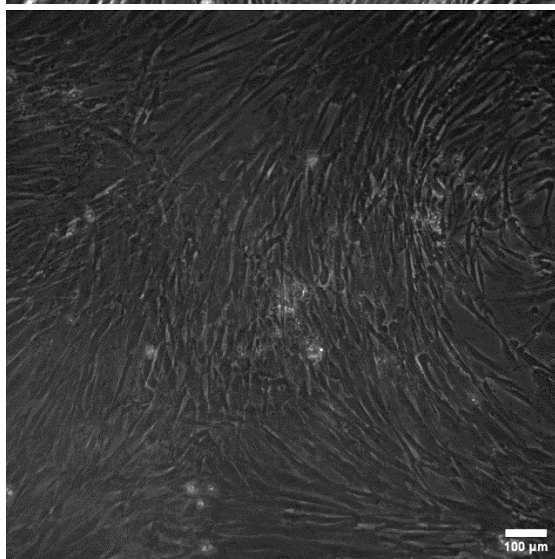
1^η ημέρα



3^η ημέρα



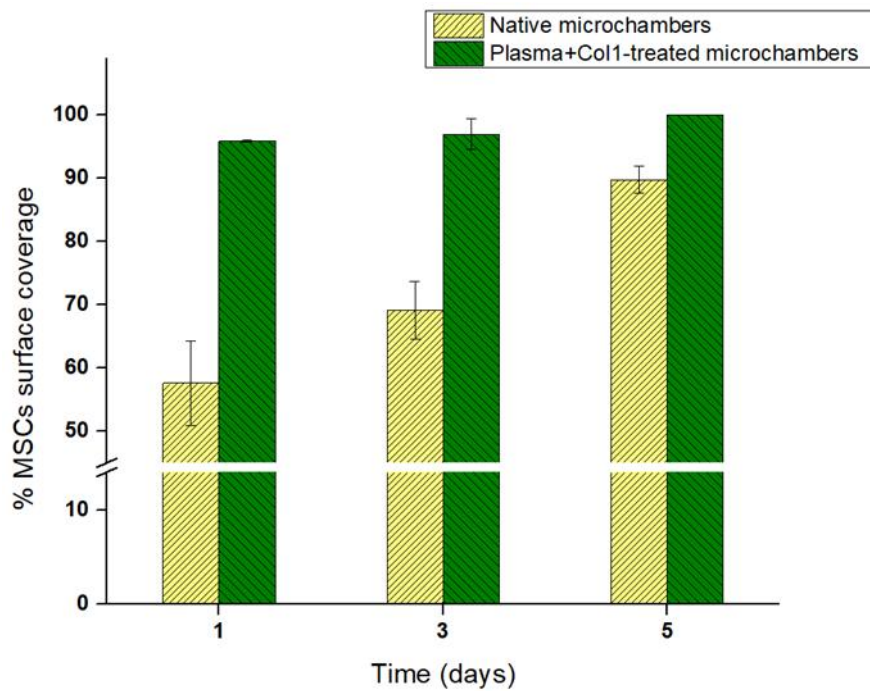
5^η ημέρα



Σχήμα 4. 13. Στατική καλλιέργεια UC-MSCs στο εσωτερικό τριδιάστατων μικροθαλάμων PDMS, προκατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο για 5 ημέρες, σε σύγκριση με ακατέργαστους μικροθαλάμους αναφοράς. Οι κατεργασμένοι μικροθάλαμοι εμφανίζουν μεγαλύτερη και περισσότερο οργανωμένη κυτταρική προσκόλληση οδηγώντας στο σχηματισμό τριδιάστατου στρωματικού ιστού. Οι εικόνες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο υπό μεγέθυνση 10x.

Ξεινώνοντας από σχετικά υψηλή αρχική συγκέντρωση (2.7×10^6 cells/mL) κατά την είσοδο των MSCs στους μικροθαλάμους, ήδη από την 1^η ημέρα τα κύτταρα εμφανίζονται επιμηκυμένα, έχοντας σχηματίσει μεταξύ τους νηματοειδείς διασυνδέσεις στο εσωτερικό τόσο των ακατέργαστων, όσο και των κατεργασμένων μικροθαλάμων. Όμως, οι προκατεργασμένοι με πλάσμα και επικαλυμμένοι με κολλαγόνο μικροθάλαμοι φαίνεται να ενισχύουν την αρχική προσκόλληση των MSCs, αναδεικνύοντας μεγαλύτερη επιφανειακή κάλυψη με κύτταρα, τα οποία έχουν ιόλας δημιουργήσει μονοστρωματικό ιστό. Εκτός όμως της μεγαλύτερης εξάπλωσης, τα MSCs παρουσιάζονται να είναι και περισσότερο ομοιόμορφα οργανωμένα. Οι παρατηρήσεις αυτές επαληθεύονται από τις αναλύσεις εικόνων, οι οποίες απέδωσαν $95.9 \pm 0.1\%$ επιφανειακή κάλυψη των MSCs στους κατεργασμένους μικροθαλάμους, συγκριτικά με $57.6 \pm 6.7\%$ στους ακατέργαστους την 1^η ημέρα. Παρ'όλο που η υψηλή αρχική συγκέντρωση των MSCs ευνόησε την πρώιμη ταχεία τους εξάπλωση και στις δύο περιπτώσεις, αναδείχθηκε 40% υψηλότερη επιφανειακή κάλυψη στους κατεργασμένους μικροθαλάμους. Προχωρώντας στην 3^η ημέρα, τα MSC διατηρούν μια μορφολογία ινοβλαστών, με τον πληθυσμό τους να έχει αυξηθεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε ο σχηματισμός ιστού να γίνεται εμφανής και στους δύο μικροθαλάμους. Στους κατεργασμένους μικροθαλάμους βέβαια, συνεχίζει να παρατηρείται μεγαλύτερο πλήθος MSCs και με καλύτερη οργάνωση σε ένα δίκτυο ιστού που διαγράφει κυκλικές διαδρομές. Τα MSCs μέσα στους ακατέργαστους μικροθαλάμους δεν εμφανίζουν ισοδύναμο βαθμό ανάπτυξης ή ομοιογένειας, καθώς αφήνουν περισσότερους κενούς χώρους, που διαταράσσουν τη συνοχή του ιστού. Και πάλι, οι ισχυρισμοί αυτοί συμμορφώνονται με την επιφανειακή κάλυψη με MSCs που προέκυψε από την ανάλυση εικόνων, η οποία φθάνει το $97.0 \pm 2.4\%$ και το $69.1 \pm 4.6\%$ εντός των κατεργασμένων και ακατέργαστων μικροθαλάμων, αντίστοιχα. Τα MSCs έχουν σχεδόν φτάσει σε πλήρη συρροή μέσα στους κατεργασμένους μικροθαλάμους, κάτι που δεν συμβαίνει στο εσωτερικό των ακατέργαστων, όπου η επιφανειακή κάλυψη των MSCs υστερεί σχεδόν κατά 29%.

Στο τέλος του πειράματος την 5^η ημέρα, τα MSCs πολλαπλασιάστηκαν περαιτέρω, δημιουργώντας τριδιάστατο στρωματικό ιστό, με κατά τόπους κυκλική τάση, στο εσωτερικό και των δύο μικροθαλάμων. Ο κατεργασμένος μικροθάλαμος διατηρεί το πλεονέκτημά του έναντι του ακατέργαστου, τόσο ως προς το βαθμό πολλαπλασιασμού των MSCs, όσο και ως προς την ομοιομορφία οργάνωσης, φθάνοντας σε πλήρη συρροή με χαρακτηριστικά ενός εξαιρετικά διατεταγμένου ιστού με κυκλική τάση. Αντίθετα, στους ακατέργαστους μικροθαλάμους, το συνεχές του στρωματικού ιστού διακόπτεται από την παρουσία μη ομοιόμορφα οργανωμένων πληθυσμών κυττάρων, καθώς και από εναπομείνουσες κενές περιοχές, ως αποτέλεσμα της μη επίτευξης πλήρους συρροής. Η ανάλυση εικόνων επαλήθευσε την 100% κάλυψη της επιφάνειας με MSCs εντός του κατεργασμένου μικροθαλάμου, σε σύγκριση με το $89.8 \pm 2.1\%$ εντός του ακατέργαστου, που εξακολουθεί να υστερεί στην επιφανειακή κάλυψη κατά 10%.



Σχήμα 4. 14. Ποσοστιαία επιφανειακή κάλυψη MSCs του εσωτερικού των τριδιάστατων προκατεργασμένων με πλάσμα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο μικροθαλάμων PDMS σε σύγκριση με ακατέργαστους μικροθαλάμους, κατά τις ημέρες 1, 3 και 5, υπολογισμένη με ανάλυση εικόνας. Οι κατεργασμένοι μικροθάλαμοι παρουσιάζουν περισσότερο εκτεταμένη επιφανειακή κάλυψη με στρωματικό ιστό, ξεκινώντας από την 1^η ημέρα, συνεχίζοντας την 3^η με σχεδόν πλήρη συρροή, και καταλήγοντας την 5^η με πλήρη συρροή και 100% κάλυψη.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι υπάρχουσες μελέτες ανάπτυξης κυττάρων σε μικρορευστονικές διατάξεις που έχουν προκατεργαστεί για την επικάλυψη με κολλαγόνο, δεν ξεπερνούν τις 5 ημέρες [52], και ορισμένες περιορίζονται στις 2 ημέρες [33]. Συγκεκριμένα, ακόμη και στην καλύτερη περίπτωση [52] δεν αναφέρεται επιφανειακή κάλυψη με κύτταρα μεγαλύτερη από 35% την 5^η ημέρα, στον αντίποδα της 100% κάλυψης που αποδεικνύεται εδώ.

Συνολικά, οι προκατεργασμένοι σε πλάσμα αέρα και επικαλυμμένοι με κολλαγόνο μικροθάλαμοι ευνοούν την αρχική προσκόλληση και ομοιόμορφη κατανομή των MSCs, προωθώντας έτσι με το πέρασμα των ημερών τον πολλαπλασιασμό τους και συμβάλλοντας σε καλύτερη οργάνωσή τους σε στρωματικό ιστό. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα [21-23], η προσκόλληση των κυττάρων σε υποστρώματα ενισχύεται με τη διαμεσολάβηση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), όπως είναι το κολλαγόνο, καθώς προσομοιάζουν καλύτερα το κυτταρικό μικροπεριβάλλον, και προωθούν έτσι την ομαλή κυτταρική λειτουργία που οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δημιουργία ιστού. Εδώ, το ενσωματωμένο κολλαγόνο τύπου I αποτελεί την πρωταρχική και πιο άφθονη πρωτεΐνη της οστικής εξωκυττάριας μήτρας, υποδηλώνοντας τη συνάφειά του με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Ως εκ τούτου, η προσκόλληση και ομαλή ανάπτυξη των MSCs στους μικροθαλάμους είναι απόρροια της επιτυχούς αινητοποίησης κολλαγόνου στο εσωτερικό τους. Όπως έχει ήδη αποδειχθεί, η αινητοποίηση του κολλαγόνου στις επιφάνειες PDMS επιτυγχάνεται με προκατεργασία πλάσματος. Επομένως, η ενεργοποίηση με πλάσμα, ως προκατεργασία για τη δέσμευση κολλαγόνου, είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό των MSCs και την ανάπτυξη του στρωματικού ιστού στους μικροθαλάμους PDMS.

4.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό, για την αντιμετώπιση της εγγενούς υδροφοβικότητας του PDMS, προτάθηκε η προκατεργασία με πλάσμα της επιφάνειάς του πριν την επίστρωση με κολλαγόνο, ως μια μέθοδος σχετικά σταθερής υδροφιλοποίησής του. Πρόκειται για μία μέθοδο εστιασμένη να εφαρμοστεί σε μικρορευστονικές διατάξεις για να υποστηρίξει την ανάπτυξη κυττάρων.

Μελετήθηκαν αρχικά δύο είδη κατεργασίας πλάσματος για την υδροφιλοποίηση της επιφάνειας PDMS, το πλάσμα αέρα χαμηλής πίεσης και η *in situ* κατεργασία με ατμοσφαιρικό πλάσμα, με το πρώτο να λαμβάνει χώρα κατά την απευθείας ενεργοποίηση των επιφανειών της μικρορευστονικής διάταξης στο στάδιο της συγκόλλησης, και το δεύτερο στο εσωτερικό της μετά τη σφράγιση της. Στοιχειομετρική ανάλυση XPS και φάσματα των περιοχών C1s, O1s και Si2p από το εσωτερικό των μικροθαλάμων απέδειξε ότι και τα δύο είδη προκαλούν οξείδωση, δημιουργώντας οξείδιο SiO_x στην επιφάνεια PDMS. Το ατμοσφαιρικό πλάσμα πλεονεκτεί ως προς το βαθμό οξείδωσης, ο οποίος αποδείχτηκε επιπλέον ότι παραμένει σχεδόν σταθερός μέχρι και μία μέρα μετά. Περαιτέρω εξετάστηκε η κλιματιστική γήρανση PDMS για τα δύο είδη πλάσματος, με μέτρηση ταχύτητας τριχοειδούς άντλησης μέσα σε μικροκανάλια PDMS. Με εξαίρεση την ημέρα της κατεργασίας, όπου η ταχύτητα ροής ήταν σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερη για την κατεργασία σε ατμοσφαιρικό πλάσμα, από την 1^η έως και την 7^η ημέρα, δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά στην υδροφιλοποίησή τους.

Προτιμήθηκε έτσι, το πλάσμα αέρα λόγω της μεγαλύτερης απλότητάς του για το μη ειδικό, και γιατί επιφέρει την απαιτούμενη οξείδωση της επιφάνειας PDMS για την ακινητοποίηση κολλαγόνου. Η επιλογή αυτή επιβεβαιώθηκε μετά από απόδειξη ομοιόμορφης ακινητοποίησης κολλαγόνου πάνω σε προκατεργασμένες με πλάσμα αέρα επιφάνειες PDMS, η οποία μάλιστα απέδωσε τη χαμηλότερη στατική γωνία επαφής στη βιβλιογραφία ($5.6^\circ \pm 1.4^\circ$).

Διερευνώντας περαιτέρω τρόπους ενεργοποίησης των μικρορευστονικών διατάξεων με το πλάσμα αέρα, εκτός της απευθείας ενεργοποίησης, εξετάστηκε και η μέσω διάχυσης, με το πλάσμα να διαχέεται μέσω της εισόδου/εξόδου της μικροδιάταξης. Μετρήσεις γωνιών επαφής εμφάνισαν υπερυδροφιλοποίηση της επιφάνειας PDMS και μάλιστα ομοιόμορφα μετά την επίστρωση κολλαγόνου για την απευθείας ενεργοποίηση, επιλέγοντάς την έτσι, ως τον προτεινόμενο τρόπο προκατεργασίας πριν το κολλαγόνο. Η διατήρηση της υδροφιλικότητας της επιφάνειας PDMS με την εν λόγω προκατεργασία πλάσματος, καθώς και λεπτών στρωμάτων SiO₂ μετά την επίστρωση κολλαγόνου, επιβεβαιώθηκε μέχρι και την 7^η ημέρα ακόμη και με διατήρηση σε ξηρό περιβάλλον. Λόγω της ομοιότητας με τα υλικά των μικροθαλάμων καλλιέργειας (PDMS και γυαλί), αποδείχθηκε με αυτό τον τρόπο η μονιμοποίηση της υδροφιλικότητας του εσωτερικού τους. Μάλιστα, η γωνία επαφής $44.4^\circ \pm 2.2^\circ$ των προκατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένων με κολλαγόνο επιφανειών PDMS είναι η χαμηλότερη από τις δημοσιευμένες μελέτες σε κατάσταση ξηρασίας την 7^η ημέρα. Ως επιπρόσθετος χαρακτηρισμός, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS), στις προκατεργασμένες επιφάνειες PDMS το πάχος του κολλαγόνου προσδιορίστηκε 27.3 ± 7.0 nm.

Αποτελώντας μία από τις λίγες μελέτες που πραγματοποιούν καλλιέργεια κυττάρων σε μικρορευστονικές διατάξεις PDMS με ενσωματωμένη την προτεινόμενη μέθοδο κατεργασίας πλάσματος, οι μικροθάλαμοι καλλιέργειας, προκατεργασμένοι με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένοι με κολλαγόνο, χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια MSCs για 5 ημέρες. Προέκυψε ενισχυμένη ανάπτυξη των MSCs και απρόσκοπτη δημιουργία τριδιάστατου στρωματικού ιστού, αγγίζοντας 100% επιφανειακή κάλυψη των μικροθαλάμων με κύτταρα την 5^η ημέρα, η υψηλότερη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αποδείχθηκε έτσι, η ικανότητα της προκατεργασίας με πλάσμα αέρα ως μεθόδου ακινητοποίησης κολλαγόνου, να ενισχύσει και να συντηρήσει τη μακροπρόθεσμη καλλιέργεια κυττάρων σε μικρορευστονικές διατάξεις PDMS.

Αυτή η γρήγορη και απλή μέθοδος τροποποίησης της επιφάνειας PDMS ενσωματώνεται στη μικροδιάταξη μυελού των οστών και φιλοδοξεί να εφαρμοστεί και σε άλλες πλατφόρμες μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΥΠΟ ΡΟΗ

Τα μικρορρευστονικά συστήματα που λειτουργούν υπό ροή εμφανίζουν εγγενή φαινόμενα δημιουργίας φυσαλίδων. Στόχος του συγκεκριμένου κεφαλαίου είναι η διερεύνηση της δυνατότητας συνεχούς, υπό ροή τροφοδοσίας της μικροδιάταξης μυελού των οστών με θρεπτικό υλικό. Για το λόγο αυτό, θα πραγματοποιηθεί μελέτη του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθαλάμους υπό ροή (ενεργή) τροφοδοσία, με σκοπό τη μετέπειτα εφαρμογή στο μικροθαλάμο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης. Η μελέτη αφορά σε χαμηλές και υψηλότερες ροές, προς χαρτογράφηση του φαινομένου σε συνάρτηση με τη ροή, ενώ γίνεται απόπειρα περιορισμού των φυσαλίδων με εφαρμογή βελιωτικών ενεργειών, καθώς και παγίδευσής τους, σε μια προσπάθεια αντιμετώπισής του.

5.1 Δημιουργία φυσαλίδων σε μικρορρευστονικά συστήματα υπό ροή (ενεργή τροφοδοσία): Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η δημιουργία και συσσώρευση φυσαλίδων αποτελεί ίσως το βασικότερο και περισσότερο συστηματικό πρόβλημα στη λειτουργία των μικρορρευστονικών συστημάτων υπό ροή. Η παγίδευση αέρα κατά την τροφοδοσία μέσω αντλιών, καθώς και κατά τη συνήθη προετοιμασία τους με τη διαδοχική ενσωμάτωση και αφαίρεση σωληνίσκων και διασυνδέσεων, ή ακόμη και κατά τη μεταφορά από τον επωαστήρα στο μικροσκοπιο (και το αντίστροφο), καθιστά τη δημιουργία φυσαλίδων ένα φαινόμενο εγγενές των μικρορρευστονικών διατάξεων υπό ροή. Είναι μάλιστα χαρακτηριστικό, ότι οι ανεπιθύμητες φυσαλίδες μετά την είσοδό τους στις διατάξεις, είναι δύσκολο να απομακρυνθούν, ενώ αντιθέτως, σταδιακά μεγαλώνουν σε μέγεθος, λόγω διαφοράς πίεσης κατά τη ροή της διάταξης [1], προκαλώντας τις περισσότερες φορές μόνιμες επιπτώσεις. Συγκεκριμένα, μπορεί να προκληθεί έμφραξη μικροκαναλιών ή αισθητήρων, βίαιες μεταβολές στη ροή, κ.λ.π., που διαταράσσουν τη στρωτή ροή των μικρορρευστονικών συστημάτων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη απόδοση των διατάξεων [2]. Οι επιπτώσεις είναι ακόμη πιο κρίσιμες, όταν οι διατάξεις χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια κυττάρων ή οργανοειδών, όπως στην περίπτωση της συγκεκριμένης έρευνας, όπου απαιτούνται πολλές ημέρες ή ακόμη και εβδομάδες συντήρησης της ροής. Οι φυσαλίδες ασκούν υψηλές επιφανειακές τάσεις στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού, που δημιουργούν πιέσεις στα κύτταρα, ικανές να διαρρήξουν τις κυτταρικές τους μεμβράνες [3]. Επιπλέον, η παρουσία τους αυξάνει τις διατμητικές τάσεις στα τοιχώματα της διάταξης κατά τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την προσκόλληση των κυττάρων σε αυτά και μεταβάλλοντας έτσι δραστηρικά το μικροπεριβάλλον τους [4,5]. Τίθεται συνεπώς, σε κάθε περίπτωση, σε κίνδυνο η βιωσιμότητα και η ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων.

5.1.1 Αίτια δημιουργίας φυσαλίδων

Από την προηγούμενη παράγραφο, γίνεται κατανοητό πως για την ομαλή λειτουργία των μικρορρευστονικών διατάξεων, ειδικότερα σε ό,τι αφορά σε εφαρμογές σχετιζόμενες με την καλλιέργεια κυττάρων, κρίνεται απαραίτητος ο περιορισμός του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων. Προς την επίτευξη αυτού, είναι

σημαντικό αρχικά να κατανοηθούν οι αιτίες και οι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργούνται οι φυσαλίδες. Έτσι, παρά τις πολλαπλές πηγές δημιουργίας τους, οι πρωταρχικές αιτίες τους συνοψίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τον υπεριορεσμό του υγρού σε αέρια, και την ύπαρξη σημείων πυρήνωσης των φυσαλίδων κατά μήκος του μικρορευστονικού δικτύου.

Ως προς την πρώτη αιτία, τον υπεριορεσμό ενός υγρού σε αέρια, ξεκινάμε αρχικά θεωρώντας ένα υγρό σε ισορροπία με ένα αέριο, το οποίο φυσιολογικά περιέχει μόρια του αερίου αυτού διαλυμένα στο εσωτερικό του. Κατ' αντιστοιχία στο εργαστήριο, για παράδειγμα τα συνήθη αντιδραστήρια, ισότονα διαλύματα ή θρεπτικά υλικά περιέχουν συγκεκριμένη συγκέντρωση (c) μορίων αέρια, κυρίως αζώτου και οξυγόνου. Ορίζεται λοιπόν η συγκέντρωση των μορίων αυτών αέρα διαλυμένων σε ένα υγρό σε κατάσταση ισορροπίας (c_s) από το νόμο του Henry:

$$c_s = H(T)P_g \quad (1)$$

όπου $H(T)$ είναι η σταθερά διαλυτότητας του νόμου του Henry, εξαρτώμενη από το εκάστοτε αέριο και μειούμενη με την αύξηση της θερμοκρασίας, και P_g είναι η πίεση του αερίου στην αέρια φάση. Σε κατάσταση ισορροπίας ($c = c_s$), το υγρό ονομάζεται κορεσμένο, ενώ οι δυναμικές καταστάσεις, όπου η συγκέντρωση c των μορίων είναι μεγαλύτερη ($c > c_s$) ή μικρότερη ($c < c_s$) της συγκέντρωσης ισορροπίας, καθορίζονται από τη σχέση:

$$\zeta = \frac{c}{c_s} - 1$$

Στην περίπτωση λοιπόν όπου $c > c_s$, ισχύει ότι $\zeta > 0$ και το υγρό θεωρείται υπεριορεσμένο, ενώ αντιθέτως, όταν $c < c_s$, άρα και $\zeta < 0$, τότε το υγρό είναι υποκορεσμένο. Συγκεκριμένα, όταν ένα υγρό είναι υπεριορεσμένο, σημαίνει ότι δεν μπορεί να συγκρατήσει άλλα αέρια, οπότε θα απελευθερώσει αέρια στο περιβάλλον, ώστε να επιστρέψει στην κατάσταση ισορροπίας, που στην περίπτωση ενός κλειστού μικρορευστονικού συστήματος, λόγω μη άμεσης επαφής με το περιβάλλον, τα αέρια αυτά εγκλωβίζονται στο υγρό.

Καταστάσεις στις οποίες μπορεί να συμβεί κάτι τέτοιο είναι κατά τις απότομες μεταβολές στη θερμοκρασία ή την πίεση, και συγκεκριμένα, κατά την αύξηση της θερμοκρασίας ή τη μείωση της πίεσης, όπως συμβαίνει κατά μήκος ενός μικρορευστονικού καναλιού. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της θέρμανσης του θρεπτικού υλικού τροφοδοσίας μιας διάταξης (που προηγουμένως φυλασσόταν στην ψύξη) ή κατά τη θέρμανση μιας διάταξης, όπως π.χ. κατά την εκτέλεση της τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR), η συγκέντρωση ισορροπίας μειώνεται, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα κορεσμού. Αντίστοιχα, κατά την τροφοδοσία μιας διάταξης υπό ροή, το υγρό από μια κατάσταση ισορροπίας, ευρισκόμενο υπό πίεση μέσα στη δεξαμενή, καταλήγει στη διάταξη σε μια κατάσταση χαμηλότερης πίεσης μέχρι να εξέλθει στην έξοδο, μειώνοντας αντίστοιχα τη συγκέντρωση ισορροπίας (βλ. σχέση (1)).

Παρ' όλα αυτά, η ύπαρξη μιας κατάστασης υπεριορεσμού, δεν επαρκεί για το σχηματισμό και τη συντήρηση μιας φυσαλίδας, γεγονός που μάς οδηγεί στη δεύτερη αιτία, την πυρήνωση της φυσαλίδας. Η πυρήνωση αποτελεί στην ουσία το πρώτο βήμα για τη δημιουργία μιας φυσαλίδας, δηλαδή το σημείο κατά το οποίο ένας πρώτο-πυρήνας φθάνει ένα κρίσιμο μέγεθος, το οποίο εξασφαλίζει τη συνεχή του αύξηση. Συναντώνται δύο είδη πυρήνωσης, η ομοιογενής, που συμβαίνει στο εσωτερικό του υγρού, και η ετερογενής, που συμβαίνει σε μια στερεή διεπιφάνεια, όπως είναι τα τοιχώματα ή τα σωματίδια.

Ως προς την ομοιογενή πυρήνωση, προκειμένου να σχηματιστεί μια φυσαλίδα στο εσωτερικό του υγρού, θα πρέπει να ξεπεραστεί ένα συγκεκριμένο ενεργειακό φράγμα που ισοδυναμεί με την ενέργεια διάρρηξης του

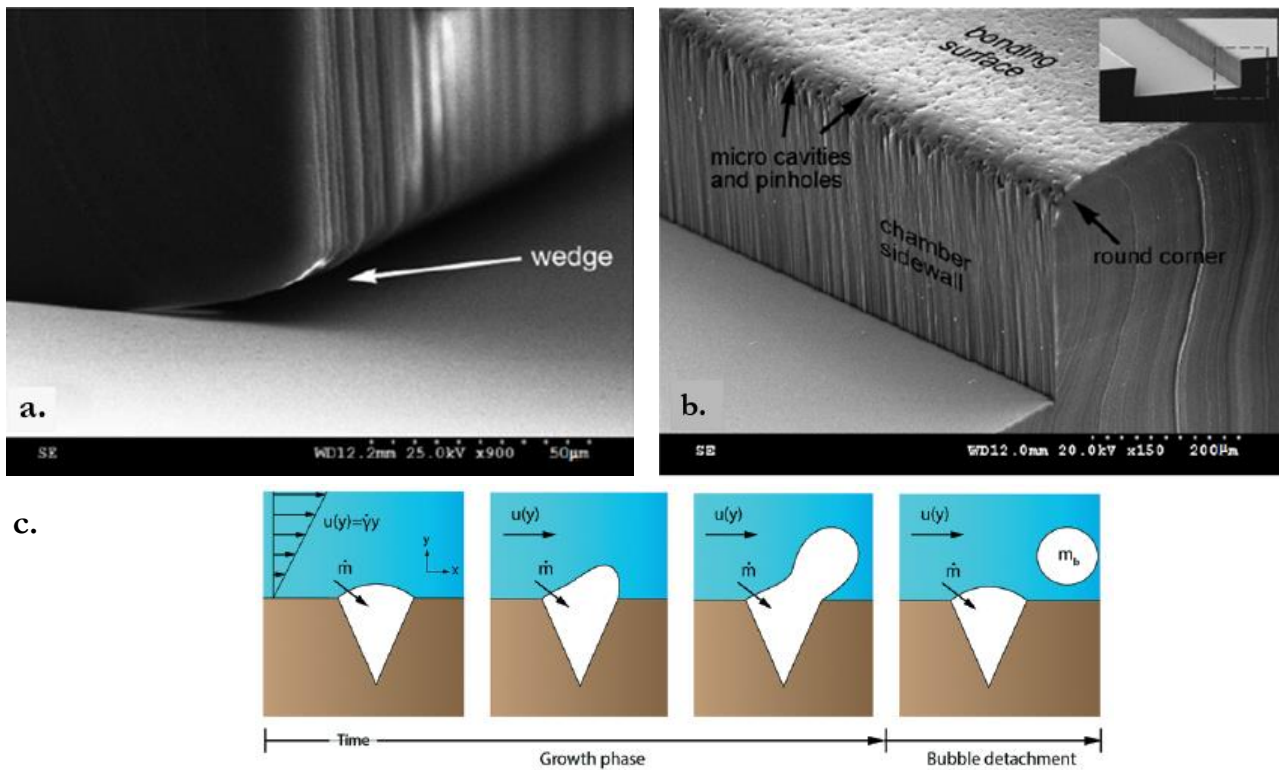
υγρού με το οποίο βρίσκεται σε επαφή. Η ενέργεια αυτή ισούται με την ενέργεια που απαιτείται για το σχηματισμό μιας φυσαλίδας με ακτίνα ίση με την κρίσιμη ακτίνα R_c , η οποία προκύπτει από τη σχέση:

$$R_c = \frac{2\sigma}{P_s \zeta},$$

όπου σ είναι η επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια υγρού-αερίου και P_s η τελική πίεση στην οποία βρίσκεται το υγρό. Η κρίσιμη ακτίνα είναι η ακτίνα για την οποία η φυσαλίδα παραμένει σταθερή, ως αποτέλεσμα του ότι η συγκέντρωση των μορίων αέρα στο υγρό και στη διεπιφάνεια υγρού-φυσαλίδας είναι ίσες, και ως εκ τούτου δεν σημειώνεται διάχυση μεταξύ των δύο φάσεων. Όταν μια φυσαλίδα σε κατάσταση κορεσμού ($\zeta = 0$) έχει ακτίνα μικρότερη της κρίσιμης ($R < R_c$), τότε η πίεση στο εσωτερικό της είναι μεγαλύτερη από την περιβάλλουσα, με αποτέλεσμα τη διάχυση μορίων αέρα από μέσα προς τα έξω, και την τελική διάλυσή της. Αντιθέτως, σε καταστάσεις υπεριορεσμού ($\zeta > 0$), όταν η ακτίνα της φυσαλίδας είναι ίση ή μεγαλύτερη της κρίσιμης ($R \geq R_c$), τότε η φυσαλίδα είτε θα μείνει σταθερή ($R = R_c$), είτε θα μεγαλώνει επ' άοριστο ($R > R_c$). Γενικότερα, η ομοιογενής πυρήνωση απαιτεί υψηλά επίπεδα υπεριορεσμού ($\zeta \gg 100$), που είναι σπάνιο να συμβούν και δε βρίσκουν εφαρμογή στις συνήθεις μικρορευστονιές εφαρμογές.

Αντιθέτως, εστιάζοντας στην ετερογενή πυρήνωση, αποτελεί την περισσότερο συχνά εμφανιζόμενη στα μικρορευστονικά συστήματα, καθώς πρακτικά απαιτεί αρκετά χαμηλότερα επίπεδα υπεριορεσμού (συνήθως $\zeta \leq 5$) [6]. Ο λόγος είναι ότι η παρουσία μιας στερεής επιφάνειας λειτουργεί ως καταλύτης, μειώνοντας το ενεργειακό φράγμα πυρήνωσης και επομένως και την κρίσιμη ακτίνα R_c , αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες πυρήνωσης μιας φυσαλίδας. Μάλιστα, σε τόσο χαμηλά επίπεδα υπεριορεσμού, έχει παρατηρηθεί ότι οι φυσαλίδες δημιουργούνται πριν καν το σύστημα γίνει υπέριορο και μόνο σε προϋπάρχοντες πυρήνες, γνωστούς ως πυρήνες Harvey, που σχηματίζονται σε σχισμές, κοιλότητες ή γενικότερα ατέλειες στις στερεές επιφάνειες [6]. Το γεγονός αυτό αποτελεί και απόδειξη ότι ο υπεριορεσμός δεν αρκεί από μόνος του για το σχηματισμό μιας φυσαλίδας.

Μία πρώτη περίπτωση ετερογενούς πυρήνωσης αποτελούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στερεής επιφάνειας, η ύπαρξη αιχμηρών γωνιών ή τραχύτητας στη μικρο ή και νανοκλίμακα. Τέτοιες ατέλειες παγιδεύουν αέρα κυρίως κατά το πρώτο γέμισμα των διατάξεων με υγρό, δημιουργώντας πιθανές εστίες πυρήνων Harvey. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 5.1a, διακρίνεται μια εικόνα SEM της διατομής ενός μικροαντιδραστήρα, κατασκευασμένου από PDMS συγκολλημένο με γυαλί. Παρατηρείται ότι η γωνία συγκόλλησης δεν είναι ιδανικά κάθετη, αλλά σχηματίζει μια σχισμή, οφειλόμενη στο ότι το PDMS καμπυλώνεται στο άκρο του. Αντίστοιχα, στο Σχήμα 5.1b εστιάζοντας στο ίδιο το PDMS με την επιφάνεια συγκόλλησης να είναι στραμμένη προς τα επάνω, είναι εμφανής η ύπαρξη μικροτραχύτητας, με την παρουσία μικροδομών και μικροκοιλοτήτων, προερχόμενης από την προκύπτουσα μήτρα εξαγωγής. Πρόκειται για περιπτώσεις σχηματισμού πυρήνων Harvey, με πιο πιθανή εξέλιξη σε καταστάσεις υπεριορεσμού να συνεχίσουν να μεγαλώνουν [7]. Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1c, είτε θα μεγαλώνουν εκτοπίζοντας το υγρό στο μικροκανάλι, είτε θα φτάσουν σε ένα κρίσιμο μέγεθος, όπου ένα τμήμα τους θα αποκολληθεί και θα παρασυρθεί από τη ροή, με τον πυρήνα όμως να παραμένει εγκλωβισμένο στην ατέλεια και να απελευθερώνει αέναα φυσαλίδες [8].

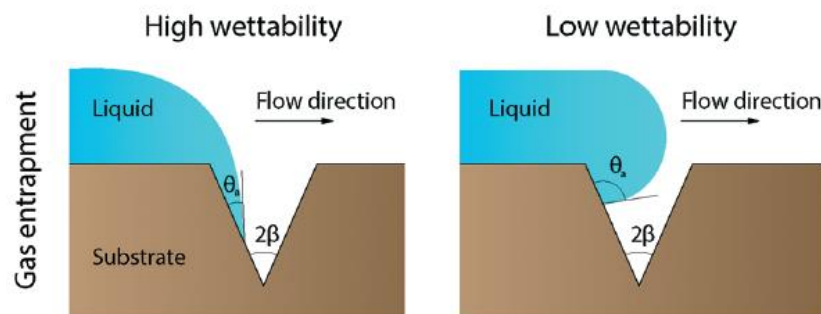


Σχήμα 5. 1. Εικόνες SEM μικροαντιδραστήρα PDMS συγκολλημένου σε γυαλί, όπου απεικονίζεται η δημιουργία σχισμής μεταξύ των δύο επιπέδων λόγω καμπυλότητας της γωνίας του PDMS (a), και η ύπαρξη μικροτραχύτητας στο επίπεδο του PDMS (b) [9]. c) Κύκλος ανάπτυξης φυσαλίδων και αποκόλλησης από έναν πυρήνα Harvey εντός σχισμής με την εφαρμογή ροής [7].

Εκτός όμως από τις επιφάνειες με κατασκευαστικές ατέλειες, έχει αποδειχθεί η δημιουργία φυσαλίδων και σε λείες επιφάνειες. Ειδικότερα, οι φυσαλίδες αυτές κατά το σχηματισμό τους βρίσκονται στη νανοκλίμακα, διαθέτοντας τυπικές διαστάσεις περίπου 100 nm σε πλάτος και 10 – 20 nm σε ύψος, με τις μέγιστες τιμές τους να φθάνουν τα 1 000 nm και 100 nm σε πλάτος και ύψος, αντίστοιχα [10]. Οι νανοφυσαλίδες αυτές, παρουσιάζουν σημαντική σταθερότητα και κατά περιπτώσεις, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να παραμείνουν στην επιφάνεια μέχρι και 44 h [11]. Αν και δεν είναι ξεκάθαρο το κατά πόσο οι φυσαλίδες μπορούν να μεγαλώσουν πέρα από τη νανοκλίμακα, κάτι τέτοιο θα ήταν πιθανό σε περίπτωση πυκνά διατεταγμένων νανοφυσαλίδων που τείνουν να συνενωθούν μεταξύ τους σε μεγαλύτερες φυσαλίδες, καθώς η μεγαλύτερη ακτίνα είναι περισσότερο ενεργειακά ευεργετική [12].

Σημαντικό ρόλο στην ετερογενή πυρήνωση διαδραματίζει η διαβροχή των στερεών επιφανειών, τόσο στις επιφάνειες με κατασκευαστικές ατέλειες, όσο και στις λείες. Ξεινώνοντας με την περίπτωση των επιφανειών με ατέλειες, θεωρούμε αρχικά ένα μέτωπο υγρού, το οποίο συναντά για πρώτη φορά, για παράδειγμα μια σχισμή. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.2, αν η επιφάνεια του στερεού είναι υδρόφιλη (στατική γωνία επαφής $\theta < 90^\circ$) και η γωνία προώθησης μικρότερη από τη σχηματιζόμενη γωνία της σχισμής ($\theta_a < 2\beta$), τότε το υγρό θα διαβρέξει πλήρως και θα γεμίσει τη σχισμή [13]. Αν η επιφάνεια όμως είναι υδρόφοβη ($\theta > 90^\circ$), τότε το υγρό κατά την κίνησή του θα εγκλωβίσει αναπότρεπτα αέρα [14], σχηματίζοντας έναν πυρήνα Harvey. Στις λείες επιφάνειες, η διαβροχή φαίνεται να επηρεάζει με αντίστοιχο τρόπο τη δημιουργία νανοφυσαλίδων, καθώς στις υδρόφοβες επιφάνειες είναι πιο συχνά εμφανιζόμενες, και παρουσιάζουν σταθερότητα μέχρι και για 20 h,

ακόμη και σε συνθήκες υποκορεσμού [15]. Μετρίως υδρόφιλες επιφάνειες μπορούν επίσης να συντηρούν νανοφυσάλιδες, με την προϋπόθεση βέβαια υψηλών επιπέδων υπεκορεσμού [16].



Σχήμα 5. 2. Παγίδευση αέρα κατά τη διαβροχή μιας επιφάνειας με ατέλεια (σχισμή). Στην υδρόφιλη επιφάνεια το υγρό θα διαβρέξει τη σχισμή (αριστερά), ενώ στην υδρόφοβη θα εγκλωβιστεί αέρας (δεξιά) [7]. Παρουσιάζεται επίσης το σχήμα της διεπαφής αέρα-υγρού λόγω των στατικών γωνιών επαφής που προκύπτουν.

Ένας τελευταίος παράγοντας ετερογενούς πυρήνωσης είναι η παρουσία μορίων επιφανειοδραστικών ουσιών στο εσωτερικό του υγρού, είτε με τη μορφή ρύπων, είτε ως πρόσθετα συστατικά. Τα μόρια των επιφανειοδραστικών ουσιών διαθέτουν ταυτόχρονα υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες και τείνουν να διαχέονται μέχρι να απορροφηθούν στη διεπιφάνεια υγρού – αερίου. Η απορρόφησή τους έχει ως αποτέλεσμα δύο βασικές συνέπειες: i) τη δημιουργία μιας «μεμβράνης» αποτελούμενης από μόρια της επιφανειοδραστικής ουσίας στη διεπιφάνεια, η οποία επηρεάζει την ανταλλαγή μορίων αέρα, καθώς και ii) τη μείωση της ασκούμενης επιφανειακής τάσης στη διεπιφάνεια, λόγω αντίστοιχης μείωσης των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων του υγρού εξαιτίας της παρεμβολής των μορίων της ουσίας [7]. Ο βαθμός της διαλυτότητας της ουσίας είναι κρίσιμος, καθώς οι διαλυτές ουσίες δεν επηρεάζουν σημαντικά τη διάχυση των μορίων αέρα διαμέσου της διεπιφάνειας, σε αντίθεση με τις μη διαλυτές [17]. Αναλυτικότερα, οι μη διαλυτές ουσίες, παραμένουν σταθερά στη διεπιφάνεια και μπορούν επιπλέον να συμπιεστούν, μειώνοντας έτσι τη διαπερατότητα της διεπιφάνειας. Κατά τη συμπίεση αυτή, η φυσαλίδα συρρικνώνεται, μέχρις ότου να σχηματιστεί ένα μονόστρωμα στη διεπιφάνειά της, οπότε και παραμένει σταθερή. Σε αυτή την περίπτωση, οι επιφανειοδραστικές ουσίες στην ουσία λειτουργούν ως σταθεροποιητές της φυσαλίδας, προστατεύοντάς την από τις όποιες διαφορές στην πίεση και από τη διάχυση μορίων αέρα.

5.1.2 Τρόποι πρόληψης δημιουργίας φυσαλίδων

Από την ανάλυση της προηγούμενης παραγράφου, γίνεται κατανοητό ότι ο σχηματισμός φυσαλίδων αποτελεί ένα επίμονο φαινόμενο, άρρηκτα συνυφασμένο με το χειρισμό των μικρορρευστονικών διατάξεων. Με δεδομένη την αναπόδραστη φύση του, κρίνεται απαραίτητος τουλάχιστον ο περιορισμός του σε επίπεδα που δε θα επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργικότητα και την εφαρμογή της μικρορρευστονικής διάταξης. Οι ενέργειες για τον περιορισμό του γίνονται με γνώμονα την αντιμετώπιση των δύο βασικών αιτιών πρόκλησής του, δηλαδή τη δημιουργία σημείων πυρήνωσης των φυσαλίδων, και συγκεκριμένα, ετερογενούς πυρήνωσης, και τον υπεκορεσμό του υγρού σε αέρια. Συνοπτικά, ελέγχοντας τη γεωμετρία της διάταξης, τις ιδιότητες

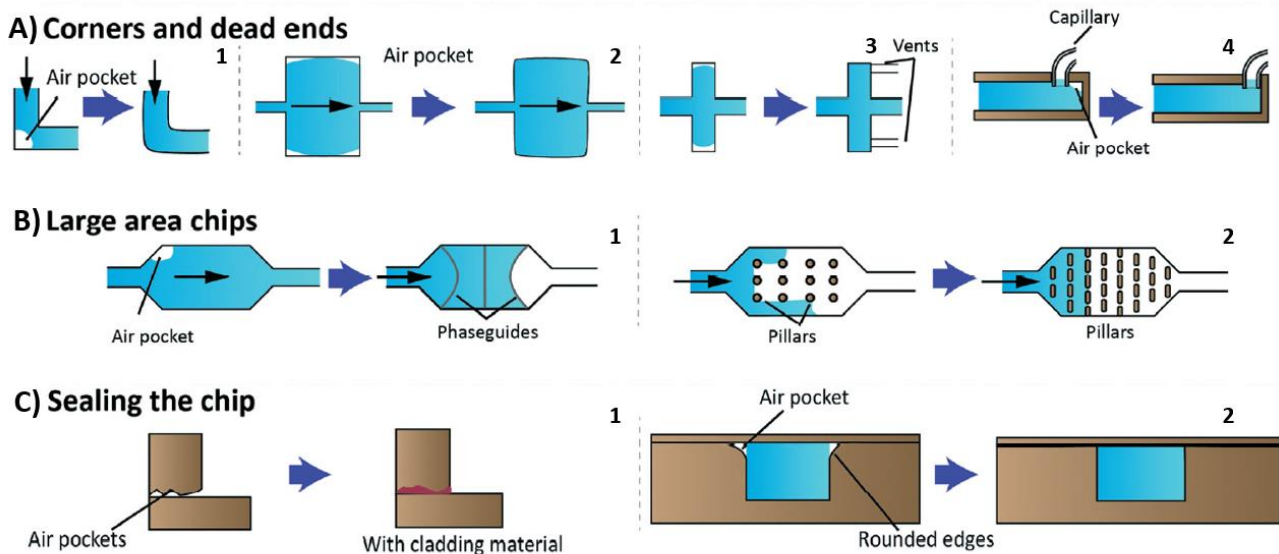
διαβροχής της, την ορθή σύνδεσή της με το περιβάλλον και αποφεύγοντας τις μεταβολές σε θερμοκρασία και πίεση, μπορεί να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων.

A. Γεωμετρία της διάταξης. Η ύπαρξη τραχύτητας, αιχμηρών γωνιών και αδιεξόδων είναι πιθανές εστίες δημιουργίας πυρήνων Harvey, που είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με τροποποιήσεις στο σχέδιο της διάταξης.

Στην περίπτωση των αιχμηρών γωνιών, θα πρέπει να επιχειρείται η εξομάλυνσή τους, καμπυλώνοντάς τις. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.3, οι αιχμηρές γωνίες είναι περιοχές παγίδευσης αέρα, και θα πρέπει να αντικαθίστανται με περισσότερο στρογγυλοποιημένες και με σχέδια που προσεγγίζουν περισσότερο τις ροϊκές γραμμές Σχήμα 5.3 A(1-2). Αν υπάρχουν δομές που λειτουργούν ως αδιέξοδα, τότε συστήνεται η δημιουργία ανοιγμάτων προς το περιβάλλον κοντά στα αδιέξοδα, που δημιουργούν βαθμίδες πίεσης και βοηθούν τη ροή να διαβρέξει περιοχές που άλλοτε θα εγκλωβιζόταν αέρας Σχήμα 5.3 A(3-4). Κάτι τέτοιο είναι πιθανό είτε με τη διάνοιξη νέων μικροκαναλιών Σχήμα 5.3 A3, εξασφαλίζοντας όμως παράλληλα ότι δε θα υπάρξει παράκαμψη της ροής μέσα από αυτά, όπως για παράδειγμα με τη χρήση υδρόφοβων επιφανειών [18], είτε εναλλακτικά με την τοποθέτηση καναλιών εισόδου-εξόδου Σχήμα 5.3 A4.

Μια ακόμη κοινή περίπτωση δημιουργίας ανεπιθύμητων φυσαλίδων είναι η κατασκευή θαλάμων μεγάλου πλάτους και χαμηλού ύψους. Εδώ το μέτωπο του υγρού δε μετακινείται με την ίδια ταχύτητα σε όλο το πλάτος του θαλάμου, αλλά γρηγορότερα στην περιφέρεια περικυκλώνοντας έτσι την κεντρική περιοχή, η οποία τελικά παραμένει ακάλυπτη. Ένας τρόπος αντιμετώπισης είναι με την τοποθέτηση οδηγών φάσης (phaseguides), που είναι μακρόστενες δομές μικρού πλάτους (ή γενικότερα, κάποιες αλλαγές στη γεωμετρία), που εκτείνονται σε όλο το μήκος ενός κινούμενου ορίου υγρού – αερίου [19]. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται μια απότομη αύξηση στην τριχοειδή πίεση, που ανακόπτει την ταχύτητα του μετώπου υγρού και το αναγκάζει να ευθυγραμμιστεί με τη δομή πριν να προχωρήσει στον επόμενο οδηγό φάσης, εξασφαλίζοντας έτσι ελεγχόμενη πλήρωση του θαλάμου σε διακριτά βήματα [19] (Σχήμα 5.3 B1). Άλλη μέθοδος είναι η ενσωμάτωση στοιχείων στο σχέδιο, όπως για παράδειγμα μικροοιλώνων, που λειτουργούν σαν τοπικά φράγματα του μετώπου υγρού. Να σημειωθεί ότι χρειάζεται προσοχή στο σχεδιασμό και στην επιλογή των σημείων τοποθέτησής τους ώστε να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη διαβροχή σε όλο τον όγκο του θαλάμου (Σχήμα 5.3 B2).

Καταστάσεις παγίδευσης αέρα είναι επίσης συχνές κατά τη συγκόλληση δύο ή περισσότερων τμημάτων της διάταξης, τα οποία παρουσιάζουν τραχύτητα και ερχόμενα σε επαφή σχηματίζουν κενές περιοχές και αιχμηρές γωνίες. Κάτι τέτοιο μπορεί να αντιμετωπιστεί με την εφαρμογή υλικού στεγανοποίησης, όπως για παράδειγμα κάποια εμπορική κόλλα ή PDMS, για την κάλυψη των ατελειών (Σχήμα 5.3 C1). Τέλος, θα πρέπει να αποφεύγονται οι καμπύλες γωνίες στο επίπεδο συγκόλλησης των τμημάτων, καθώς αποτελούν αντίστοιχα περιοχές εγκλωβισμού αέρα (Σχήμα 5.3 C2).



Σχήμα 5. 3. Παραδείγματα δομών που συμβάλλουν στο σχηματισμό φυσαλίδων σε μικρορρευστονικές διατάξεις και τρόποι αντιμετώπισης. Α) Γωνίες και αδιέξοδα, όπου συστήνεται η καμπύλωση των γωνιών, και ο εξαερισμός ή η αλλαγή τοποθέτησης των καναλιών εισόδου/εξόδου. Β) Δυσκολία στην πλήρωση θαλάμων με υψηλή αναλογία πλάτους προς ύψος, που αντιμετωπίζεται με τοποθέτηση οδηγών φάσης ή γεωμετρίας μικροκολώνων. Γ) Συγκόλληση επιπέδων με μικροτραχύτητα, όπου προτείνεται η στεγανοποίηση με κατάλληλα υλικά και η αποφυγή στρογγυλεμένων άκρων [7].

Β. Ιδιότητες διαβροχής της διάταξης. Όπως αναπτύχθηκε στην Παράγραφο 5.1.1, οι υδρόφοβες επιφάνειες ευνοούν περισσότερο το σχηματισμό φυσαλίδων, καθώς λόγω ατελούς διαβροχής, δημιουργούν πιο εύκολα εστίες πυρήνων Harvey. Για την κατασκευή των μικρορρευστονικών διατάξεων προτιμώνται συνήθως πολυμερή λόγω μεγαλύτερης ευκολίας κατεργασίας, και συγκεκριμένα ελαστομερή, θερμοπλαστικά και θερμοσκληρυνόμενα, με μεγάλο όμως ποσοστό αυτών να είναι υδρόφοβα. Μια συνήθης μέθοδος υδροφιλοποίησης των πολυμερών, αλλά και ανόργανων υλικών με βάση το πυρίτιο, όπως για παράδειγμα το γυαλί, είναι η κατεργασία με πλάσμα οξυγόνου, που εισαγάγει πολικές ομάδες στην επιφάνεια [20]. Στην περίπτωση του ελαστομερούς PDMS, όπως αναλύεται περισσότερο διεξοδικά στο Κεφάλαιο 4, η υδροφιλοποίησή του επιτυγχάνεται κύρια με τη δημιουργία ομάδων σιλανόλης (-SiOH) [21], αν και είναι παροδική λόγω γήρανσης [22]. Αντιθέτως, τα θερμοπλαστικά πολυμερή διατηρούν την υδροφιλικότητά τους για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, κατά περιπτώσεις και χρόνια [23]. Άλλη μέθοδος υδροφιλοποίησης, ευρύτερα εφαρμόσιμη στα πολυμερή, είναι η επικάλυψη των επιφανειών με αυτοοργανωμένα μονοεπίπεδα (self-assembled monolayers) μορίων. Πρόκειται για αυθόρμητα οργανωμένες δομές λόγω της συνάφειας των ενεργών ομάδων τους με την επιφάνεια, με περισσότερο υδρόφιλες τις ομάδες που περιέχουν -OH, -SiH₃ -CONH₂ [24,25].

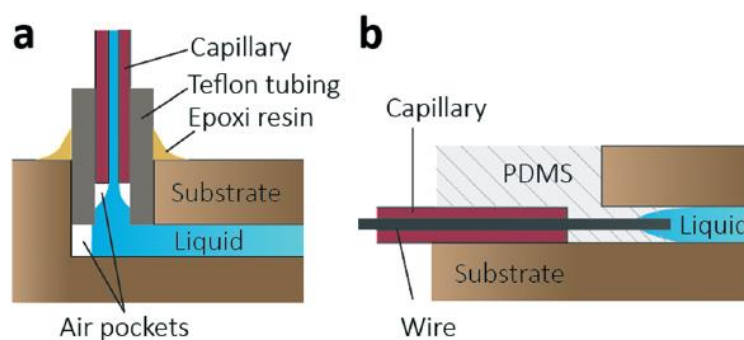
Γ. Χρήση εμπορικών εξαρτημάτων και σύνδεση της διάταξης με το περιβάλλον. Για τη λειτουργία των μικρορρευστονικών διατάξεων, καθώς και τη σύνδεσή τους με το περιβάλλον, χρησιμοποιούνται εμπορικά στοιχεία, όπως βαλβίδες, διασταυρώσεις (T-junctions), διασυνδέσεις και προσαρμογείς. Τα στοιχεία αυτά, αν και είναι σχεδιασμένα να ελαχιστοποιούν νεκρούς όγκους [26], όπως για παράδειγμα με το να είναι βιδωτού τύπου, είναι πρακτικά αδύνατο να αποφευχθεί ο σχηματισμός πυρήνων Harvey σε όλο το μήκος μιας διαδρομής από το φιαλίδιο τροφοδοσίας μέχρι και τη διάταξη. Είναι σύνηθες να σχηματίζονται στο τέλος των σωληνίσκων, καθώς και στα σημεία επαφής στερεού – στερεού είτε μεταξύ προσαρμογέων και

σωληνίσκων, είτε μεταξύ παρεμβαλλόμενων διασυνδέσεων, και μάλιστα, κατά κύριο λόγο κατά την πρώτη πλήρωση του συστήματος με υγρό.

Ένας τρόπος αντιμετώπισης θα ήταν η αποφυγή χρήσης πολλών τέτοιων εξαρτημάτων και η το δυνατόν μεγαλύτερη απλούστευση του συστήματος με τις απολύτως απαραίτητες διασυνδέσεις. Επιπλέον, στις περιπτώσεις ενεργούς τροφοδοσίας μέσω αντλίας, η πίεση σταδιακά μειώνεται από το φιαλίδιο τροφοδοσίας/σύριγγα προς τη διάταξη λόγω υδραυλικής αντίστασης, ευνοώντας έτσι συνθήκες υπερχορεσμού. Συστήνεται επομένως, η τοποθέτηση των οποιωνδήποτε εξαρτημάτων να πραγματοποιηθεί όσο το δυνατόν πιο κοντά στο φιαλίδιο τροφοδοσίας/σύριγγα.

Ακόμη, θα πρέπει να εξασφαλίζεται καλή σφράγιση στα σημεία εφαρμογής των διασυνδέσεων και να περιορίζεται ο νεκρός όγκος τους, με τη χρήση κόλλας, εποξειδικής ρητίνης ή ταινίας Teflon. Εναλλακτικά, θα πρέπει η διασύνδεση να τοποθετείται σε θέση που αποτρέπει τη δημιουργία νεκρού όγκου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.4 [27]. Στο Σχήμα 5.4a παρουσιάζεται η σύνδεση ενός τριχοειδούς σωληνίσκου εισόδου με τη διάταξη, που έχει τοποθετηθεί εντός δευτέρου σωληνίσκου Teflon, ώστε να εξασφαλιστεί καλύτερη επαφή, ο οποίος περιμετρικά έχει καλυφθεί με εποξειδική ρητίνη για καλύτερη σφράγιση. Όπως όμως γίνεται αντιληπτό, συνεχίζει να σχηματίζεται νεκρός όγκος στο τέλος τόσο του τριχοειδούς σωληνίσκου, όσο και της περιβάλλουσας δομής. Στο Σχήμα 5.4b, παρουσιάζεται ένας τρόπος αποφυγής παγίδευσης αέρα, όπου ο τριχοειδής στερεώνεται στο υπόστρωμα με την έγχυση PDMS και στην κατεύθυνση της ροής, ενώ εσωτερικά διαπερνάται από ένα μεταλλικό σωληνίσκο για να μη διακοπεί η ροή, ο οποίος μετά αφαιρείται.

Τέλος, δε θα πρέπει να αμελείται η ποιότητα των σωληνίσκων και των διασυνδέσεων, που μετά από κάποιο διάστημα χρειάζεται να αντικατασταθούν. Ιδιαίτερα μάλιστα οι πολυμερικοί σωληνίσκοι φθείρονται φυσιολογικά μετά από χρήση ορισμένων χημικών, δημιουργώντας τραχύτητα που σχηματίζει πυρήνες Harvey.



Σχήμα 5. 4. a) Σύνδεση τριχοειδούς σωληνίσκου και περιοχές όπου μπορεί να σχηματιστούν θύλακες αέρα. b) Τοποθέτηση του τριχοειδούς σωληνίσκου στην κατεύθυνση ροής, διαπερνώντας στο εσωτερικό του μεταλλικό σύρμα, που στη συνέχεια αφαιρείται [27].

Δ. Έλεγχος πειραματικών συνθηκών. Όπως αποδείχτηκε στην Παράγραφο 5.1.1 και τη Σχέση (1), υπερχορεσμός ($\zeta > 0$) μπορεί να προκληθεί λόγω μείωσης της πίεσης ή αύξησης της θερμοκρασίας μεταξύ του φιαλιδίου τροφοδοσίας/σύριγγας και της μικρορευστονικής διάταξης. Οι βαθμίδες αυτές πίεσης και

θερμοκρασίας είναι βέβαια εγγενείς του πειραματικού συστήματος, αλλά υπάρχει η δυνατότητα περιορισμού τους, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα υπερχορεσμού και τη συχνότητα παραγωγής φυσαλίδων.

Η βαθμίδα πίεσης μπορεί να μειωθεί μειώνοντας την υδραυλική αντίσταση μεταξύ φιαλιδίου τροφοδοσίας/σύριγγας και διάταξης, ενδεικτικά δηλαδή μειώνοντας το μήκος των σωληνίσκων σύνδεσης ή αυξάνοντας τη διάμετρό τους. Ασφαλώς βέβαια, υπάρχει και η δυνατότητα να μειωθεί η συχνότητα της παροχής, μειώνοντας την πίεση στο φιαλίδιο τροφοδοσίας/σύριγγα, όπου αυτό είναι εφικτό. Επίσης, σε κλειστά μικρορευστονικά συστήματα μπορεί να γίνει αναρρόφηση από την έξοδο, αντί της συνηθισμένης τροφοδοσίας από την είσοδο, που εξασφαλίζει ότι όλο το σύστημα παραμένει σε πιέσεις κάτω της ατμοσφαιρικής [7]. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε συνθήκες υποχορεσμού, αποτρέποντας το σχηματισμό φυσαλίδων, αλλά και διαλύοντας τις ήδη υπάρχουσες.

Για τον περιορισμό της βαθμίδας θερμοκρασίας, θα πρέπει όλο το σύστημα να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία. Για παράδειγμα, αν υπάρχει ενεργός τροφοδοσία, το υγρό εντός του φιαλιδίου τροφοδοσίας ή της σύριγγας θα πρέπει να βρίσκεται στην ίδια θερμοκρασία με τη διάταξη. Για παράδειγμα, όταν το θρεπτικό υλικό ή γενικότερα, κάποιο βιολογικό αντιδραστήριο φυλάσσεται στους 4°C ή ακόμη και στους -20°C, συστήνεται η θέρμανσή του στη θερμοκρασία τροφοδοσίας πριν την έναρξη του πειράματος. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν σε εφαρμογές σχετιζόμενες με την καλλιέργεια κυττάρων, όχι όμως σε εκείνες που απαιτούν μεταβαλλόμενες είτε/και υψηλές θερμοκρασίες στη διάταξη, όπως σε PCR συνεχούς ροής.

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης των βαθμίδων πίεσης και θερμοκρασίας είναι εξαέρωση των υγρών τροφοδοσίας πριν την ενσωμάτωσή τους στη διάταξη, ως μια μέθοδος μείωσης των επιπέδων κορεσμού τους. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί συνδέοντας το υγρό με αντλία κενού, που αφαιρεί σε σημαντικό ποσοστό τον περιεχόμενο αέρα. Για παράδειγμα, για κενό 0.1 bar, περίπου 90% του αέρα απομακρύνεται, όπως προκύπτει από το νόμο του Henry (Σχέση (1)). Παρ'όλα αυτά, η εξαέρωση του υγρού είναι προσωρινή, καθώς κατά τη σύνδεσή του με τη διάταξη απαιτούνται περίπου 5 – 30 min, αναλόγως του όγκου του υγρού, για να ολοκληρωθεί η διάχυση των αερίων και να επέλθει νέα ισορροπία [7]. Συνεπώς, οι πειραματικοί χρόνοι επηρεάζουν την εμφάνιση φυσαλίδων, και ακόμη και αν λάβουμε υπόψη μας το χρόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη και την αποκόλληση φυσαλίδων, τα μικρής χρονικής διάρκειας πειράματα, που δεν ξεπερνάνε τη 1 h – 2 h, είναι προτιμητέα και χαρακτηρίζονται από μειωμένη περιεκτικότητα σε φυσαλίδες. Εναλλακτικές της σύνδεσης με αντλία κενού είναι η θέρμανση ή και ο βρασμός του υγρού ή η τοποθέτησή του σε υπερήχους [28].

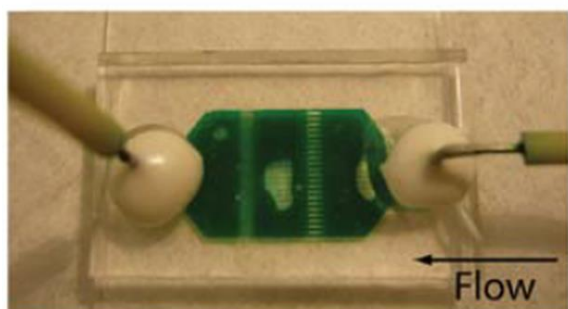
Ε. Ενσωμάτωση παγίδων φυσαλίδας. Η δημιουργία φυσαλίδων είναι εγγενής ενός μικρορευστονικού συστήματος υπό ροή, και παρά τις προαναφερόμενες βελτιωτικές ενέργειες (Α – Δ), σε πολλές περιπτώσεις η σύνδεση μιας παγίδας φυσαλίδας κρίνεται απαραίτητη για τον περιορισμό του φαινομένου, ιδιαίτερα σε πειράματα που απαιτούν μέρες για την ολοκλήρωσή τους. Οι παγίδες αυτές μπορεί είτε να κατασκευάζονται είτε να προμηθεύονται εμπορικά. Στην πρώτη περίπτωση, η λειτουργία τους στηρίζεται συνήθως σε τρεις βασικές αρχές ή και συνδυασμό ορισμένων από αυτές, και συγκεκριμένα, στην ενσωμάτωση κάποιων φυσικών στοιχείων και γεωμετριών, στη χρήση διαπερατών υλικών, όπως το PDMS, και στην εκμετάλλευση των ιδιοτήτων διαβροχής των υλικών. Παρ'αυτά παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα παγίδων από τη βιβλιογραφία, συμβατών με εφαρμογές για την καλλιέργεια κυττάρων.

Οι Sung et al. [29] κατασκεύασαν μια μικροπαγίδα, απεικονιζόμενη στο Σχήμα 5.5a, η οποία παγιδεύει μηχανικά τις φυσαλίδες με φυσικά στοιχεία, επιτρέποντας παράλληλα την ανεμπόδιση ροή των υγρών από εναλλακτικές διαδρομές, μη φρασσόμενες από φυσαλίδες. Η διττή αυτή λειτουργία της επιτυγχάνεται διαχωρίζοντας το κεντρικό κανάλι PDMS σε δύο επιμέρους επίπεδα, το καθένα βάρους 50 μm, τα οποία απεικονίζονται στο Σχήμα 5.5b. Συγκεκριμένα, το σχέδιο του άνω επιπέδου αποτελείται από κενούς χώρους

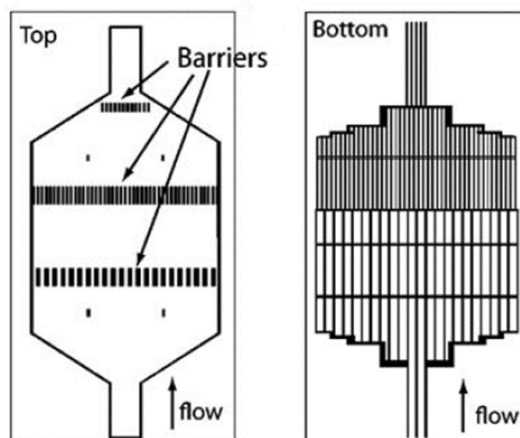
για την παγίδευση φυσαλίδων και 3 σειρές από εμπόδια, που ανακόπτουν τη διαδρομή των φυσαλίδων. Τα εμπόδια διαθέτουν διάκενα μειούμενου μεγέθους καθώς προχωρούν προς την έξοδο, ξεκινώντας από τα 200 μm στην πρώτη σειρά και καταλήγοντας στα 100 μm στην τρίτη. Με αυτό τον τρόπο, φυσαλίδες μεγαλύτερου μεγέθους από 100 μm ανακόπτονται στα εμπόδια, επιτυγχάνοντας έτσι να μην μπλοκαριστεί ακόμη και το στενότερο κανάλι της διάταξης σε σύνδεση, πλάτους 100 μm . Αντίστοιχα, το κάτω επίπεδο που αποτελείται από πολλαπλά στενότερα κανάλια πλάτους 30 – 50 μm , δίοδοι διαφυγής της ροής σε περίπτωση φραγής του άνω επιπέδου. Έτσι, εκμεταλλευόμενη όχι μόνο την πλευστότητα των φυσαλίδων, αλλά και μέσω φυσικών εμποδίων, η παγίδα συγκεντρώνει τις φυσαλίδες στο άνω επίπεδο, ενώ το κάτω που αποτελείται από στενότερες δομές επιτρέπει τη συνέχιση της ροής.

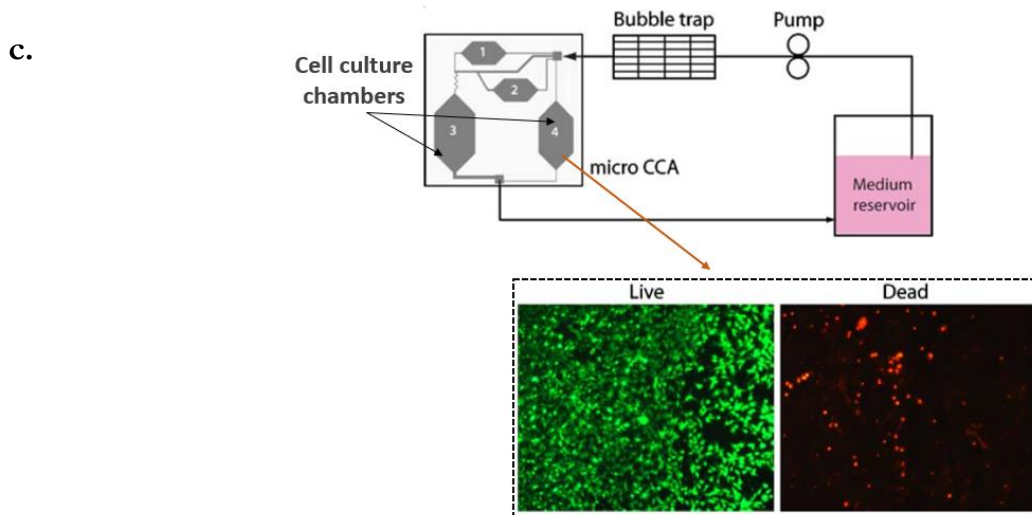
Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της δυνατότητας της παγίδας να συντηρήσει μια πολυήμερη καλλιέργεια κυττάρων. Έτσι, η παγίδα συνδέθηκε στην είσοδο μικρορευστονικής διάταξης μCCA (micro cell culture analog – μCCA [30], μέσα στην οποία τοποθετήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος HepG2/C3A, δημιουργώντας ένα κλειστό κύκλωμα ανατροφοδοτούμενο μέσω περισταλτικής αντλίας, απεικονιζόμενο στο Σχήμα 5.5c. Μετά από 72 h ανατροφοδοσίας, σήμανση ζωντανών/νεκρών κυττάρων (με χρώση καλσεΐνη AM/αιθίδιο ομοδιμερές, αντίστοιχα) παρουσίασε ότι τα περισσότερα κύτταρα ήταν ζωντανά, με μόνο ένα ποσοστό περίπου 10% αυτών να είναι νεκρά (Σχήμα 5.5c). Αντίστοιχο σύστημα, απουσία παγίδας δεν μπόρεσε να ολοκληρωθεί λόγω συσσώρευσης φυσαλίδων.

a.



b.

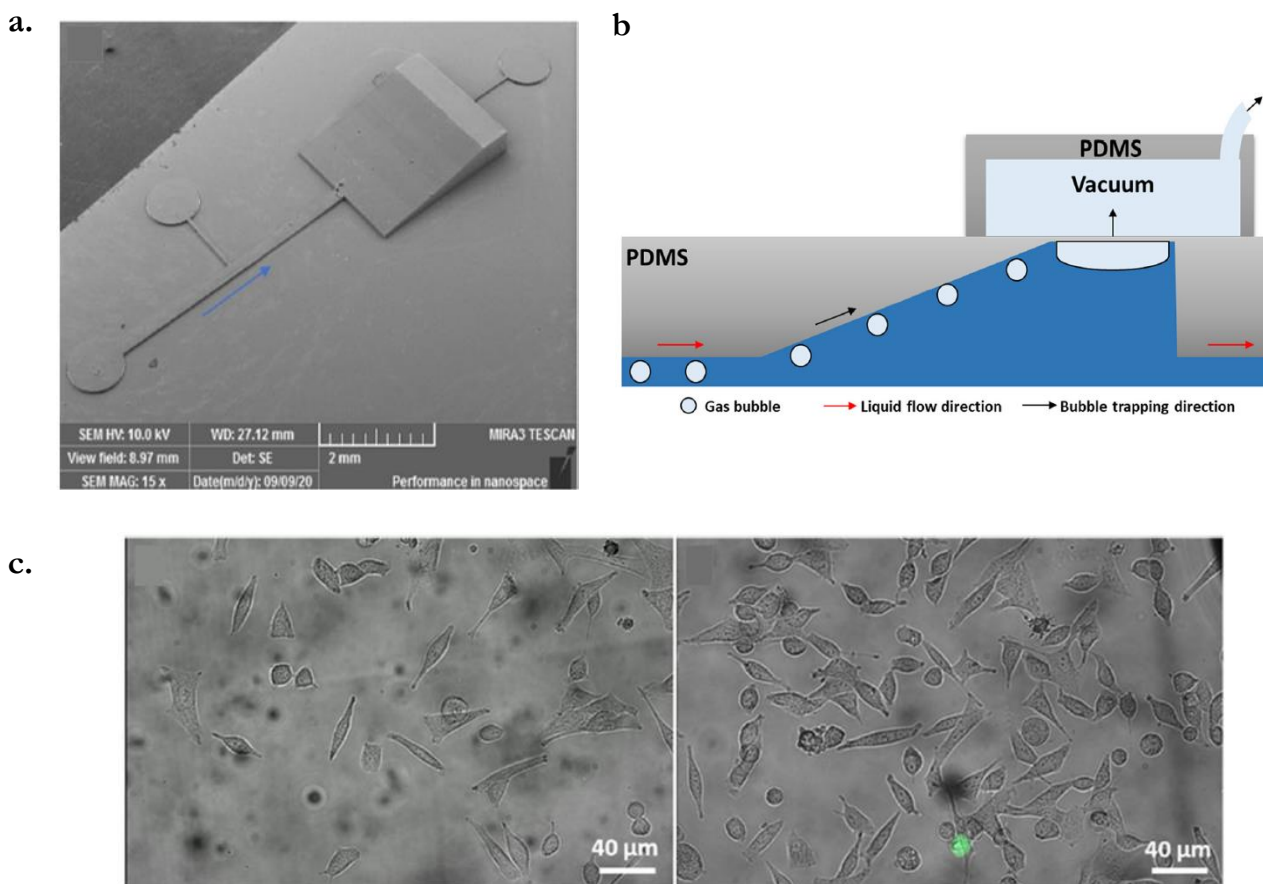




Σχήμα 5. 5. Μικροπαγίδα φυσαλίδων συνδεδεμένη εξωτερικά με μικρορευστονική διάταξη. α) Ρεαλιστική εικόνα της παγίδας. β) Αποτελείται από δύο επίπεδα και η λειτουργία της στηρίζεται σε μηχανική παγίδευση με χρήση φυσικών εμποδίων. Στο άνω επίπεδο υπάρχουν τρεις σειρές από εμπόδια μειούμενου διάκενου για την παγίδευση φυσαλίδων μεγαλύτερων από 100 μm, ενώ το κάτω επίπεδο επιτρέπει τη διαφυγή της ροής. γ) Μικρορευστονική διάταξη μCCA σε σύνδεση με τη μικροπαγίδα διατήρησε τη βιωσιμότητα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων κατά περίπου 90% (live/dead cell imaging) σε διάστημα 72 h [29].

Οι Huang et al. [31] ανέπτυξαν μια μικροδιάταξη με ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, η οποία επιτρέπει την εκτόνωσή τους σε πραγματικό χρόνο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την τεχνική του πολυμερισμού δύο φωτονίων (two-photon polymerization – 2PP) κατασκεύασαν μια τριδιάστατη δομή μέσα στη μικροδιάταξη, η οποία αποτελείται από το μικροκανάλι εισόδου, ύψους 30 μm, ένα μικροθάλαμο μεγαλύτερου πλάτους, με κεκλιμένη οροφή θετικής κλίσης και μήκος τόξου 2.03 mm, η οποία καταλήγει σε μια επίπεδη περιοχή σταθερού ύψους 350 μm και μήκους 500 μm, και τέλος, το μικροκανάλι εξόδου, ίδιου ύψους (30 μm) με το μικροκανάλι εισόδου, όπως φαίνεται στην εικόνα SEM του Σχήματος 5.6a . Ο μικροθάλαμος στην ανώτερη περιοχή του καλύπτεται από μια λεπτή διαπερατή μεμβράνη PDMS, πάχους 300 μm, και επιτρέπει τη σύνδεσή του με ένα θάλαμο αρνητικής πίεσης προς εκτόνωση των συσσωρευμένων φυσαλίδων. Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της παγίδας, απεικονιζόμενη στο Σχήμα 5.6b , όσες φυσαλίδες εισέρχονται αρχικά από το μικροκανάλι εισόδου, λόγω της πλευστότητάς τους θα κινηθούν ανοδικά κατά μήκος του κεκλιμένου και θα συγκεντρωθούν στην κορυφή του, όπου είναι δυνατόν να απομακρυνθούν μέσω της λεπτής μεμβράνης με εφαρμογή αρνητικής πίεσης. Έτσι, έχοντας αφαιρέσει τις φυσαλίδες από την κυρίως ροή, το υγρό συνεχίζει ανεμπόδιστα προς το μικροκανάλι εξόδου.

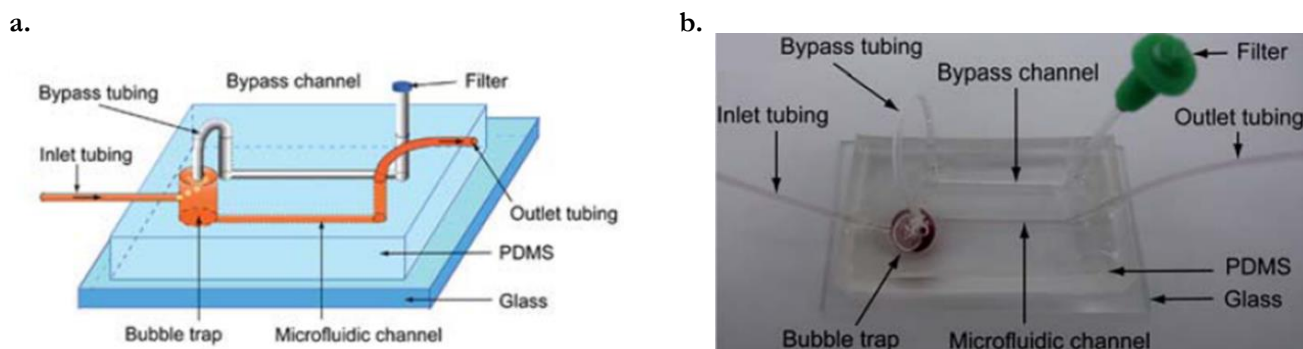
Η λειτουργία της μικροδιάταξης - παγίδας εξετάστηκε σε πείραμα με καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων A549 (ATCC CCL-185™) εντός του μικροθαλάμου για 5 ημέρες υπό συνεχή τροφοδοσία 5 μL/h και με την παράλληλη εφαρμογή αρνητικής πίεσης. Η βιωσιμότητα και ανάπτυξη των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από τη λειτουργία της παγίδας, αντιθέτως ευνοήθηκε, καθώς δεν υπήρξε συσσώρευση φυσαλίδων και τα κύτταρα από την 1^η ημέρα καλλιέργειας έως την 5^η αυξήθηκαν πληθυσμιακά αγγίζοντας 70% πληρότητα με ποσοστό μεγαλύτερο του 95% να είναι ζωντανά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.6c μετά από χρώση ιωδιδίου.



Σχήμα 5. 6. Μικροδιάταξη με ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, κατασκευασμένη με την τεχνική του πολυμερισμού δύο φωτονίων (two-photon polymerization – 2PP). a) Εικόνα SEM της μικροδιάταξης με την παγίδα φυσαλίδων. b) Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της παγίδας. Οι φυσαλίδες στο μικροκανάλι ανέρχονται σταδιακά προς το μικροθάλαμο παγίδευσης, όπου με εφαρμογή αρνητικής πίεσης μέσω της λεπτής μεμβράνης PDMS, απομακρύνονται συνεχώς. c) Δοκιμή λειτουργίας της μικροδιάταξης απέδωσε επιτυχή καλλιέργεια και ανάπτυξη επιθηλιακών κυττάρων A549 για 5 ημέρες με συνεχή εκτόνωση των φυσαλίδων. Σχεδόν 100% βιωσιμότητα την 1^η ημέρα (αριστερά), και 95% μετά από τις 5 ημέρες (δεξιά) [31].

Συνεχίζοντας, οι Zheng et al. [32] εισήγαγαν ένα άπλο σύστημα παγίδας φυσαλίδων, που δεν παρεμβάλλεται στην κυρίως ροή και δεν απαιτεί παύση του πειράματος ή σύνδεση με αρνητική πίεση για την εκτόνωση των φυσαλίδων. Ειδικότερα, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.7a, το σύστημα αποτελείται από δύο μικροκανάλια, εκ των οποίων το ένα διαρρέεται από την κυρίως ροή και χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια κυττάρων, ενώ το δεύτερο χρησιμεύει ως μια παράκαμψη για την εκκένωση φυσαλίδων μέσω ενός παραβολικού σωλήνα. Ο σωλήνας αυτός ενώνει το θάλαμο της παγίδας με το δεύτερο μικροκανάλι, το οποίο στο τέλος του καταλήγει σε φίλτρο 0.2 μm με τριπλή χρησιμότητα, την εκτόνωση φυσαλίδων, την αποφυγή βακτηριακών μολύνσεων και την ανταλλαγή αερίων (O₂, CO₂) για την κυτταροκαλλιέργεια. Στο Σχήμα 5.7b παρατίθεται η αντίστοιχη μακροσκοπική εικόνα του συστήματος με την ενσωματωμένη παγίδα. Προ-οστεοβλάστες ποντικού MC 3T3 E1 καλλιεργήθηκαν στο μικροκανάλι καλλιέργειας για 10 ημέρες υπό συνεχή παροχή 3 μL/min μέσω αντλίας.

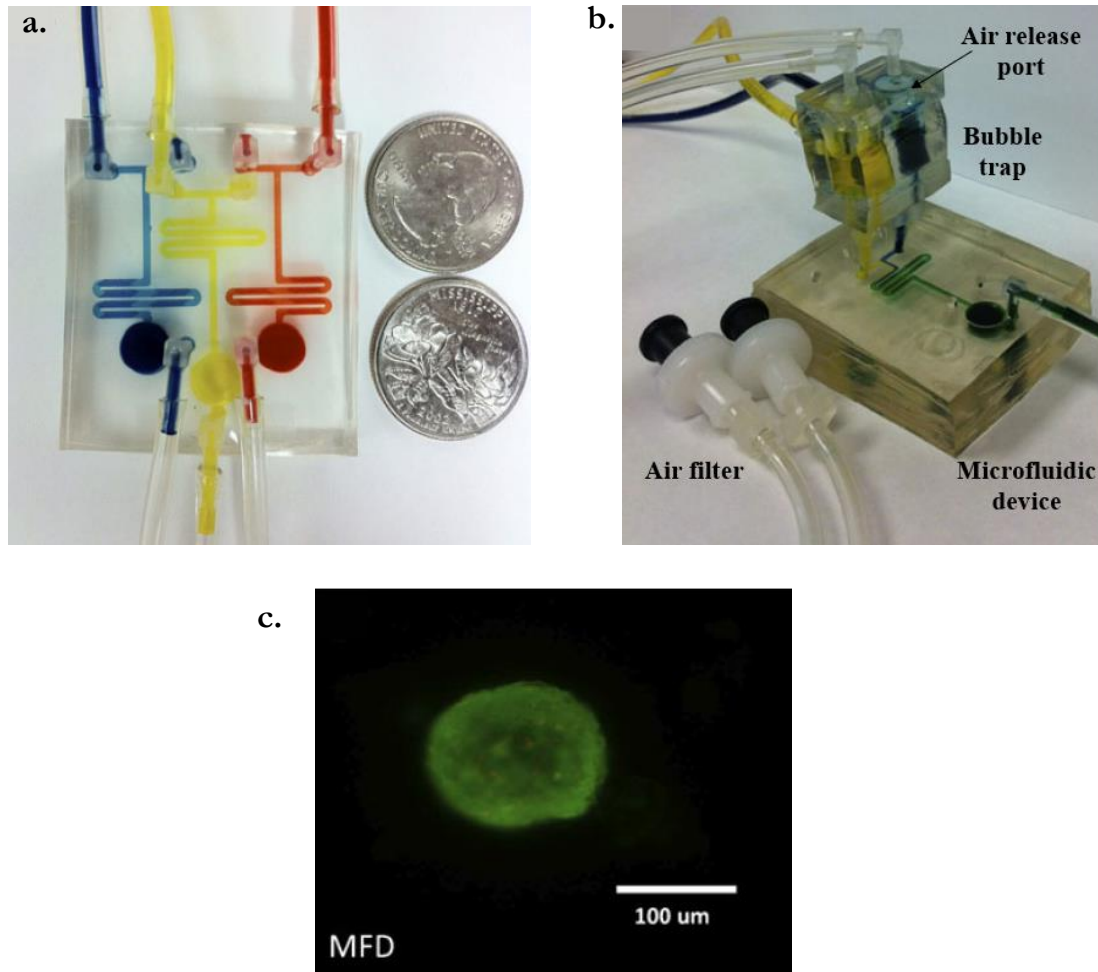
Μετά από σήμανση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα τους, αποδείχτηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων και ο γρήγορος πολλαπλασιασμός τους στο τέλος των 10 ημερών.



Σχήμα 5. 7. Εξωτερικά συνδεδεμένο σύστημα PDMS παγίδευσης φυσαλίδων. α) Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος, αποτελούμενο από δύο μικροανάλια, ένα διαρροέμενο από την κυρίως ροή, και ένα για την εκτόνωση φυσαλίδων μέσω παραβολικού σωλήνα. β) Φωτογραφία του συστήματος παγίδευσης φυσαλίδων [32].

Οι Wang et al. [33] ανέπτυξαν μια μικρορευστονική διάταξη με μια φορητή παγίδα παρεμφερούς λειτουργίας με τους Zheng et al. [32], με τη διαφορά όμως ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μια οποιαδήποτε γεωμετρία μικροδιάταξης. Η μικροδιάταξη αποτελείται από τρία επίπεδα PDMS με τρία πανομοιότυπα και ανεξάρτητα μεταξύ τους μικρορευστονικά συστήματα (Σχήμα 5.8α). Το ανώτερο επίπεδο καθενός μικρορευστονικού συστήματος, διαθέτει δύο εισόδους, μία έξοδο και έναν ελισσόμενο αναμεικτη αποτελούμενο από έξι επιμέρους αναμεικτες μορφής «ψαροκόκκαλου», που χρησιμεύει στην ανάμειξη διαλυμάτων και τη δημιουργία δυναμικών συνθηκών για την κυτταροκαλλιέργεια. Το ενδιάμεσο επίπεδο έχει ένα μικροθάλμο 50 μL , και το κατώτερο επίπεδο μια συστοιχία από μικροπηγάδια ύψους και διαμέτρου 100 μm και 350 μm , αντίστοιχα. Ως προς την παγίδα, είναι απλής κατασκευής, με τρία επίπεδα PDMS, πάχους 0.5 cm το ανώτερο και κατώτερο, και 1 cm το ενδιάμεσο, όπου και βρίσκονται δύο κυλινδρικοί θάλαμοι διαμέτρου 8 mm. Η εκτόνωση φυσαλίδων επιτρέπεται μέσω ενός παραβολικού σωλήνα που καταλήγει σε φίλτρο αέρα 0.2 μm . Όλο το σύστημα με τη διάταξη σε σύνδεση με την παγίδα απεικονίζεται στο Σχήμα 5.8b .

Στη μελέτη αυτή, συσσωματώματα κυττάρων παγκρέατος ποντικών καλλιιεργήθηκαν για 24 h σε δυναμικές συνθήκες ροής 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ στα μικροπηγάδια της διάταξης. Δεν παρατηρήθηκαν καθόλου φυσαλίδες, και ένα 97% των κυττάρων παρέμειναν ζωντανά, όπως προκύπτει από το συσσωμάτωμα του Σχήματος 5.8c, όπου με πράσινη φθορίζουσα (Syto-green) σημαίνονται τα ζωντανά και με κόκκινη (βρωμιούχο αιθίδιο) τα νεκρά.

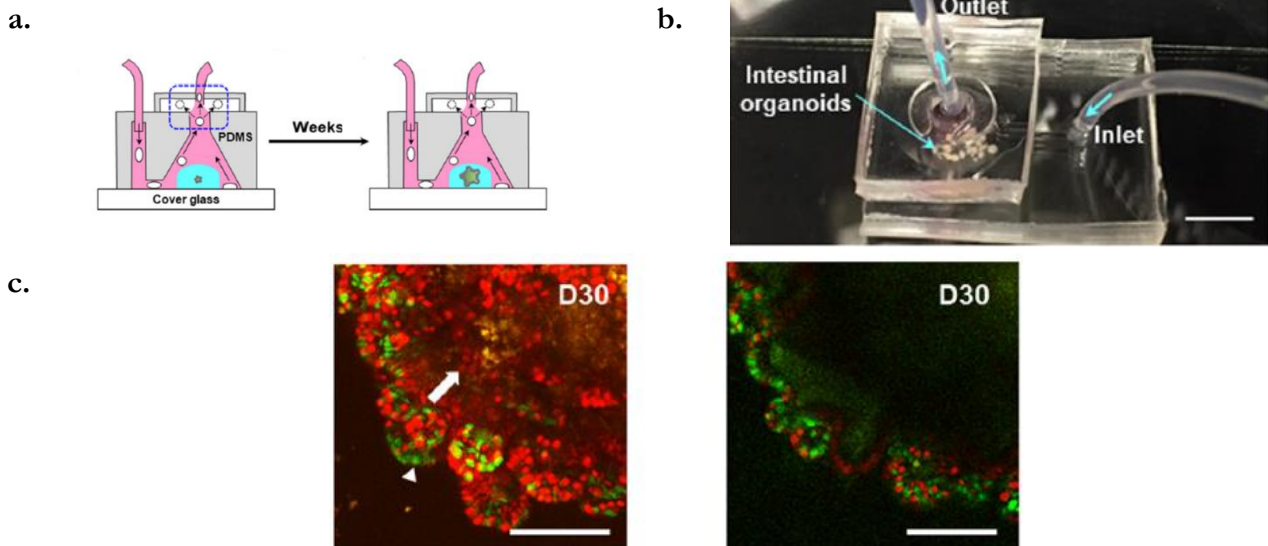


Σχήμα 5. 8. Εξωτερικά συνδεόμενη απλής κατασκευής φορητή παγίδα PDMS. α) Φωτογραφία της μικροδιάταξης, αποτελούμενη από τρία λειτουργικά πανομοιότυπα δίκτυα μικροκαναλιών. Κάθε δίκτυο διαθέτει τρία επίπεδα, με το ανώτερο να χρησιμεύει για την έγχυση και ανάμιξη ουσιών, το ενδιάμεσο για την τροφοδοσία θρεπτικού υλικού, και το κατώτερο για την καλλιέργεια κυττάρων. β) Φωτογραφία της διάταξης με συνδεδεμένη την παγίδα PDMS, αποτελούμενη από τρία επίπεδα, από τα οποία στο ενδιάμεσο βρίσκονται δύο μικροθάλαμοι για την εκτόνωση φυσαλίδων. γ) Εικόνα φθορισμού συσσωματώματος κυττάρων παγκρέατος ποντικών ύστερα από σήμανση με πράσινη χρωστική για τα ζωντανά, και κόκκινη για τα νεκρά κύτταρα. Σχεδόν 100% των κυττάρων παρέμειναν ζωντανά [33].

Τέλος, οι Lee et al. [34] κατασκεύασαν μια μικροδιάταξη εντέρου σε ψηφίδα (intestine-on-a-chip) με ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο σχέδιο του Σχήματος 5.9α, η διάταξη αποτελείται από έναν ανοδικό μικροθάλαμο καλλιέργειας, κωνικού σχήματος, ο οποίος έρχεται σε άμεση επαφή με την παγίδα, που είναι ένας απλός μικροθάλαμος, καλυμένος με μια διαπερατή μεμβράνη PDMS. Το όλο σύστημα είναι από PDMS και μακροσκοπική εικόνα του φαίνεται στο Σχήμα 5.9β. Κατά την αρχή λειτουργίας του, όσες φυσαλίδες εισέρχονται, επιπλέον προς το ανώτερο τμήμα του κώνου και την παγίδα, όπου τελικά διαχέονται μέσω της μεμβράνης στην ατμόσφαιρα.

Η εν λόγω παγίδα δοκιμάστηκε ως προς την καλλιέργεια κυττάρων για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, δηλαδή για 30 ημέρες. Ανθρώπινα εντερικά οργανοειδή τοποθετήθηκαν στο μικροθάλαμο καλλιέργειας υπό τροφοδοσία 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, όπου στο τέλος των 30 ημερών μπορούσαν να διακριθούν διαφοροποιημένες μορφές

των εντερικών βλαστοκυττάρων, σημασμένες με διαφορετικές χρωστικές, κόκκινη και πράσινη, μετά από παρατήρηση 20x σε συνεσιακό μικροσκόπιο (Σχήμα 5.9c). Αυτό σημαίνει πως η παγίδα λειτουργεί αποτελεσματικά, επιτρέποντας στη μικροδιάταξη την επιτυχή συντήρηση και ανάπτυξη του εντερικού μικροπεριβάλλοντος για χρονικό διάστημα ενός μηνός, καθιστώντας τη έτσι κατάλληλη για μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα.



Σχήμα 5. 9. Παγίδα φυσαλίδων ενσωματωμένη στην κορυφή μικροδιάταξης εντέρου σε ψηφίδα. α) Σχηματική αναπαράσταση της μικροδιάταξης με την παγίδα. Ο κωνικός μικροθάλαμος καλλιέργειας έρχεται σε άμεση επαφή με το μικροθάλαμο της παγίδας στην κορυφή του, ο οποίος καλύπτεται από μεμβράνη PDMS, μέσω της οποίας οι ανερχόμενες φυσαλίδες εκτονώνονται στην ατμόσφαιρα. β) Φωτογραφία της μικροδιάταξης με την ενσωματωμένη παγίδα. γ) Εικόνες συνεσιακού μικροσκοπίου από την καλλιέργεια εντερικού οργανοειδούς για 30 ημέρες στη μικροδιάταξη με την παγίδα. Η σήμανση κυττάρων με διαφορετικές χρωστικές (κόκκινη, πράσινη) απέδειξε την ικανότητα των εντερικών βλαστοκυττάρων να διαφοροποιούνται [34].

5.2 Πειραματικό μέρος

5.2.1 Μελέτη δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθαλάμους υπό ροή

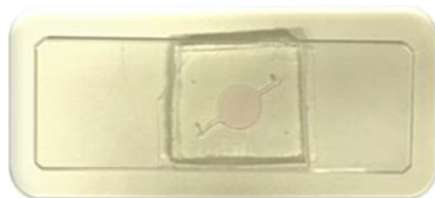
5.2.1.1 Πειραματικές διατάξεις και συνθήκες

Για τη μελέτη της λειτουργίας της μικροδιάταξης υπό ροή, χρησιμοποιήθηκαν μικροθάλαμοι καλλιέργειας σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις: α) σφραγισμένοι μικροθάλαμοι απουσία τροφοδοσίας (μηδενική ροή), β) μικροθάλαμοι υπό χαμηλή ροή (0.04 – 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) και γ) μικροθάλαμοι υπό υψηλότερη ροή (6.7 - 13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Σε κάθε περίπτωση, οι μικροθάλαμοι καλλιέργειας PDMS, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4, δημιουργούνται με την επικόλληση ενός απλού επιπέδου PDMS από τη μία πλευρά, διαστάσεων 30 mm x 25 mm x 3 mm (μήκος x πλάτος x πάχος), κι ενός γυαλιού μικροσκοπίου από την άλλη (Σχήμα 5.10).

Σε όλες τις περιπτώσεις, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων οι μικροδιατάξεις τοποθετούνται εντός φούρνου (Nabertherm High Temperature Furnace, 08/16/P330) σε θερμοκρασία 37°C και με την προσθήκη

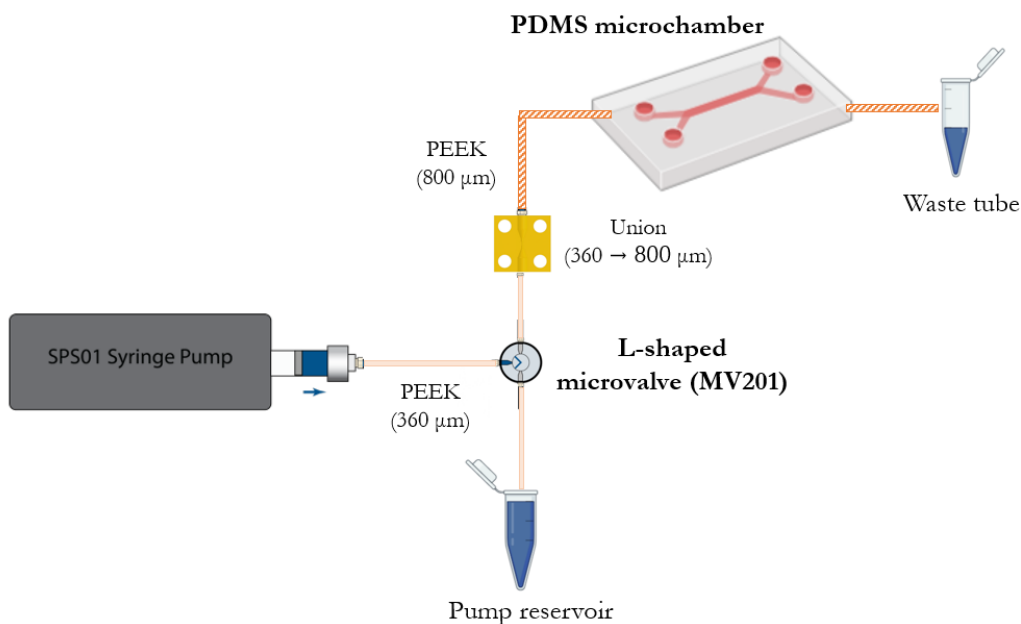
κατάλληλης υγρασίας (κατ'αναλογία με την υγρασία στον επωαστήρα), προς προσομοίωση των συνθηκών καλλιέργειας. Επιπλέον, οι παρατηρήσεις ως προς την επιφάνεια κάλυψης του εσωτερικού των μικροθαλάμων/μικροδιατάξεων με φυσαλίδες είναι ποιοτικές και στηρίζονται σε φωτογραφίες που λήφθηκαν σε δεδομένα χρονικά διαστήματα.



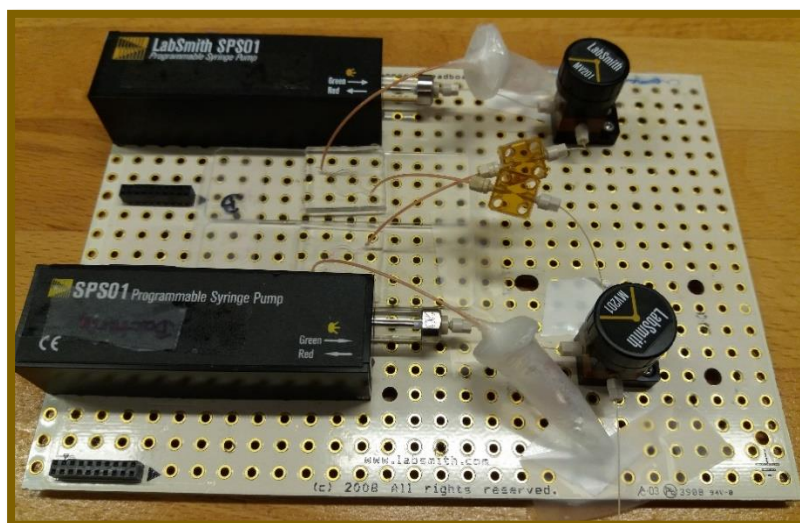
Σχήμα 5. 10. Φωτογραφία του μικροθαλάμου καλλιέργειας PDMS που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων.

Οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι μηδενικής ροής, επικαλύφθηκαν με πιεζοευαίσθητη ταινία πολυολεφίνης (3M 9795 Advanced Polyolefin Microplate Sealing Tape) στην είσοδο και έξοδο τους. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 2 h, 6 h και 12.5 h, ενώ χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις μικροθάλαμοι. Οι μικροθάλαμοι καλλιέργειας υπό χαμηλές ροές τροφοδοτήθηκαν με 0.04 – 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ μέσω σύνδεσης με τις μικροαντλίες σύριγγας LabSmith SPS01, που έχουν περιγραφεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2. Συνοπτικά, η πειραματική διάταξη, απεικονιζόμενη σχηματικά στο Σχήμα 5.11a, περιλαμβάνει τη μικροαντλία σύριγγας LabSmith SPS01 σε σύνδεση με το μικροθάλαμο, ελεγχόμενης ροής από το λογισμικό uProcess, καθώς και μια παρεμβλλόμενη μικροβαλβίδα MV201 (LabSmith Inc.) για τον προσδιορισμό της κατεύθυνσης ροής, προσαρμοσμένες στους κατάλληλους υποδοχείς της πλακέτας uProcess breadboard. Η μικροαντλία είναι μέγιστου όγκου 20 μL για τη ροή 0.04 $\mu\text{L}/\text{min}$, και 40 μL για τις ροές 0.08 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Στην είσοδο και έξοδο της μικροαντλίας και της μικροβαλβίδας συνδέονται τριχοειδή σωληνάκια PEEK, εξωτερικής και εσωτερικής διαμέτρου 360 μm και 150 μm , αντίστοιχα. Στο μικροθάλαμο συνδέονται σωληνάκια PEEK με εξωτερική διάμετρο 800 μm και εσωτερική 360 μm , με την έξοδό του να καταλήγει σε erppendorf προς συλλογή των υγρών. Για τη σύνδεση του μικροθαλάμου με τη μικροβαλβίδα μεσολαβεί ένωση που συνδέει τα δύο σωληνάκια διαφορετικής εξωτερικής διαμέτρου, των 800 μm του μικροθαλάμου με εκείνο των 360 μm της μικροβαλβίδας. Να σημειωθεί πως ο νεκρός όγκος στην αντλία, τα σωληνάκια και τη βαλβίδα περιορίστηκε στο ελάχιστο δυνατό. Κάθε πείραμα, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα σε δύο μικροθαλάμους, με τον καθένα να συνδέεται με τη δική του μικροαντλία για λόγους επαναληψιμότητας, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.11b. Οι μικροθάλαμοι παρατηρήθηκαν συγκεκριμένα για ροές τροφοδοσίας 0.04 $\mu\text{L}/\text{min}$, 0.08 $\mu\text{L}/\text{min}$, και 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Για τις ροές 0.04 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 0.08 $\mu\text{L}/\text{min}$, η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε ανά 2 h για σύνολο 6 h, καθώς και στο τέλος των 12.5 h για τη ροή 0.04 $\mu\text{L}/\text{min}$. Για την καθυστέρηση της εισόδου φυσαλίδων στο μικροθάλαμο, δοκιμάστηκε επιπλέον η τοποθέτηση της πλακέτας breadboard υπό κλίση 10° – 20° για τις ροές 0.08 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$, και για σύνολο παρατήρησης 6 h και 3 h, αντίστοιχα. Με αυτό τον τρόπο, διατηρήθηκαν υπερυψωμένες οι μικροαντλίες και οι εισοδοί των μικροθαλάμων, σε μια προσπάθεια περιορισμού των φυσαλίδων στις σύριγγες λόγω χαμηλότερης πίεσης.

a.



b.

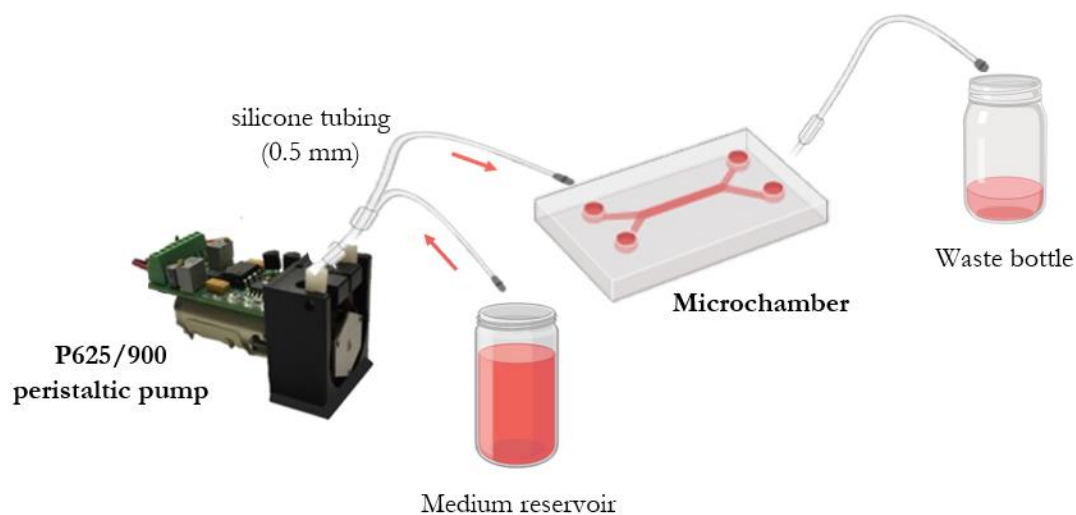


Σχήμα 5. 11. a) Σχηματική αναπαράσταση της χρησιμοποιηθείσας διάταξης και συνδεσμολογίας για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων υπό χαμηλές ροές ($0.04 - 0.2 \mu\text{L}/\text{min}$). Αποτελείται από μικροαντλία σύριγγας LabSmith SPS01, συνδεδεμένη με το μικροθάλαμο μέσω ένωσης σωληνίσκων PEEK εσωτερικής διαμέτρου από $360 \mu\text{m}$ σε $800 \mu\text{m}$, και μικροβαλβίδα MV201 για τη ρύθμιση δύο πιθανών κατευθύνσεων ροής (μία για την πλήρωση της αντλίας, και μία για την κατεύθυνση της ροής από την αντλία προς το μικροθάλαμο), καθοριζόμενων μέσω λειτουργίας «L». b) Ρεαλιστική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης τροφοδοσίας με μικροαντλίες σύριγγας, όπου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη μελέτη δύο μικροθαλάμων.

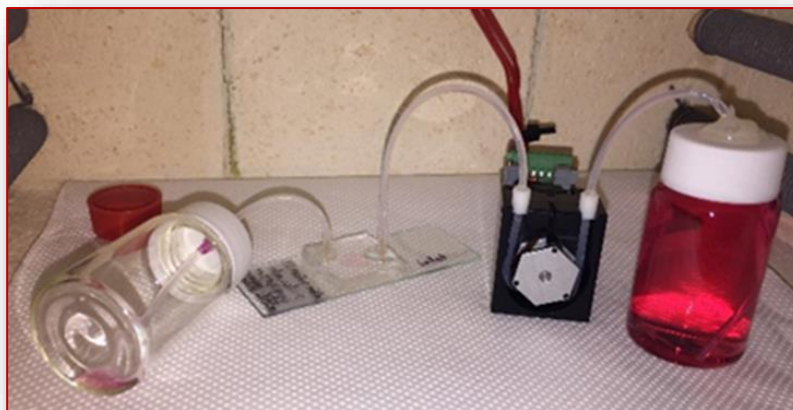
Για τη μελέτη υψηλότερων ροών, οι μικροθάλαμοι τροφοδοτήθηκαν με $6.7 \mu\text{L}/\text{min}$ και $13.6 \mu\text{L}/\text{min}$, οι οποίες είναι εντός του εύρους ροών ($1 - 36 \mu\text{L}/\text{min}$) που χρησιμοποιούνται συχνότερα στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών σε φηφίδα [35–37]. Ο μικροθάλαμος συνδέεται με περισταλτική μικροαντλία, μοντέλο

P625/900 (Instech Laboratories Inc.) συνδεδεμένη με πλατφόρμα Arduino για τον έλεγχο της ροής της μέσω υπολογιστή (Κεφάλαιο 2). Όπως αποδίδεται στο Σχήμα 5.12a, η αντλία φέρει σωληνάκι σιλικόνης εξωτερικής και εσωτερικής διαμέτρου 2 mm και 0.5 mm, αντίστοιχα, η μία άκρη του οποίου συνδέεται με γυάλινο φιαλίδιο τροφοδοσίας (20 mL), και η άλλη καταλήγει στην είσοδο του μικροθαλάμου. Στην έξοδο του ο μικροθάλαμος συνδέεται με αντίστοιχο σωληνάκι σιλικόνης με το φιαλίδιο αποβλήτων. Σωληνάκια PEEK εξωτερικής διαμέτρου 800 μm και εσωτερικής 360 μm προσαρμόζονται στα σωληνάκια σιλικόνης πριν την τοποθέτησή τους στην είσοδο και έξοδο του μικροθαλάμου για καλύτερη εφαρμογή. Οι εισοδοί-έξοδοι των μικροθαλάμων στεγανοποιήθηκαν για την αποφυγή διαρροών με εποξειδική κόλλα, που σφραγίζει τη διεπαφή σωληνάκι – PDMS. Η διάταξη, όπως παρατηρήθηκε εντός φούρνου παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα 5.12b. Για τη ροή 6.7 μL/min, ο μικροθάλαμος παρατηρήθηκε στους μεγάλους χρόνους, ενώ για τη ροή 13.6 μL/min στους μικρούς χρόνους ανά 1 h προς εντοπισμό της ώρας εισόδου φυσαλίδας.

a.



b.

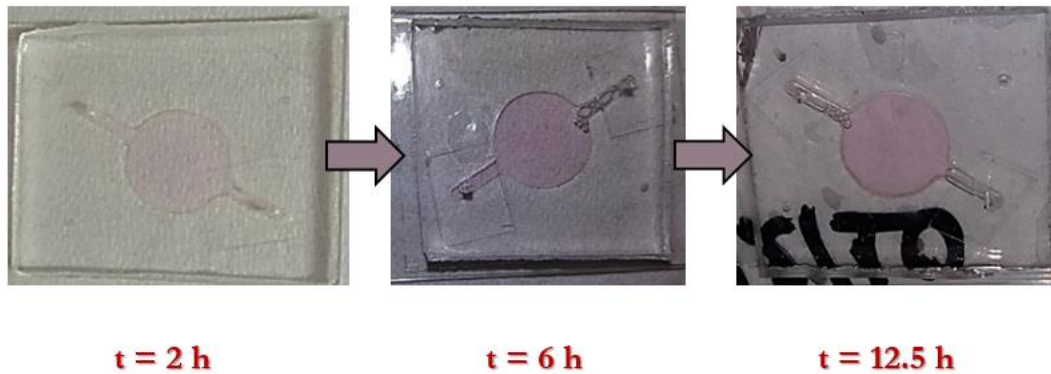


Σχήμα 5. 12. a) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας για την τροφοδοσία μικροθαλάμων υπό υψηλότερες ροές ($6.7 \mu\text{L}/\text{min}$ και $13.6 \mu\text{L}/\text{min}$), η οποία περιλαμβάνει περισταλτική μικροαντλία P625/900 (Instech Laboratories Inc.) συνδεδεμένη μέσω σωληνίσκων σιλικόνης με το μικροθάλαμο. b) Ρεαλιστική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης, όπως τοποθετήθηκε εντός φούρνου για τη μελέτη της.

5.2.1.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Ξεινώνοντας από τους σφραγισμένους μικροθαλάμους, στο Σχήμα 5.13 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες για χρόνους παρατήρησης 2 h, 6 h και 12.5 h. Στις 2 h είναι εμφανές πως δεν έχει δημιουργηθεί φυσαλίδα, ενώ στις 6 h έχει γεμίσει με φυσαλίδες το ένα μικροκανάλι, και τέλος, στις 12.5 h και τα δύο μικροκανάλια. Από το γεγονός ότι οι φυσαλίδες είναι εστιασμένες στα μικροκανάλια, πιθανολογείται ότι η εξάτμιση προήλθε κυρίως μέσα από τις ταινίες πολυολεφίνης.

Για όγκο ενός μικροκαναλιού περίπου $2 (2.2) \mu\text{L}$, η επιφάνεια των δύο μικροκαναλιών, αντιστοιχεί σε ποσοστό κάλυψης με φυσαλίδες περίπου 17 – 20% του μικροθαλάμου. Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο ότι από τις 6 h στις 12.5 h, δηλαδή για περίπου διπλάσιο χρόνο, διπλάσιος όγκος μικροθαλάμου έχει γεμίσει με φυσαλίδες. Συγκεκριμένα, στις 6 h προσεγγιστικά 2 – 2.5 μL είναι ο όγκος των φυσαλίδων, και στις 12.5 h αντίστοιχα 4 – 4.5 μL , γεγονός που αποδίδει ένα προσεγγιστικό ρυθμό εξάτμισης 0.3 – 0.4 $\mu\text{L}/\text{h}$. Απουσία ενδιάμεσης παρατήρησης μεταξύ 2 – 6 h, εμποδίζει τον ακριβή προσδιορισμό της ώρας εκκίνησης της εξάτμισης. Όμως, για να έχει φθάσει στις 6 h να εξατμιστεί ολόκληρο το μικροκανάλι, η εξάτμιση θα πρέπει να ξεκινήσει τουλάχιστον 2 – 3 h νωρίτερα, δηλαδή το νωρίτερο κατά την 3^η – 4^η ώρα. Παρ'όλα αυτά, στηριζόμενοι σε δοκιμασμένα αποτελέσματα, θεωρούμε πως η σφράγιση των μικροθαλάμων εξασφαλίζει απουσία φυσαλίδων μέχρι τη 2^η ώρα.

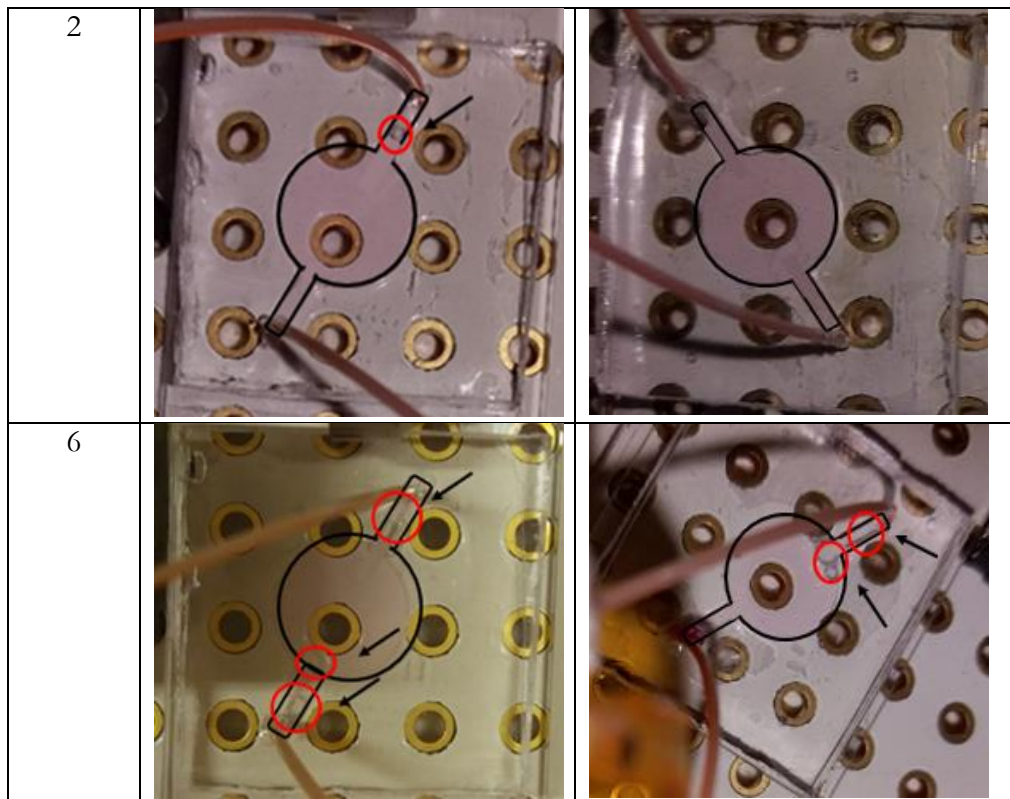


Σχήμα 5. 13. Χρονική εξέλιξη του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε σφραγισμένους με πιεζοευαίσθητη ταινία πολυολεφίνης στην είσοδο-εξόδο τους μικροθαλάμους. Είσοδος φυσαλίδας πραγματοποιήθηκε σε χρόνο $t > 2$ h, ενώ στις 12.5 h μόνο τα μικροκανάλια εισόδου-εξόδου είχαν καλυφθεί με φυσαλίδες.

Κατά τη μελέτη τροφοδοσίας των μικροθαλάμων υπό χαμηλή ροή ($0.04 \mu\text{L}/\text{min}$ και $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$) σε μικρούς χρόνους της τάξης των ωρών, παρατηρήθηκε είσοδος φυσαλίδας τη 2^η ώρα, χωρίς όμως να αποκλείεται είσοδος της πριν τις 2 h, ελλείψει ενδιάμεσης παρατήρησης. Με την τοποθέτηση του breadboard υπό κλίση $10^\circ - 20^\circ$ στις ροές $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$ και $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$, εντοπίστηκαν φυσαλίδες στην καλύτερη περίπτωση στις 4 h, σηματοδοτώντας έτσι μία καθυστέρηση το μέγιστο κατά 2 h, με την αδυναμία ακριβούς χρονικού προσδιορισμού να οφείλεται στο βήμα παρατήρησης διάρκειας 2 h. Χαρακτηριστικά, στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται εικόνες από τα δύο πειράματα ροής $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$, όπου το breadboard είναι τοποθετημένο οριζόντια και υπό κλίση, κατά τη 2^η και 6^η ώρα. Παρατηρείται ότι με την τοποθέτηση υπό κλίση του breadboard δεν εντοπίστηκαν φυσαλίδες στις 2 h, αλλά άρχισαν να εμφανίζονται από την 4^η ώρα, ενώ την 6^η ώρα είχαν πλέον αυξηθεί και συσσωρευτεί στην ανυψωμένη είσοδο των μικροθαλάμων. Πράγματι δηλαδή, οι φυσαλίδες καθυστέρησαν να εισέλθουν στο μικροθάλαμο όχι παραπάνω από 2 h, ενώ επιπλέον, ήταν μικρότερες σε πλήθος και όγκο εκείνες που τελικά συσσωρεύτηκαν στην είσοδο των μικροθαλάμων στις 6 h, πιθανότατα γιατί μέρος τους συγκρατείται στην υπερυψωμένη σύριγγα.

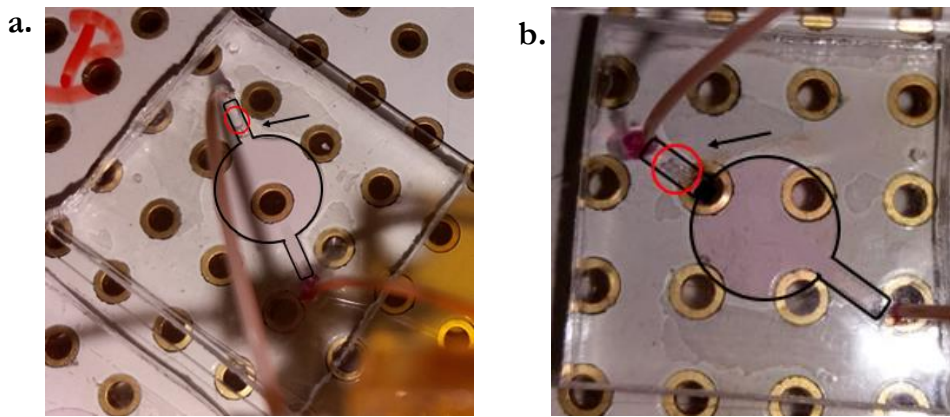
Πίνακας 5. 1. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα μικροθαλάμων υπό χαμηλή ροή ($0.08 \mu\text{L}/\text{min}$) σε μικρούς χρόνους (2 h και 6 h) με το breadboard της αντλίας τοποθετημένο οριζόντια και υπό κλίση $10^\circ - 20^\circ$. Η τοποθέτηση του breadboard υπό κλίση παρατηρήθηκε να καθυστερεί την είσοδο φυσαλίδων κατά το μέγιστο 2 h. Προς διευκόλυνση, έχει τονιστεί το περίγραμμα του μικροθαλάμου και οι φυσαλίδες έχουν σημανθεί με βελάνια.

Χρόνος (h)	Breadboard οριζόντια	Breadboard υπό κλίση ($10^\circ - 20^\circ$)
------------	----------------------	--



Εστιάζοντας στη ροή $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$, αν και η παρατήρηση διήρκησε 3 h λόγω διαρροής στην είσοδο του μικροθαλάμου, όσες φυσαλίδες έχουν δημιουργηθεί είναι συσσωρευμένες στην υπερυψωμένη είσοδο του μικροθαλάμου, όπως είναι εμφανές από το Σχήμα 5.14a. Συγκρίνοντας την 3^η ώρα της ροής $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ με την 4^η ώρα της $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$ (Σχήμα 5.14b), περίπου 75% του μικροκαναλιού έχει καλυφθεί με φυσαλίδες σε σύγκριση με την περίπου 100% κάλυψη στη ροή $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$. Συγκεκριμένα, για όγκο μικροκαναλιού $2 \mu\text{L}$, στη ροή $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$ θεωρούμε περίπου $2 \mu\text{L}$ όγκο φυσαλίδων, ενώ στη ροή $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$, περίπου 25% μικρότερο, δηλαδή $1.5 \mu\text{L}$, όγκος που μειώνεται περαιτέρω αν λάβουμε υπόψη μας τη διαρροή στην είσοδο. Η αύξηση της ροής περιόρισε τη διαπερατότητα των ατμών μέσω του PDMS, και κατ'επέκταση τις φυσαλίδες, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η εμφάνισή τους στο εσωτερικό των μικροθαλάμων είναι φαινόμενο εξαρτώμενο από τη ροή τροφοδοσίας.

Τέλος, σε μεγάλους χρόνους παρατήρησης των μικροθαλάμων υπό χαμηλή ροή, και συγκεκριμένα, στις 12.5 h (ροή $0.04 \mu\text{L}/\text{min}$) οι μικροθάλαμοι εμφανίστηκαν πλήρως άδειοι, έχοντας γεμίσει με φυσαλίδες. Ενδέχεται ή μάλλον είναι αρκετά πιθανό και πάλι, το άδειασμα να είχε συντελεστεί σε χρόνο νωρίτερο της παρατήρησης.



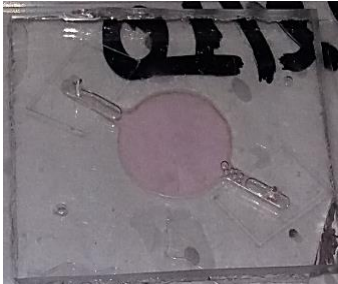
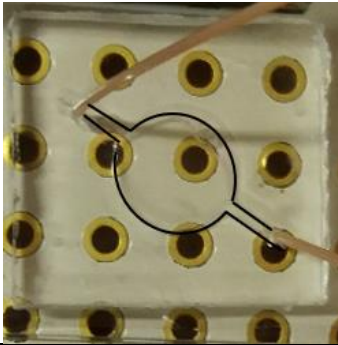

Σχήμα 5. 14. Στιγμιότυπα παρατήρησης μικροθαλάμου υπό χαμηλές ροές σε μικρούς χρόνους, και συγκεκριμένα, a) ροής 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ την 3^η ώρα, και b) ροής 0.08 $\mu\text{L}/\text{min}$ την 4^η ώρα. Προκύπτει εξάρτηση της εμφάνισης φυσαλίδων από τη ροή, καθώς με την αύξησή της μειώνεται η επιφανειακή κάλυψη από φυσαλίδες. Προς διευκόλυνση, έχει τονιστεί το περίγραμμα του μικροθαλάμου και οι φυσαλίδες έχουν σημειωθεί με βελόνια.

Μεταβαίνοντας στις υψηλότερες ροές, εντοπίστηκε είσοδος φυσαλίδας από την 1^η ώρα και στις δύο δοκιμαζόμενες ροές (6.7 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$), ενώ ο θάλαμος γέμιζε με φυσαλίδες τη 16^η ώρα (6.7 $\mu\text{L}/\text{min}$). Με τη χρήση υψηλότερων ροών, εξισορροπείται η διαπερατότητα των ατμών μέσω PDMS, που ήταν έντονη για τις χαμηλές ροές, και παρουσιάζεται περισσότερο ευκρινώς η συμπεριφορά του συστήματος υπό ροή. Παρατηρείται ότι παρά την αύξηση της ροής εντός των συνήθων ορίων για τις μικροδιατάξεις μυελού των οστών σε ψηφίδα, δεν αποτράπηκε η είσοδος φυσαλίδων στο μικροθάλαμο. Με αυτό τον τρόπο, επιβεβαιώνεται και πειραματικά, ότι η εμφάνιση φυσαλίδων είναι φαινόμενο εγγενές των μικρορευστοκινών συστημάτων υπό ροή.

Στον Πίνακα 5.2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι παρατηρούμενες ώρες εισόδου φυσαλίδων και αδειάσματος των μικροθαλάμων λόγω της παρουσίας τους για τις διάφορες καταστάσεις μηδενικής, χαμηλής και υψηλότερης ροής, συνοδευόμενες από τις αντίστοιχες φωτογραφίες. Να σημειωθεί ότι στις χαμηλές ροές, λαμβάνεται υπόψη η οριζόντια τοποθέτηση του breadboard.

Πίνακας 5. 2. Συμπεριφορά μικροθαλάμων υπό ροή σε μικρούς και μεγάλους χρόνους, με καταγραφή των ωρών εισόδου φυσαλίδας και αδειάσματος τους, αντίστοιχα, για τρεις καταστάσεις i) μηδενικής ροής (σφραγισμένοι μικροθάλαμοι), ii) χαμηλής ροής (0.04 – 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$), και iii) υψηλότερης ροής (6.7 – 13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$). Μεγαλύτερη καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας, καθώς και στο άδειασμα του μικροθαλάμου, παρουσιάζουν οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι.

Ροή	Μικροί χρόνοι (είσοδος φυσαλίδας)	Μεγάλοι χρόνοι (% επιφανειακή κάλυψη με φυσαλίδες)
-----	---	--

<p>Μηδενική (σφραγισμένοι μικροκροθάλαμοι)</p>	<p>3^η – 4^η ώρα</p>	<p>17 – 20% σε 12.5 h</p> 
<p>Χαμηλές (0.04 – 0.2 μL/min)</p>	<p>≤ 2^η ώρα</p>	<p>100% σε 12.5 h</p> 
<p>Υψηλότερες (6.7 – 13.6 μL/min)</p>	<p>1^η ώρα</p>	<p>100% σε 16 h</p> 

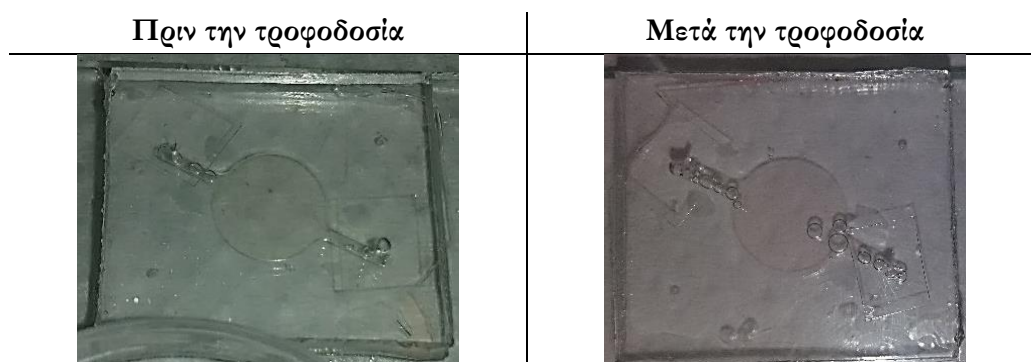
Ως προς την ώρα εισόδου φυσαλίδων, θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους οι χαμηλές και υψηλότερες ροές, λόγω διαφορετικού βήματος παρατήρησης, που ήταν 2 h και 1 h, αντίστοιχα, γεγονός που δεν αποκλείει την είσοδο φυσαλίδας στους μικροθαλάμους χαμηλής ροής νωρίτερα από τις 2 h. Σε κάθε περίπτωση πάντως, οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι εμφανίζουν τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας, κατά την 3^η – 4^η ώρα. Στους μεγάλους χρόνους, οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι παρουσιάζονται επίσης να πλεονεκτούν, καθώς στις 12.5 h, μόνο τα μικροκανάλια εισόδου-εξόδου έχουν γεμίσει με φυσαλίδες (17 – 20% της επιφάνειας του μικροθαλάμου), ενώ αντίθετα, στον ίδιο χρόνο στις χαμηλές ροές το σύνολο του μικροθαλάμου μαζί με τα μικροκανάλια του έχουν γεμίσει με φυσαλίδες. Συγκριτικά με τους μικροθαλάμους υπό υψηλότερες ροές, που έχουν αδειάσει τη 16^η ώρα, οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι εμφανίζουν επίσης καλύτερη απόδοση, καθώς δεδομένου του μικρού ρυθμού εξάτμισής τους ($\approx 0.3 - 0.4 \mu\text{L}/\text{h}$), σε διάστημα 3.5 h σίγουρα δε θα είχε αδειάσει όλος ο μικροθάλαμος. Η επί της ουσίας μη εμφάνιση φυσαλίδων στους σφραγισμένους μικροθαλάμους (αν δεχτούμε ότι η εξάτμιση προήλθε κύρια μέσα από τις ταινίες πολυολεφίνης των μικροκαναλιών), αποτελεί ένδειξη εισόδου των φυσαλίδων με τη ροή. Έτσι, σε συμφωνία και με τη θεωρητική ανάλυση της Παραγράφου 5.1.1, προκύπτει ότι το φαινόμενο δημιουργίας φυσαλίδων είναι αναπόφευκτο στα μικρορευστονικά συστήματα υπό ροή.

5.2.1.3 Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε μικροθαλάμους

Προς πειραματική επιβεβαίωση των συμπερασμάτων αναφορικά με τη δημιουργία φυσαλίδων σε μικροθαλάμους υπό ροή, δοκιμάστηκε η καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) σε μικροθαλάμους υπό χαμηλή ροή. Η τροφοδοσία υπό χαμηλή ροή συνδυάστηκε με διαλειμματική σφράγιση των μικροθαλάμων για τη διατήρηση των μικροθαλάμων σε μεγάλους χρόνους. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε η βέλτιστη δοκιμασμένη περίπτωση από άποψη καθυστέρησης εμφάνισης φυσαλίδων για τις χαμηλές ροές και τη σφράγιση των μικροθαλάμων, που αφορά στην τοποθέτηση του breadboard υπό κλίση $10^\circ - 20^\circ$ με ροή $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ για τροφοδοσία 4 h, και στη σφράγιση των μικροθαλάμων για 2 h.

MSCs αρχικής συγκέντρωσης $1.4 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ εισήχθησαν σε δύο μικροθαλάμους και παρατηρήθηκαν για 6 ημέρες. Μια πλήρης πειραματική μέρα περιλάμβανε αρχική τροφοδοσία για 4 h, ακόλουθη σφράγιση των μικροθαλάμων για 2 h, στη συνέχεια εκ νέου τροφοδοσία για 4 h και τέλος, παρομονή των μικροθαλάμων σφραγισμένων overnight. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε μόνο τις 2 πρώτες ημέρες, με τις υπόλοιπες 4 ημέρες να πραγματοποιείται χειρωνακτική ανανέωση (χρήση πιπέτας) θρεπτικού υλικού ανά 24 h. Τα MSCs διατηρήθηκαν εντός του επωαστήρα σε συνθήκες 5% CO_2 , 37°C , και με την κατάλληλη υγρασία και παρατηρούνταν καθημερινά σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM IRE2).

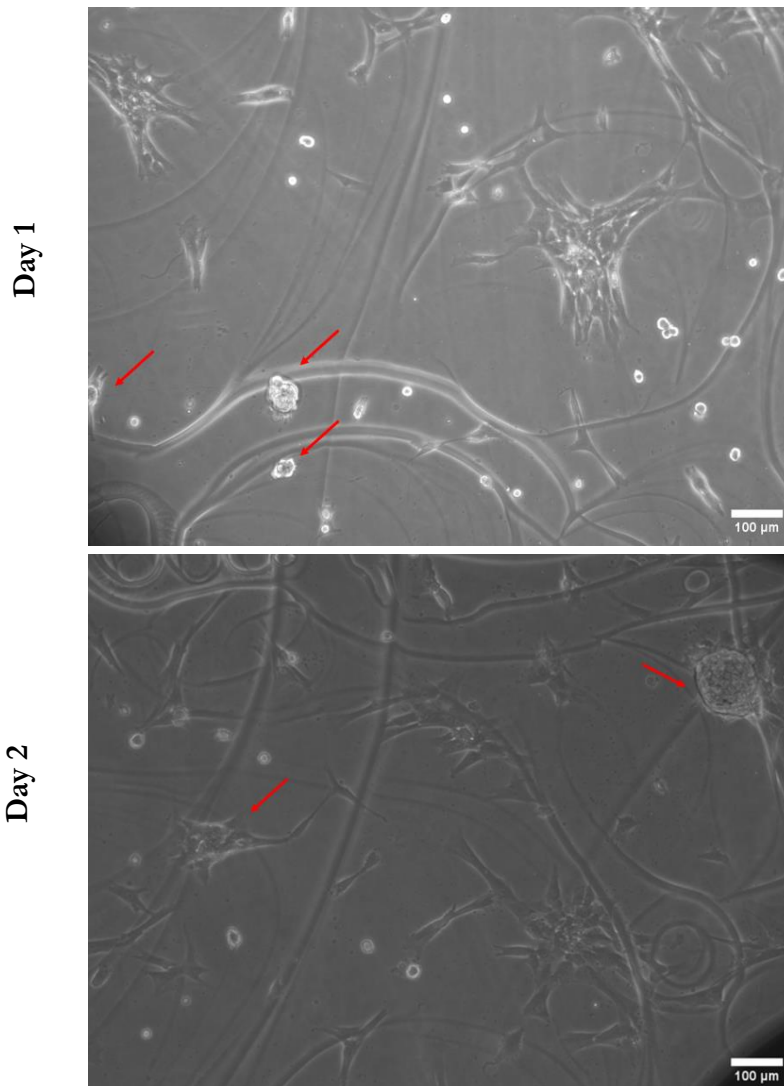
Παρατηρήθηκε ότι με την υπό ροή τροφοδοσία των μικροθαλάμων, αυξανόταν το πλήθος και το ποσοστό επιφανειακής κάλυψης με φυσαλίδες στο τέλος της ημέρας. Χαρακτηριστικές είναι οι φωτογραφίες του Σχήματος 5.15, όπου απεικονίζεται ένας εκ των μικροθαλάμων πριν και αμέσως μετά τις δύο τροφοδοσίες που πραγματοποιούνται μέσα σε μία ημέρα, όπου να σημειωθεί ότι δεν υπήρξε εμφανής δημιουργία φυσαλίδων κατά το ενδιάμεσο στάδιο σφράγισης των μικροθαλάμων. Ενώ πριν την τροφοδοσία είναι συγκεντρωμένες στο ένα μικροκανάλι, μετά καλύπτονται ολοκληρωτικά και τα δύο μικροκάνάλια, και συμπληρωματικά εμφανίζονται στο εσωτερικό του μικροθαλάμου, εμφανίζοντας δηλαδή τουλάχιστον διπλάσια εισαγωγή φυσαλίδων. Για το λόγο αυτό, η τροφοδοσία δε συνεχίστηκε μετά τη 2^η μέρα και αντικαταστάθηκε με ημερήσια ανανέωση του θρεπτικού υλικού.



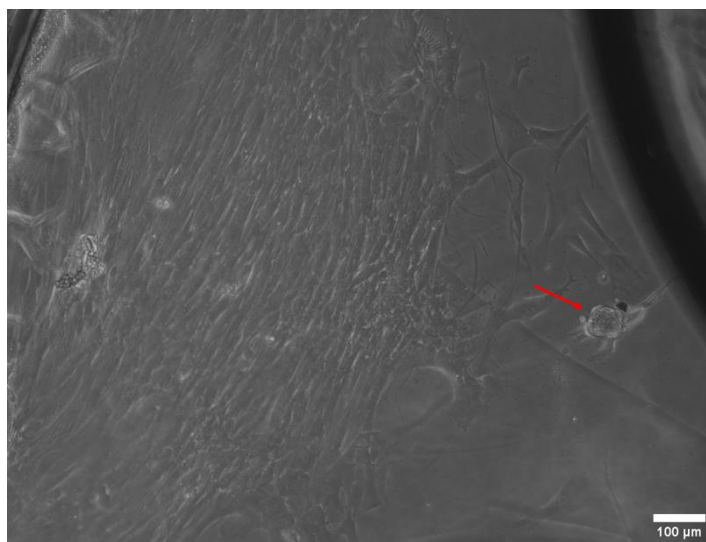
Σχήμα 5. 15. Εικόνες του μικροθαλάμου όπου έγινε καλλιέργεια MSCs με εναλλασσόμενη τροφοδοσία υπό χαμηλή ροή ($0.2 \mu\text{L}/\text{min}$) και σφράγιση τους, πριν την τροφοδοσία τους (αριστερά), και μετά από δύο τροφοδοσίες (δεξιά) στη διάρκεια μίας μέρας, όπου είναι εμφανής ο κατ'ελάχιστο διπλασιασμός της επιφανειακής κάλυψης με φυσαλίδες.

Ειδικότερα, από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, όπως παρατίθεται και στο Σχήμα 5.16, την 1^η μέρα εμφανίζεται αραιή και κατά τόπους συσσωρευμένη δημιουργία στρωματικού ιστού, ενώ κάνουν την εμφάνισή τους λίγα συσσωματώματα των MSCs, δηλαδή συνενώσεις τους με το σχηματισμό πυκνών διακυτταριών επαφών μέσω μορίων κυτταρικής προσκόλλησης [38]. Έχει αποδειχθεί ότι τα συσσωματώματα

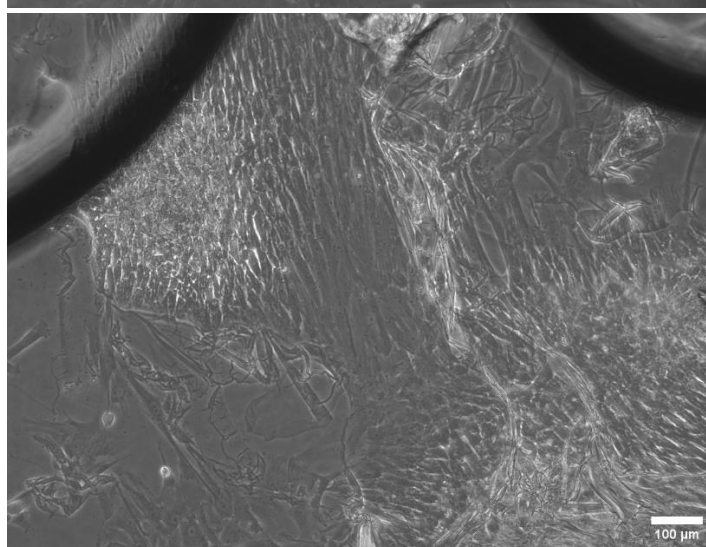
δημιουργούνται αυθόρμητα *in vitro* απουσία προσκολλητικής επιφάνειας, κάτω από άσκηση πιέσεων, ή εντός περιορισμένων χώρων [38–40]. Τη 2^η μέρα σημειώνεται συγκρατημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων και ανάπτυξη του στρωματικού ιστού και παράλληλα, αύξηση και διόγκωση των αιωρούμενων συσσωματωμάτων. Την 4^η και 6^η μέρα, είναι εμφανής η συσώρευση των MSCs κοντά στα τοιχώματα του μικροθαλάμου με το εσωτερικό του να είναι σποραδικά καλυμένο με ιστό και με σταθερά αυξανόμενα συσσωματώματα. Καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος, η αύξηση στον πληθυσμό των MSCs, αν και υπαρκτή, είναι περιορισμένη και αναντίστοιχη της αρχικής τους συγκέντρωσης, ενδεικτικό της μη ομαλής τους ανάπτυξης.



Day 4



Day 6

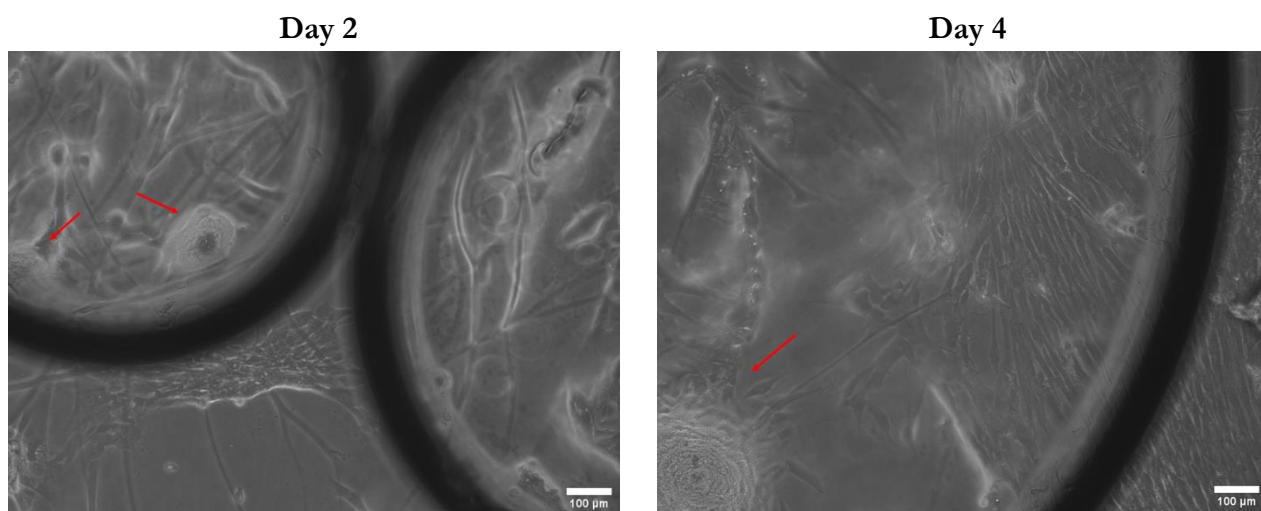


Σχήμα 5. 16. Χρονική εξέλιξη καλλιέργειας MSCs εντός μικροθαλάμων με συνδυαστική τροφοδοσία υπό χαμηλή ροή (0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) και σφράγιση τις πρώτες 2 ημέρες, και ακόλουθη στατική καλλιέργεια μέχρι και την 6^η ημέρα. Περιορισμένη και ανομοιόμορφη ανάπτυξη ιστού στρώματος, και δημιουργία συσσωματωμάτων, επηρεαζόμενη από την έντονη παρουσία φυσαλίδων, εμφανών και στις εικόνες της 4^{ης} και 6^{ης} ημέρας. Τα συσσωματώματα υποδεικνύονται με βελάκια.

Σημαντικό ρόλο στην ανάσχεση της ανάπτυξής τους, διαδραματίζει η ύπαρξη φυσαλίδων. Με το πέρασμα των ημερών, οι φυσαλίδες φυσιολογικά αυξάνονται σε πλήθος και μέγεθος, με αποτέλεσμα η αρχική εισαγωγή τους κατά την τροφοδοσία των δύο πρώτων ημερών να είναι καθοριστική για τη μετέπειτα έκβαση του πειράματος, ακόμη και κατά τη διεξαγωγή του σε στατικές συνθήκες. Τα βλαστοκύτταρα, μεσεγχυματικά και αιμοποιητικά, του μυελού των οστών επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας, με ποσοστά οξυγόνου 1.5%, 5.4% και 7% αναλόγως της περιοχής του σώματος [41–44], γεγονός που σημαίνει ότι η έκθεσή τους σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου της ατμόσφαιρας (21%), όπως το περιεχόμενο στις φυσαλίδες, τα υποβάλλει σε οξειδωτικό στρες, μεταβάλλοντας το μεταβολισμό τους και επιφέροντας δραματικές επιπτώσεις στην ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται [45]. Έτσι, τη 2^η μέρα (Σχήμα 5.17), οι προϋπάρχουσες

φυσαλίδες, έχοντας μεγαλώσει, επηρεάζουν έμμεσα την οργάνωση και τη συμπεριφορά των κυττάρων, τα οποία παρουσιάζονται να συγκεντρώνονται ασφυκτικά περιφερειακά αυτών. Μάλιστα, κατά την 4^η μέρα (Σχήμα 5.17), σημαντικό ποσοστό των κυττάρων αναπτύσσεται συμπιεζόμενο κάτω από μία μεγάλη φυσαλίδα, ενώ ένα μεγάλο συσσωμάτωμα διαμορφώνεται μέσα σε αυτή. Πιθανολογείται ότι η παρουσία φυσαλίδων ενισχύει την εμφάνιση συσσωματωμάτων λόγω στέρησής τους από προσκολλητικές επιφάνειες που θα τους έδιναν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν, καθώς και λόγω ανάπτυξης μηχανικών τάσεων στις διεπιφάνειες επαφής με φυσαλίδες, που τα περιορίζουν χωρικά.

Συμπεραίνεται επομένως και πειραματικά ότι η διαλειμματική τροφοδοσία των μικροθαλάμων ή με χαμηλή ροή δεν ευνοεί την καλλιέργεια κυττάρων σε μεγάλους χρόνους της τάξης των ημερών. Επιπλέον, σε κάθε περίπτωση, η παρουσία φυσαλίδων είναι ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη των κυττάρων, καθιστώντας αναγκαίο τον περιορισμό του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων.



Σχήμα 5. 17. Αντιπροσωπευτικές εικόνες περιοχών μικροθαλάμων υπό χαμηλή ροή συνδυαστικά με σφράγιση, οι οποίες έχουν καλυφθεί με φυσαλίδες, επηρεάζοντας την οργάνωση και βιωσιμότητα των MSCs. Τα MSCs υποβάλλονται σε οξειδωτικό στρες και συμπιέζονται να αναπτυχθούν περιφερειακά ή κάτω από τις φυσαλίδες. Με βελάνια υποδεικνύεται η ανάπτυξη συσσωματωμάτων.

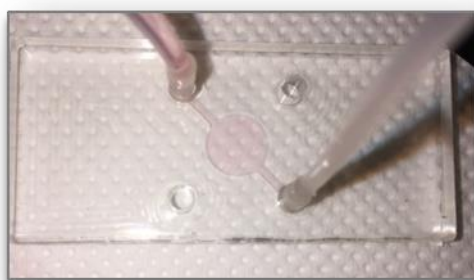
5.2.2 Αντιμετώπιση δημιουργίας φυσαλίδων σε μικρορευστονικά συστήματα υπό υψηλότερες ροές

Εστιάζοντας στις υψηλότερες ροές, που είναι περισσότερο αρμοστές για την μακροπρόθεσμη τροφοδοσία μικροδιατάξεων οργάνων σε ψηφίδα, επιχειρήθηκαν ορισμένες τροποποιήσεις για την πρόληψη της δημιουργίας φυσαλίδων. Πρόκειται αρχικά, για την εφαρμογή βελτιωτικών ενεργειών, συμβατών με τους τρόπους αντιμετώπισης της Παραγράφου 5.1.2, που αφορούν κύρια στη βελτίωση της συνδεσμολογίας, της υδροφοβικότητας του υλικού, και τη μείωση των βαθμίδων θερμοκρασίας και πίεσης μεταξύ του φιαλιδίου τροφοδοσίας και του μικροθαλάμου. Μετέπειτα, δοκιμάζεται η ενσωμάτωση εμπορικής παγίδας συνδυαστικά με τις βελτιωτικές ενέργειες, ώστε να διερευνηθεί ενδεχόμενη συνεισφορά της στον περαιτέρω περιορισμό των φυσαλίδων.

5.2.2.1 Βελτιωτικές ενέργειες για τον περιορισμό των φυσαλίδων και συνδυαστική ενσωμάτωση εμπορικής παγίδας

Οι ενέργειες που δοκιμάστηκαν για τη βελτίωση του φαινομένου εμφάνισης φυσαλίδων ήταν:

1. Αντί του μικροθαλάμου καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας, αυξάνοντας έτσι το πάχος του PDMS στα 4 mm, σε σχέση με τα 3 mm του μικροθαλάμου καλλιέργειας. Ενδέχεται έτσι, να υπάρξει μια καθυστέρηση στη διαπερατότητα ατμών μέσω του PDMS, που οδηγεί σε δημιουργία φυσαλίδων. Εκτός αυτών, η μελέτη του μικροθαλάμου τροφοδοσίας είναι και περισσότερο ορθή, καθώς και στη μικροδιάταξη η τροφοδοσία θα γίνεται σε αυτόν.
2. Προς αντιμετώπιση της υδροφοβικότητας του PDMS, μετά την ενεργοποίηση του μικροθαλάμου τροφοδοσίας σε πλάσμα αέρα στο στάδιο της συγκόλλησής του με το γυαλί, το εσωτερικό του επικαλύφθηκε με κολλαγόνο (type I collagen), εντός 2 h από την ενεργοποίησή του. Έτσι, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 4, επιτυγχάνεται μονιμοποίηση της υδροφιλικότητας του PDMS, με γωνία επαφής περίπου ίση με 44°, τουλάχιστον για 7 ημέρες (συντήρηση σε ξηρό περιβάλλον). Το πρωτόκολλο επικάλυψης με κολλαγόνο αναφέρεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 4.
3. Βελτιώθηκε η συνδεσμολογία του μικροθαλάμου με την αντλία και το φιαλίδιο αποβλήτων προς καλύτερη σφράγιση της εισόδου και εξόδου του προς αποφυγή εγκλωβισμού αέρα. Αυτό επιτεύχθηκε αρχικά με την ενσωμάτωση στο σχέδιό του εσοχών εισόδου/εξόδου για προσαρμογείς και επιπλέον, με τη μετέπειτα κατασκευή των κατάλληλων προσαρμογέων που εφαρμόζουν σωστά. Οι προσαρμογείς κατασκευάστηκαν με 3D εκτύπωση (βλ. Κεφάλαιο 3), χρησιμοποιώντας εκείνον με εξωτερική διάμετρο 1.65 mm στην είσοδο και με 2.5 mm στην έξοδο. Οι διαστάσεις αυτές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις εσωτερικές διαμέτρους των αντίστοιχων σωληνίσκων τους. Στο παρακάτω Σχήμα 5.18 παρουσιάζεται ο μικροθάλαμος με ενσωματωμένους τους προσαρμογείς και τους σωληνίσκους.



Σχήμα 5. 18. Φωτογραφία του μικροθαλάμου τροφοδοσίας PDMS με τους ειδικά κατασκευασμένους με 3D εκτύπωση προσαρμογείς για τη βελτίωση της συνδεσμολογίας του με την περισταλτική αντλία και το φιαλίδιο αποβλήτων, στα πλαίσια των τροποποιήσεων για τον περιορισμό του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων.

4. Για τη μείωση της βαθμίδας θερμοκρασίας μεταξύ του φιαλιδίου τροφοδοσίας και του μικροθαλάμου, το θρεπτικό υλικό μετά την αφαίρεσή του από τη συντήρηση, όπου φυλασσόταν στους 4°C, αφήθηκε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) πριν την προώθησή του στο θάλαμο.

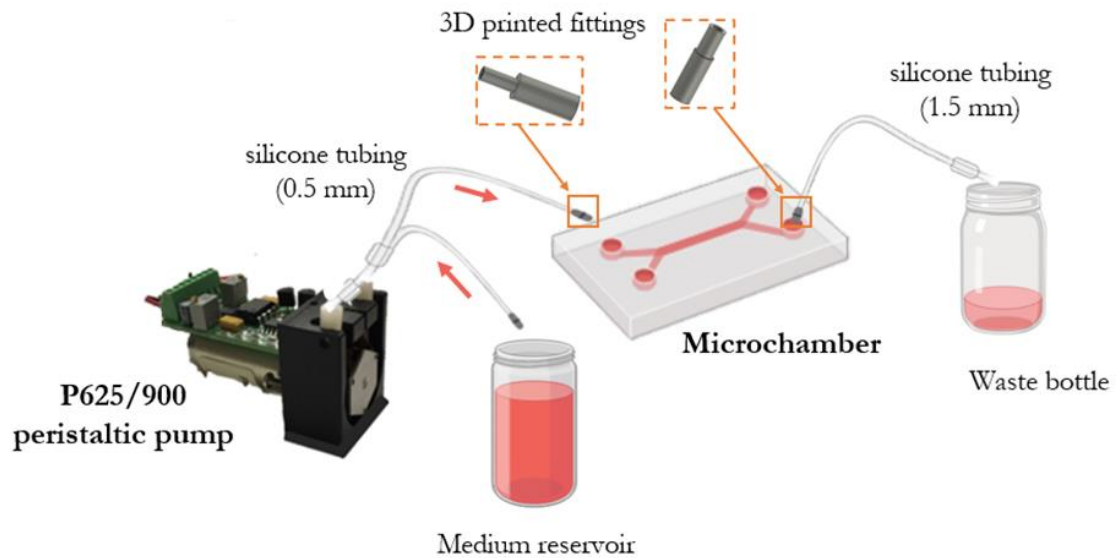
5. Σε καθένα από τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό. Έτσι, περιορίζεται το ποσοστό των επιφανειοδραστικών ουσιών, και ειδικότερα των μη διαλυτών (ρύποι, πρόσθετα συστατικά), που λειτουργούν ως εστίες πυρήνωσης. Για τον ίδιο λόγο, οι σωληνίσκοι και οι προσαρμογείς καθαρίζονται ενδελεχώς με ισοπροπανόλη και ακολούθως με απιονισμένο νερό πριν τη χρήση τους.

Στο Σχήμα 5.19 που ακολουθεί, παρουσιάζεται σχηματικά (Σχήμα 5.19a) η πειραματική διάταξη μετά τις βελτιωτικές ενέργειες, καθώς και ρεαλιστική εικόνα της διάταξης (Σχήμα 5.19b). Ο μικροθάλαμος τροφοδοσίας συνδέεται στην είσοδό του με την περισταλτική αντλία (P625/900) και στην έξοδό του με το φιαλίδιο αποβλήτων. Μέσω των προσαρμογών, η σύνδεση με την αντλία και το φιαλίδιο πραγματοποιείται με σωληνάκια σιλικόνης εξωτερικής και εσωτερικής διαμέτρου (2 mm , 0.5 mm) και (2.5 mm, 1.5 mm) για την αντλία και το φιαλίδιο, αντίστοιχα.

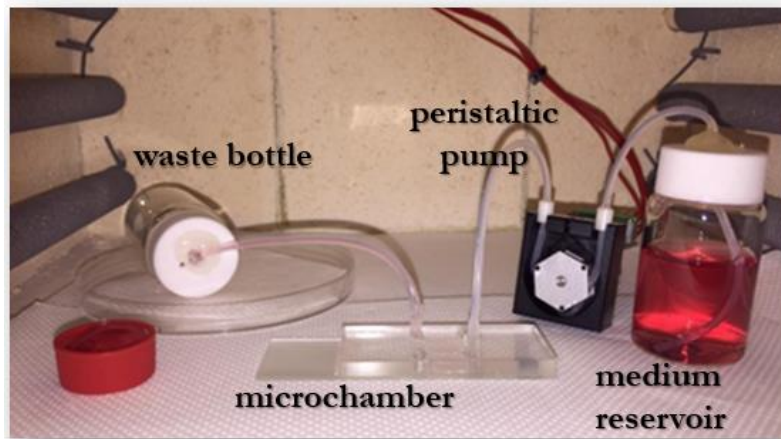
Με την ενσωμάτωση παγίδας, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.20a, το σύστημα τροποποιείται παρεμβάλλοντας μεταξύ του μικροθαλάμου τροφοδοσίας και της περισταλτικής αντλίας την εμπορική παγίδα. Λόγω αυτής της διαμεσολάβησης, στην είσοδο του μικροθαλάμου τοποθετήθηκε ίδιος προσαρμογέας 3D εκτύπωσης με εξωτερική διάμετρο 2.5 mm, και ίδιος σωληνίσκος σιλικόνης εσωτερικής διαμέτρου 1.5 mm. Στην παγίδα εφαρμόστηκαν εμπορικοί σπειρωτοί προσαρμογείς για σωληνίσκους με μέγιστη εσωτερική διάμετρο 1.5 mm, των οποίων το ακροφύσιο ήταν κωνικής μορφής. Η σύνδεση της παγίδας με την αντλία έγινε με το σωληνίσκο σιλικόνης εσωτερικής διαμέτρου 0.5 mm. Να σημειωθεί εδώ, ότι οι προσαρμογείς επιλέχθηκαν ώστε να είναι συμβατοί με τους σωληνίσκους σιλικόνης, με αποτέλεσμα να μην ταιριάζουν απόλυτα στις εσοχές της παγίδας, γεγονός που αντιμετωπίστηκε με κάλυψη των σπειρωμάτων τους με ταινία Teflon. Στο Σχήμα 5.20b αποδίδεται ρεαλιστική εικόνα της πειραματικής διάταξης.

Και στις δύο περιπτώσεις, η ροή τροφοδοσίας ορίστηκε στα 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, με το όλο σύστημα να τοποθετείται εντός φούρνου θερμοκρασίας 37°C και με την προσθήκη κατάλληλης υγρασίας. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε ανά 1 h για τις πρώτες 7 h και στη συνέχεια, αφέθηκε overnight μέχρι ολοκλήρωσης προσεγγιστικά μίας ημέρας, και συγκεκριμένα, 25 – 26 h για την περίπτωση εφαρμογής μόνο των βελτιωτικών ενεργειών, και 24 h για τη συνδυαστική ενσωμάτωση της παγίδας. Οι παρατηρήσεις είναι ποιοτικές και στηρίζονται σε φωτογραφίες που λήφθηκαν σε δεδομένες χρονικές στιγμές.

a.

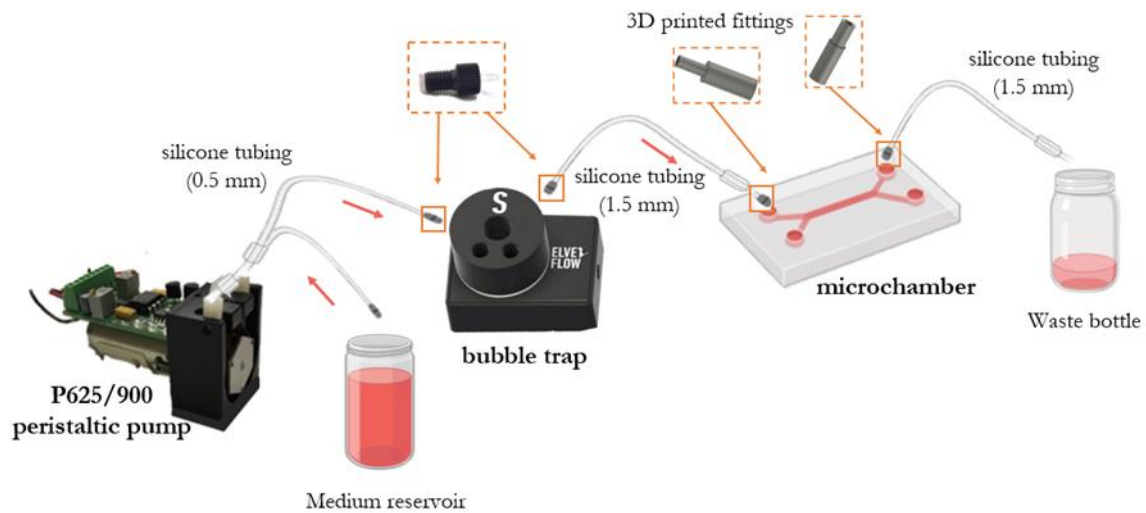


b.

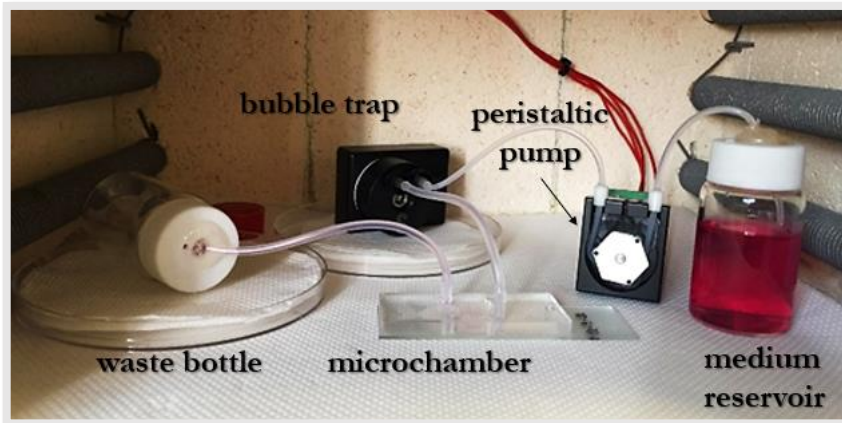


Σχήμα 5. 19. a) Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας για την τροφοδοσία των μικροθαλάμων υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ μετά την ενσωμάτωση βελτιωτικών ενεργειών για την αντιμετώπιση της δημιουργίας φυσαλίδων. Αυξήθηκε το πάχος του PDMS που περιβάλλει το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, κατασκευάστηκαν ειδικοί προσαρμογείς σωληνίσκων εισόδου-εξόδου με 3D εκτύπωση, υδροφιλοποιήθηκε το εσωτερικό του μικροθαλάμου, και το θρεπτικό υλικό αφέθηκε να μεταβεί σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση του. b) Ρεαλιστική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας εντός του φούρνου για τη μελέτη.

a.



b.



Σχήμα 5. 20. α) Σχηματική απόδοση της χρησιμοποιηθείσας πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας τροφοδοσίας μικροθαλάμων υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ με ενωμάτωση των βελτιωτικών ενεργειών και εμπορικής παγίδας για την αντιμετώπιση της δημιουργίας φυσαλίδων. Η παγίδα τοποθετείται μεταξύ του μικροθαλάμου τροφοδοσίας και της περισταλτικής αντλίας. β) Φωτογραφία της διάταξης εντός του φούρνου κατά την πειραματική διαδικασία.

Απουσία παγίδας, εντοπίστηκε μικρή φυσαλίδα στην είσοδο του μικροθαλάμου από τη 2^η ώρα, η οποία την 3^η ώρα είχε πλέον εμφανώς εισέλθει στο θάλαμο. Την 7^η ώρα περίπου 50% του μικροθαλάμου είχε καλυφθεί με φυσαλίδες, ποσοστό που παρέμεινε περίπου σταθερό στο τέλος των 25 – 26 h. Στο Σχήμα 5.21α παρουσιάζεται η εξέλιξη του φαινομένου για χρόνους $t = 1 \text{ h}$, $t = 2 \text{ h}$, $t = 3 \text{ h}$, $t = 7 \text{ h}$ και $t = 25 - 26 \text{ h}$. Παρατηρήθηκε ακόμη, ότι αρκετές φυσαλίδες ήταν συσσωρευμένες στο φιαλίδιο τροφοδοσίας και συγκεκριμένα, στην επιφάνεια του σωληνίσκου ήδη από την 1^η ώρα (Σχήμα 5.21b), ενώ εντοπίστηκαν φυσαλίδες να μετακινούνται από το φιαλίδιο τροφοδοσίας προς το μικροθάλαμο.

a.

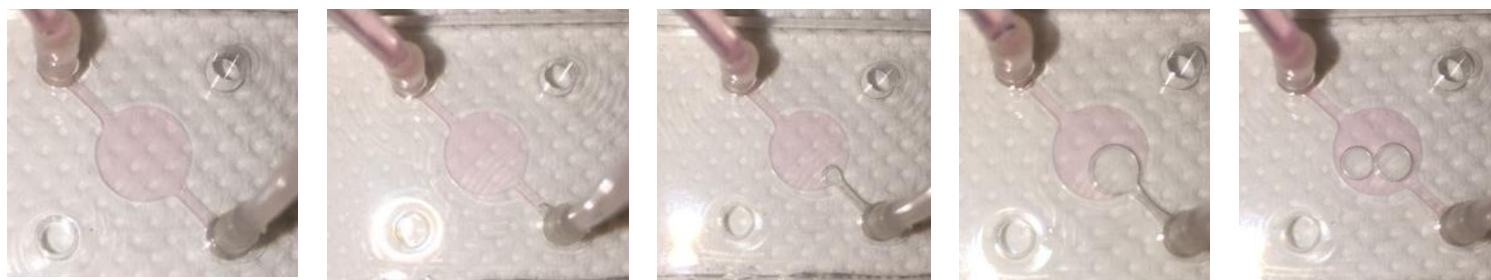
t = 1 h

t = 2 h

t = 3 h

t = 7 h

t = 25 – 26 h




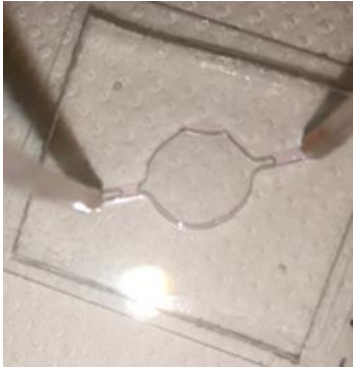
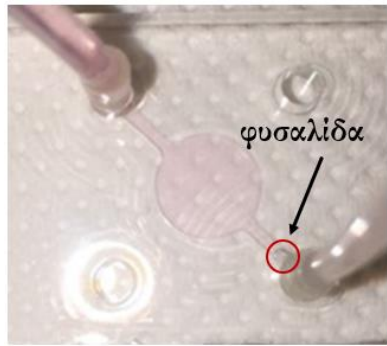

b.



Σχήμα 5. 21. a) Χρονική εξέλιξη φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων στο σύστημα υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ απουσία εμπορικής παγίδας. Εντοπίστηκε είσοδος φυσαλίδας τη 2^η ώρα, καλύπτοντας προοδευτικά περίπου 25% του μικροθαλάμου σε 25 – 26 h. b) Αντιπροσωπευτική εικόνα φιαλιδίου τροφοδοσίας με πλήθος φυσαλίδων συσσωρευμένων στο σωληνίσκο σιλικόνης.

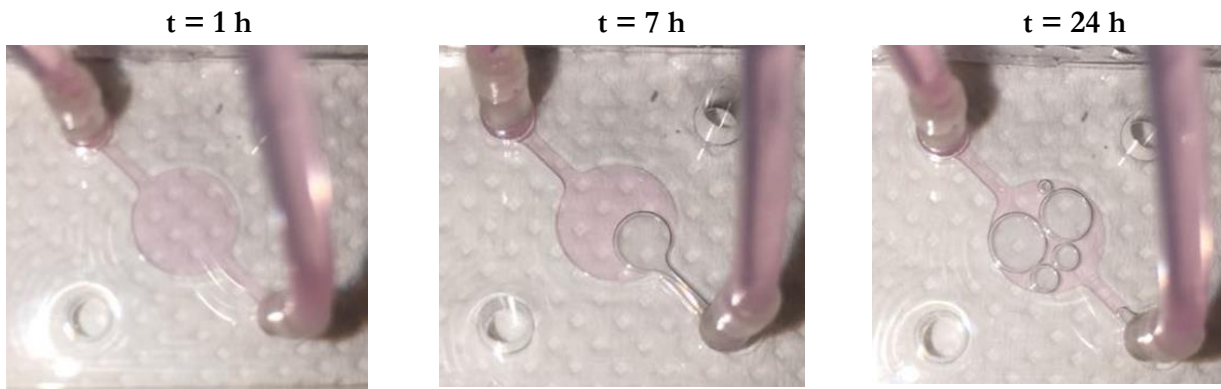
Συνολικά, σε μικρούς χρόνους επιτεύχθηκε καθυστέρηση μίας ώρας στην είσοδο φυσαλίδας, συγκρίνοντας με αντίστοιχο πείραμα υψηλότερων ροών (13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$, Παράγραφος 5.2.1.2), απουσία των βελτιωτικών ενεργειών. Σε μεγάλους χρόνους, ενώ χωρίς τις βελτιωτικές ενέργειες ο μικροθάλαμος είχε αδειάσει στις 16 h (6.7 $\mu\text{L}/\text{min}$), παρουσία των ενεργειών στις 25 – 26 h, δηλαδή περίπου 10 h μετά, μόνο το 25% του μικροθαλάμου είχε αδειάσει. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στους μεγάλους χρόνους, που είναι και μεγαλύτερης σημασίας για τις μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα, με τις ενέργειες αυτές, βελτιώθηκε ο σχηματισμός φυσαλίδων, καθυστερώντας κατ'ελάχιστο 10 h το γέμισμα το μικροθαλάμου με φυσαλίδες. Ο παρακάτω Πίνακας 5.3 συνοψίζει τα συμπεράσματα αυτά με αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τους μικροθαλάμους.

Πίνακας 5. 3. Αντιπαραβολή λειτουργίας μικροθαλάμων υπό υψηλότερες ροές (6.7 – 13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$) σε μικρούς και μεγάλους χρόνους, πριν και μετά την ενσωμάτωση βελτιωτικών ενεργειών περιορισμού εμφάνισης φυσαλίδων, όπως για παράδειγμα, η τροποποίηση της συνδεσμολογίας, η υδροφιλοποίηση του PDMS, και η μείωση βαθμίδας θερμοκρασίας. Με τις ενέργειες αυτές, επιτεύχθηκε κύρια περιορισμός των φυσαλίδων στους μεγάλους χρόνους, με περίπου 25% κάλυψη σε διάρκεια μιας ημέρας.

Μικροθάλαμοι υπό υψηλότερες ροές (6.7 – 13.6 $\mu\text{L}/\text{min}$)	Μικροί χρόνοι (είσοδος φυσαλίδας)	Μεγάλοι χρόνοι (% επιφανειακή κάλυψη με φυσαλίδες)
Χωρίς βελτιωτικές ενέργειες περιορισμού φυσαλίδων	<p style="text-align: center;">1^η ώρα</p> 	<p style="text-align: center;">100% σε 16 h</p> 
Με βελτιωτικές ενέργειες περιορισμού φυσαλίδων	<p style="text-align: center;">2^η ώρα</p> 	<p style="text-align: center;">25% σε 25 – 26 h</p> 

Παρ' όλα αυτά, η ορατή είσοδος φυσαλίδας από τη 2^η ώρα συνεχίζει να θεωρείται πρόωρη, ενώ η επικάλυψη του 25% του θαλάμου με φυσαλίδες στο τέλος της 1^{ης} ημέρας είναι ανεπιθύμητη για τη μετέπειτα έκβαση του πειράματος. Τέλος, η παρουσία φυσαλίδων στο φαλίδιο μόλις από την 1^η ώρα, δηλώνει ότι ο καθαρισμός του σωληνίσκου τροφοδοσίας και η χρησιμοποίηση πρόσφατα παρασκευασμένου θρεπτικού υλικού δεν αρκούν για την αποφυγή σχηματισμού εστιών πυρήνωσης των φυσαλίδων.

Στο σύστημα παρουσία παγίδας, είσοδος φυσαλίδας στο μικροθάλαμο παρατηρήθηκε στις 7 h, ενώ στις 24 h περίπου 60% του θαλάμου έχει καλυφθεί με φυσαλίδες. Στο Σχήμα 5.22 παρατίθενται χαρακτηριστικά στιγμιότυπα του μικροθαλάμου στους χρόνους 1 h, 7 h και 24 h.

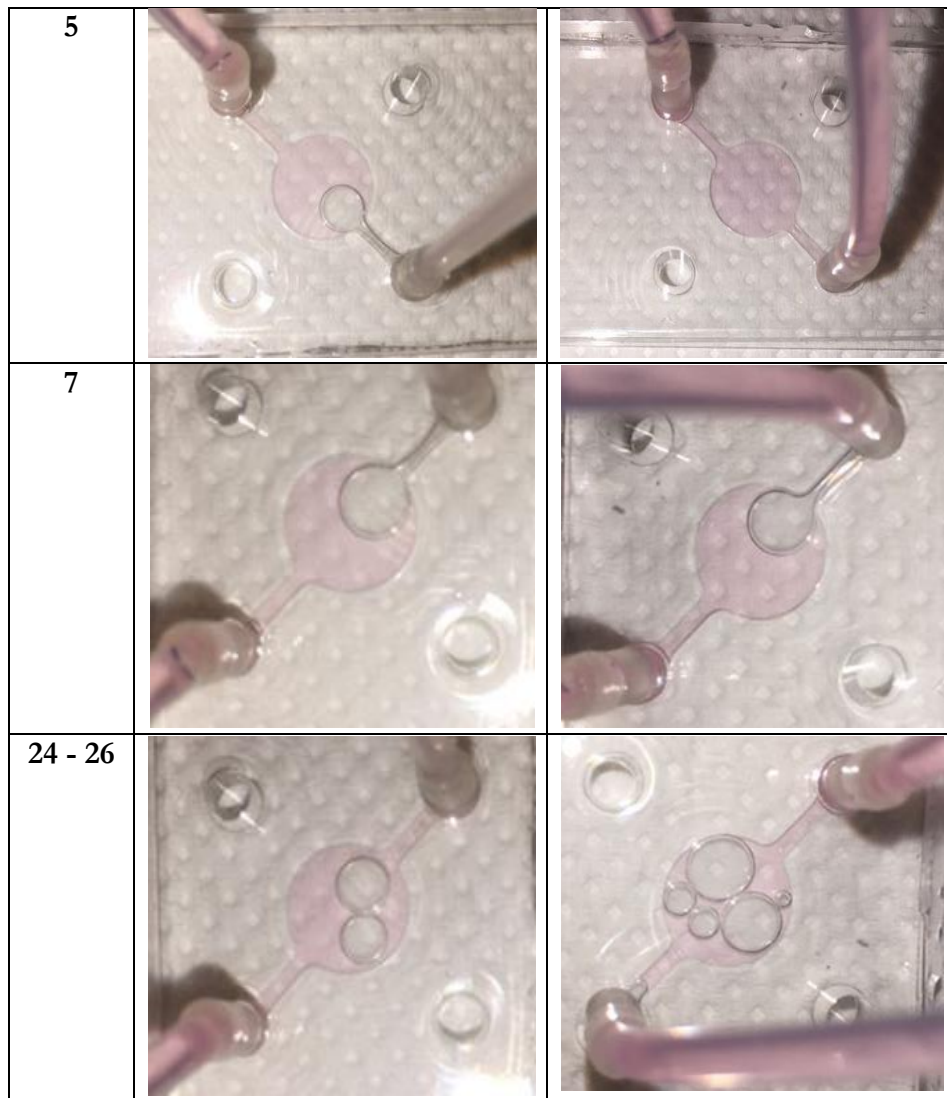


Σχήμα 5. 22. Χρονική εξέλιξη σχηματισμού φυσαλίδων στο σύστημα υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ με εμπορική παγίδα. Πραγματοποιήθηκε είσοδος φυσαλίδας την 7^η ώρα, ενώ περίπου 60% του μικροθαλάμου καλύφθηκε με φυσαλίδες την 24^η ώρα.

Προκειμένου να αναδειχθεί καλύτερα η συνεισφορά της ενσωμάτωσης της παγίδας, πραγματοποιείται σύγκριση με το αντίστοιχο προγενέστερο πείραμα απουσία παγίδας και στις ίδιες συνθήκες. Στον Πίνακα 5.4 που ακολουθεί, συγκεντρώνονται εικόνες από αντιπροσωπευτικούς χρόνους 2 h, 7 h και 24 – 26 h για τα δύο συστήματα.

Πίνακας 5. 4. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα των μικροθαλάμων υπό υψηλότερη ροή (11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$) με και χωρίς τη διαμεσολάβηση εμπορικής παγίδας φυσαλίδων σε αντιπροσωπευτικούς χρόνους 2 h, 5h, 7h, και 24 – 26 h. Η παγίδα παρουσιάζεται ευεργετική στους μικρούς χρόνους, καθυστερώντας κατά 5 h την είσοδο φυσαλίδας, ενώ στους μεγάλους χρόνους φαίνεται να επιδεινώνει κατά περίπου 35% την επιφανειακή κάλυψη με φυσαλίδες.

Χρόνος (h)	Απουσία παγίδας	Παρουσία παγίδας
2		



Προκύπτει ότι με την ενσωμάτωση παγίδας, υπάρχει καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας στο μικροθάλαμο. Συγκεκριμένα, ενώ απουσία παγίδας η φυσαλίδα εισέρχεται την 2^η ώρα, με την παγίδα εισέρχεται την 7^η ώρα, καθυστερώντας για 5 ώρες.

Την 7^η ώρα, τα δύο συστήματα οδηγούν σε παραπλήσια κάλυψη του μικροθαλάμου με φυσαλίδες, δηλαδή σε ποσοστό περίπου 25-30% < 50%. Ενώ απουσία παγίδας το ποσοστό αυτό παραμένει σχεδόν σταθερό στο 25% στο τέλος μιας ημέρας (25 – 26 h), με την παγίδα σε συγκρίσιμη χρονική διάρκεια (24 h), έχει ανέλθει περίπου στο 60%. Συνεπώς, η ενσωμάτωση παγίδας σε χρονικό διάστημα μιας ημέρας, που είναι πιο κοντά στους απαιτούμενους χρόνους καλλιέργειας κυττάρων, ίσως και να επιδείνωσε κατά 35% την επιφανειακή κάλυψη του μικροθαλάμου με φυσαλίδες, γεγονός που κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην ενσωμάτωση περισσότερων διεπαφών στην πειραματική διάταξη για τη σύνδεσή της.

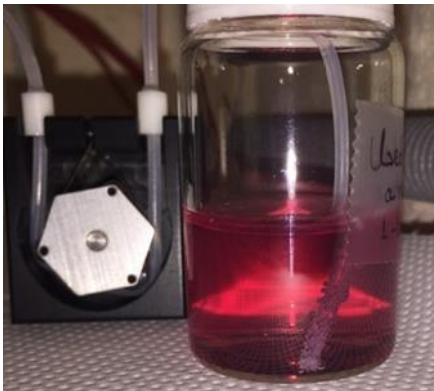
Έτσι, η παγίδα φαίνεται να πλεονεκτεί στους μικρούς χρόνους της τάξης των ωρών, σε αντίθεση με τους μεγάλους χρόνους της τάξης των ημερών.

Συγκεντρωτικά, από τα δύο πειράματα με και χωρίς παγίδα, προέκυψαν κάποιες κοινές συστηματικές και επαναλαμβανόμενες παρατηρήσεις.

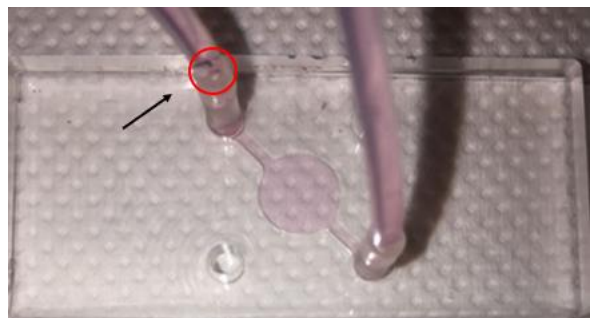
- Υπήρξαν αρκετές φυσαλίδες στο φιαλίδιο τροφοδοσίας, και συγκεκριμένα στο σωληνίσκο της αντλίας μέσα σε αυτό, παρά τον καθαρισμό του κάθε φορά αμέσως πριν τη χρήση του (Σχήμα 5.23a). Ο σωληνίσκος σιλικόνης είναι υδρόφοβος, γεγονός που ευνοεί τη δημιουργία εστιών πυρήνωσης καθ'όλο το μήκος του, αλλά και στο τελείωμά του, στα τοιχώματα πλευρικά της εισόδου του υγρού, όπου και είναι περισσότερο επίφοβη η ανάμειξη των φυσαλίδων με τη ροή. Παρατηρήθηκε μάλιστα συχνά, κίνηση των φυσαλίδων από το φιαλίδιο τροφοδοσίας προς το μικροθάλαμο. Συμπεραίνεται επομένως, ότι το φιαλίδιο τροφοδοσίας είναι μια βασική πηγή δημιουργίας φυσαλίδων.
- Εντοπίζεται συσσώρευση φυσαλίδων στις άκρες των προσαρμογών είτε του μικροθαλάμου (Σχήμα 5.23b) είτε της παγίδας (Σχήμα 5.23c). Κάτι τέτοιο είναι ανεπιθύμη καθώς είναι επιφάνειες με ατέλειες και τραχύτητα που ευνοούν την παγίδευση αέρα. Συσσώρευση παρατηρείται και σε σημεία εσωτερικά των σωληνίσκων, οφειλόμενη στο υδρόφοβο υλικό τους, την ύπαρξη ατελειών και την ενδεχόμενη φθορά τους με τις χρήσεις.
- Οι σωληνίσκοι σύνδεσης του μικροθαλάμου και της παγίδας είναι σιλικόνης και είναι πιθανόν να γίνεται διαπνοή του θρεπτικού υλικού μέσω αυτών.
- Παρά την ύπαρξη φυσαλίδων στο μικροθάλαμο, καθώς και στους σωληνίσκους εισόδου και εξόδου του, η ροή τροφοδοσίας δεν επηρεάζεται και διαπερνά ανεμπόδιστα το μικροθάλαμο μέχρι και το φιαλίδιο αποβλήτων, όπως προέκυψε από καταμέτρηση του όγκου αποβλήτων στο τέλος κάθε πειράματος (διάρκειας μίας ημέρας).

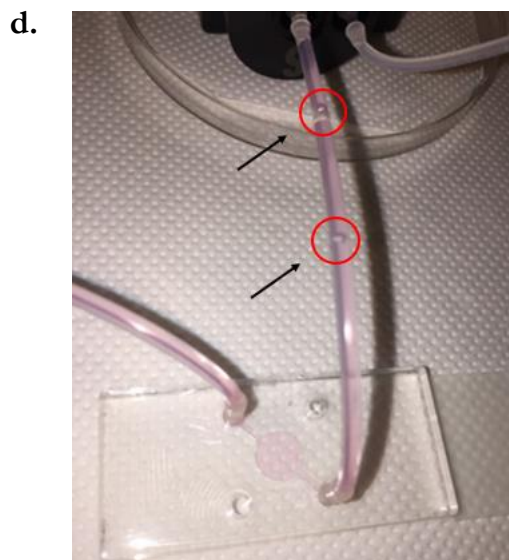
Τέλος, συγκεκριμένα ως προς το σύστημα παρουσία παγίδας, παρατηρείται μετακίνηση μεγαλύτερων φυσαλίδων (Σχήμα 5.23d), που δίνουν ενδεχομένως την εντύπωση ότι υπάρχουν συγκεκριμένα σημεία πυρήνωσης τους λόγω της αύξησης των διασυνδέσεων που είναι απαραίτητες για την ενσωμάτωση της παγίδας στο ρευστονικό δίκτυο.

a.



b.





Σχήμα 5. 23. Συστηματικές παρατηρήσεις κατά την τροφοδοσία μικροθαλάμων υπό ροή 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, απουσία και παρουσία εμπορικής παγίδας φυσαλίδων. a) Συσώρευση φυσαλίδων στο σωληνίσκο σιλικόνης στο εσωτερικό του φιαλιδίου τροφοδοσίας, b) Συγκέντρωση φυσαλίδων στις άκρες των προσαρμογέων του μικροθαλάμου, καθώς και c) της παγίδας, d) Μετακίνηση μεγαλύτερων φυσαλίδων στο σύστημα με την παγίδα, πιθανώς λόγω μεγαλύτερου πλήθους διασυνδέσεων. Οι φυσαλίδες υποδεικνύονται με βελάκια.

5.2.2.2 Εξαέρωση θρεπτικού υλικού στα συστήματα απουσία και παρουσία εμπορικής παγίδας





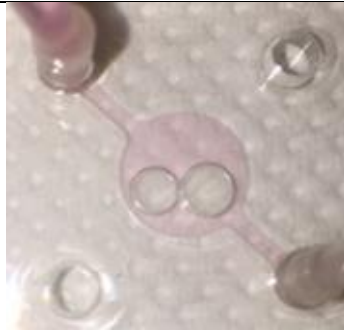

Όπως αποδείχτηκε, στο φιαλίδιο τροφοδοσίας υπάρχουν πολλές φυσαλίδες, οι οποίες δημιουργούνται πριν την εισαγωγή ροής στο σύστημα. Επιχειρείται λοιπόν, ο περιορισμός αυτού του συστηματικού παράγοντα, που ενδεχομένως επιδείνωσε τη λειτουργία των δύο συστημάτων, απουσία και παρουσία παγίδας, ώστε τα οποιαδήποτε αποτελέσματα να είναι το κατά δυνατόν περισσότερο οφειλόμενα στο ίδιο το σύστημα. Για το λόγο αυτό, δοκιμάζεται η απομάκρυνση αέρα από το θρεπτικό υλικό τροφοδοσίας πριν την ενσωμάτωσή του στη διάταξη, ως μια μέθοδος περιορισμού της βαθμίδας πίεσης μεταξύ του φιαλιδίου και του μικροθαλάμου. Η εξαέρωση πραγματοποιήθηκε σε ξηραντήρα στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου βιο-μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (bioMEMS), του I.N.N., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για χρόνο 2 – 2.5 h κάθε φορά. Και στα δύο συστήματα, η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε ανά 1 h, μέχρι τις πρώτες 5 h για το σύστημα απουσία παγίδας, και μέχρι τις πρώτες 3 h παρουσία παγίδας. Τα συστήματα στη συνέχεια αφέθηκαν overnight, μέχρι τις 23 h και 19 h, απουσία και παρουσία παγίδας, αντίστοιχα. Τέλος, το κάθε σύστημα αντιπαραβάλλεται με αντίστοιχο πείραμα, στο οποίο δεν έχει εξαερωθεί το θρεπτικό υλικό, ώστε να γίνει αντιληπτή η συνεισφορά της απομάκρυνσης του αέρα.

- Σύστημα απουσία παγίδας

Αρχικά, εστιάζοντας στο σύστημα χωρίς την παγίδα, στις 5 h δεν εντοπίστηκε καμία φυσαλίδα, ενώ στις 23 h περίπου 40-45% του μικροθαλάμου είχε καλυφθεί με φυσαλίδες. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο τέλος του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν φυσαλίδες δια γυμνού οφθαλμού στο φιαλίδιο τροφοδοσίας. Υπενθυμίζεται ότι στο αντίστοιχο σύστημα χωρίς εξαέρωση θρεπτικού υλικού, είχε εισαχθεί φυσαλίδα τη 2^η ώρα και

σημειώθηκε περίπου 25% κάλυψη στις 25 – 26 h. Στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται εικόνες από τους μικροθαλάμους για χρόνους 2 h, 5 h, καθώς και 23 h / 25 – 26 h, με και χωρίς εξαέρωση, αντίστοιχα.

Πίνακας 5. 5. Εξέλιξη φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθάλαμο τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού χωρίς ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, με ή χωρίς να έχει προγενέστερα απομακρυνθεί ο αέρας από το θρεπτικό υλικό στο φιαλίδιο τροφοδοσίας. Παρουσιάζεται η 2^η και 5^η ώρα και για τα δύο συστήματα, και η 23^η, 25^η – 26^η του συστήματος, με και χωρίς την εξαέρωση, αντίστοιχα. Προκύπτει θετική επίδραση της εξαέρωσης στους μικρούς χρόνους, με τουλάχιστον 3 h καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας, όχι όμως στους μεγάλους χρόνους.

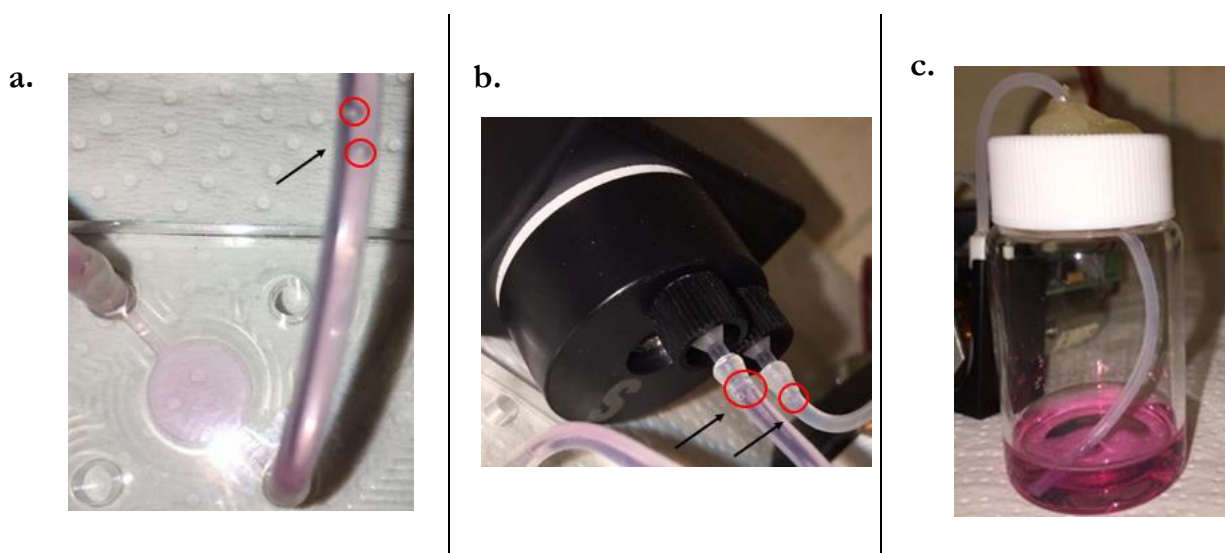
Χρόνος (h)	Χωρίς παγίδα και χωρίς απομάκρυνση αέρα	Χωρίς παγίδα και με απομάκρυνση αέρα
2		
5		
23 / 25 – 26		

Από τον παραπάνω Πίνακα 5.5, προκύπτει ότι απομακρύνοντας τον αέρα από το θρεπτικό υλικό υπάρχει καθυστέρηση τουλάχιστον 3 h στην είσοδο φυσαλίδας στο μικροθάλαμο, αφού μέχρι την 5^η ώρα παρατήρησης δεν υπήρξε φυσαλίδα, σε αντίθεση με τη 2^η ώρα που εισήχθη χωρίς την εξαέρωση. Όμως, σε διάρκεια μιας ημέρας, η απομάκρυνση του αέρα δε φαίνεται να έχει θετική επίδραση, καθώς ακόμη και για 2-3 h νωρίτερα, σημειώνεται περίπου 15 - 20% μεγαλύτερη κάλυψη από φυσαλίδες. Δεχόμενοι ότι η αύξηση αυτή στην κάλυψη ενδέχεται να είναι τυχαία, δεν μπορεί σίγουρα να εξαχθεί ότι με την απομάκρυνση αέρα η κάλυψη από φυσαλίδες περιορίζεται, αλλά στην καλύτερη περίπτωση παραμένει ίδια.

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι σε μικρούς χρόνους της τάξης των ωρών η απομάκρυνση αέρα ευεργετεί τον περιορισμό φυσαλίδων, αλλά σε μεγάλους χρόνους της τάξης των ημερών δεν προσφέρει στο σύστημα. Το γεγονός αυτό συνάδει με άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι η εξαέρωση του υγρού ευνοεί προσωρινά [7], και πραγματοποιείται εκ νέου επάνοδος αέρα στο υγρό λόγω διάχυσης, εξαερωμένη κάθε φορά από τις ειδικές συνθήκες του κάθε συστήματος και το χρόνο που απαιτείται για να βρεθεί σε νέα ισορροπία το υγρό με το αέριο σε επαφή.

- Σύστημα παρουσία παγίδας

Στο εν λόγω σύστημα, στις 3 h δεν είχε εισέλθει φυσαλίδα στο μικροθάλαμο, ενώ στις 19 h περίπου 50 - 60% του θαλάμου ήταν καλυμένο με φυσαλίδες. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τη 2^η ώρα, εντοπίστηκαν φυσαλίδες να κινούνται στο σωληνάκι από την έξοδο της παγίδας προς την είσοδο του μικροθαλάμου (Σχήμα 5.24a). Επιπλέον, ο εγγλωβισμός αέρα στον προσαρμογέα εξόδου της παγίδας ήταν και πάλι συστηματικό φαινόμενο, εμφανές δια γυμνού οφθαλμού από τις πρώτες ώρες του πειράματος, όπως παρουσιάζεται ενδεικτικά την 3^η ώρα στο Σχήμα 5.24b. Στο τέλος του πειράματος, στο φιαλίδιο τροφοδοσίας δεν υπήρχαν φυσαλίδες (Σχήμα 5.24c).



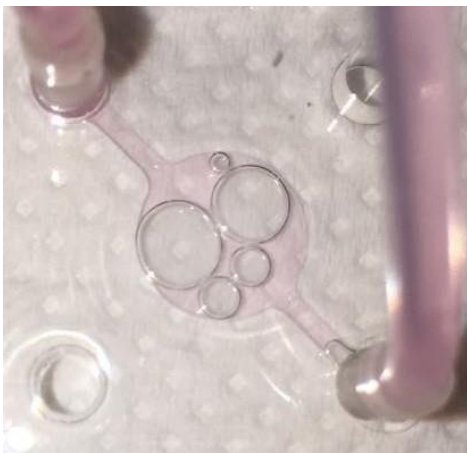
Σχήμα 5. 24. Παρατηρήσεις κατά την τροφοδοσία μικροθαλάμων υπό ροή με ενσωματωμένη εμπορική παγίδα φυσαλίδων, όπου έχει προηγηθεί εξαέρωση του θρεπτικού υλικού. a) Ροή φυσαλίδων από την έξοδο της παγίδας προς την είσοδο του μικροθαλάμου τη 2^η ώρα παρατήρησης. b) Παγίδευση φυσαλίδων στον κωνικό προσαρμογέα στην έξοδο της παγίδας την 3^η ώρα παρατήρησης. c) Ανυπαρξία φυσαλίδων ορατών δια γυμνού οφθαλμού στο φιαλίδιο τροφοδοσίας ακόμη και μετά από 18 h συνεχούς τροφοδοσίας.

Σε αντίστοιχο πείραμα, στο οποίο δεν είχε εξαερωθεί το θρεπτικό υλικό, εντοπίστηκε είσοδος φυσαλίδας την 7^η ώρα, με αντίστοιχο δεδομένο αρχικής εισόδου φυσαλίδας να εκλείπει για το πείραμα με την εξαέρωση. Επομένως, τα δύο πειράματα μπορούν να συγκριθούν ως προς το τέλος τους, και ειδικότερα, η 24^η ώρα χωρίς εξαέρωση με τη 19^η ώρα με εξαέρωση, όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 5.6. Εδώ διακρίνεται περίπου 30% κάλυψη του μικροθαλάμου στις 19 h με την εξαέρωση, με ένα περίπου 60% κάλυψη στις 24 h χωρίς την

εξαέρωση. Λαμβάνοντας υπόψη τη διαπίστωση για την ωφελιμότητα της εξαέρωσης στο σύστημα απουσία παγίδας μόνο στους μικρούς χρόνους, η κατά 30% μικρότερη κάλυψη από φυσαλίδες σε χρόνο παρατήρησης νωρίτερο κατά 5 h σε συνολική διάρκεια περίπου μιας ημέρας στο σύστημα που έχει γίνει εξαέρωση, επικυρώνει ότι δε συνδράμει σε μεγάλους χρόνους.

Πίνακας 5. 6. Μικροθάλαμος υπό ροή με ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, με ή χωρίς να έχει προγενέστερα απομακρυνθεί ο αέρας από το θρεπτικό υλικό στο φιαλίδιο τροφοδοσίας, κατά την 24^η και 19^η ώρα, για το σύστημα χωρίς και με εξαέρωση, αντίστοιχα. Συγκρισιμες καταστάσεις κάλυψης με φυσαλίδες των δύο συστημάτων για 5 h μεταξύ τους χρονική διαφορά, που επιβεβαιώνει τη μη συνεισφορά της εξαέρωσης στους μεγάλους χρόνους.

Με παγίδα φυσαλίδων (t = 24 h)



Με παγίδα φυσαλίδων & εξαέρωση (t =19 h)



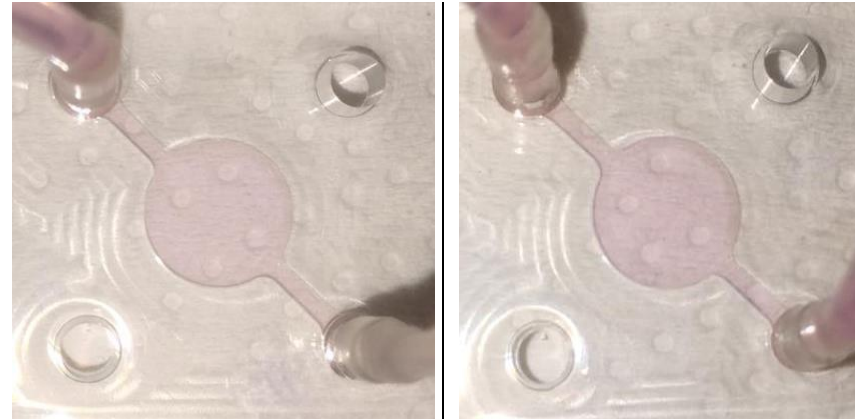
- Σύγκριση συστημάτων απουσία και παρουσία παγίδας

Ολοκληρώνοντας, συγκρίνονται μεταξύ τους τα συστήματα με και χωρίς παγίδα, στα οποία έχει απομακρυνθεί ο αέρας από το φιαλίδιο τροφοδοσίας. Στον Πίνακα 5.7 που ακολουθεί, παρατίθενται φωτογραφίες από τα δύο συστήματα σε χαρακτηριστικούς χρόνους 3 h, καθώς και 19 h, 21 h, για το σύστημα με και χωρίς παγίδα, αντίστοιχα.

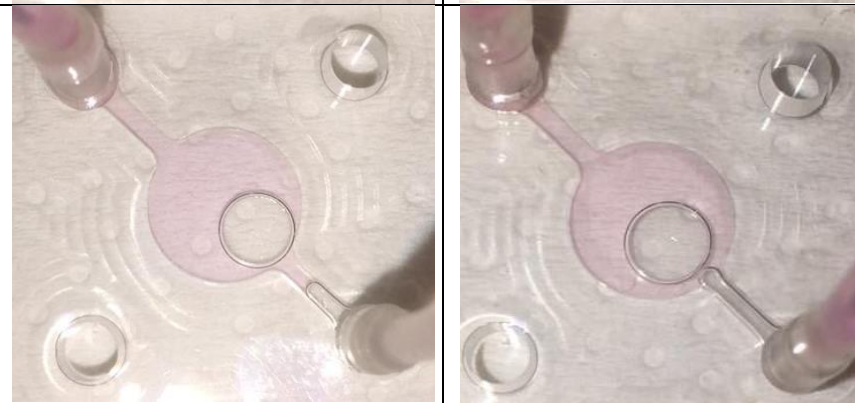
Πίνακας 5. 7. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα μελέτης δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθάλαμο τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού, απουσία και παρουσία εμπορικής παγίδας, έχοντας προγενέστερα απομακρύνει τον αέρα από το φιαλίδιο τροφοδοσίας. Παρουσιάζονται οι ώρες 3^η και για τα δύο συστήματα, καθώς και 21^η για το σύστημα απουσία παγίδας, και 19^η για το σύστημα παρουσία παγίδας. Στους μικρούς χρόνους εμφανίζεται η συνεισφορά της εξαέρωσης και στα δύο συστήματα, σε αντίθεση με τους μεγάλους χρόνους, όπου αναδεικνύεται αυτούσια η συμπεριφορά τους.

Χρόνος (h)	Χωρίς παγίδα φυσαλίδων και με απομάκρυνση αέρα	Με παγίδα φυσαλίδων και απομάκρυνση αέρα
------------	--	--

3



19/21



Από τον παραπάνω πίνακα, είναι εμφανές ότι η εικόνα του μικροθαλάμου στους μικρούς χρόνους, μέχρι 3 h είναι ίδια και για τα δύο συστήματα, παρουσιάζοντας την ωφέλεια της εξάερωσης στο σύστημα απουσία παγίδας. Όμως, στις 21 h απουσία παγίδας η κατάσταση είναι συγκρίσιμη με εκείνη στις 19 h παρουσία παγίδας, με μάλιστα κατά 10% μικρότερη κάλυψη με φυσαλίδες παρά τις 3 h διαφορά μεταξύ των δύο συστημάτων. Στην ουσία δηλαδή, σε μεγάλους χρόνους, εμφανίζεται αυτούσια η συμπεριφορά του κάθε συστήματος, χωρίς κάποια επίδραση από την εξάερωση που πραγματοποιήθηκε στην εκκίνηση. Πράγματι, φαίνεται ότι το σύστημα χωρίς παγίδα έχει μικρότερη συσσώρευση φυσαλίδων σε σχέση με εκείνο με την παγίδα. Επιβεβαιώνεται λοιπόν, και κατά τη σύγκριση των δύο διαφορετικών συστημάτων, με και χωρίς παγίδα, ότι η απομάκρυνση αέρα, δεν καταφέρει να μειώσει τη δημιουργία φυσαλίδων σε χρόνους της τάξης των ημερών.

5.2.2.3 Ερμηνεία δυσλειτουργίας παγίδας



Όπως αποδείχτηκε στις προηγούμενες παραγράφους, η εμπορική παγίδα καθυστερεί την εμφάνιση φυσαλίδων σε μικρούς χρόνους της τάξης των ωρών, ενώ στους μεγάλους χρόνους της τάξης των ημερών η ενσωμάτωσή της δεν παρουσιάστηκε ωφέλιμη. Μάλιστα, με την εξάερωση του θρεπτικού υλικού, η λειτουργία της στους μεγάλους χρόνους δε φάνηκε να βελτιώνεται. Παραμένει συνεπώς να διερευνηθούν τα αίτια που προκάλεσαν τη δυσλειτουργία της. Εξετάζεται το ενδεχόμενο το θρεπτικό υλικό λόγω της μικρής επιφανειακής τάσης του να διαβρέχει τη μεμβράνη PTFE της παγίδας με το πέρασμα των ωρών, φράσσοντας έτσι τους μικροπόρους της και επηρεάζοντας την υδροφοβικότητά της, με άμεση επίπτωση στη δυνατότητα εκτόνωσης των φυσαλίδων. Προς διερεύνηση αυτού, το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από υγρό μεγαλύτερης επιφανειακής

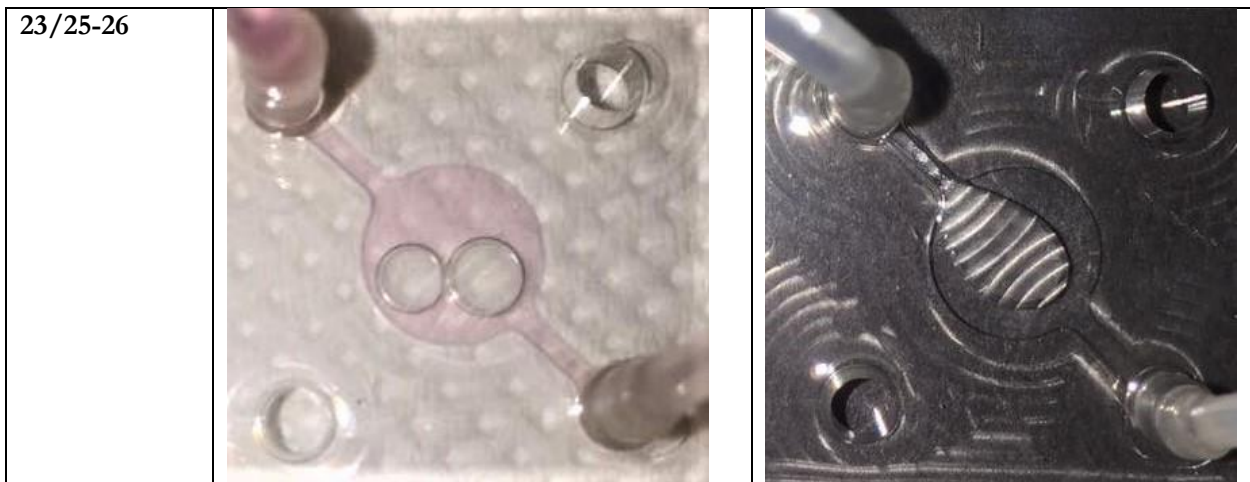
ενέργειας, το απιονισμένο νερό. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σύστημα απουσία και παρουσία παγίδας για ροή τροφοδοσίας 11.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, και διήρκησε 23 – 24 h, και συγκεκριμένα, 23 h χωρίς και 24 h με την παγίδα. Σε κάθε περίπτωση, το σύστημα συγκρίθηκε με αντίστοιχο πείραμα με χρήση θρεπτικού υλικού.

- Σύστημα απουσία παγίδας

Παρατηρήθηκε είσοδος φυσαλίδας τη 2^η ώρα, ενώ στις 23 h σημειώθηκε ένα ποσοστό κάλυψης 60% με φυσαλίδες. Υπενθυμίζεται ότι σε αντίστοιχο σύστημα με θρεπτικό υλικό, εισήλθε φυσαλίδα και πάλι στις 2 h, ενώ στις 25 – 26 h περίπου 25% του θαλάμου είχε φυσαλίδες. Στον Πίνακα 5.8 αντιπαραβάλλεται το σύστημα για τα δύο υγρά τροφοδοσίας. Η αλλαγή του υγρού σε απιονισμένο δε μεταθέτει το χρόνο εισόδου φυσαλίδας, ενώ φαίνεται ότι η φυσαλίδα που εισέρχεται είναι μεγαλύτερου μεγέθους. Στο τέλος των πειραμάτων, στις 23 h για το απιονισμένο νερό ένα ποσοστό 60% είναι καλυμένο με φυσαλίδες, και στις 25 - 26 h για το θρεπτικό υλικό, αν και πρόκειται για 2 – 3 h μετά, ένα μικρότερο ποσοστό 25% έχει καλυφθεί. Ενδέχεται η αύξηση της επιφανειακής τάσης του υγρού να περιορίσει τη διαβροχή του μικροθαλάμου, των προσαρμογέων, σωληνίσκων και γενικότερα, όλων των εξαρτημάτων στην πορεία του υγρού, οδηγώντας σε 30 - 35% αύξηση στην κάλυψη με φυσαλίδες στο τέλος της παρατήρησης. Συνεπώς, δε διακρίνεται κάποια βελτίωση στη λειτουργία της παγίδας με την αλλαγή του υγρού.

Πίνακας 5. 8. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα μελέτης φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθάλαμο τροφοδοσίας χωρίς ενσωματωμένη παγίδα φυσαλίδων, με το υγρό τροφοδοσίας να είναι θρεπτικό υλικό ή απιονισμένο νερό. Παρουσιάζεται η 2^η ώρα και για τα δύο υγρά, καθώς και η 23^η για το απιονισμένο σε αντιστοιχία με την 25^η-26^η για το θρεπτικό υλικό. Δε μεταβλήθηκε η ώρα εισόδου φυσαλίδες με το απιονισμένο νερό, ενώ προέκυψε μεγαλύτερη επιφάνεια κάλυψης με φυσαλίδες σε μεγάλους χρόνους.

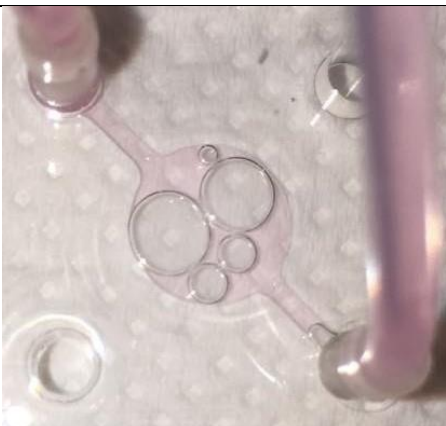

Χρόνος παρατήρησης (h)	Χωρίς παγίδα φυσαλίδων	
	Θρεπτικό υλικό	Απιονισμένο νερό
2		



- Σύστημα παρουσία παγίδας

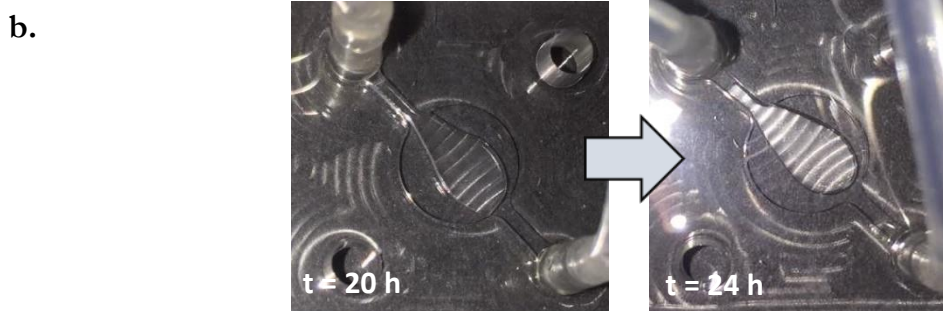
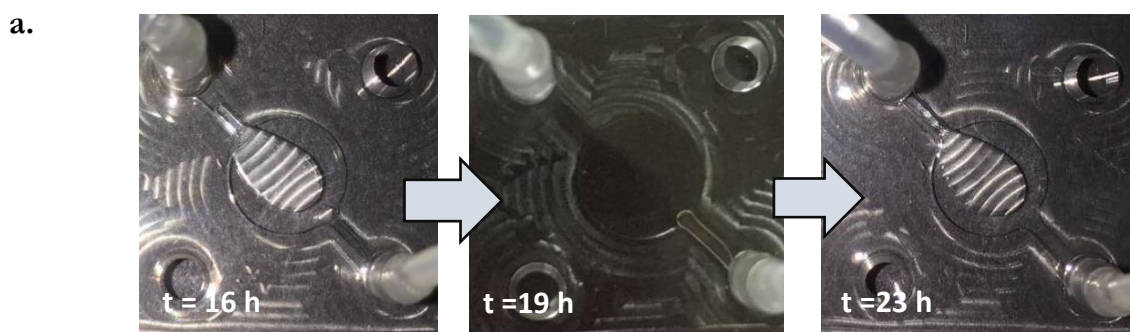
Μέχρι και την 3^η ώρα δεν εισήλθε φυσαλίδα και την 24^η ώρα περίπου 60% του μικροθαλάμου είχε καλυφθεί με φυσαλίδες. Σε αντιπαράβολή με αντίστοιχο πείραμα με χρήση θρεπτικού υλικού, ελλείπει εντοπισμού ώρας εισόδου φυσαλίδας με το απιονισμένο νερό, η σύγκριση πραγματοποιείται στο τέλος του πειράματος, στις 24 h, με χαρακτηριστικές εικόνες να προβάλλονται στον Πίνακα 5.9. Με το θρεπτικό υλικό σημειώνεται επίσης ένα 60% κάλυψη με φυσαλίδες, όπως αντίστοιχα και με το απιονισμένο νερό. Οι δύο μικροθάλαμοι είναι συγκρίσιμοι κατά το τέλος του πειράματος, υποδηλώνοντας ότι δε σημειώνεται βελτίωση με την αλλαγή του υγρού διαβροχής. Μπορεί συνεπώς να εξαχθεί ότι το θρεπτικό υλικό δεν ήταν η αιτία που η παγίδα δυσλειτουργούσε.

Πίνακας 5. 9. Αντιπαράβολή συστημάτων μικροθαλάμων τροφοδοσίας συνδεδεμένων με παγίδα φυσαλίδων με το υγρό τροφοδοσίας να είναι θρεπτικό υλικό ή απιονισμένο νερό. Στους μεγάλους χρόνους (24 h) τα δύο συστήματα είναι συγκρίσιμα.

Χρόνος παρατήρησης (h)	Με παγίδα φυσαλίδων	
	Θρεπτικό υλικό	Απιονισμένο νερό
24		

Από τα πειράματα αυτά, επιβεβαιώνεται ότι το θρεπτικό υλικό δεν είναι βασική αιτία για την είσοδο φυσαλίδων στο μικροθαλάμο. Αναγνωρίζονται επομένως ως βασικές αιτίες, το ίδιο το σύστημα, αποτελούμενο από PDMS, τα χρησιμοποιούμενα εξαρτήματα και συνδεσμολογία, καθώς και οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης.

Όμως, παρ' όλο που το θρεπτικό υλικό δεν ευθύνεται για την είσοδο φυσαλίδων, έγινε μια παρατήρηση ενδεχομένως δηλωτική ενός πλεονεκτήματος της χρήσης απιονισμένου υγρού. Συγκεκριμένα, και στα δύο συστήματα, με και χωρίς παγίδα, με υγρό τροφοδοσίας απιονισμένο νερό, σημειώθηκε ανακύκλωση του φαινομένου εμφάνισης φυσαλίδας με την προώθηση ευμεγέθους φυσαλίδας από το εσωτερικό του μθαλάμου προς την έξοδο και αργότερα ει νέου είσοδο νέας φυσαλίδας και επανάληψη της ίδιας διαδικασίας. Ειδικότερα, στο σύστημα χωρίς παγίδα, η φυσαλίδα που έχει δημιουργηθεί στο μικροθαλάμο τη 16^η ώρα, έχει αποχωρήσει από αυτόν τη 19^η ώρα και έχει ήδη αρχίσει να εισέρχεται η νέα, η οποία με τη σειρά της εμφανίζει την ίδια εικόνα την 23^η ώρα με την παλαιά της 16^η ώρας, ολοκληρώνοντας έναν πλήρη κύκλο σε 7 h. Η εξέλιξη όλου του φαινομένου απεικονίζεται στο Σχήμα 5.25a. Στο σύστημα με παγίδα, η ανακύκλωση της δημιουργίας φυσαλίδων πραγματοποιείται με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με το αντίστοιχο απουσία παγίδας. Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργούμενη φυσαλίδα εντός του θαλάμου στις 20 h προωθείται σταδιακά προς την έξοδό του, μην έχοντας όμως αποβληθεί μέχρι και την 24^η ώρα, δηλαδή 4 h μετά (Σχήμα 5.25b). Στην αντίστοιχη περίπτωση απουσία παγίδας, παρόμοιου μεγέθους φυσαλίδα εντός του θαλάμου στις 16 h έχει αποχωρήσει από το θάλαμο τη 18^η ώρα, δηλαδή 2 h νωρίτερα σε σχέση με το σύστημα με την παγίδα. Να σημειωθεί εδώ, ότι η ανακύκλωση του φαινομένου υποδεικνύει την ύπαρξη πυρήνων Harvey, εγγενών του συστήματος και των συνθηκών, όπου η φυσαλίδα σταδιακά μεγαλώνει και αποκολλάται παρασυρόμενη από τη ροή, ενώ ο πυρήνας παραμένει και δημιουργεί ει νέου φυσαλίδες.



Σχήμα 5. 25. Ανακύνκωση του φαινομένου δημιουργίας δυσαλίδων στο εσωτερικό μικροθαλάμων υπό ροή απιονισμένου νερού σε συστήματα απουσία και παρουσία παγίδας φυσαλίδων, ενδεικτική της ύπαρξης πυρήνων Harvey. a) Απουσία παγίδας, η κάλυψη του μικροθαλάμου με φυσαλίδα τη 16^η ώρα προσομοιάζει εκείνη της 23^{ης} ώρας. b) Παρουσία παγίδας σημειώνεται βραδύτερη ανακύνκωση των φυσαλίδων, με τη φυσαλίδα από την 20^η στην 24^η ώρα να μην έχει ακόμη αποβληθεί από το θάλαμο.

Με τη χρήση θρεπτικού υλικού δεν παρατηρείται αντίστοιχο φαινόμενο ανακύνκωσης, αντιθέτως, μετά την είσοδο μια φυσαλίδας, είναι δύσκολη η απομάκρυνσή της από το μικροθάλαμο, ιδιαίτερα αν είναι μεγάλου μεγέθους, όπως εκείνες που εντοπίστηκαν να ανακύνκωνονται με το απιονισμένο νερό (Σχήμα 5.25a,b). Επιπλέον, στο θρεπτικό υλικό παρατηρούνται συνήθως περισσότερες, διάσπαρτες φυσαλίδες, ακόμη και μικρότερου μεγέθους, ενώ στο απιονισμένο, εμφανιζόταν μια μεγάλη φυσαλίδα. Κάτι τέτοιο είναι λογικό, καθώς στο θρεπτικό υλικό, λόγω περιεκτικότητας σε πλειάδα συστατικών, είναι πιο εύκολη η πυρήνωση φυσαλίδων και η δημιουργία πολλαπλών εστιών, και αντίστοιχα, στο απιονισμένο, λόγω μεγαλύτερης επιφανειακής ενέργειας, είναι πιο εύκολη η συνένωσή τους σε μια μεγαλύτερη φυσαλίδα. Συνεπώς, η χρήση θρεπτικού υλικού συνεισφέρει περιορισμένα στη γένεση και είσοδο φυσαλίδων στο μικροθάλαμο, αλλά βοηθάει στη συντήρηση του φαινομένου, διευκολύνοντας την παραμονή και εξέλιξη όσων φυσαλίδων έχουν ήδη εισέλθει.

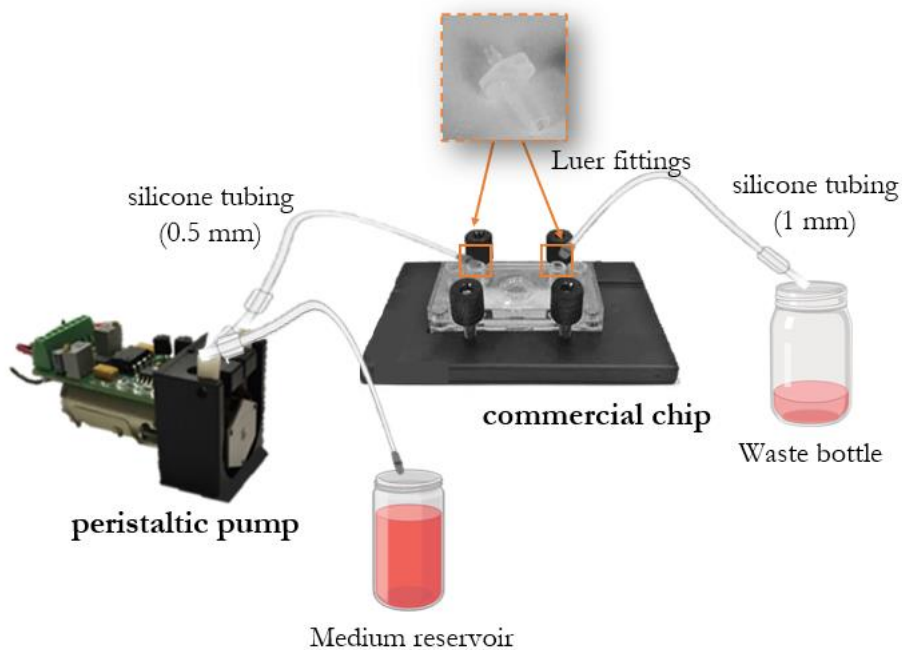
Έτσι, έχοντας αποκλείσει ότι το θρεπτικό υλικό είναι αιτία δυσλειτουργίας της παγίδας, διερευνώνται άλλοι λόγοι που τελικά την προκάλεσαν, οι οποίοι εντοπίζονται στη συνδεσμολογία και τις πειραματικές συνθήκες. Καταρχάς, σημαντικό πρόβλημα προκαλούσαν οι προσαρμογείς της παγίδας, οι οποίοι δεν ήταν οι αρχικώς προοριζόμενοι από τον κατασκευαστή, αλλά επιλέχθηκαν με γνώμονα την εφαρμογή τους στους σωληνίσκους του συστήματος. Οι προσαρμογείς άφηναν κενό χώρο στις εσοχές της παγίδας, καθώς οι άκρες τους δεν ακουμπούσαν σε αυτές. Επιπλέον, η άλλη άκρη τους, όπου συνδέονταν οι σωληνίσκοι, ήταν κωνικής μορφής, αφήνοντας αντίστοιχα κενό χώρο πλευρικά του κώνου. Όπως έχει προαναφερθεί, στο σύστημα με παγίδα, συνήθως εντοπιζόνταν μεγαλύτερες φυσαλίδες, υποδηλώνοντας ενδεχομένως τη δημιουργία τους εκτός της παγίδας. Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, εντοπιζόταν συστηματικά φυσαλίδα στον προσαρμογέα, που σταδιακά εξελισσόταν σε μεγάλη και ελευθερωνόταν με τη ροή προς το θάλαμο. Πιθανολογείται επομένως, ότι μια από τις βασικές εστίες πυρήνωσης των φυσαλίδων είναι στον προσαρμογέα. Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό η διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης να μην ήταν αρκετά μεγάλη ώστε να διεκπεραιωθεί η εκτόνωση των φυσαλίδων μέσω αυτής. Αναφέρεται από τον κατασκευαστή ότι για τη συγκεκριμένη παγίδα, μικρού μεγέθους, σε τόσο χαμηλές ροές ($\approx 11 \mu\text{L}/\text{min}$) απαιτείται διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης $\Delta P \geq 1\ 500 \text{ mbar} \approx 1.5 \text{ atm}$ ώστε να εξασφαλιστεί πως ένα ποσοστό 86 – 90% των φυσαλίδων θα εκτονωθεί. Προς εξασφάλιση αυτής της διαφοράς πίεσης, απαιτούταν η σύνδεση της παγίδας με αντλία κενού για τη δημιουργία υποπίεσης στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Δεν υπήρχε όμως η δυνατότητα σύνδεσης αντλίας κενού εξωτερικά του επωαστήρα κυττάρων στις εγκαταστάσεις του I.IB.E.A.A.

5.2.3 Σύγκριση με εμπορική μικροδιάταξη (υψηλότερες ροές)

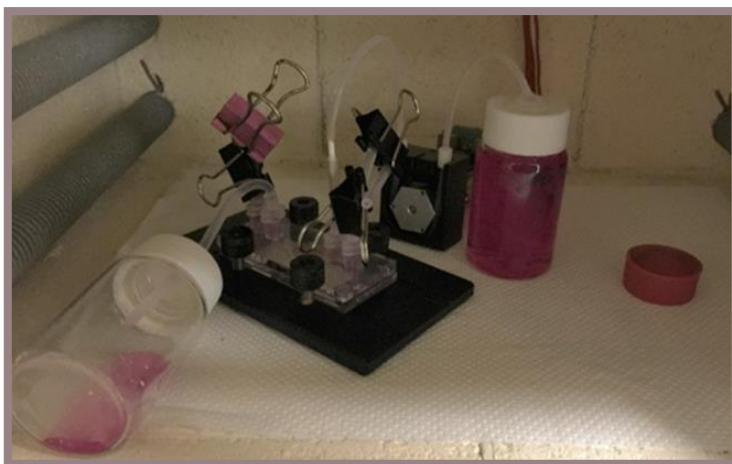
Σε μία προσπάθεια καλύτερης κατανόησης του φαινομένου της δημιουργίας φυσαλίδων σε παρόμοιες μικρορευστονικές διατάξεις, δοκιμάστηκε η μελέτη εμπορικής μικροδιάταξης υπό υψηλότερη ροή ως μια

πλατφόρμα κοντινή στη μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα. Η εμπορική μικροδιάταξη που χρησιμοποιήθηκε προσφέρεται για την τριδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων και ιστών επιτρέποντας τη διεξαγωγή πειραμάτων υπό συνθήκες δυναμικής ροής. Αγοράστηκε από την εταιρεία Darwin Microfluidics (Παρίσι, Γαλλία), και παρουσιάζεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 (βλ. Παρ. 2.3). Εν συντομία, η μικροδιάταξη αποτελείται από δύο κυλινδρικούς μικροθαλάμους πολυανθρακικού (polycarbonate - PC), που επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω ημιδιαπερατού κυψελοειδούς πλαισίου κυτταροκαλλιέργειας (culture patch), το οποίο φέρει ένα πλέγμα νανοϊών ζελατίνης. Ο ανώτερος μικροθάλαμος απομονώθηκε από τον κατώτερο αντικαθιστώντας το πλαίσιο κυτταροκαλλιέργειας με υμένιο PDMS (αναλογίας 10:1, πάχους ≈ 0.2 mm). Με αυτό τον τρόπο, η μελέτη περιορίζεται στον ανώτερο μικροθάλαμο, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί ως μικροθάλαμος τροφοδοσίας, κατ'αναλογία με τους μικροθαλάμους PDMS που χρησιμοποιήθηκαν στην έως τώρα μελέτη. Η εμπορική μικροδιάταξη συνδέθηκε με την περισταλτική αντλία P625/900 για τη μελέτη της υπό ροή, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.26a σχηματικά, και στο Σχήμα 5.26b ρεαλιστικά. Συγκεκριμένα, στις τέσσερις εσοχές της τοποθετούνται Luer προσαρμογείς πολυπροπυλενίου (PP), στους οποίους συνδέονται σωληνάκια σιλικόνης, επικαλυμένα με πλατίνα (λευκόχρυσο) εξωτερικής και εσωτερικής διαμέτρου 3 mm και 1mm, αντίστοιχα. Το σωληνάκι σιλικόνης της αντλίας, εσωτερικής διαμέτρου 0.5 mm, συνδέεται με το σωληνάκι του μικροθαλάμου τροφοδοσίας της μικροδιάταξης με τη διαμεσολάβηση ενός μικρού μήκους σωληνίσκου PEEK, εξωτερικής διαμέτρου 0.8 mm, γύρω από τον οποίο περιελίσσεται ταινία Teflon για την καλύτερη προσαρμογή του στο σωληνάκι της μικροδιάταξης. Το σωληνάκι της αντλίας στο άλλο άκρο του συνδέεται με το γυάλινο φιαλίδιο τροφοδοσίας (20 mL), με αντίστοιχο φιαλίδιο να χρησιμοποιείται και στην έξοδο του μικροθαλάμου τροφοδοσίας για τη συλλογή αποβλήτων.

a.



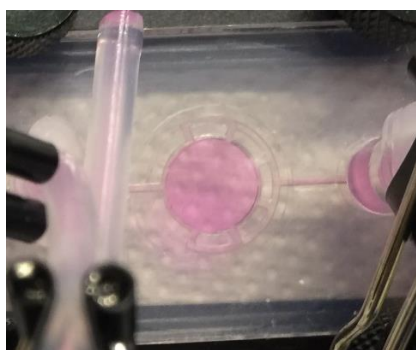
b.



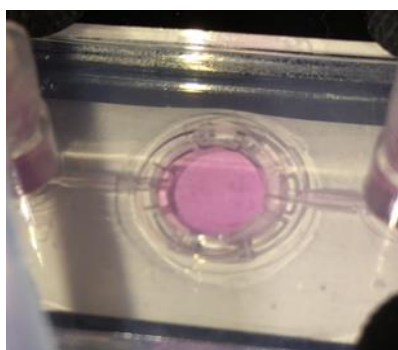
Σχήμα 5. 26. a) Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης και συνδεσμολογίας που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη υπό υψηλότερες ροές (6 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 13 $\mu\text{L}/\text{min}$) εμπορικής μικροδιάταξης για τη 3D καλλιέργεια κυττάρων. Η μικροδιάταξη συνδέεται με περισταλτική αντλία μέσω κατάλληλων εμπορικών προσαρμογών Luer και σωληνίσκων σιλικόνης. b) Φωτογραφία της πειραματικής διάταξης στο εσωτερικό φούρνου.

Η μικροδιάταξη εξετάστηκε υπό ροή 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ για χρόνο 18 h, καθώς και 13 $\mu\text{L}/\text{min}$ για χρόνο 16 h. Το όλο σύστημα τοποθετήθηκε εντός φούρνου θερμοκρασίας 37°C με την προσθήκη κατάλληλης υγρασίας. Και στις δύο περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκε φυσαλίδα στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας, ενώ επιπλέον, μέτρηση του αποβληθέντος θρεπτικού υλικού στην έξοδο στο τέλος του κάθε πειράματος, επιβεβαίωσε την ελάχιστη οριζόμενη ροή τροφοδοσίας, ενδεικτικό της ορθής πειραματικής έκβασης. Στο Σχήμα 5.27 απεικονίζονται φωτογραφίες της μικροδιάταξης στο τέλος της παρατήρησης για την κάθε ροή.

Ροή 6 $\mu\text{L}/\text{min}$



Ροή 13 $\mu\text{L}/\text{min}$



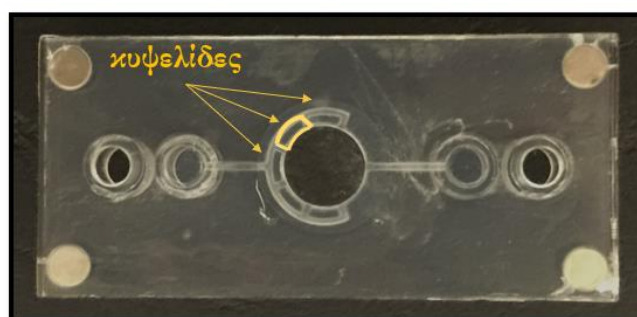
Σχήμα 5. 27. Στιγμιότυπα του μικροθαλάμου τροφοδοσίας της εμπορικής μικροδιάταξης για τις ροές 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 13 $\mu\text{L}/\text{min}$, και χρόνο 18 h και 16 h, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε είσοδος φυσαλίδας σε καμία από τις περιπτώσεις.

Προκύπτει επομένως, ότι σε αντίθεση με τους μικροθαλάμους PDMS, η εμπορική μικροδιάταξη μπορεί να λειτουργήσει στις υψηλότερες ροές χωρίς την εμφάνιση φυσαλίδων στους μεγάλους χρόνους (μέχρι και 16 – 18 h). Εντοπίζονται όμως σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο διατάξεων, οι οποίες σύμφωνα και την ανάλυση της Παραγράφου 5.1, είναι ευνοϊκές για την εμπορική μικροδιάταξη και ικανές να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα αυτά.

Αρχικά, το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένη η εμπορική διάταξη, το πολυανθρακικό (PC) δεν είναι διαπερατό σε αέρια, αναφέροντας χαρακτηριστικά το συντελεστή διαπερατότητας $O_2 \approx 1.68$ barrer [46], σε αντίθεση με το PDMS των μικροθαλάμων που είναι ιδιαίτερα διαπερατό, με υψηλό συντελεστή διαπερατότητας, ενδεικτικά με συντελεστή διαπερατότητας $O_2 \approx 370$ barrer [47]. Επιπλέον, υπάρχει διαφορά και στις ιδιότητες διαβροχής των δύο υλικών, που όπως αποδείχτηκε στην Παράγραφο 5.1.1 είναι σημαντικός παράγοντας γένεσης φυσαλίδων. Συγκεκριμένα, το PC είναι υδρόφιλο, με στατική γωνία επαφής $\approx 68.4^\circ$ [48], σε αντίθεση με το PDMS που είναι υδρόφοβο με γωνία επαφής $\approx 110^\circ$ [49]. Παρά την ενεργοποίηση που υφίσταται το PDMS κατά την έκθεσή του σε πλάσμα αέρα στο στάδιο της συγκόλλησης και τη σταθερή υδρόφιλοποίηση με κολλαγόνο (βλ. Κεφ. 4), δεν αποκλείεται να υπάρχουν τοπικές παρεκκλίσεις στη διαβροχή ειδικότερα στις εγχοπές εισόδου/εξόδου στο άνω επίπεδο του θαλάμου, οι οποίες είναι πιθανόν να αποτελέσουν εστίες πυρήνωσης φυσαλίδων.

Ακόμη, η εμπορική διάταξη παρουσιάζει σχεδιαστικό πλεονέκτημα με την τοποθέτηση κυψελίδων περιφερειακά των μικροθαλάμων από την πλευρά των εισόδων (Σχήμα 5.28), οι οποίες δρουν σαν τοπικά φράγματα του μετώπου υγρού, ισοκατανέμοντάς το να καλύψει ομοιόμορφα όλο το θάλαμο, αποτρέποντας τη δημιουργία κενών περιοχών κεντρικά του θαλάμου. Δεν αποκλείεται ακόμη, οι κυψελίδες αυτές να δρουν ως φυσικά στοιχεία – παγίδες φυσαλίδων, μην επιτρέποντας να εισέλθουν στο θάλαμο φυσαλίδες μεγαλύτερες από το μεταξύ τους διάκενο (Παράγραφος 5.1.2)

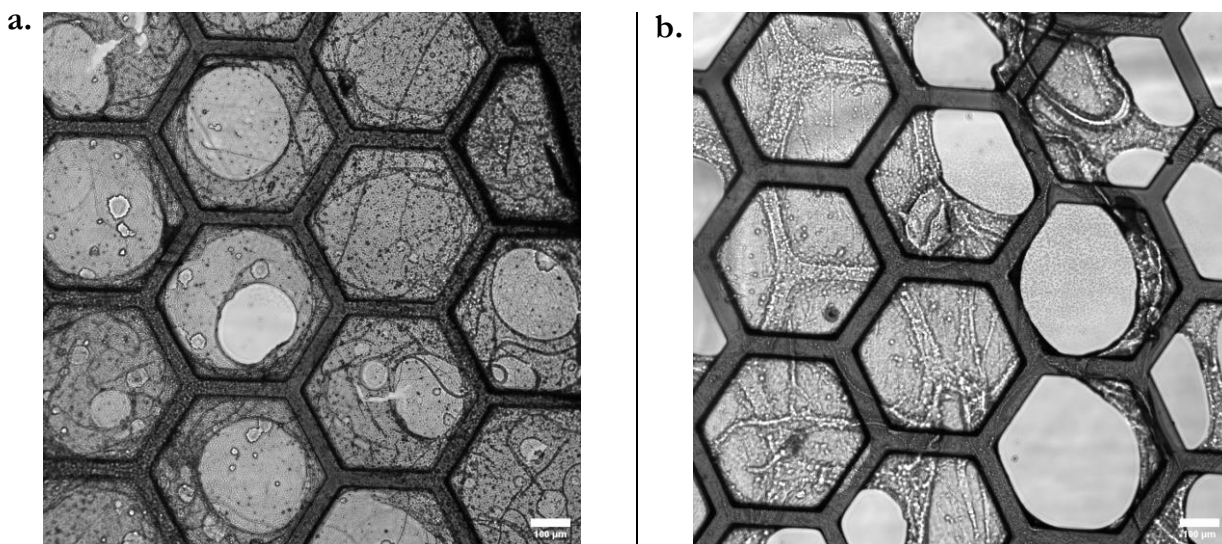
Ας προστεθεί σε αυτά, ο ακριβής σχεδιασμός της εμπορικής διάταξης για την ορθή συνδεσμολογία της, που αποτρέπει τη δημιουργία περιοχών παγίδευσης αέρα και εξασφαλίζει καλή σφράγιση. Πρόκειται για τις ειδικές εσοχές στο άνω επίπεδό του, όπου προσαρμόζονται οι κατάλληλοι Luer προσαρμογείς, συνοδευόμενοι από την ανάλογο μεγέθους σωλήνωση σιλικόνης. Αντιθέτως, στους μικροθαλάμους, εμφανίζονταν προβλήματα διαρροών από την είσοδο και έξοδό τους κατά την απευθείας σύνδεσή τους με τη σωλήνωση, λόγω σχισμών που δημιουργούνταν στο PDMS κατά τη χρήση. Το γεγονός αυτό αντιμετωπίστηκε με επικάλυψη με εποξειδική κόλλα, χωρίς όμως έτσι να εξασφαλίζεται απόλυτα η μη δημιουργία πυρήνων Harvey (δες Παράγραφο 5.1.1).



Σχήμα 5. 28. Απεικόνιση των κυψελίδων στην περιφέρεια του μικροθαλάμου της εμπορικής μικροδιάταξης, που λειτουργούν ως τοπικά φράγματα του μετώπου υγρού, συνεισφέροντας έτσι στην ομοιόμορφη διαβροχή του εσωτερικού του, αλλά και στην παγίδευση φυσαλίδων.

Θα πρέπει να τονιστεί, ότι έγινε προσπάθεια χρήσης της εμπορικής μικροδιάταξης ως μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα, δοκιμάζοντας αρχικά την καλλιέργεια MSCs, όπου ενσωματώθηκε το πλαίσιο κυτταροκαλλιέργειας, ώστε να χρησιμοποιηθούν και οι δύο μικροθάλαμοι της. Είναι χαρακτηριστικό ότι από την 1^η κιόλας χρήση, σημειώθηκε κατάρρευση του πλέγματος ζελατίνης του πλαισίου καλλιέργειας υπό το βάρος του θρεπτικού υλικού, με τα MSCs να διαφεύγουν στον κάτω μικροθάλαμο. Το γεγονός αυτό επαναλήφθηκε και με αντικατάσταση του πλαισίου. Οπτική παρατήρηση του πλαισίου απέδειξε την ύπαρξη οπών κυμαινόμενου μεγέθους από 100 μm έως και 250 μm (Σχήμα 5.29a), οι οποίες μετά τη κατάρρευση διανοίχθηκαν σε μεγέθη μέχρι και περίπου 380 μm (σχεδόν ολόκληρης της κυψέλης) (Σχήμα 5.29b). Αν ληφθεί υπόψη ότι το μέσο μέγεθος των MSCs είναι 10 – 12 μm (κατά την προσκόλλησή τους σε επιφάνεια), συμπεραίνεται ότι μέσω των διανοιγμένων οπών πέρασαν στον κάτω μικροθάλαμο.

Συνεπώς, η συγκεκριμένη εμπορική διάταξη δεν ενδείκνυται για χρήση της ως μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα, και την *in vitro* δημιουργία οργανοειδούς μυελού των οστών. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι συχνά, ακόμη και εμπορικές διατάξεις που προορίζονται για μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα, διαθέτουν κατασκευαστικές αδυναμίες και δεν επιτυγχάνουν να υπηρετήσουν το σκοπό χρήσης τους.



Σχήμα 5. 29. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) του πλαισίου κυτταροκαλλιέργειας PEGDA a) πριν και b) μετά την πραγματοποίηση κυτταροκαλλιέργειας. Διακρίνονται οπές έως και 250 μm, οι οποίες μετά φθάνουν μέχρι και τα 380 μm, αποκαλύπτοντας σχεδόν ολόκληρη την κυψέλη. Η κλίμακα είναι στα 100 μm.

5.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις

Στο κεφάλαιο αυτό, μελετήθηκε το φαινόμενο δημιουργίας φυσαλίδων στα μικρορρευστονικά συστήματα υπό ροή, μιας πρωταρχικής σημασίας ανασταλτικό παράγοντα στην εύρυθμη λειτουργία τους. Η εκδήλωση του φαινομένου είναι μάλιστα πιο έντονη σε εφαρμογές σχετιζόμενες με την καλλιέργεια κυττάρων ή οργανοειδών, όπου απαιτούνται ημέρες ή και εβδομάδες πειράματος, όπως συμβαίνει στις μικροδιατάξεις οργάνων σε ψηφίδα, και συγκεκριμένα, στη μικροδιάταξη μυελού των οστών της εν λόγω διατριβής.

Βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, βασικά αίτια δημιουργίας του φαινομένου είναι ο υπερκορεσμός του υγρού τροφοδοσίας σε αέρια, και η ύπαρξη σημείων πυρήνωσης των φυσαλίδων στο μικρορρευστονικό

σύστημα. Ο υπερκορεσμός προκαλείται από μεταβολές στη θερμοκρασία και την πίεση μεταξύ του φιαλιδίου τροφοδοσίας και της διάταξης, αλλά δεν επαρκεί για το σχηματισμό φυσαλίδων. Προαπαιτείται συγκεκριμένα, η ύπαρξη ετερογενούς κατά κύριο λόγο πυρήνωσης, η οποία συντελείται κατά της αέριας φάσης με κάποια στερεή επιφάνεια. Τέτοιες περιπτώσεις πυρήνωσης αποτελούν συνήθως τα ίδια τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στερεής επιφάνειας, με το σχηματισμό για παράδειγμα γωνιών ή τραχύτητας, η υδροφοβικότητα της διάταξης ή της συνδεσμολογίας, καθώς και η ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών στο εσωτερικό του υγρού. Όπως αναλύθηκε, οι πιο σημαντικοί τρόποι αντιμετώπισης αφορούν στη διαμόρφωση της γεωμετρίας της διάταξης με την ενσωμάτωση φυσικών στοιχείων ομογενοποίησης του μετώπου ροής και την αποφυγή αδιεξόδων, τόσο στη διάταξη όσο και κατά τη σύνδεση των εμπορικών εξαρτημάτων, τη σωστή σφράγιση, την υδροφιλοποίηση του συστήματος, και βέβαια, τον περιορισμό των βαθμίδων θερμοκρασίας και πίεσης. Σε κάθε περίπτωση όμως, ο σχηματισμός φυσαλίδων αποτελεί εγγενές φαινόμενο ενός μικρορευστονικού συστήματος, με την απόλυτη εξάλειψή του να μοιάζει ανέφικτη.

Πραγματοποιήθηκε συνεπώς πειραματική μελέτη του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων σε μικροθαλάμους υπό ροή, κατ' αναλογία του μικροθαλάμου τροφοδοσίας της μικροδιάταξης, ως ένας τρόπος πρακτικής κατανόησής του και αντιμετώπισης. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σφραγισμένοι μικροθάλαμοι (μηδενικής ροής), μικροθάλαμοι υπό χαμηλές ροές (0.04 – 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) και μικροθάλαμοι υπό υψηλότερες ροές (6.7 – 13 $\mu\text{L}/\text{min}$). Οι σφραγισμένοι μικροθάλαμοι παρουσίασαν τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στην είσοδο φυσαλίδας κατά την 3^η – 4^η ώρα, και τη μικρότερη επιφανειακή κάλυψη με φυσαλίδες στους μεγάλους χρόνους (12.5 h). Στις χαμηλές ροές, αποδείχτηκε εξάρτηση του φαινομένου από το μέγεθος της ροής, καθώς, εκτός της έμφυτης δημιουργίας φυσαλίδων, το σύστημα επιβαρύνθηκε με φαινόμενα διαπερατότητας ατμών θρεπτικού υλικού μέσω PDMS λόγω ανεπαρκούς ροής. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε είσοδος φυσαλίδας από τη 2^η ώρα και πλήρες άδειασμα του μικροθαλάμου στις 12.5 h, χωρίς να αποκλείεται να είχαν και τα δύο συμβεί νωρίτερα, καθώς δεν υπήρξε προγενέστερη παρατήρηση. Η ανεπάρκεια των χαμηλών ροών αποδείχθηκε και κατά την απόπειρα καλλιέργειας MSCs συγκέντρωσης 1.4×10^6 cells/mL υπό ροή 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ για 2 ημέρες. Προέκυψε ότι δεν μπορεί πρακτικά να συντηρήσει συνεχή τροφοδοσία σε χρόνους της τάξης των ημερών, προκαλώντας ανάσχεση της ανάπτυξης κυττάρων λόγω της παρουσίας φυσαλίδων από την 1^η ημέρα. Η μετάβαση σε υψηλότερες ροές, ενώ αντιμετώπισε τη διαπερατότητα μέσα από το PDMS, επιβεβαίωσε την άρρηκτη σύνδεση των μικρορευστονικών συστημάτων με τη δημιουργία φυσαλίδων. Εμφανίστηκαν φυσαλίδες ως αποτέλεσμα της λειτουργίας του συστήματος, σημειώνοντας είσοδο φυσαλίδας την 1^η ώρα και γέμισμα θαλάμου με φυσαλίδες τη 16^η.

Για την αντιμετώπιση των εγγενών αιτίων ετερογενούς πυρήνωσης (/δημιουργίας φυσαλίδων) πραγματοποιήθηκαν βελτιωτικές ενέργειες κατά την τροφοδοσία των μικροθαλάμων με υψηλότερες ροές. Συγκεκριμένα, έγινε μονιμοποίηση της υδροφιλοποίησης του μικροθαλάμου, βελτίωση συνδεσμολογίας με κατάλληλους προσαρμογείς και ελάττωση των βαθμίδων θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα να σημειωθεί είσοδος φυσαλίδας τη 2^η ώρα και μόλις 25% κάλυψη του μικροθαλάμου με φυσαλίδες στο τέλος μιας ολόκληρης ημέρας (25 – 26 h). Σε μια προσπάθεια περαιτέρω περιορισμού του φαινομένου, δοκιμάστηκε η ενσωμάτωση εμπορικής παγίδας. Προέκυψε όμως, ότι η δράση της παγίδας είναι ευεργετική μόνο σε μικρούς χρόνους της τάξης των ωρών, καθυστερώντας μεν την είσοδο φυσαλίδας μέχρι την 7^η ώρα, παρουσιάζοντας δε χειρότερη εικόνα σε μεγάλους χρόνους, στο τέλος μιας ημέρας (24 h) με 60% κάλυψη με φυσαλίδες. Δοκιμάστηκε επιπλέον εξαέρωση του θρεπτικού υλικού πριν την τροφοδοσία, η οποία είχε προσωρινή δράση, καθώς αντίστοιχα σε μεγάλους χρόνους δεν περιορίσε το φαινόμενο. Τέλος, μελέτη εμπορικής μικροδιάταξης υπό ροή, εμφάνισε την εξάρτηση της εμφάνισης φυσαλίδων από το ίδιο το υλικό κατασκευής, καθώς το PC έχει χαμηλό συντελεστή διαπερατότητας σε αέρια και είναι περισσότερο υδρόφιλο, σε σχέση με το PDMS των μικροθαλάμων.

Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι πρωταρχικές αιτίες πρόκλησης του φαινομένου στις μικροδιατάξεις PDMS είναι το ίδιο το σύστημα, η διάταξη μαζί με τα χρησιμοποιούμενα εξαρτήματα και τη συνδεσμολογία, και το ίδιο το υλικό PDMS υψηλής διαπερατότητας σε αέρια και υδροφοβικότητας. Σε δεύτερο βαθμό, αιτίες αποτελούν οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης στο φιαλίδιο τροφοδοσίας, όπου εντοπίζεται σημαντικό πλήθος φυσαλίδων.

Συστήνεται έτσι, η διατήρηση όλων των προτεινόμενων βελτιωτικών ενεργειών της Παραγράφου 5.2.2.1 κατά τη λειτουργία των μικροδιατάξεων υπό (υψηλότερη) ροή, οι οποίες περιόρισαν σημαντικά την κάλυψη του θαλάμου με φυσαλίδες, από 100% σε 25% στους μεγάλους χρόνους, σημειώνοντας 75% βελτίωση σε διάρκεια μίας ημέρας. Ως επιπλέον μελλοντικές ενέργειες περιορισμού του φαινομένου, και εξασφάλισης ομαλής λειτουργίας της διατάξης σε χρόνους μεγαλύτερους της μίας ημέρας, προτείνεται αρχικά η παραμονή του φιαλιδίου τροφοδοσίας σε θερμοκρασία 37°C πριν τη χρήση του για περαιτέρω μείωση των βαθμίδων θερμοκρασίας. Ακόμη, συστήνεται η υδροφιλοποίηση του σωληνίσκου της περισταλτικής αντλίας με παραμονή του εντός φιαλιδίου που περιέχει θρεπτικό υλικό για τουλάχιστον 1 h. Κυρίως όμως, συστήνεται επανεξέταση της λειτουργίας της παγίδας, με την εφαρμογή άντλησης στην έξοδό της προς δημιουργία υποπίεσης και διευκόλυνση απομάκρυνσης των φυσαλίδων. Θα πρέπει βέβαια, να χρησιμοποιηθούν/κατασκευαστούν και ταιριαστοί προσαρμογείς στην είσοδο και έξοδό της, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κενών χώρων στη συνδεσμολογία της. Τέλος, οι σωληνίσκοι διασύνδεσης σιλικόνης από το φιαλίδιο τροφοδοσίας προς τη διάταξη θα μπορούσαν να ενισχυθούν με κάποια επίστρωση (όπως για παράδειγμα πλατίνα), που θα περιόριζε τη διαπερατότητα ατμών του θρεπτικού υλικού μέσα από αυτά. Με την εφαρμογή του συνόλου των προαναφερόμενων ενεργειών, είναι πολύ πιθανή η ομαλή λειτουργία μιας μικροδιάταξης υπό ροή στους μεγάλους χρόνους.

Με βάση όμως τις υπάρχουσες συνθήκες και δυνατότητες, και όπως θα παρουσιαστεί στο Κεφάλαιο 7, η παρουσία φυσαλίδων στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης μυελού των οστών, επηρεάζει σε βάθος ημερών την ανάπτυξη των κυττάρων στο μικροθάλαμο καλλιέργειας. Κι αυτό γιατί, ακόμη και αν η ροή τροφοδοσίας δεν επηρεαστεί από την παρουσία φυσαλίδων, περιορίζεται η διάχυση θρεπτικού υλικού προς το μικροθάλαμο καλλιέργειας από τις περιοχές του μικροθαλάμου τροφοδοσίας που καλύπτονται με φυσαλίδες. Επιπλέον, είναι πιθανή η εμφάνιση φυσαλίδων και στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, είτε λόγω επικοινωνίας με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, είτε κατά τη διάρκεια πειραματικών χειρισμών. Έτσι, και δεδομένου ότι η παρουσία έστω και λίγων φυσαλίδων είναι επιζήμια για την επιβίωση των κυττάρων, θεωρήθηκε σε αυτό το στάδιο περισσότερο ασφαλής η μετάβαση σε μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας, όπως θα αναλυθεί στο Κεφάλαιο 7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟΥΣ ΤΡΕΙΣ ΜΙΚΡΟΘΑΛΑΜΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Το κεφάλαιο αυτό εστιάζει στη γεωμετρία μιας μικροδιάταξης που θα περιλαμβάνει τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας, στα πλαίσια των μελλοντικών προτάσεων της εν λόγω διατριβής. Πραγματοποιείται μια απόπειρα αναλυτικού προσδιορισμού της γεωμετρίας της, ώστε να εξασφαλίζεται ισοδύναμη πλήρωση των μικροθαλάμων της με το σχεδιασμό άνισου μήκους μικροκαναλιών που οδηγούν σε αυτούς. Συνοδευτικά, πραγματοποιείται προσομοίωση της πίεσης και της ταχύτητας ροής του υγρού σε μόνιμη κατάσταση, η οποία δίνει ικανοποιητική κάλυψη των απαιτήσεων για ισοδύναμη λειτουργία των 3 μικροθαλάμων, ενώ διευκολύνει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης διαφοράς ύψους στον προθάλαμο σε σχέση με τα μικροκανάλια για την εξασφάλιση βελτιωμένης λειτουργίας της μικροδιάταξης.

Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται μια προκαταρκτική μελέτη για την ενσωμάτωση τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας στην ίδια πλατφόρμα, με στόχο την παραλληλοποίηση των πειραμάτων και τη συγκριτική καλλιέργεια οργανοειδών μυελού των οστών που αναπτύσσονται ταυτόχρονα στην πλατφόρμα αυτή. Παρουσιάζεται η αρχικά υλοποιημένη πειραματική διάταξη χωρίς λεπτομερή σχεδιασμό. Δοκιμή διαβροχής των μικροθαλάμων τροφοδοσίας οδήγησε σε ανάγκη ακριβούς σχεδιασμού της γεωμετρίας τους, ώστε να υπακούει στους κανόνες πτώσης πίεσης. Με αναλυτική προσέγγιση ορίστηκαν άνισα μήκη μικροκαναλιών εισόδου προς τους μικροθαλάμους, ενώ ακολούθησε προσομοίωση της πίεσης και ταχύτητας του υγρού προς έλεγχο των συγκεκριμένων τροποποιήσεων.

6.1 Αρχικά προταθείσα γεωμετρία μικροδιάταξης τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας

Η προτεινόμενη διάταξη περιλαμβάνει τρία επίπεδα, με το ανώτερο να φιλοξενεί ένα κοινό προθάλαμο θρεπτικού υλικού, ο οποίος διαχωρίζεται σε τρία ξεχωριστά κανάλια, καταλήγοντα σε μικροθαλάμους τροφοδοσίας, ευθυγραμμισμένους με τους μικροθαλάμους καλλιέργειας του κατώτερου επιπέδου. Η επικοινωνία μεταξύ των δύο επιπέδων πραγματοποιείται μέσω παρεμβαλλόμενων πορώδων μεμβρανών. Η διάταξη σφραγίζεται από κάτω με γυαλί μικροσκοπίου, από όπου γίνεται και η παρατήρηση των κυττάρων. Η ροϊκή διασύνδεση της διάταξης με το περιβάλλον πραγματοποιείται από το ανώτερο επίπεδο τροφοδοσίας μέσω τεσσάρων κατάλληλα διανοιγμένων οπών, για την προσαρμογή διασυνδέσεων ανά δύο αντιστοιχίζουσες σε κάθε επίπεδο μικροθαλάμων. Οι διαστάσεις των μικροθαλάμων καλλιέργειας και τροφοδοσίας διατηρήθηκαν στις τιμές των αρχικά προτεινόμενων για τη μικροδιάταξη, δηλαδή (διάμετρος x ύψος) 9 mm x 0.2 mm και 11 mm x 0.3 mm και όγκος περίπου 13 μL και 29 μL για κάθε μικροθάλαμο καλλιέργειας και τροφοδοσίας, αντίστοιχα.

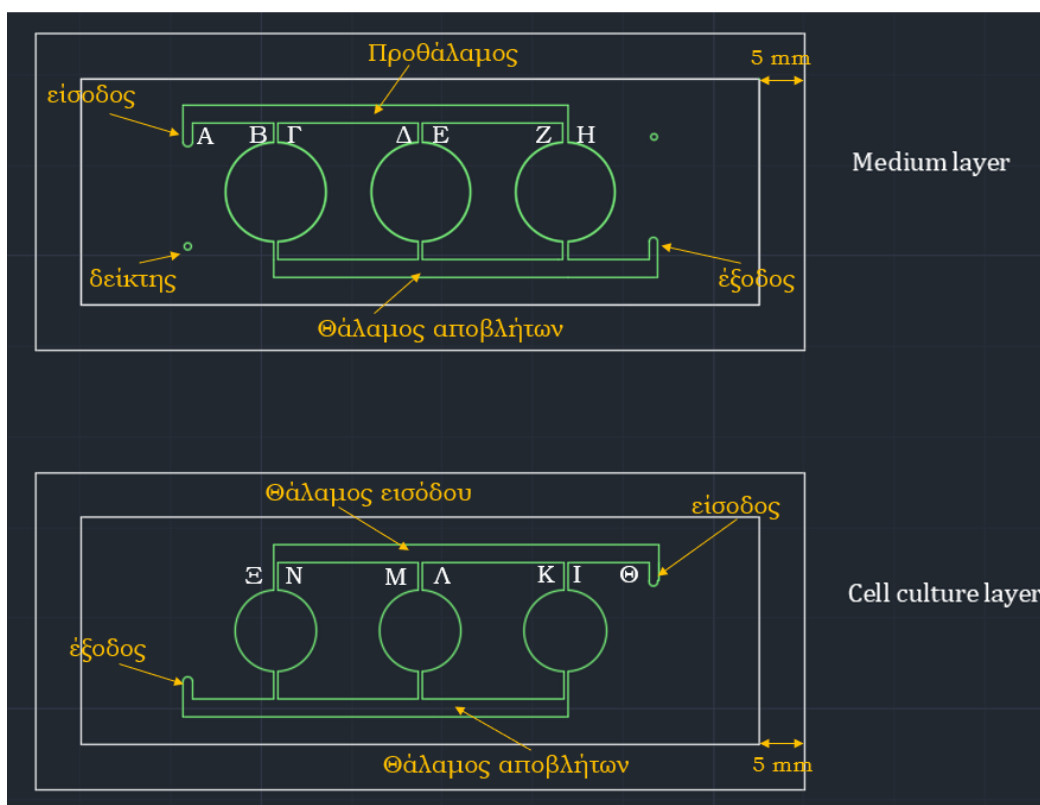
6.1.1 Σχεδιασμός και κατασκευή εκμαγείων των θαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας της μικροδιάταξης

Αρχικά σχεδιάστηκαν τα εκμαγεία των επιπέδων τροφοδοσίας και καλλιέργειας, στο λογισμικό σχεδίασης AutoCAD. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το Σχήμα 6.1, όπου παρουσιάζεται το 2D σχέδιο CAD των δύο

επιπέδων, διακρίνεται αρχικά η συνολική σχεδιαστική επιφάνεια κάθε επιπέδου, που είναι 75 mm x 25 mm (συμβατή με την επιφάνεια γυαλιού μικροσκοπίου), και η οποία περιοριζόμενη από ένα παραλληλόγραμμο πλαίσιο πλάτους 5 mm, καταλήγει να είναι 65 mm x 15 mm.

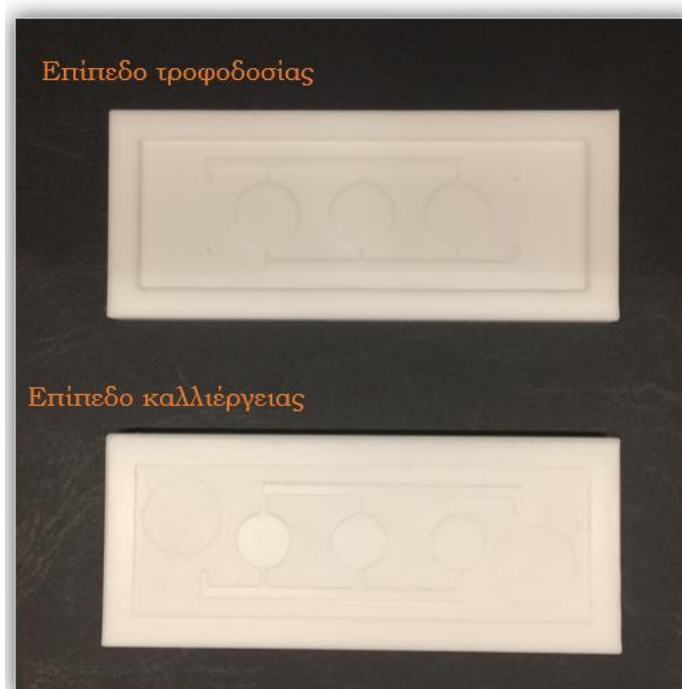
Στο επίπεδο τροφοδοσίας, εκτός του κοινού προθάλαμου, υπάρχει και ο κοινός θάλαμος αποβλήτων, με τον κάθε θάλαμο να διαθέτει τα δικά του μικροκανάλια εισόδου και εξόδου. Ο προθάλαμος είναι διαστάσεων 42.5 mm x 2 mm και τα επιμέρους μικροκανάλια πλάτους (ΒΓ) = (ΔΕ) = (ΖΗ) = 0.5 mm και μήκους 2.01 mm. Τα ευθύγραμμα τμήματα που σημειώνονται στο Σχήμα 6.1 διαθέτουν μήκη: (ΑΒ) = 9 mm, (ΓΔ) = (ΕΖ) = 15.5 mm. Λόγω της αντικατοπτρικής συμμετρίας που εμφανίζει το επίπεδο ως προς τον άξονα x, οι διαστάσεις για τα μικροκανάλια και θάλαμο αποβλήτων είναι οι ίδιες με εκείνες του θαλάμου τροφοδοσίας και των μικροκαναλιών του. Επιπλέον, διακρίνονται δύο οπές-δείκτες διαμέτρου 0.7 mm, που συμπέφτουν με τα μικροκανάλια εισόδου και εξόδου του επιπέδου καλλιέργειας, προς δυνατότητα πρόσβασης στους μικροθαλάμους καλλιέργειας. Οι κοινόι θάλαμοι με τα μικροκανάλια τους, καθώς και οι μικροθάλαμοι, όταν κατασκευαστούν θα προεξέχουν κατά 0.3 mm, ενώ το παραλληλόγραμμο πλαίσιο και οι οπές-δείκτες κατά 1 mm.

Στο επίπεδο καλλιέργειας, εντοπίζονται κοινός θάλαμος εισόδου και αποβλήτων για όλους τους μικροθαλάμους μαζί με τα αντίστοιχα μικροκανάλια τους. Λόγω επίσης αντικατοπτρικής συμμετρίας ως προς τον άξονα x, οι θάλαμοι είναι κοινών διαστάσεων 42.5 mm x 2 mm και τα αντίστοιχα μικροκανάλια τους πλάτους (ΙΚ) = (ΛΜ) = (ΝΞ) = 0.5 mm και μήκους 3 mm. Κατ'αντιστοιχία με το επίπεδο τροφοδοσίας, τα ευθύγραμμα τμήματα του επιπέδου καλλιέργειας, όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 6.1, διαθέτουν μήκη: (ΘΙ) = 9 mm, και (ΚΛ) = (ΜΝ) = 15.5 mm. Το σύνολο των καναλιών, μικροκαναλιών, μικροθαλάμων καλλιέργειας, καθώς και το παραλληλόγραμμο πλαίσιο όταν υλοποιηθούν θα εξέχουν κατά 0.2 mm. Τέλος, τα μικροκανάλια εισόδου και εξόδου κάθε επιπέδου είναι πλάτους 1 mm.



Σχήμα 6. 1. 2D σχέδιο CAD των επιπέδων τροφοδοσίας (πάνω) και καλλιέργειας (κάτω) της προτεινόμενης μικροδιάταξης με τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας.

Η υλοποίηση των εκμαγείων των επιπέδων τροφοδοσίας και καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική (CNC), κάνοντας χρήση των σχεδίων CAD των δύο επιπέδων (Σχήμα 6.1). Τα εκμαγεία κατασκευάστηκαν σε υπόστρωμα Teflon, και απεικονίζονται στο Σχήμα 6.2. Στη συνέχεια, με χρήση λιθογραφίας χαλαρής ύλης (soft lithography) κατασκευάστηκαν τα επίπεδα PDMS τροφοδοσίας και καλλιέργειας, με αναλογία όγκου 10:1 (βάση:διασταυρωτής), τα οποία έφεραν διαμορφωμένες τις συμπληρωματικές δομές των αντίστοιχων εκμαγείων τους.



Σχήμα 6. 2. Φωτογραφία εκμαγείων επιπέδου τροφοδοσίας και καλλιέργειας της προτεινόμενης μικροδιάταξης με τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας σε υπόστρωμα Teflon.

6.1.2 Αξιολόγηση λειτουργίας της μικροδιάταξης

Τα επίπεδα PDMS δοκιμάστηκαν ως προς τη συγκολλητική τους ικανότητα, καθώς και ως προς τη δυνατότητα πλήρωσης των σχηματιζόμενων μικρορευστονικών δομών τους κατά τη δημιουργία κλειστού κυκλώματος ροής.

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα PDMS τροφοδοσίας και καλλιέργειας συγκολλήθηκαν πλήρως τόσο με επίπεδα υποστρώματα PDMS, όσο και με το γυαλί, μετά την έκθεση αμφοτέρων σε πλάσμα αέρα (Covance multi-system) στις συνθήκες συνθήκες (ισχύς 100 W, πίεση 8.27×10^{-1} Torr μετά την εισαγωγή αερίου, ροή αέρα 50

sccm, χρόνος 1 min). Το γεγονός αυτό μάς υποδεικνύει ότι η τραχύτητα των εκμαγείων Teflon δεν επηρεάζει τη συγκολλητική ικανότητα των προκύπτοντων επιπέδων PDMS.

Στη συνέχεια, το επίπεδο τροφοδοσίας PDMS συγκολλήθηκε με επίπεδο υπόστρωμα PDMS και επιχειρήθηκε η πλήρωσή του με απιονισμένο νερό. Παρατηρήθηκε ανομοιόμορφη πλήρωση με μερικά πλήρη τον 1^ο μικροθάλαμο και την έξοδο προς το θάλαμο αποβλήτων, και από εκεί μερικώς στον 3^ο μικροθάλαμο. Χωρίς να αποκλείεται κάποιο τυχαίο κατασκευαστικό σφάλμα στη διάταξη που οδήγησε σε ανομοιόμορφη πλήρωση, είναι εμφανές ότι απαιτείται λεπτομερής σχεδιασμός της γεωμετρίας του μικρορρευστονικού ώστε να διασφαλιστεί η πλήρωση και των 3 μικροθαλάμων και η ισοδύναμη λειτουργία τους.

6.2 Αναλυτικά σχεδιασμένη γεωμετρία μικροδιάταξης τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας βάσει κανόνων πτώσης πίεσης

Η αδυναμία πλήρωσης των μικροθαλάμων του επιπέδου τροφοδοσίας υπαγορεύει ακριβή προσδιορισμό της γεωμετρίας του. Ως γνωστόν, η ροή ενός υγρού μέσα σε ένα σωλήνα δέχεται αντιστάσεις λόγω τριβής στο εσωτερικό του σωλήνα, οφειλόμενες σε διατμητικές τάσεις λόγω ιξώδους του υγρού, καθώς και σε αναταράξεις λόγω της τραχύτητας των εσωτερικών τοιχωμάτων του σωλήνα. Η τριβή αυτή οδηγεί σε απώλειες ενέργειας του μετώπου ροής, που εκφράζονται ως απώλειες μετώπου ρευστού ή απώλειες πίεσης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση αυτών των απωλειών είναι κυρίως το ιξώδες του ρευστού, η διάμετρος του σωλήνα και η τραχύτητα των εσωτερικών τοιχωμάτων του, το μήκος της διανυόμενης απόστασης, και τέλος, οι υψομετρικές μεταβολές κατά τη διαδρομή του ρευστού.

Βάσει αυτών, η νέα γεωμετρία θα πρέπει να οριστεί, λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις απώλειες ενέργειας στο σχηματιζόμενο μικρορρευστονικό σύστημα. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις:

α) Σε κάθε διασταύρωση ροής, θα πρέπει να εξασφαλίζεται πρώτα προτίμηση πλήρωσης του προθαλάμου πριν από τον αντίστοιχο μικροθάλαμο. Στην οριακή περίπτωση θα πρέπει να σημειώνεται ίση πτώση πίεσης στον προθάλαμο για την πλήρωση με υγρό με εκείνη στο μικροκανάλι εισόδου στο μικροθάλαμο.

β) Το υγρό να εμφανίζει ίση ογκομετρική ροή σε όλους τους μικροθαλάμους, ώστε να λειτουργούν ισοδύναμα οι 3 μικροθάλαμοι, το οποίο σημαίνει ότι στα σημεία εισόδου και εξόδου των μικροκαναλιών των μικροθαλάμων θα πρέπει να είναι ίση η πτώση πίεσης.

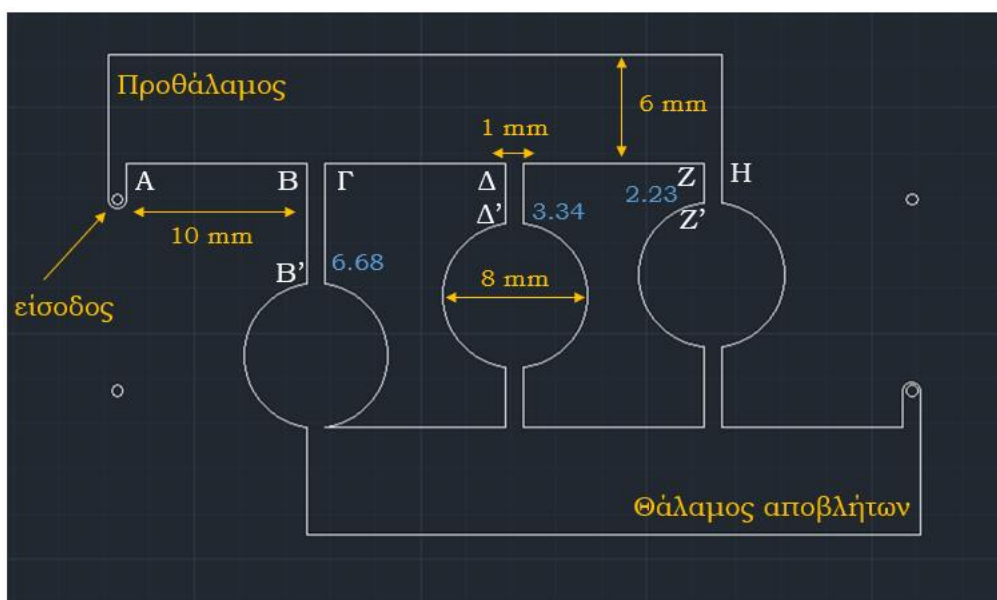
Στις παρακάτω ενότητες εστιάζουμε στο επίπεδο τροφοδοσίας, λόγω του ίδιου σχεδίου των δύο επιπέδων, οπότε οι προϋποθέσεις αυτές θα εφαρμόζονται αντίστοιχα και στο μικρορρευστονικό σύστημα του επιπέδου καλλιέργειας. Επιπλέον, το μικρορρευστονικό δίκτυο τροφοδοσίας θα λειτουργεί συνεχώς κατά την ανάπτυξη του οργάνου, επομένως πρακτικά είναι πιο σημαντική η καλή λειτουργία του, δηλ. η ισοδύναμη λειτουργία των 3 μικροθαλάμων.

Η εξίσωση Darcy–Weisbach είναι μια εμπειρική εξίσωση της ρευστοδυναμικής, η οποία υπολογίζει τις απώλειες μετώπου ρευστού ή αλλιώς απώλειες πίεσης, που προκαλούνται από την τριβή [1]. Ονομάστηκε από τους Henry Darcy και Julius Weisbach που συνέβαλαν στον ορισμό της, και προκύπτει από τη σχέση:

$$\Delta P = f \cdot \rho \cdot \frac{L}{D} \cdot \frac{u^2}{2} \quad (1)$$

όπου ΔP είναι οι απώλειες πίεσης, f ο συντελεστής τριβής Darcy, που είναι ένας αδιάστατος παράγοντας τριβής εξαρτώμενος από τον αριθμό Reynolds και τη σχετική τραχύτητα του σωλήνα, ρ η πυκνότητα του υγρού, L το μήκος του σωλήνα, D η διάμετρος του, και u η ταχύτητα της ροής [1].

Για να πληρούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις (α) και (β), το σχέδιο του επιπέδου τροφοδοσίας διαμορφώθηκε όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 6.3, με αναγραφόμενες τις τιμές όλων των διαστάσεων που προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις προϋποθέσεις (α) και (β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε σχέση με την αρχική γεωμετρία, η διάμετρος του κάθε μικροθαλάμου μειώθηκε στα 8 mm (από τα 11 mm). Με αυτό τον τρόπο, δίνεται περιθώριο αύξησης του πλάτους του προθαλάμου στα 6 mm (από τα 2 mm), γεγονός το οποίο επιλέχθηκε με τη λογική της μείωσης της αντίστασης στον προθάλαμο, στα πλαίσια πλήρωσης της προϋπόθεσης (α). Επιπλέον, δεδομένου ότι χρειάζεται να εξασφαλιστεί ελάχιστη απόσταση 2 mm ανάμεσα στους μικροθαλάμους (διάμετρου 8 mm, για καλή σφράγιση), η ελάχιστη τιμή των μεσοδιαστημάτων μεταξύ των εισόδων μικροθαλάμων ορίστηκε $L_{AB} = L_{\Gamma\Delta} = L_{EZ} = 10$ mm.



Σχήμα 6. 3. 2D σχέδιο CAD του επιπέδου τροφοδοσίας, τροποποιημένου γεωμετρικά ώστε να εξασφαλίζεται α) προτίμηση πλήρωσης του προθαλάμου αντί των μικροθαλάμων, και β) ίση ογκομετρική ροή και στους 3 μικροθαλάμους. Όλες οι αναγραφόμενες διαστάσεις είναι σε mm.

Ξεκινώντας, η εφαρμογή της εξίσωσης (1) για την ικανοποίηση των οριζόμενων προϋποθέσεων πραγματοποιήθηκε θεωρώντας τις διαμέτρους των μικροκαναλιών πριν τους μικροθαλάμους ίσες μεταξύ τους, δηλαδή $D_{B\Gamma} = D_{\Delta E} = D_{ZH} = 1$ mm, και μεταβάλλοντας μόνο τα μήκη τους $L_{B\Gamma}$, $L_{\Delta\Delta'}$ και $L_{ZZ'}$.

Έτσι, για την προϋπόθεση (α), αν λάβουμε υπόψη μας ότι στη θέση Δ έχουμε διπλάσια πτώση πίεσης σε σχέση με τη θέση B, και αντίστοιχα στη θέση Z τριπλάσια, για να προτιμάται πλήρωση του προθαλάμου αντί του μικροκαναλιού εισόδου στους μικροθαλάμους, θα πρέπει να ισχύει:

$$\Delta P_{\Delta\Delta'} = \frac{1}{2} \Delta P_{BB'} \Rightarrow \frac{L_{\Delta\Delta'}}{D_{\Delta E}} = \frac{1}{2} \frac{L_{BB'}}{D_{B\Gamma}} \xrightarrow{D_{B\Gamma} = D_{\Delta E} = 1 \text{ mm}} L_{\Delta\Delta'} = \frac{1}{2} L_{BB'} \quad (2) \quad \text{και}$$

$$\Delta P_{ZZ'} = \frac{1}{3} \Delta P_{BB'} \Rightarrow \frac{L_{ZZ'}}{D_{ZH}} = \frac{1}{3} \frac{L_{BB'}}{D_{B\Gamma}} \xrightarrow{D_{B\Gamma} = D_{ZH} = 1 \text{ mm}} L_{ZZ'} = \frac{1}{3} L_{BB'} \quad (3)$$

Συνεχίζοντας, για να ικανοποιείται η προϋπόθεση (α) στη θέση Δ, δηλαδή το υγρό όταν φθάνει στη συγκεκριμένη διασταύρωση να έχει τουλάχιστον ίση πτώση πίεσης στον προθάλαμο και το μικροκανάλι ΔΔ', θα πρέπει να ισχύει:

$$\Delta P_{\Delta Z} \leq \Delta P_{\Delta\Delta'} \Rightarrow Q \frac{L_{\Delta Z}}{D_{\Delta Z}} \leq Q \frac{L_{\Delta\Delta'}}{2D_{\Delta E}} \quad (4), \text{ όπου } Q \text{ είναι η αρχική ογκομετρική παροχή}$$

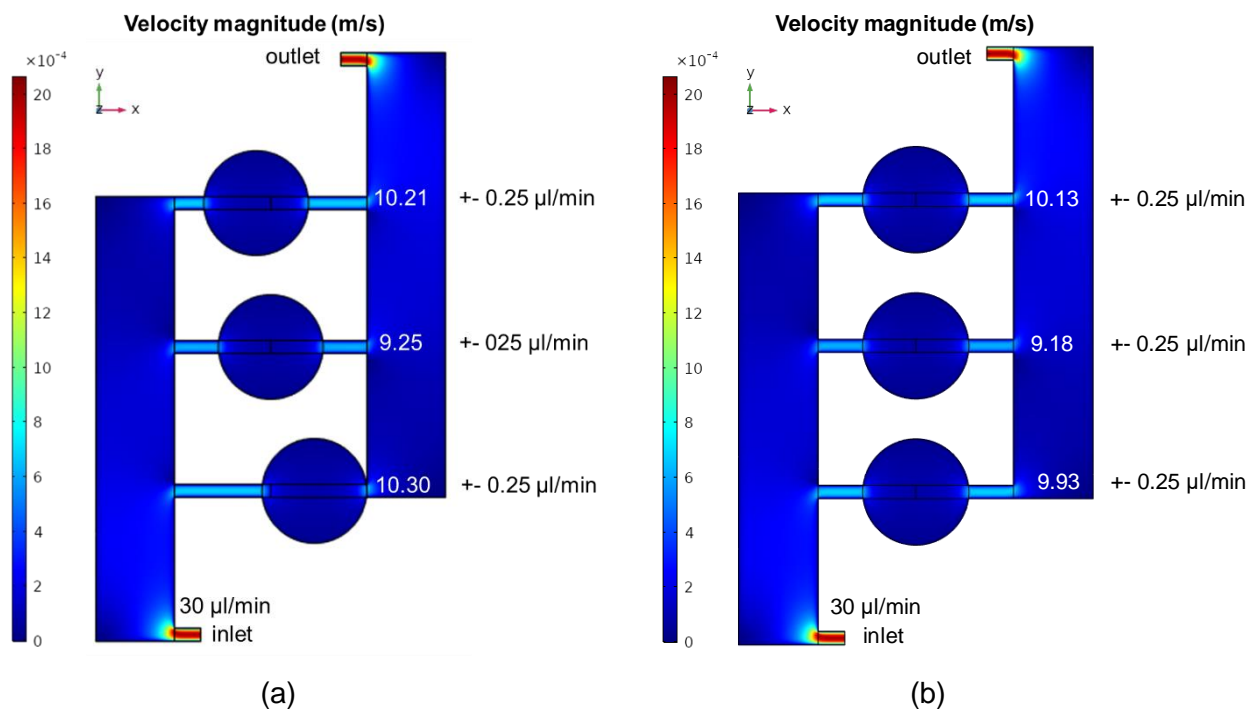
$$\text{Έτσι, (4)} \Rightarrow L_{\Delta\Delta'} \geq 2 \frac{L_{\Delta Z} \cdot D_{\Delta E}}{D_{\Delta Z}} \xrightarrow{L_{\Delta Z}=10 \text{ mm}, D_{\Delta Z}=6 \text{ mm}}$$

$$L_{\Delta\Delta'} \geq 3.34 \text{ mm} \xrightarrow{\text{οριακή συνθήκη}} L_{\Delta\Delta'} = 3.34 \text{ mm} \quad (5)$$

Έτσι, μέσω της σχέσης (5), από τη σχέση (2) προκύπτει $L_{BB'} = 6.68 \text{ mm}$, και ακολούθως, από τη σχέση (3) έχουμε $L_{ZZ'} = 2.23 \text{ mm}$. Καθίσταται εμφανές ότι καθώς αυξάνεται το διανυόμενο μήκος του μετώπου ρευστού, πρέπει να μειωθεί το μήκος των μικροκαναλιών ώστε να ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις (α) και (β).

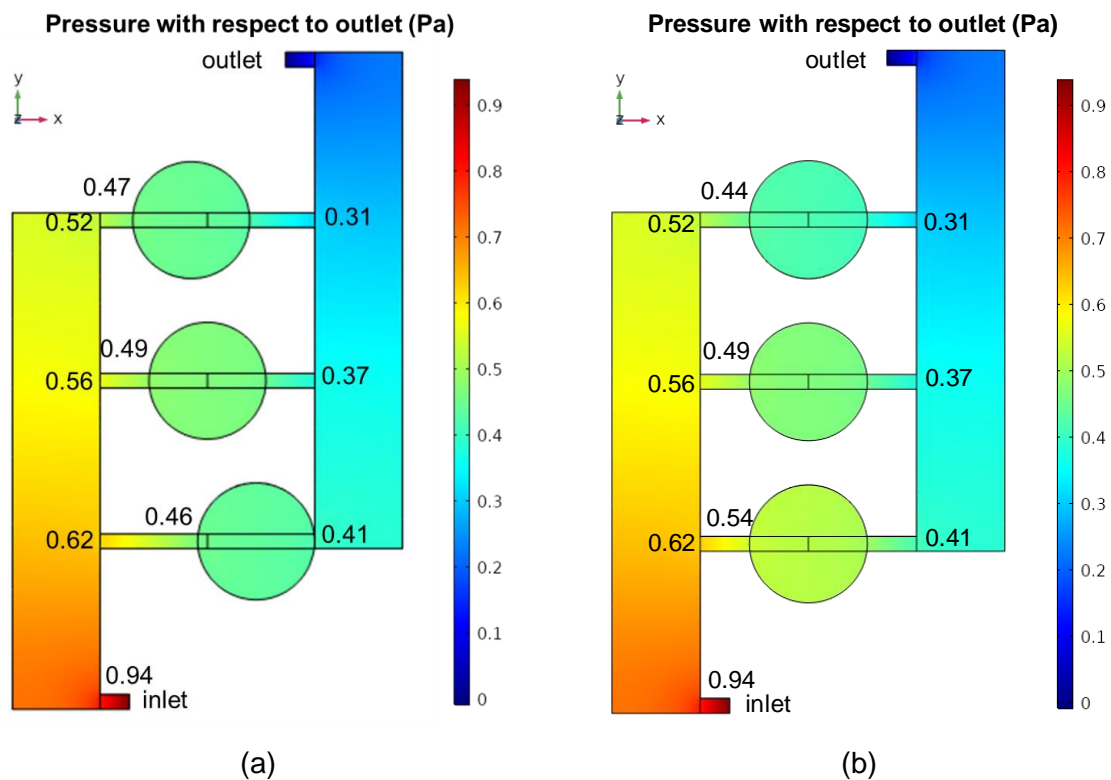
Πριν την υλοποίηση του εικμαγείου του επιπέδου τροφοδοσίας, κρίθηκε απαραίτητη η προσομοίωση της ταχύτητας και της πίεσης του υγρού σε σχέση με την έξοδο του μικροκυκλώματος. Με αυτό τον τρόπο, προσομοιώνεται η ροή στο μικροκύκλωμα, και διερευνάται κατά πόσο οι εφαρμοζόμενες συνθήκες (α) και (β) εξασφάλισαν πλήρη και ομοιόμορφη πλήρωση. Προς σύγκριση, προσομοιώνεται παράλληλα η ίδια γεωμετρία, με τη μόνη διαφορά ότι τα μήκη των μικροκαναλιών είναι μεταξύ τους ίσα, δηλαδή $L_{BB'} = L_{\Delta\Delta'} = L_{ZZ'} = 3.34 \text{ mm}$. Ακόμη, και στα δύο σχέδια, το βάθος του συνόλου των θαλάμων, μικροθαλάμων και μικροκαναλιών είναι ίδιο και ίσο με 0.5 mm. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Γεώργιο Κόκκορη, Αναπληρωτή Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., με χρήση του λογισμικού COMSOL Multiphysics 5.5.

Στα Σχήματα 6.4 και 6.5 παρατίθενται για τις γεωμετρίες με (a) άνισα και (b) ίσα μήκη μικροκαναλιών, τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της ταχύτητας και της πτώσης πίεσης, αντίστοιχα, σε σχέση με την έξοδο, στο μέσο του βάθους του μικροκυκλώματος τροφοδοσίας, και για ογκομετρική παροχή στην είσοδο ίση με 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Τα αποτελέσματα αφορούν σε μόνιμη κατάσταση, αφού το υγρό έχει πληρώσει ολόκληρο το μικροκύκλωμα. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι για το επίπεδο καλλιέργειας είναι σημαντική κυρίως η πλήρωση, όχι η λειτουργία σε μόνιμη κατάσταση, δεδομένου ότι δεν έχουμε ροή παρά μόνο μέχρι την τοποθέτηση των κυττάρων στους μικροθαλάμους.



Σχήμα 6. 4. Προσομοίωση ταχύτητας (ογκομετρικής ροής) για το επίπεδο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης με τους τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας για α) την τροποποιημένη γεωμετρία με άνισα μήκη μικροκαναλιών και β) ίσα μήκη μικροκαναλιών, σε μόνιμη κατάσταση και σε μέσο βάθος. Προκύπτουν παραπλήσιες ροές εξόδου, προσεγγιστικά στο 1/3 της ροής εισόδου και στις δύο γεωμετρίες.

Από την προσομοίωση της ταχύτητας ροής, υπολογίζεται επίσης η ογκομετρική ροή στα σημεία ενδιαφέροντος των τριπλών θαλάμων. Ως προς την ογκομετρική ροή, παρατηρούμε ότι τα άνισα μήκη των μικροκαναλιών πριν τους μικροθαλάμους δε διαφοροποιούν τις ογκομετρικές ροές εξόδου των μικροκαναλιών μετά την πλήρωση των αντίστοιχων μικροθαλάμων, με αποτέλεσμα να είναι ίσες και στις δύο γεωμετρίες. Επίσης, οι ογκομετρικές ροές εξόδου από κάθε μικροκανάλι είναι μεταξύ τους παρεμφερείς (μέσα στο σφάλμα των υπολογισμών $\pm 0.25 \mu\text{L}/\text{min}$), κοντά στο 1/3 της ροής τροφοδοσίας, δηλαδή στα 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, όπως ήταν αναμενόμενο. Τέλος, και στις δύο γεωμετρίες, παρατηρείται ότι η ταχύτητα στα μικροκανάλια είναι μεγαλύτερη από εκείνη του προθαλάμου, γεγονός αναμενόμενο λόγω μικρότερου πλάτους των μικροκαναλιών. Σε κάθε περίπτωση, επειδή το σύστημα μελετάται σε μόνιμη κατάσταση, καλύτερη εικόνα της αρχικής κατάστασης πλήρωσης μάς δίνει η προσομοίωση της πίεσης.



Σχήμα 6. 5. Αποτελέσματα προσομοίωσης πίεσης για το επίπεδο τροφοδοσίας της μικροδιάταξης των τριών μικροθαλάμων καλλιέργειας για a) την τροποποιημένη γεωμετρία με άνισα μήκη μικροκαναλιών και b) ίσα μήκη μικροκαναλιών, σε μόνιμη κατάσταση και σε μέσο βάθος. Στη γεωμετρία άνισων μηκών μικροκαναλιών εξασφαλίζεται προτίμηση πλήρωσης του προθαλάμου πριν από τα μικροκανάλια που οδηγούν στους μικροθαλάμους, καθώς και παραπλήσιες απώλειες πίεσης μεταξύ εισόδων και εξόδων των μικροθαλάμων.

Παρατηρώντας λοιπόν τη προσομοίωση της πίεσης στις δύο γεωμετρίες, φαίνεται αρχικά ότι εμφανίζουν ίδιες πτώσεις πίεσης στην έξοδο των μικροκαναλιών. Αυτό ήταν επίσης αναμενόμενο, καθώς τα άνισα μήκη των μικροκαναλιών πριν και μετά τους μικροθαλάμους στην 1^η γεωμετρία, δεν επηρεάζουν τις τελικές πιέσεις εξόδου, καθώς και στις δύο γεωμετρίες, οι συνολικές διανυόμενες αποστάσεις κάθε μικροκαναλιού είναι ίσες. Επιπλέον, στη γεωμετρία άνισων μικροκαναλιών (a), η πτώση πίεσης καθ'όλο το μήκος του προθαλάμου είναι μικρότερη σε σχέση με την πτώση πίεσης σε καθένα από τα μικροκανάλια εισόδου στους μικροθαλάμους, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο προτίμηση ροής του υγρού στον προθάλαμο πριν να κινηθεί προς τους μικροθαλάμους, προς ικανοποίηση με αυτό τον τρόπο της συνθήκης (α). Στον αντίποδα, στη γεωμετρία ίσων καναλιών (b), ήδη στο 1^ο μικροκανάλι εισόδου σημειώνεται μικρότερη πτώση πίεσης σε σχέση με την αντίστοιχη του προθαλάμου στο 2^ο σημείο διασταύρωσης, υποδεικνύοντας προτίμηση πλήρωσης πρώτα του 1^{ου} μικροκαναλιού αντί του προθαλάμου, αναιρώντας τη συνθήκη (α). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με την πειραματικά παρατηρούμενη συμπεριφορά πλήρωσης του μικρορευστονικού κυκλώματος του επιπέδου τροφοδοσίας (βλ. Παρ. 6.1.2), όπου αρχικά πληρώθηκε μερικώς το 1^ο μικροκανάλι αντί του προθαλάμου. Στην υλοποίηση που προηγήθηκε του σχεδιασμού, η χρήση μικρότερου πλάτους προθαλάμου επιδείνωσε περαιτέρω το αποτέλεσμα.

Στη γεωμετρία άνισων μηκών επίσης, εξασφαλίζονται ελαφρά μικρότερες απώλειες πίεσης λίγο πριν τις εισόδους των μικροθαλάμων ($0.62-0.56 \text{ Pa} < 0.62-0.46 \text{ Pa}$ για το 1^ο μικροθάλαμο, κ.ο.κ. για τους υπόλοιπους), γεγονός που δηλώνει πως δεν υπάρχει προτίμηση ροής σε κάποια από τις τρεις εισόδους

μικροθαλάμων πριν την πλήρωση του προθαλάμου, ικανοποιώντας έτσι τη συνθήκη (α). Όσον αφορά τις απώλειες πίεσης ανάμεσα στις εισόδους και εξόδους των μικροθαλάμων ($0.62-0.41 \sim 0.56-0.37 \sim 0.52-0.31$), αυτές είναι ίσες με μικρές μεταξύ τους αποκλίσεις (της τάξης 0.02 Pa), ικανοποιώντας έτσι τη συνθήκη (β) για ισοδύναμη λειτουργία των τριών μικροθαλάμων.

6.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις

Στο κεφάλαιο αυτό, προτάθηκε η αρχιτεκτονική και λογική λειτουργίας μιας μικροδιάταξης αποτελούμενης από τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας, προς συγκριτική πειραματική μελέτη των αποτελεσμάτων που παράγονται ταυτόχρονα στους 3 μικροθαλάμους καλλιέργειας και επιτάχυνση των πειραματικών διαδικασιών. Η αρχιτεκτονική περιλαμβάνει ένα κοινό προθάλαμο θρεπτικού υλικού στο άνω επίπεδο, διαχωριζόμενο σε τρεις ξεχωριστούς μικροθαλάμους τροφοδοσίας των μικροθαλάμων καλλιέργειας του κατώτερου επιπέδου, που θα τροφοδοτούνται μέσω παρεμβλλόμενων πορώδων μεμβρανών.

Η υλοποίηση των μικροθαλάμων τροφοδοσίας και καλλιέργειας και η μετέπειτα δοκιμή πλήρωσης, που αποδείχτηκε ανομοιόμορφη, οδήγησε στην ανάγκη λεπτομερούς σχεδιασμού της γεωμετρίας του μικρορευστονικού δικτύου. Στα πλαίσια αυτού, ορίζονται ορισμένες συνθήκες ομοιόμορφης πλήρωσης των μικρορευστονικών δικτύων καλλιέργειας και τροφοδοσίας, οι οποίες είναι κοινές λόγω ίδιου σχεδίου. Συγκεκριμένα, επιχειρείται αρχικά, εξασφάλιση πτώσης πίεσης στα μικροκανάλια πριν από τους μικροθαλάμους μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη για την πλήρωση με υγρό καθ' όλο το μήκος του προθαλάμου, ώστε να προτιμηθεί η πλήρωσή του πριν τα μικροκανάλια. Εκτός αυτού, στοχεύεται ίση πτώση πίεσης και μεταξύ των τριών μικροκαναλιών, ώστε να λειτουργούν ισοδύναμα. Με βάση αυτές τις δύο συνθήκες, πραγματοποιήθηκε αναλυτική σχεδίαση νέας γεωμετρίας του μικρορευστονικού δικτύου με άνιση μήκη μικροκαναλιών εισόδου στους μικροθαλάμους.

Στηριζόμενοι στη γεωμετρία αυτή, ακολούθησε προσομοίωση της ογκομετρικής ροής και της πίεσης σε σχέση με την έξοδο του μικροκυκλώματος τροφοδοσίας για υγρό σε μόνιμη κατάσταση. Προέκυψε πτώση πίεσης σε όλο το μήκος του μικροθαλάμου μικρότερη των πτώσεων πίεσης στα μικροκανάλια εισόδου στους μικροθαλάμους, καθώς και ίσες (εντός σφάλματος) πτώσεις πίεσης μεταξύ των μικροκαναλιών, ικανοποιώντας έτσι τους κανόνες πτώσης πίεσης.

Πριν την οριστικοποίηση της γεωμετρίας της μικροδιάταξης, συστήνονται περαιτέρω τροποποιήσεις στη γεωμετρία, ώστε να αυξηθεί η ασφάλεια ομοιόμορφης πλήρωσης. Συγκεκριμένα, για την ασφαλέστερη λειτουργία της διάταξης προτείνεται η χρήση διαφορετικού ύψους (μεγαλύτερου) στον προθάλαμο και στους μικροθαλάμους (μικρότερου). Αυτή εισάγεται πιο εύκολα στην αριθμητική προσομοίωση από ό,τι στην αναλυτική μέθοδο και προτείνεται προς μελλοντική μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ

Στόχος του συγκεκριμένου κεφαλαίου είναι να παρουσιάσει την καλλιέργεια κυττάρων και την απόπειρα δημιουργίας αιμοποιητικού οργανοειδούς μυελού των οστών στην κατασκευασμένη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού. Χρησιμοποιούνται αρχικά μικροθάλαμοι καλλιέργειας ως πλατφόρμες καθορισμού της μεθόδου απεικόνισης των MSCs με χρήση φθορισμού, καθώς και για μελέτη της καλλιέργειας MSCs από ενήλικους δότες μυελού των οστών, υγιείς και ασθενείς ΣΕΛ. Ακολούθως, σε σύγκριση με την κατασκευασμένη μεμβράνη PDMS, η εμπορική μεμβράνη PET, ως τμήμα της μικροδιάταξης, ανέδειξε γρηγορότερη και καλύτερα οργανωμένη εξάπλωση των MSCs, οδηγώντας έτσι σε επιλογή της. Η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας σε συγκριτική μελέτη με τη μικροδιάταξη υπό ροή (ενεργούς τροφοδοσίας) για την καλλιέργεια MSCs προτιμήθηκε για το σταθερό και βιώσιμο σχηματισμό στρωματικού μυελικού ιστού, σε συμφωνία με τα συμπεράσματα του Κεφαλαίου 5. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επιτυχής συγκαλλιέργεια MSCs/HSPCs, αμιγώς *in vitro* και απουσία ικτριωμάτων στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας για 3 ημέρες, με ευοίωνα αποτελέσματα στην κατεύθυνση της δημιουργίας οργανοειδούς μυελού των οστών.

Στο Κεφάλαιο 4 αποδείχτηκε ενισχυμένη ανάπτυξη και καλύτερη οργάνωση των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) σε μικροθαλάμους πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS) που είχαν προκατεργαστεί με πλάσμα αέρα χαμηλής πίεσης και μετέπειτα επικαλυφθεί με κολλαγόνο. Ως απόρροια αυτού, όλες οι καλλιέργειες κυττάρων του κεφαλαίου αυτού πραγματοποιούνται σε μικρορευστονικές διατάξεις PDMS, μικροθαλάμους και μικροδιατάξεις σε ψηφίδα, ενεργοποιημένους με πλάσμα αέρα κατά τη σφράγιση τους και ακολούθως επιστρωμένους με κολλαγόνο.

7.1 Μικροθάλαμοι καλλιέργειας ως πρώιμη πλατφόρμα μελέτης

7.1.1 Χρώση μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων σε μικροθαλάμους καλλιέργειας

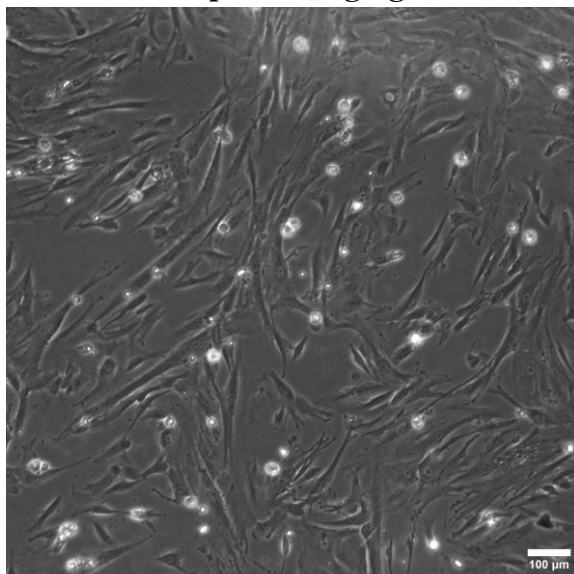
Ως μια μέθοδος ευκρινέστερης οπτικής παρατήρησης, καθώς και ποσοτικού χαρακτηρισμού των κυττάρων, MSCs ομφάλιου λώρου (UC-MSCs) σημάνθηκαν με διάλυμα πράσινης φθορίζουσας χρωστικής diO με αραιώση 1:100 (diO solution : MSCs suspension). Τα MSCs αρχικής συγκέντρωσης 3×10^5 cells/mL τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε δύο μικροθαλάμους καλλιέργειας, όπου και παρέμειναν για 4 ημέρες εντός επωαστήρα σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με 37°C και 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε υπό στατικές συνθήκες με καθημερινή ανανέωση του θρεπτικού υλικού. Τα MSCs παρατηρούνταν καθημερινά σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο Leica DM IRE2, και την τελευταία μέρα (4^η) παρατηρήθηκαν επιπλέον στο συνεστιακό μικροσκόπιο Aurox Clarity Laser Free Confocal (Aurox LFC). Στο Σχήμα 7.1, παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες (μεγέθυνσης 10x) οπτικής μικροσκοπίας (optical) και μικροσκοπίας φθορισμού (fluorescence) των MSCs από την 1^η έως την 4^η ημέρα. Ανάλυση των εικόνων φθορισμού με το πρόγραμμα ImageJ απέδωσε την επιφάνεια του μικροθαλάμου (μm^2) που καλύπτεται με MSCs ανά τις ημέρες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.2. Τα αποτελέσματα προέκυψαν μετά από ανάλυση τουλάχιστον 3 εικόνων φθορισμού για κάθε ημέρα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι επιφάνειες και τα ποσοστά

κάλυψης υπολογίστηκαν με μετρήσεις φθορισμού, και αποδίδουν μικρότερες τιμές σε σχέση με τις δια ζώσης και οπτικά παρατηρούμενες, καθώς δε συνυπολογίζεται ο προερχόμενος φθορισμός από τα χαμηλότερα στρώματα, και επιπλέον, κατά τη μέτρηση φθορισμού με ImageJ, δεν είναι εφικτή η απόλυτη ταύτιση των περιοχών φθορισμού με τις καταμετρούμενες. Επιπρόσθετα, με το πέρασμα των ημερών μειώνεται μερικώς το σήμα φθορισμού της χρωστικής σήμανσης λόγω πολλαπλασιασμού των κυττάρων, επιδρώντας έτσι και στην υπολογιζόμενη επιφάνεια κάλυψης.

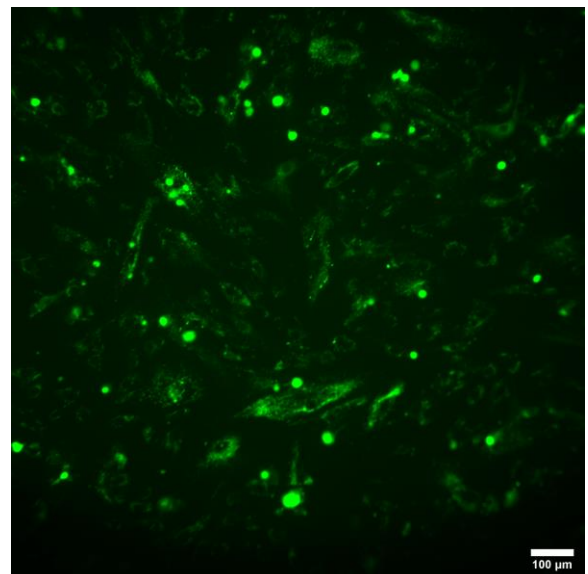
Παρατηρώντας τις εικόνες του Σχήματος 7.1 οδηγούμαστε σε κοινά για τα δύο είδη απεικόνισης συμπεράσματα ως προς την ανάπτυξη των MSCs ανά τις ημέρες, γεγονός που υποδηλώνει και την επιτυχή σήμανση των κυττάρων. Πιο αναλυτικά, την 1^η ημέρα τα MSCs παρουσιάζουν τη γνωστή μορφολογία ινοβλαστών (fibroblast-like), με ρομβοειδές και επίμηκες σχήμα οφειλόμενο στην προσκολλητική τους φύση. Εντοπίζονται σε όλη την έκταση του μικροθαλάμου με σχεδόν ίδια πυκνότητα ως ένδειξη της ομοιόμορφης διασποράς τους, ενώ κατά τόπους έχουν δημιουργήσει μονοστρωματικό ιστό (ποιοτική παρατήρηση). Από την ανάλυση των εικόνων προκύπτει μέση επιφάνεια κάλυψης περίπου ίση με $2.8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, που αντιστοιχεί σε 16% της επιφάνειας απεικόνισης. Τη 2^η ημέρα τα κύτταρα έχουν εμφανώς εξαπλωθεί, καλύπτοντας το μεγαλύτερο τμήμα του θαλάμου με ιστό. Η έκταση των κενών περιοχών έχει περιοριστεί, και η μέση επιφάνεια κάλυψης αυξάνεται στα $3.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, που αντιστοιχεί σε 19% της επιφάνειας. Την 3^η και 4^η ημέρα τα MSCs συνεχίζουν την εύρυθμη ανάπτυξή τους, καταλήγοντας την 4^η ημέρα να φθάσουν σε πλήρη συρροή. Και τις δύο ημέρες έχει πλέον σχηματιστεί πολυστρωματικός ιστός οργανωμένος σε συνεχές δίκτυο που εμφανίζει κατά τόπους κυκλικές τάσεις. Η μέση επιφάνεια κάλυψης υπολογίζεται στα $4.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ και $5.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, δηλαδή σε ποσοστά 28% και 33%, την 3^η και 4^η ημέρα, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη και τη φυσιολογική μείωση σήματος φθορισμού με τις ημέρες, την 4^η ημέρα ($5.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) η μέση επιφάνεια κάλυψης έχει κατ'ελάχιστο διπλασιαστεί σε σχέση με την 1^η ($2.8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$).

Day 1

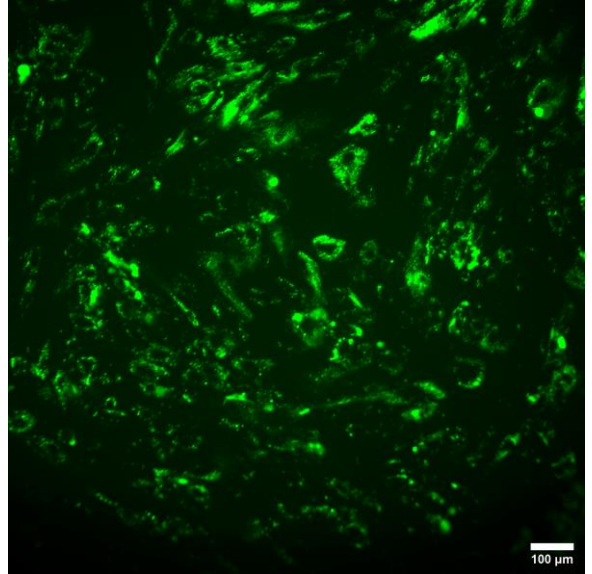
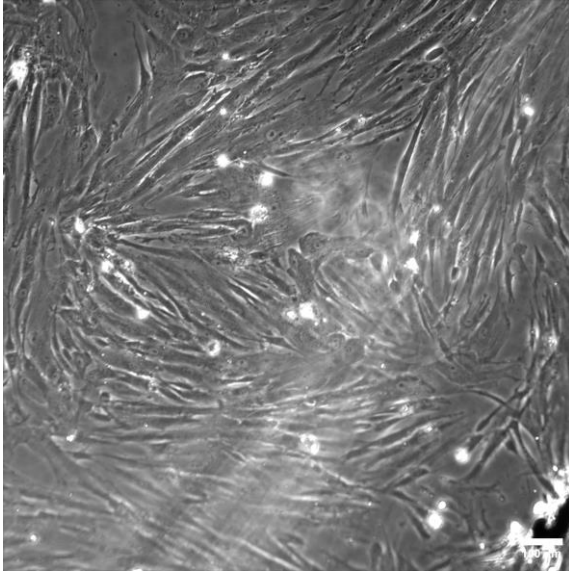
Optical imaging



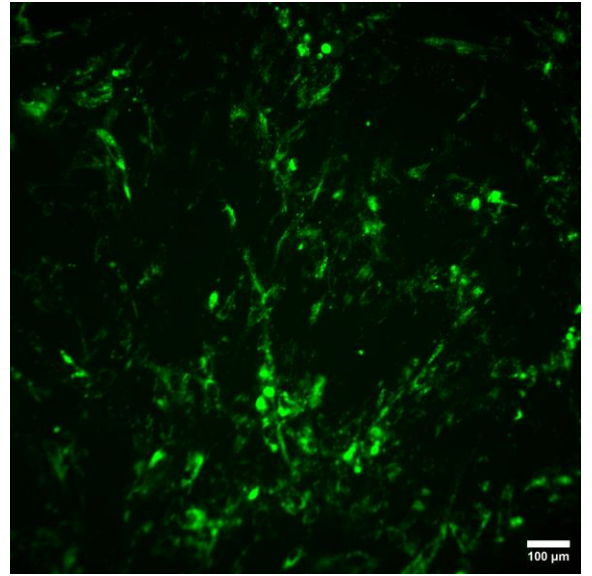
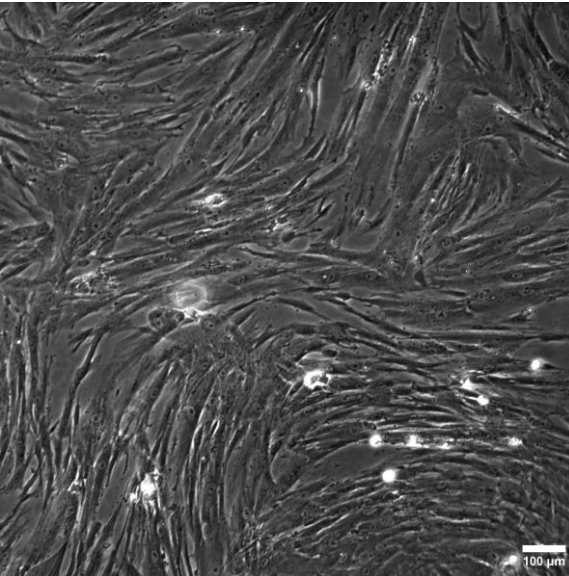
Fluorescence



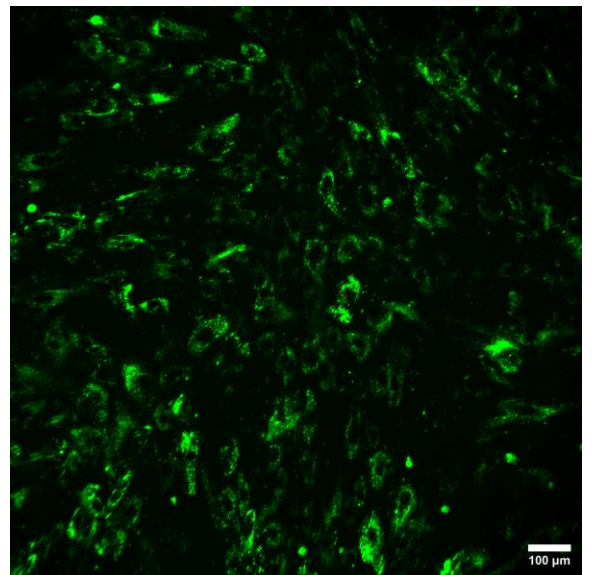
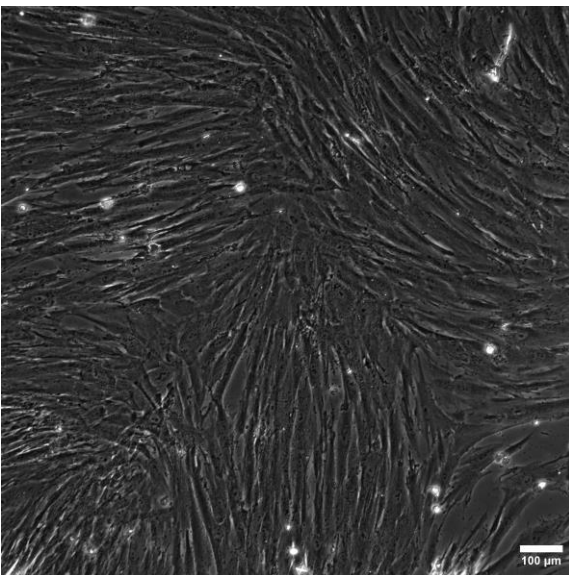
Day 2



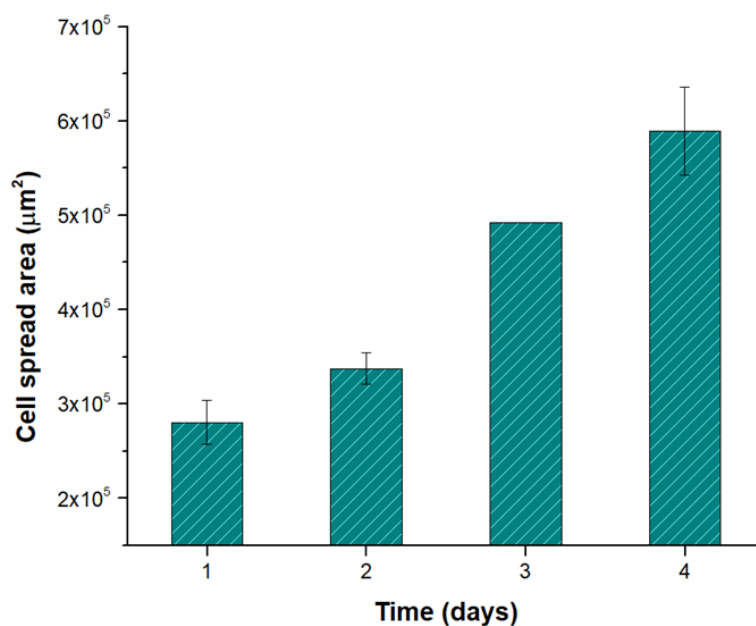
Day 3



Day 4



Σχήμα 7. 1. Εικόνες (μεγέθυνσης 10x) οπτικού και φθορισμού με πράσινη χρωστική diO των UC-MSCs στο εσωτερικό προκατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμένων με κολλαγόνο μικροθαλάμων από την 1^η έως την 4^η ημέρα. Στις εικόνες φθορισμού τα UC-MSCs παρουσιάζουν τη γνωστή ατρακτοειδή μορφολογία και πληθαίνουν σταθερά με το χρόνο, αποδεικνύοντας την επιτυχή χρώση τους με τη χρωστική diO, και τη δυνατότητα χρήσης της ως μια μέθοδο ποσοτικού χαρακτηρισμού.

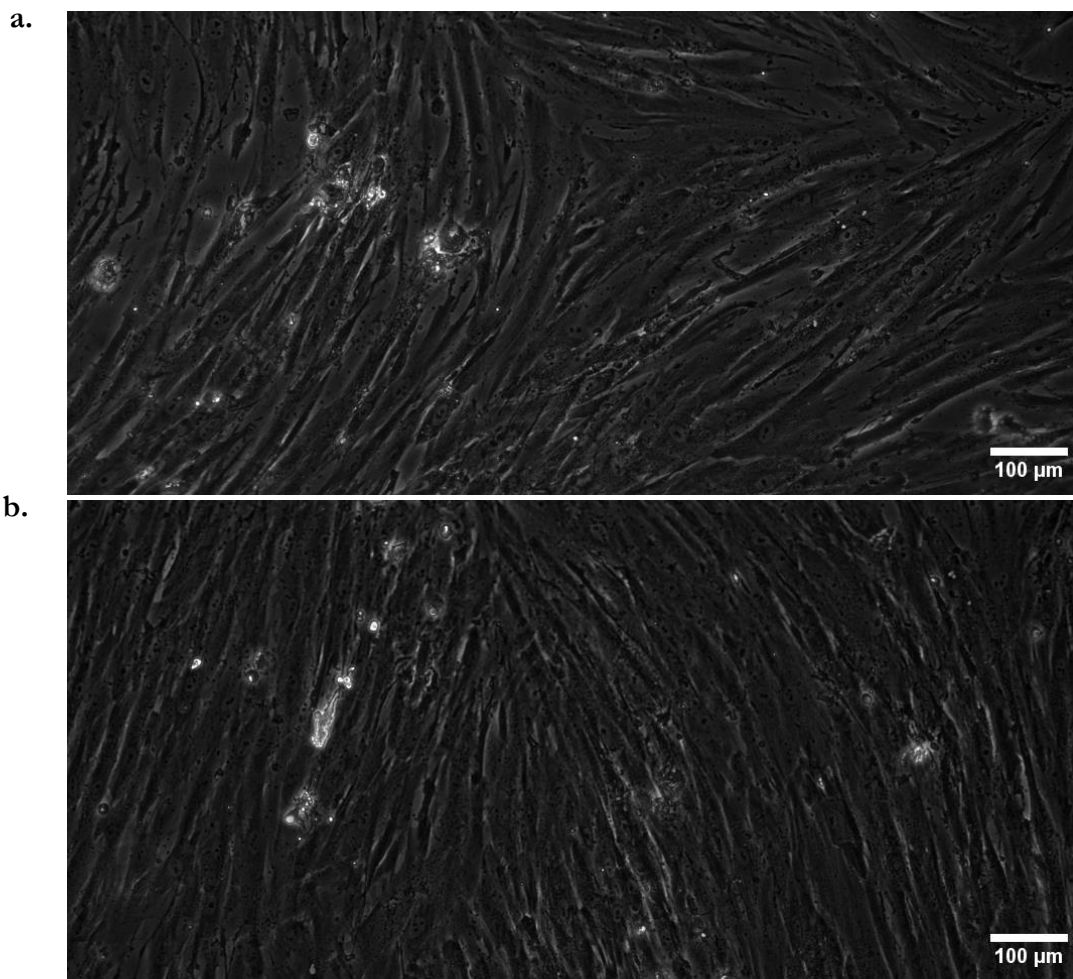


Σχήμα 7. 2. Μέση επιφάνεια κάλυψης (μm²) με UC-MSCs, σημασμένων με τη χρωστική diO, των μικροθαλάμων που έχουν προκατεργαστεί με πλάσμα και επικαλυφθεί με κολλαγόνο, όπως προκύπτει από ανάλυση εικόνων φθορισμού. Η επιφάνεια κάλυψης αυξάνεται προχωρώντας προς την 4^η ημέρα.

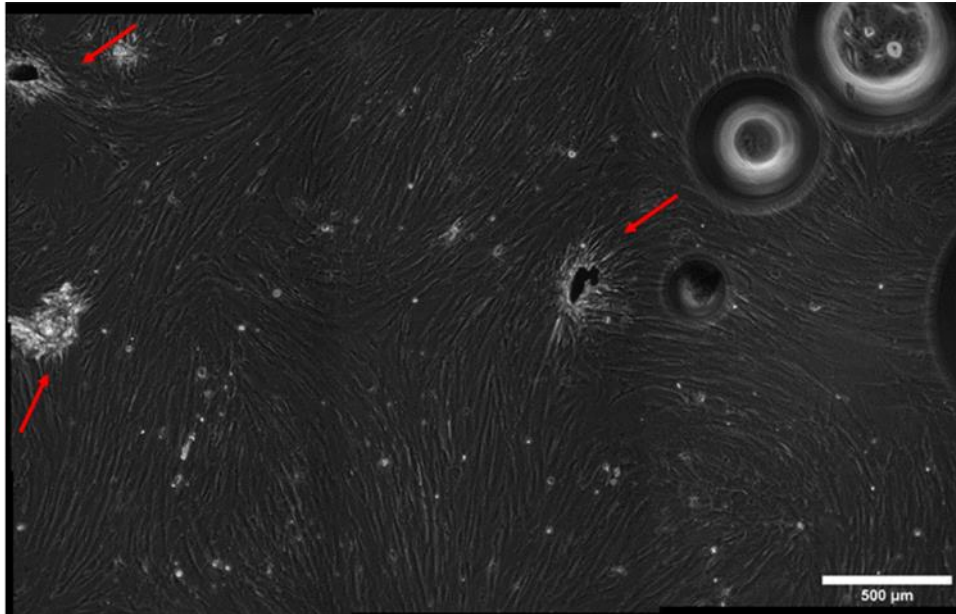
Προχωρώντας στην απεικόνιση με το συνεστιακό μικροσκόπιο της 4^{ης} ημέρας, στο Σχήμα 7.3a,b παρουσιάζονται δύο εικόνες σε μεγέθυνση 10x του σχηματιζόμενου ιστού, όπου φαίνεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια η ομοιομορφία και η πληρότητα κάλυψης του μικροθαλάμου με στρωματικό ιστό. Επιπλέον, στο Σχήμα 7.3c παρατίθεται συγχωνευμένη εικόνα (μεγέθυνσης 10x) συνολικής επιφάνειας περίπου 3.7 x 2.4 mm², αποτέλεσμα σύμπτυξης επιμέρους περιοχών του μικροθαλάμου. Στην εικόνα αυτή διακρίνονται κάποιες (υποδεικνυόμενες με βέλη) ασυνέχειες στο σχηματιζόμενο ιστό, οφειλόμενες όμως σε κατασκευαστικές ατέλειες του μικροθαλάμου, ενώ παρατηρούνται και ορισμένες φυσαλίδες, οι οποίες βρίσκονται σε υψηλότερο επίπεδο σε σχέση με τον ιστό. Τέλος, με τη χρήση του μικροσκοπίου, υπολογίζοντας τη μετατόπιση του επιπέδου εστίασης στα όρια του σχηματιζόμενου ιστού, υπολογίστηκε το φαινόμενο πάχος του την 4^η ημέρα σε $d_{\text{apparent}} = 45.2 \mu\text{m}$, το οποίο χρειάζεται να διορθωθεί λόγω διάθλασης της ακτινοβολίας μέσα από το θρεπτικό υλικό (n_{medium}) και λόγω συνυπολογισμού του βάθους πεδίου (depth of field – DOF). Έτσι το πραγματικό πάχος ιστού (d_{actual}), υπολογίζεται από τη σχέση:

$$d_{\text{actual}} = (d_{\text{apparent}} - \text{DOF}) \cdot \frac{n_{\text{medium}}}{n_{\text{air}}} \quad (1)$$

όπου για $\text{DOF} = 11.5 \mu\text{m}$ (φακός μεγέθυνσης 10x), $n_{\text{medium}} = 1.4$ και δείκτη διάθλασης αέρα $n_{\text{air}} = 1$, προέκυψε $d_{\text{actual}} = 47.2 \mu\text{m}$. Για μέσο πάχος ενός μεσεγχυματικού κυττάρου $2.6 \mu\text{m}$ [1], προκύπτουν περίπου 18 στρώματα κυττάρων, αποδεικνύοντας έτσι το σχηματισμό τριδιάστατου πολυστρωματικού ιστού. Από όλα τα παραπάνω, επιβεβαιώνονται και με τη χρήση φθορισμού τα συμπεράσματα του Κεφαλαίου 4. Από την πρώτη έως και την τελευταία ημέρα διακρίνεται ομοιόμορφη εξάπλωση των MSCs μέσα στους προκατεργασμένους με πλάσμα αέρα και επικαλυμμένους με κολλαγόνο μικροθαλάμους, με τα κύτταρα σταδιακά να αναπτύσσονται ομαλά διαμορφώνοντας υγιή τριδιάστατη μήτρα, ικανή για τη μετέπειτα φιλοξενία των HSCs.



c.



Σχήμα 7. 3. Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου των MSCs σε μικροθαλάμους καταργασμένους με πλάσμα και με επίστρωση κολλαγόνου την 4^η ημέρα καλλιέργειας. a), b) Εικόνες μεγέθυνσης 10x, που αναδεικνύουν την ομοιομορφία ανάπτυξης ιστού στρώματος σε σπειροειδή σχηματισμό. c) Συμπυκνωμένη εικόνα (μεγέθυνσης 10x) συνολικής επιφάνειας περίπου 3.7 x 2.4 mm² από επιμέρους περιοχές του μικροθαλάμου, όπου διακρίνεται η πληρότητα κάλυψης με MSCs. Οι ασυνέχειες στον ιστό (κόκκινα βέλη) οφείλονται σε κατασκευαστικές ατέλειες.

7.1.2 Πιλοτική καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων μυελού των οστών ενηλίκων

7.1.2.1 Καλλιέργεια υγιών δοτών και ασθενών (Συστηματικού Ερυθρηματώδους Λύκου) μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων

Πραγματοποιήθηκε πρωτόλεια μελέτη της ανάπτυξης MSCs προερχόμενων από το μυελό των οστών ενηλίκων, υγιών δοτών και ασθενών με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο (ΣΕΛ). Η εν λόγω μελέτη είναι η μοναδική της διατριβής που χρησιμοποιεί κύτταρα μυελού των οστών ενηλίκων, καθώς στις υπόλοιπες προέρχονται από τον ομφάλιο λώρο. Επιπλέον, εξετάζεται για πρώτη φορά η ανάπτυξη μεσεγχυματικών κυττάρων από ασθενείς ΣΕΛ.

Συγκεκριμένα, MSCs αρχικής συγκέντρωσης 8×10^4 cells/mL τοποθετήθηκαν σε μικροθαλάμους καλλιέργειας καταργασμένους με πλάσμα αέρα και επικαλυμένους με κολλαγόνο. Δύο μικροθάλαμοι χρησιμοποιήθηκαν για κάθε είδος MSCs, υγιή και ασθενή, και καλλιεργήθηκαν υπό στατικές συνθήκες με σχεδόν καθημερινή ανανέωση θρεπτικού υλικού για 8 ημέρες. Τα υγιή MSCs ήταν κυτταρικού περάσματος P4 και τα ασθενή P6, και καλλιεργήθηκαν εντός επωαστήρα σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας 37°C και με παροχή 5% CO₂. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο Leica DM IRE2, με χαρακτηριστικές εικόνες (μεγέθυνσης 10x) να παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.4. Σαν επιπλέον μέθοδος χαρακτηρισμού καταμετρήθηκε το πάχος του σχηματιζόμενου ιστού σε συγκεκριμένες ημέρες, χρησιμοποιώντας της διόρθωση της σχέσης (1).

Τόσο τα υγιή όσο και τα ασθενή MSCs εμφανίζουν ομαλή ανάπτυξη τις δύο πρώτες ημέρες παρουσιάζοντας όμως διαφοροποιήσεις στη μορφολογία τους. Συγκεκριμένα, ενώ τα ασθενή MSCs εμφανίζουν τη γνωστή ατρακτοειδή μορφολογία, που προσομοιάζει εκείνη των ινοβλαστών, τα υγιή παρουσιάζονται εμφανώς μεγαλύτερα και πεπλατυσμένα, με περιορισμένο πυρήνα και κοκκώδες κυτταρόπλασμα. Τα χαρακτηριστικά

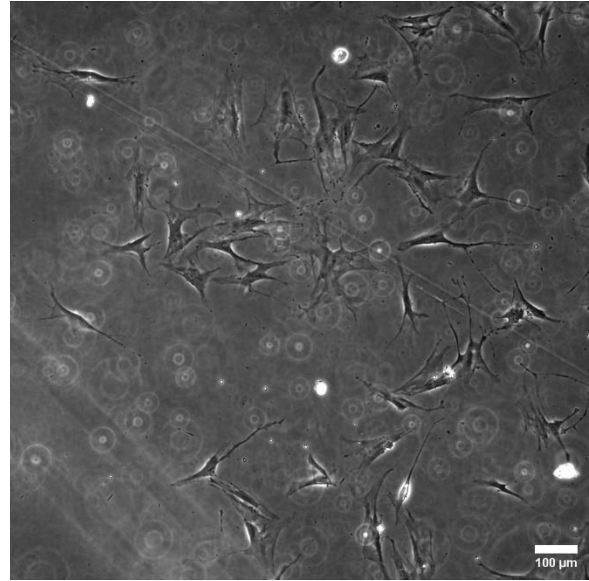
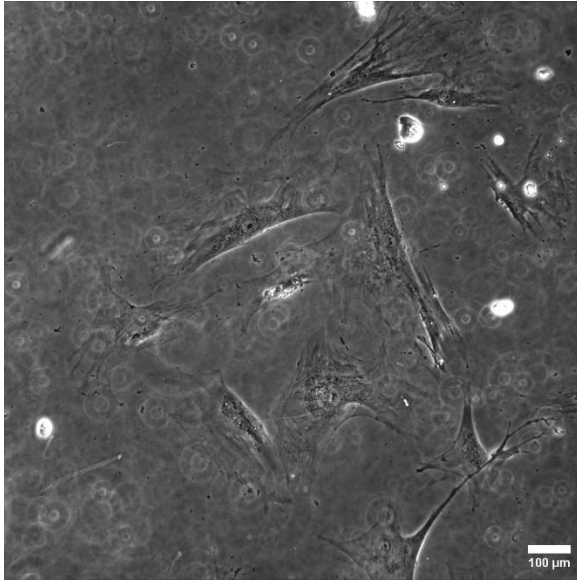
αυτά υποδεικνύουν κυτταρική γήρανση των υγιών MSCs [2], που επειδή δεν αιτιολογείται από το μικρό κυτταρικό τους πέρασμα (μόλις P4), αποδίδεται στο ότι προέρχονται από δότη μεγάλης ηλικίας (≥ 70 χρονών). Είναι γνωστό ότι η κυτταρική γήρανση στα MSCs συνδέεται είτε με την εκτεταμένη καλλιέργεια (μεγάλος αριθμός κυτταρικού περάσματος) [3] είτε με την προχωρημένη ηλικία του δότη [4,5]. Στο Σχήμα 7.5 παρουσιάζονται ενδεικτικά εικόνες μικροσκοπίου υγιών MSCs μικρού αριθμού περάσματος από νεαρό και γηρασμένο δότη [4], όπου είναι εμφανής η μορφολογική ομοιότητα των κυττάρων του τελευταίου με τα υγιή MSCs της δικής μας μελέτης. Το γεγονός όμως αυτό δεν απέτρεψε την ανάπτυξή τους από την 1^η μέχρι τη 2^η ημέρα, κατορθώνοντας να σχηματίσουν κατά τόπους τριδιάστατο στρωματικό ιστό. Από την 4^η ημέρα η ανάπτυξή τους ανακόπτεται, με τον πληθυσμό τους να παραμένει σχεδόν σταθερός μέσα σε διάστημα 2 ημερών, όπως προκύπτει από ποιοτικές παρατηρήσεις. Το γεγονός αυτό αποδίδεται πρωταρχικά στην έλλειψη ανανέωσης θρεπτικού υλικού την 3^η ημέρα, η οποία αύξησε την παρουσία φυσαλίδων στο εσωτερικό του μικροθαλάμου, μεταβάλλοντας τις απαιτούμενες συνθήκες υποξίας για τη διαβίωση των MSCs [6], και παράλληλα δυσχεραίνοντας την είσοδο θρεπτικού υλικού τις επόμενες μέρες. Επιπλέον επιβαρυντικός παράγοντας υπήρξε βέβαια και η κυτταρική γήρανση, η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των MSCs. Ακόμη, ξεκινώντας από την 4^η ημέρα αρκετά κύτταρα μεταβάλουν το σχήμα τους σε περισσότερο επιμήκεις στην προσπάθειά τους να φθάσουν σε γειτονικά κύτταρα που είναι πλέον απομακρυσμένα λόγω μείωσης του πληθυσμού τους. Την 6^η και 8^η ημέρα είναι πλέον εμφανής η επίδραση των φυσαλίδων στα κύτταρα, των οποίων η πυκνότητα έχει μειωθεί σημαντικά, σε επίπεδα χαμηλότερα σε σχέση με εκείνη της 1^{ης} ημέρας, ενώ όσα κύτταρα έχουν παραμείνει μοιάζουν στην πλειοψηφία τους με μακρόστενα ινίδια. Οι εικόνες των υγιών MSCs την 6^η ημέρα έχουν ληφθεί από το τμήμα του μικροθαλάμου που δεν είχε καλυφθεί με φυσαλίδες, και παρατίθενται στο Σχήμα 7.4 για λόγους πληρότητας.

Τα ασθενή MSCs εμφανίζονται να αναπτύσσονται σταθερά με το χρόνο μέχρι και την 8^η ημέρα, σχηματίζοντας κατά τόπους αραιό τριδιάστατο ιστό από τη 2^η ημέρα. Την 4^η ημέρα ο ιστός αρχίζει να επεκτείνεται περισσότερο και παρουσιάζει σπειροειδή οργάνωση, που γίνεται πιο διακριτή τις επόμενες ημέρες με την πληθυσμιακή αύξηση των κυττάρων. Όμως, μέχρι και την 8^η ημέρα δεν κατόρθωσε να σχηματιστεί συνεχής στρωματικός ιστός, αλλά διακοπτόταν επιμέρους από κενές περιοχές, μην καλύπτοντας τελικά ολόκληρη την επιφάνεια του θαλάμου. Αν κρίνουμε από τη μορφολογία των ασθενών MSCs, και με βάση το Σχήμα 7.5, προέρχονται από νεαρό δότη, γεγονός που θα έπρεπε να σημαίνει μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Αντιθέτως, αν εστιάσουμε στις 2 πρώτες ημέρες καλλιέργειας, ο ρυθμός ανάπτυξης των ασθενών MSCs είναι ανάλογος με των υγιών, που όπως προαναφέρθηκε, υπόκεινται σε κυτταρική γήρανση και συνεπώς διαθέτουν μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα. Μέτρηση του πάχους του σχηματιζόμενου ιστού στα υγιή MSCs τη 2^η ημέρα και στα ασθενή την 8^η ημέρα έδωσε, τιμές $20.8 \pm 1.2 \mu\text{m}$ και $28.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$, αντίστοιχα. Προκύπτει δηλαδή μια διαφορά πάχους περίπου $7 \mu\text{m}$ σε 6 ημέρες, η οποία αναμενόταν να είναι μεγαλύτερη σε περίπτωση ομαλής ανάπτυξης των ασθενών MSCs, γεγονός που ενισχύει τον ισχυρισμό περί βραδύτητας ανάπτυξής τους. Αποδεικνύεται έτσι, ότι τα ασθενή MSCs έχουν μειωμένο πολλαπλασιαστικό ρυθμό, σε σχέση με εκείνο που θα είχαν τα υγιή MSCs από έναν αντίστοιχα νεαρό δότη, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά [5,7]. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι τα MSCs από μυελό των οστών ενηλίκων με ΣΕΛ εμφανίζουν επιβραδυμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα αντίστοιχα υγιή. Συστήνεται μελλοντικά η επανάληψη του πειράματος με τα δύο είδη MSCs να προέρχονται από δότες παραπλήσιας ηλικίας, καθώς και κοντινού κυτταρικού περάσματος, ώστε να επιβεβαιωθούν οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ υγιών και ασθενών MSCs μυελού των οστών ενηλίκων.

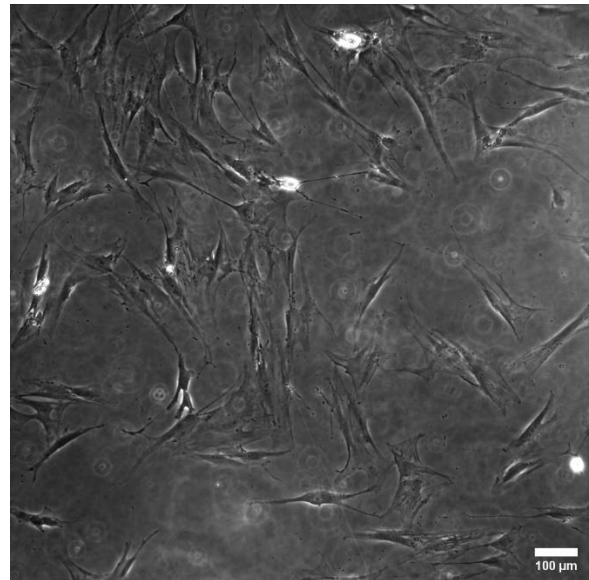
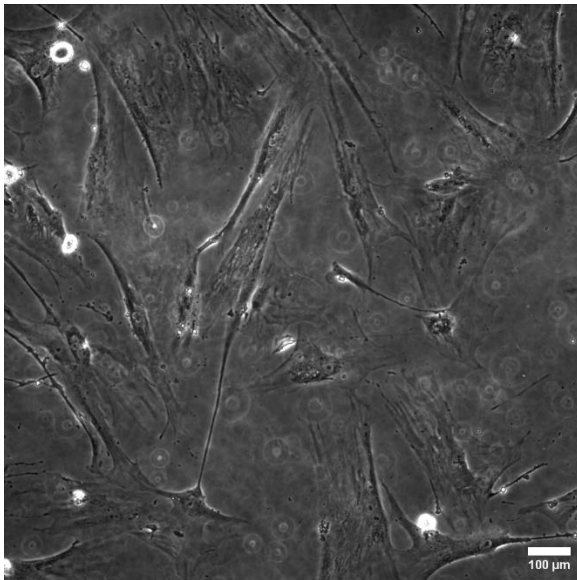
Healthy MSCs (from aged donor)

SLE MSCs (from young donor)

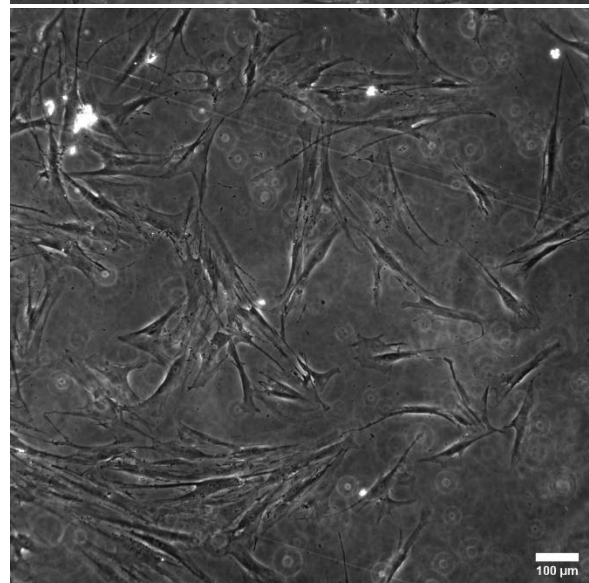
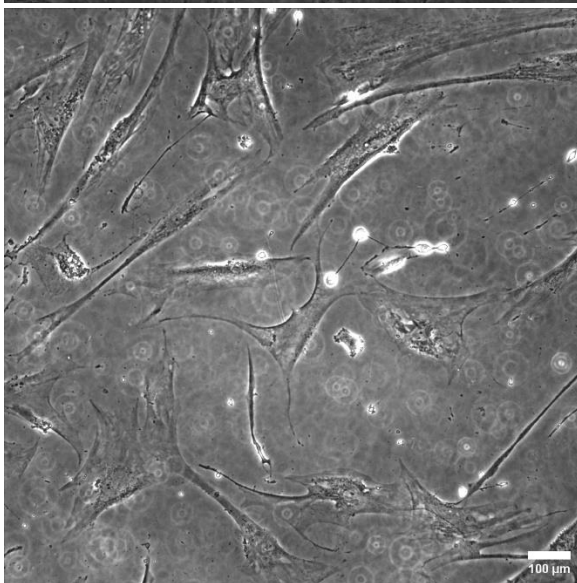
Day 1



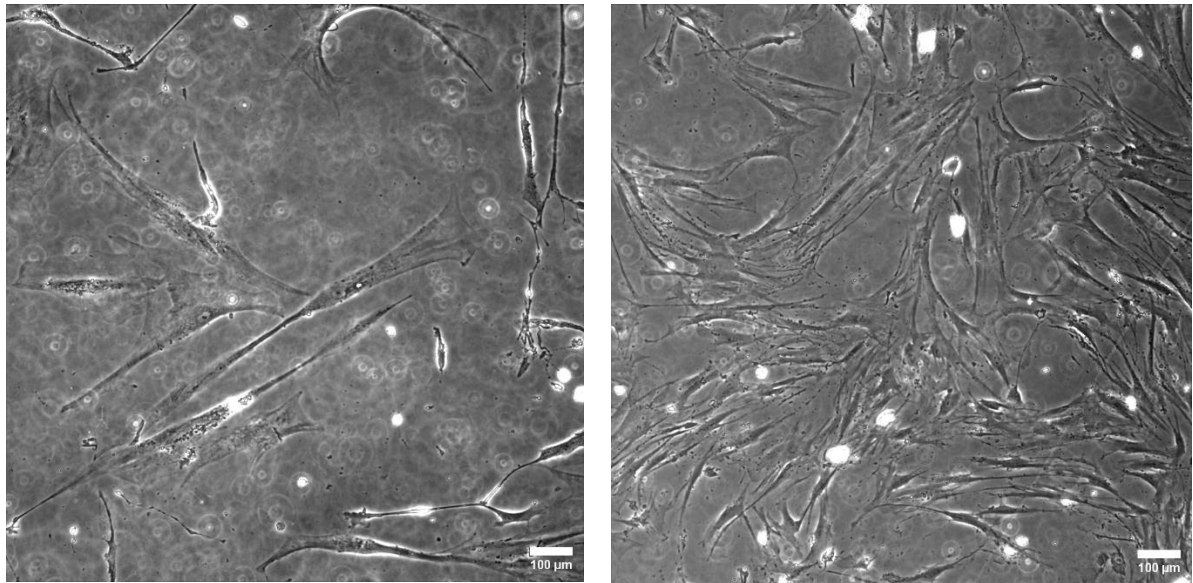
Day 2



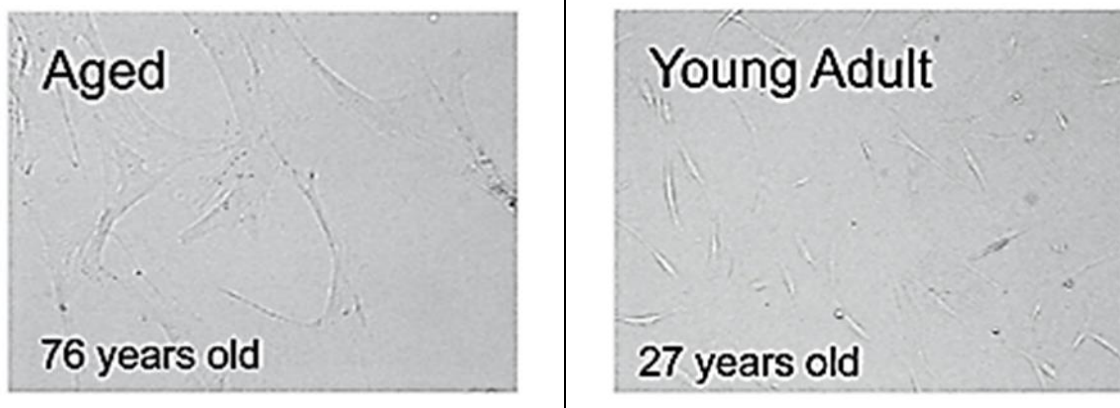
Day 4



Day 6



Σχήμα 7. 4. Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης BM-MSCs, προερχόμενων από το μυελό των οστών ενηλίκων, υγιών και ασθενών, στο εσωτερικό μικροθαλάμων μέχρι την 6^η ημέρα. Τα ασθενή MSCs διαθέτουν τη γνωστή ατρακτοειδή μορφολογία, ενώ τα υγιή έχουν πεπλατυστεί, και εμφανίζουν κοκκώδες κυτταρόπλασμα, υποδεικνύοντας την προέλευσή τους από ηλικιωμένο δότη. Η ομαλή ανάπτυξη των MSCs, υγιών και ασθενών, μέχρι τη 2^η ημέρα, ανακόπτεται από την 4^η, λόγω έλλειψης ανανέωσης θρεπτικού υλικού την 3^η ημέρα.

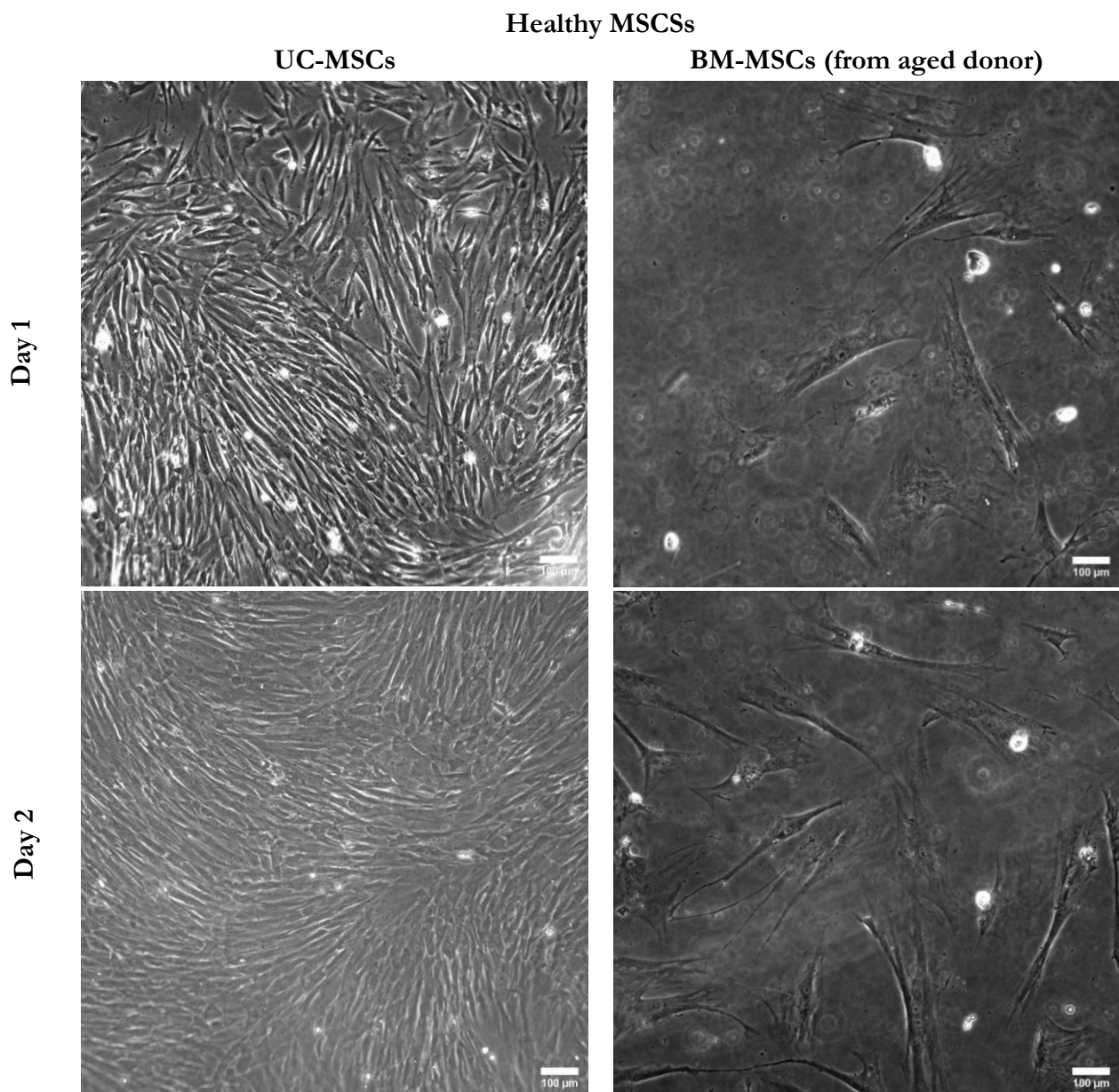


Σχήμα 7. 5. Χαρακτηριστικές εικόνες μικροσκοπίου από MSCs προερχόμενα από ενήλικα δότη, ηλικιωμένο (αριστερά), και νεαρό (δεξιά) [4].

7.1.2.2 Σύγκριση υγιών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων μυελού των οστών ενηλίκων με του ομφάλιου λώρου

Στην παράγραφο αυτή, γίνεται συγκριτική μελέτη υγιών MSCs προερχόμενων από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs) και το μυελό των οστών ηλικιωμένων ενηλίκων (BM-MSCs). Συγκεκριμένα, συγκρίνονται UC-MSCs

αρχικής συγκέντρωσης 2.7×10^6 cells/mL με τα υγιή BM-MSCs συγκέντρωσης 8×10^4 cells/mL, για διάστημα 2 ημερών εντός κατεργασμένων με πλάσμα αέρα και επικαλυμένων με κολλαγόνο μικροθαλάμων καλλιέργειας. Οι μικροθάλαμοι είναι χωρητικότητας 15 μ L, προερχόμενοι από το εμπορικό PTFE (βλ. Κεφάλαιο 3). Τα δύο είδη κυττάρων θα διερευνηθούν κυρίως ως προς τη μορφολογία τους, καθώς διαφέρουν σημαντικά ως προς την αρχική τους συγκέντρωση καλλιέργειας (περίπου 34 φορές μεγαλύτερη η συγκέντρωση των UC-MSCs), ενώ επιπλέον, δεν είναι του ίδιου κυτταρικού περάσματος. Στο Σχήμα 7.6 που ακολουθεί συγκεντρώνονται χαρακτηριστικές φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) των κυττάρων.



Σχήμα 7. 6. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) υγιών MSCs, σφραγισμένου λώρου (UC-MSCs) και μυελού των οστών ενηλίκων (BM-MSCs) στο εσωτερικό μικροθαλάμων μέχρι τη 2^η ημέρα καλλιέργειας. Τα UC-MSCs

εμφανίζουν τη γνωστή μορφολογία ινοβλαστών, ενώ τα BM-MSCs είναι πεπλατυσμένα λόγω προέλευσής τους από ηλικιωμένο δότη.

Παρατηρώντας τη μορφολογία των δύο ειδών κυττάρων διαφορετικής προέλευσης, διακρίνονται διαφοροποιήσεις, καθώς ενώ τα UC-MSCs έχουν το αναμενόμενο ατρακτοειδές σχήμα, τα BM-MSCs, όπως αναλύθηκε και παραπάνω, είναι εμφανώς μεγαλύτερα και πεπλατυσμένα, θυμίζοντας γηρασμένους ινοβλάστες. Στηριζόμενοι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν υπάρχει ειδοποιός μορφολογική διαφοροποίηση των MSCs προερχόμενων από τον ομφάλιο λώρο και το μυελό των οστών ενηλίκων, καθώς από κοινού η μορφολογία τους μοιάζει με εκείνη των ινοβλαστών [8,9]. Συνεπώς, η παρατηρούμενη μορφολογική διαφοροποίηση αποδίδεται στην κυτταρική γήρανση των υγιών BM-MSCs, όπως συνέβη και κατά τη σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα ασθενή MSCs, λόγω προέλευσής τους από ηλικιωμένο δότη.

Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι στις υπάρχουσες μελέτες τονίζεται ο διαφορετικός ρυθμός πολλαπλασιασμού UC-MSCs και BM-MSCs, με τα πρώτα να πολλαπλασιάζονται σημαντικά πιο γρήγορα [9,10]. Είναι ενδεικτικό ότι για UC-MSCs περάσματος 0 – 3, ο χρόνος διπλασιασμού είναι μόλις 2 – 3 ημέρες, ενώ για BM-MSCs περάσματος 2 – 3 είναι μέχρι και τετραπλάσιος φθάνοντας τις 11 – 12 ημέρες [10]. Στην περίπτωση μας όμως, δεν μπορούμε να αποδώσουμε τη διαφορά αυτή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού με σιγουριά, λόγω των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών των δύο ειδών κυττάρων (συγκέντρωση και ηλικία δότη).

7.2 Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας

Στο Κεφάλαιο 5 αποδείχτηκε η δυσκολία περιορισμού των φυσαλίδων στο εσωτερικό των μικρορευστονικών διατάξεων υπό ροή, σε βαθμό ικανοποιητικό ώστε να μην επηρεάζεται η λειτουργικότητά τους και η δυνατότητα βιώσιμης συντήρησης μιας καλλιέργειας κυττάρων. Σε αυτό το πλαίσιο, συστήθηκε η μετάβαση σε μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα παθητικής τροφοδοσίας με θρεπτικό υλικό, κατά την οποία, η ανανέωση του θρεπτικού υλικού δεν πραγματοποιείται ενεργά μέσω αντλίας, αλλά φυσικά μέσω διάχυσης από ένα τρυβλίο μεγάλης χωρητικότητας σε θρεπτικό υλικό. Εκτός αυτών, τα κύτταρα μυελού των οστών δεν απαιτούν έντονες μηχανικές τάσεις και μεγάλες βαθμίδες ταχύτητας, πίεσης ή συγκεντρώσεων για την εύρυθμη ανάπτυξή τους. Έτσι, η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με την χαμηλότερης συχνότητας ανανέωση θρεπτικού υλικού, δεν εμποδίζει τη δημιουργία και συντήρηση του οργανοειδούς.

Στις παραγράφους που ακολουθούν, παρουσιάζεται η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας, ο πειραματικός έλεγχος για την επιλογή της καταλληλότερης πορώδους μεμβράνης, της κατασκευασμένης μεμβράνης πολυ(διμεθυλοσιλιζάνης) (PDMS) ή της εμπορικής μεμβράνης πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET). Τέλος, πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη καλλιέργειας των MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας σε σχέση με τη μικροδιάταξη ενεργούς τροφοδοσίας (υπό ροή).

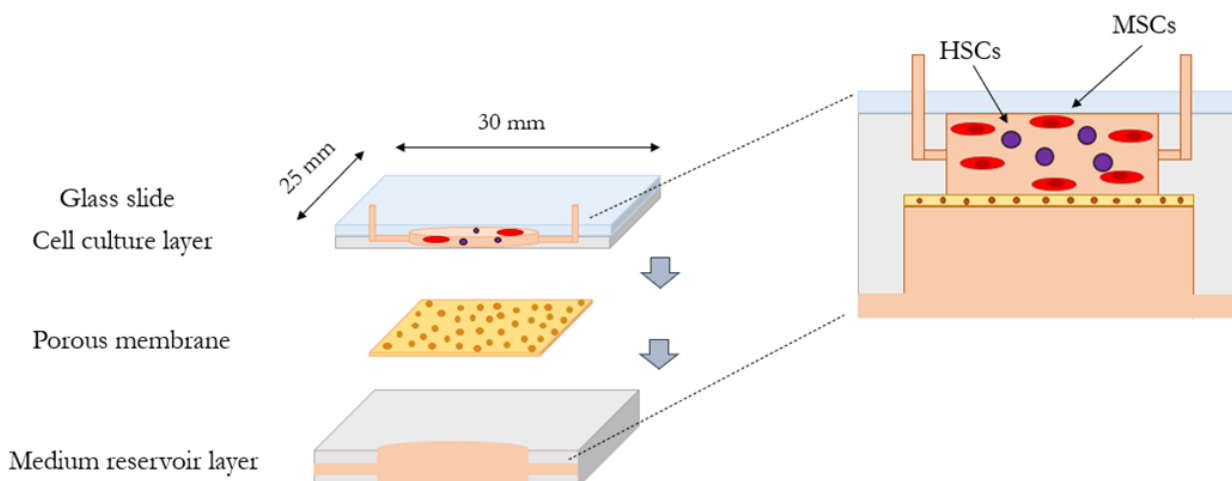
7.2.1 Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα παθητικής τροφοδοσίας

Η μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας περιλαμβάνει δύο επίπεδα, με το ανώτερο να σχηματίζει το μικροθάλαμο καλλιέργειας, και το κατώτερο να λειτουργεί ως δεξαμενή τροφοδοσίας, και με

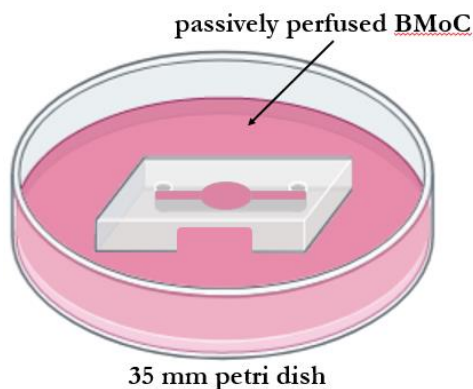
τη μεταξύ τους επικοινωνία να διασφαλίζεται μέσω πορώδους μεμβράνης. Τόσο το ανώτερο επίπεδο καλλιέργειας, όσο και το επίπεδο της δεξαμενής είναι από PDMS, ενώ η παρεμβαλλόμενη μεμβράνη είναι είτε η κατασκευασμένη PDMS είτε εμπορική PET. Η μικροδιάταξη σφραγίζεται στην κορυφή από γυαλί μικροσκοπίου, από όπου πραγματοποιείται η παρατήρηση των κυττάρων. Στο Σχήμα 7.7a φαίνεται 3D σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων της μικροδιάταξης, καθώς και μια διατομή του, όπου διακρίνεται η συγκαλλιέργεια MSCs και HSCs στον άνω μικροθάλαμο. Ο μικροθάλαμος καλλιέργειας είναι κυλινδρικού σχήματος, ενώ η δεξαμενή είναι διαμπερής και παραμένει βυθισμένη σε 35 mm - τρυβλίο καλλιέργειας γεμάτο με θρεπτικό υλικό. Έτσι, η ανανέωση του θρεπτικού υλικού στο εσωτερικό του μικροθαλάμου καλλιέργειας είναι συνεχής και πραγματοποιείται μέσω διάχυσης από τους πόρους της μεμβράνης. Στο Σχήμα 7.7b αποδίδεται σχηματικά η μικροδιάταξη βυθισμένη στο τρυβλίο, και στο Σχήμα 7.7c η ρεαλιστική της εικόνα. Η είσοδος και έξοδος του μικροθαλάμου καλύπτονται με φιλμ πολυολεφίνης, ενώ το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου ανανεωνόταν χειροκίνητα ανά 1 – 2 ημέρες αναλόγως των αναγκών της καλλιέργειας.

Οι διαστάσεις του μικροθαλάμου καλλιέργειας και των συνοδών μικροκαναλιών παρέμειναν ίδιες με του αντίστοιχου επιπέδου στη μικροδιάταξη 2^{ns} γενιάς (βλ. Κεφάλαιο 3). Υπενθυμίζεται σύντομα ότι ο μικροθάλαμος είναι διαμέτρου 6 mm και πάχους 0.5 mm. Η δεξαμενή τροφοδοσίας είναι διαμέτρου 8 mm, και διανοίγεται με διατρητήρα βιοψίας αντίστοιχης διαμέτρου, ενώ το πάχος της είναι 1.5 – 2 mm. Αντιδιαμετρικά της δεξαμενής διανοίγονται με χρήση κοπιδιού μικροκανάλια πλάτους έως 2 mm, ώστε να εξασφαλίζεται η ροή θρεπτικού υλικού προς τη δεξαμενή. Τα επίπεδα του μικροθαλάμου καλλιέργειας, της δεξαμενής τροφοδοσίας και του γυαλιού μικροσκοπίου έχουν κοινές διαστάσεις (μήκος x πλάτος) 30 x 25 mm². Το γυαλί στην κορυφή της διάταξης φέρει δύο οπές διαμέτρου 1 – 1.3 mm, διανοιγμένες με εργαλείο Dremel, που ευθυγραμμίζονται με τα μικροκανάλια εισόδου και εξόδου του σχηματιζόμενου μικροθαλάμου καλλιέργειας.

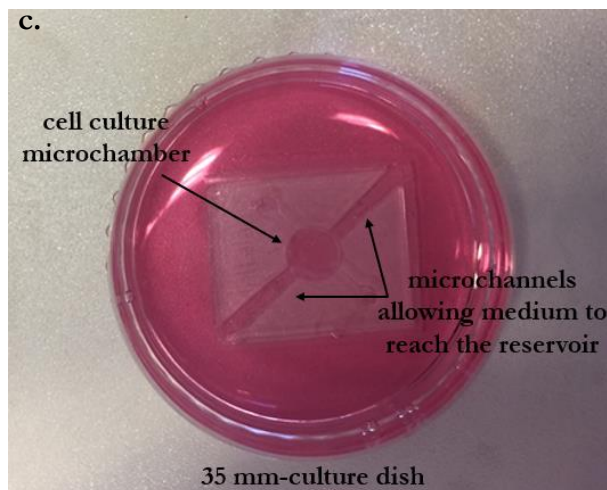
a.



b.



c.



Σχήμα 7. 7. Μικροδιάταξη μυελού των οστών σε ψηφίδα παθητικής τροφοδοσίας. α) Ανεπτυγμένη 3D άποψη της μικροδιάταξης (αριστερά), αποτελούμενη από δύο επίπεδα PDMS, τον άνω κυλινδρικό μικροθάλαμο καλλιέργειας και την κάτω δεξαμενή τροφοδοσίας, διαχωριζόμενα μεταξύ τους με πορώδη μεμβράνη. Η παρατήρηση των κυττάρων και η επικοινωνία με το περιβάλλον πραγματοποιείται μέσω γυαλιού στην κορυφή της μικροδιάταξης. Σε μεγέθυνση (δεξιά) παρουσιάζεται μια διατομή της μικροδιάταξης, όπου διακρίνεται η καλλιέργεια των κυττάρων (MSCs και HSCs) στον άνω μικροθάλαμο και οι ροϊκές διεπαφές μέσω του γυαλιού. β) Σχηματική απόδοση και γ) φωτογραφία της μικροδιάταξης βυθισμένης σε τρυβλίο 35 mm γεμάτο με θρεπτικό υλικό κατά την πειραματική διαδικασία.

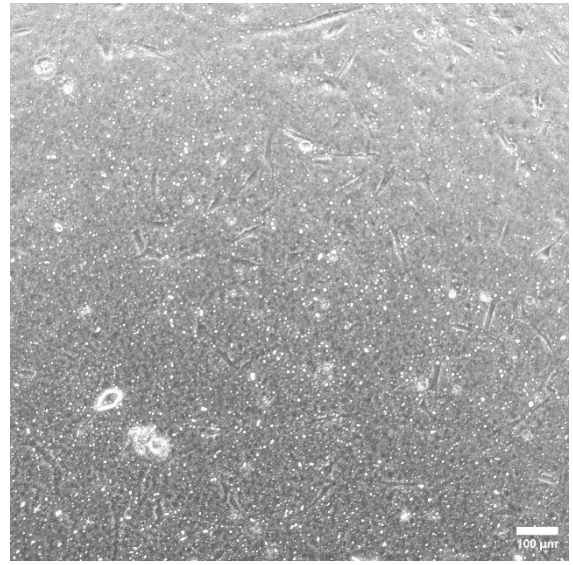
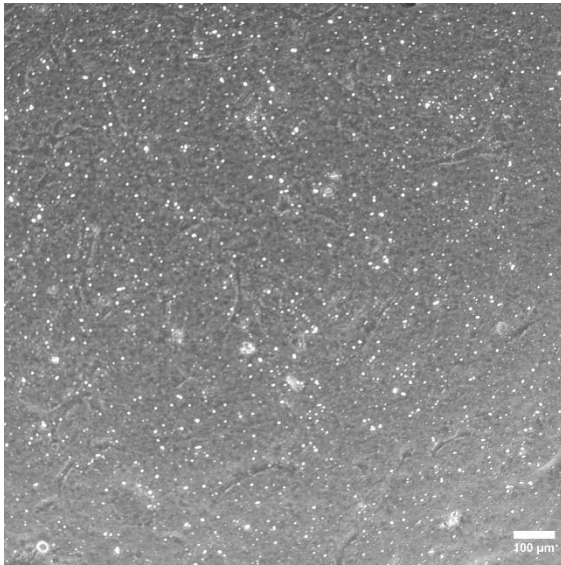
7.2.2 Έλεγχος βιο-συμβατότητας μεμβράνης πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET)

Πριν την ενσωμάτωση της πορώδους μεμβράνης PET στη μικροδιάταξη δοκιμάστηκε η συμβατότητά της με τα MSCs. Για το λόγο αυτό, MSCs πλήθους 10^5 τοποθετήθηκαν στις εμπορικές μεμβράνες μέσα σε πιάτο 24 πηγαδιών και καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες. Οι μεμβράνες επαλύφθηκαν με κολλαγόνο (επάωση στους 37°C για 30 min), και μελετήθηκαν σε σύγκριση με μεμβράνες αναφοράς απουσία κολλαγόνου, ώστε να εξεταστεί παράλληλα η συνεισφορά του κολλαγόνου στην ανάπτυξη των κυττάρων στο υλικό PET. Για λόγους επαναληψιμότητας, χρησιμοποιήθηκαν 2 μεμβράνες σε κάθε περίπτωση. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν ανά 2 ημέρες, και με την ίδια συχνότητα πραγματοποιούνταν η παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο Leica DM IRE2. Τα εξαγόμενα συμπεράσματα στηρίζονται σε ποιοτικές παρατηρήσεις, που συνάδουν με τις διαζώσεις. Ενδεικτικά, στο Σχήμα 7.8 απεικονίζονται χαρακτηριστικές οπτικές εικόνες (μεγέθυνσης 10x) από τα πηγάδια με τις μεμβράνες αναφοράς (reference membranes) και εκείνα με τις επικαλυμμένες με κολλαγόνο μεμβράνες (collagen-coated membranes) για τις ημέρες 2, 4 και 6.

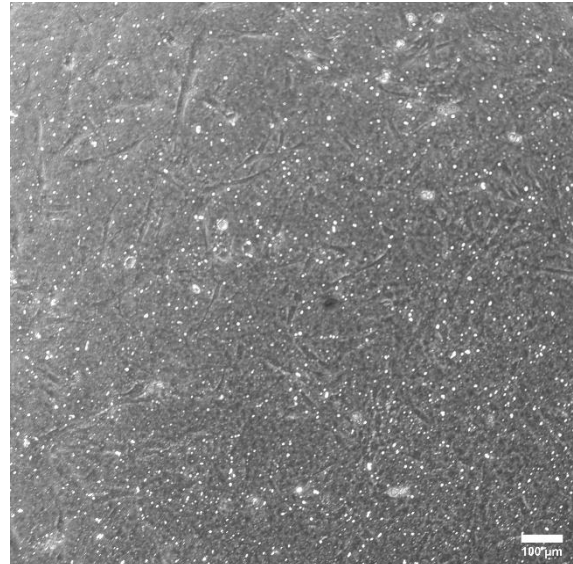
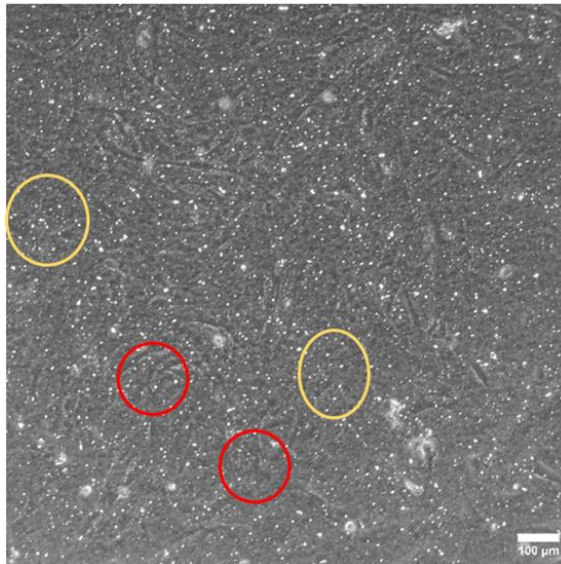
Reference membranes

Collagen-coated membranes

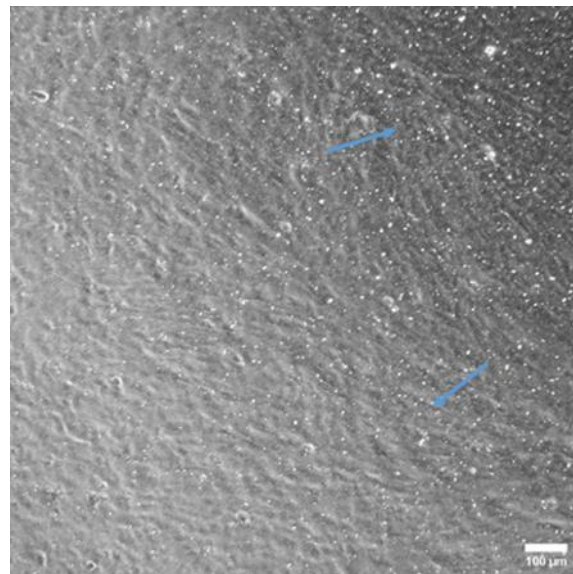
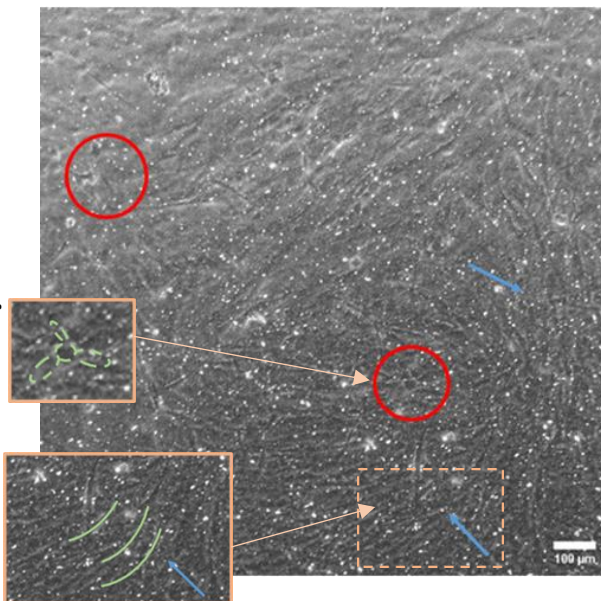
Day 2



Day 4



Day 6



Σχήμα 7. 8. Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης MSCs σε εμπορικές μεμβράνες πολυεστέρα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET), με και χωρίς επικάλυψη κολλαγόνου (αντίστοιχα reference και collagen-coated membranes) εντός πιάτου 24 πηγάδιων για χρόνο 6 ημερών. Οι μεμβράνες υποστηρίζουν την ομαλή ανάπτυξη των MSCs, με τις επικαλυμμένες με κολλαγόνο να ευνοούν περισσότερο την ομοιομορφία και ταχύτητα εξάπλωσής τους. Για τις ημέρες 4^η και 6^η, με κόκκινους κύκλους εικονίζονται τοπικές ανομοιόμορφες συγκεντρώσεις κυττάρων, με κίτρινους κύκλους η παρουσία κενών από κύτταρα περιοχών, και με μπλε βέλη ο σπειροειδής σχηματισμός ιστού στρώματος. Προς διευκόλυνση παρατήρησης, την 6^η ημέρα στα πηγάδια αναφοράς παρουσιάζονται σε μεγέθυνση ενδεικτικά μια περιοχή με κόκκινο κύκλο και μία με μπλε βέλος. Με πράσινες εστιγμένες καμπύλες υποδεικνύονται στην πρώτη περίπτωση τα κύτταρα ανομοιόμορφα συσσωρευμένα, και στη δεύτερη, με πράσινες καμπύλες οι νοητές σπειροειδείς διαδρομές των κυττάρων.

Αρχικά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει δυσκολία στην παρατήρηση των κυττάρων λόγω μη διαπερατότητας της εμπορικής μεμβράνης, γεγονός που δημιουργεί θόρυβο στις εικόνες. Πέραν όμως αυτού, ως γενικά συμπεράσματα προκύπτουν ότι τα MSCs αναπτύσσονται ομαλά στη μεμβράνη PET, με και χωρίς την επικάλυψη κολλαγόνου, γεγονός που οφείλεται στην ούτως ή άλλως ειδική επιφανειακή επεξεργασία που έχουν υποστεί από τον κατασκευαστή, ευνοϊκή για την ανάπτυξη κυττάρων. Παρατηρείται όμως, μικρή ενίσχυση του βαθμού οργάνωσης και της ταχύτητας ανάπτυξης των MSCs παρουσία κολλαγόνου, όπως αντίστοιχα είχε παρατηρηθεί και στο PDMS.

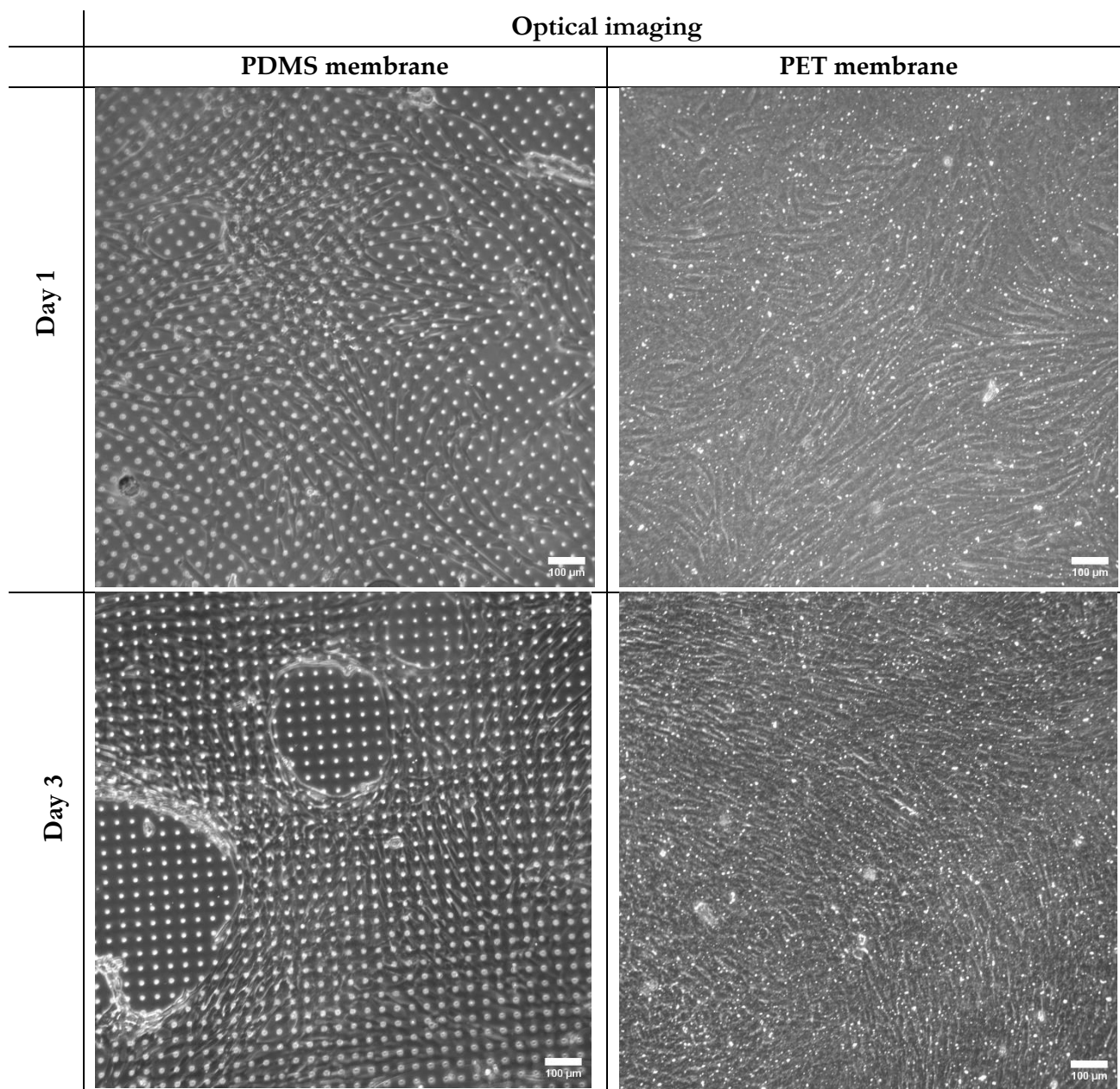
Ειδικότερα, στις μεμβράνες που έχουν επικαλυφθεί με κολλαγόνο, φαίνεται ότι προωθείται η αρχική προσκόλληση των MSCs, οδηγώντας από τις πρώτες ημέρες, και εν προκειμένω από την απεικονιζόμενη 2^η ημέρα σε ταχύτερη εξάπλωσή τους. Η συγκεκριμένη τάση παρατηρείται και τις επόμενες μέρες, όπου επιπλέον, από την 4^η ημέρα, από το σύνολο των παρατηρήσεων διακρίνεται κατά μέσο όρο περισσότερο ομοιόμορφη οργάνωση των MSCs στις μεμβράνες με το κολλαγόνο. Τα MSCs εμφανίζονται περισσότερο απλωμένα σε όλη την έκταση της επικαλυμμένης με κολλαγόνο μεμβράνης ως ένδειξης επιτυχούς προσκόλλησης, ενώ απουσία κολλαγόνου παρατηρούνται περισσότερο εντοπισμένες συνενώσεις MSCs (κόκκινοι κύκλοι), αφήνοντας έτσι περισσότερες κενές περιοχές (κίτρινοι κύκλοι). Την 6^η ημέρα τα MSCs αποκαλύπτουν το γνωστό σπειροειδή τρόπο οργάνωσής τους στις μεμβράνες με και χωρίς κολλαγόνο, κατορθώνοντας επιπλέον να καλύψουν το μεγαλύτερο μέρος των μεμβρανών με στρωματικό ιστό. Με μπλε βέλη υποδεικνύεται η σπειροειδής τους οργάνωση και στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα όμως απουσία κολλαγόνου, τα MSCs δεν έχουν αναπτυχθεί εξίσου, και η σπειροειδής τους εξάπλωση διακόπτεται κατά τόπους από ανομοιόμορφα σχηματισμένους πληθυσμούς κυττάρων (κόκκινοι κύκλοι). Συμπερασματικά, η μεμβράνη PET ενδείκνυται για την καλλιέργεια των MSCs, και με την επιπρόσθετη επίστρωσή της με κολλαγόνο επιτυγχάνεται ταχύτερη και καλύτερα οργανωμένη ανάπτυξή τους.

7.2.3 Συγκριτική μελέτη καλλιέργειας μεσεγγυματιών βλαστοκυττάρων σε μεμβράνες τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) και πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS) στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας

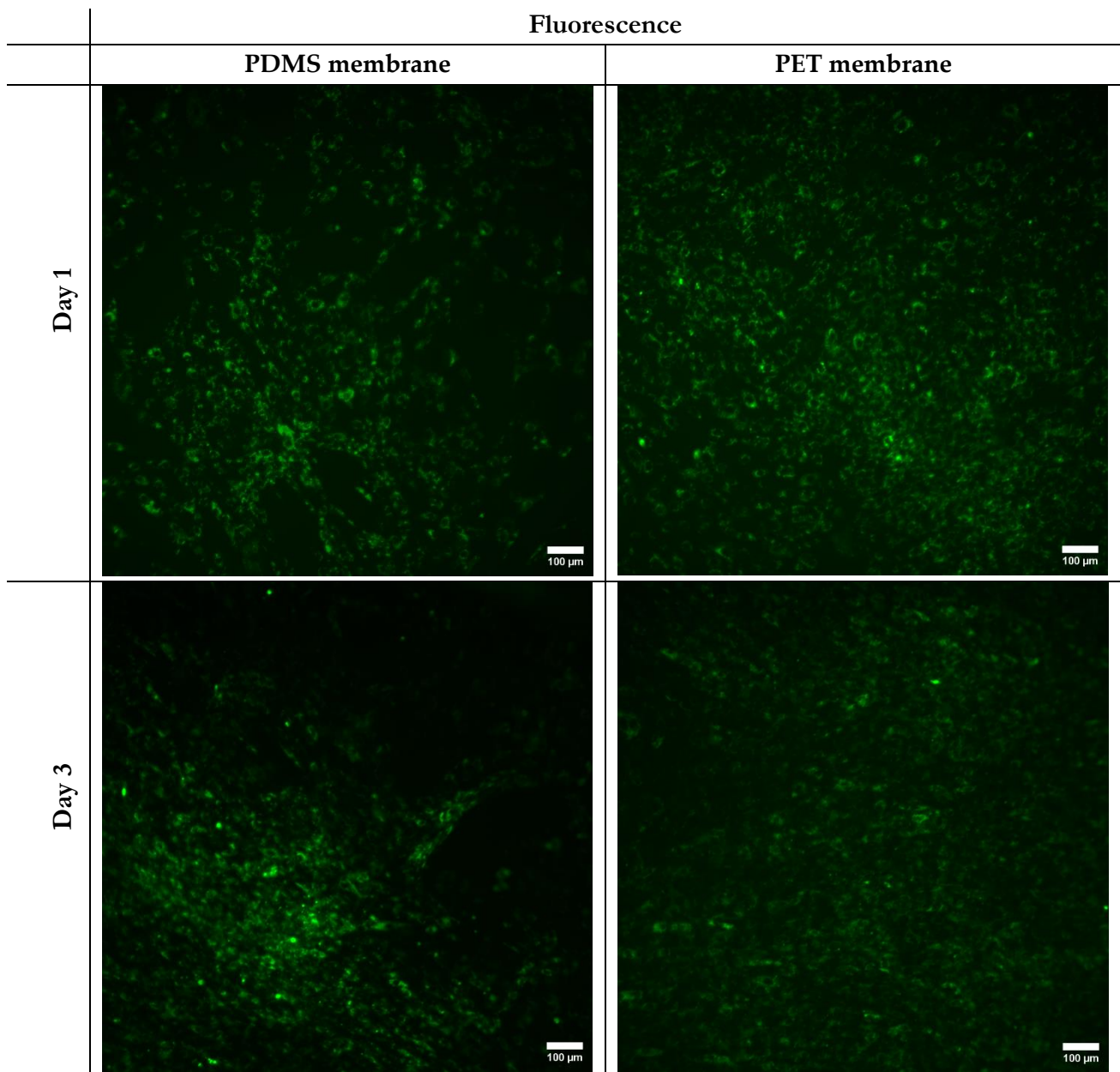
Έχοντας αποδείξει τη βιο-συμβατότητα της μεμβράνης PET, προκειμένου να αποφασιστεί αν θα προτιμηθεί έναντι της κατασκευασμένης PDMS διενεργείται καλλιέργεια UC-MSCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών με τα δύο είδη μεμβρανών. Συγκεκριμένα, τα MSCs σημάθηκαν με την πράσινη χρωστική diO με αραιώση 1:100, και τοποθετήθηκαν στη συνέχεια με αρχική συγκέντρωση 5.6×10^5 cells/mL στο μικροθάλαμο καλλιέργειας της κάθε μικροδιάταξης. Ο μικροθάλαμος είχε προγενέστερα επικαλυφθεί με κολλαγόνο, καλύπτοντας έτσι και την εκάστοτε μεμβράνη. Οι μικροδιάταξεις βυθίστηκαν η καθεμία σε τρυβλίο 35 mm γεμάτο με θρεπτικό υλικό και τοποθετήθηκαν εντός του επωαστήρα στις κατάλληλες συνθήκες. Λόγω της

υψηλής αρχικής συγκέντρωσης MSCs, η συγκριτική καλλιέργεια στις δύο μεμβράνες διήρκησε 3 ημέρες, κατά τις οποίες τα MSCs παρατηρούνταν καθημερινά στο ανάστροφο μικροσκόπιο Leica DM IRE2, ενώ η μικροδιάταξη με τη μεμβράνη PDMS διατηρήθηκε επιπλέον μέχρι την 5^η ημέρα, όπου και παρατηρήθηκε στο συνεστιακό μικροσκόπιο Aurox.

Ακολουθούν αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικού και φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) των MSCs στα Σχήματα 7.9 και 7.10, αντίστοιχα, για κάθε είδος μεμβράνης της μικροδιάταξης την 1^η και 3^η ημέρα. Επιπρόσθετα, στο Σχήμα 7.11 απεικονίζεται γραφικά η επιφάνεια του μικροθαλάμου (μm^2) της μικροδιάταξης που καλύπτεται από MSCs τις αντίστοιχες ημέρες και για τις δύο μεμβράνες. Το γράφημα είναι αποτέλεσμα ανάλυσης στο ImageJ τουλάχιστον 5 εικόνων για κάθε είδος μεμβράνης και κάθε ημέρα.



Σχήμα 7. 9. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) της ανάπτυξης των MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με πορώδη μεμβράνη PDMS και PET την 1^η και 3^η ημέρα. Διακρίνεται περισσότερο ομοιόμορφη εξάπλωση των MSCs συνολικά στην επιφάνεια της μεμβράνης PET.

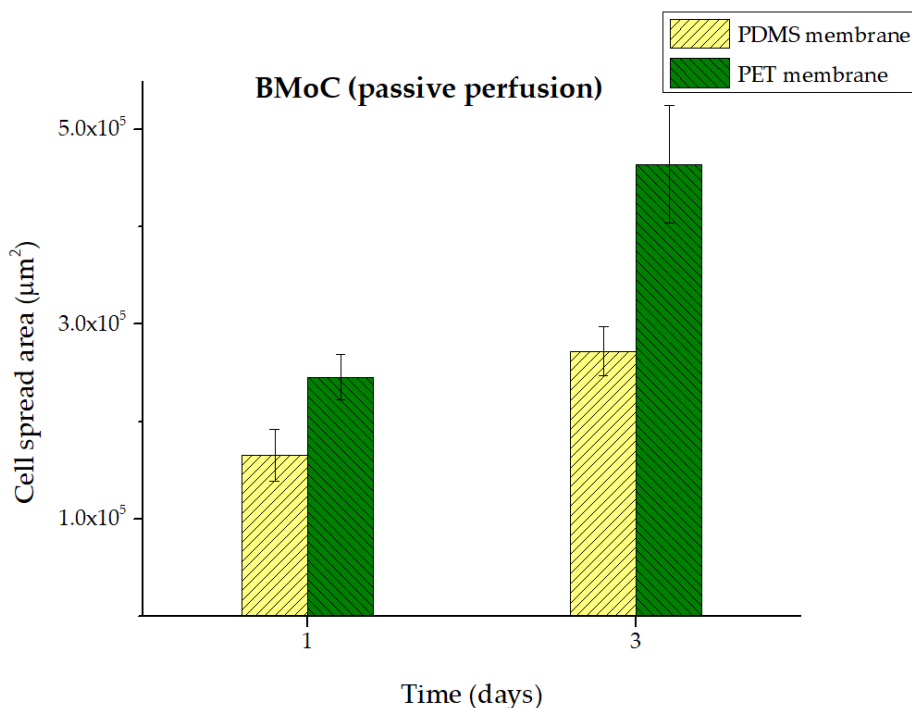


Σχήμα 7. 10. Εικόνες φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) των MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με πορώδη μεμβράνη PDMS και PET κατά την 1^η και 3^η ημέρα. Στη μεμβράνη PDMS εντοπίζονται περισσότερο εκτεταμένες σκοτεινές περιοχές, δηλωτικές μεγαλύτερης ανομοιομορφίας ιστού στρώματος.

Είναι εμφανές τόσο από τις εικόνες οπτικού, όσο και από τις φθορισμού, ότι τα MSCs εμφανίζουν περισσότερο ομοιόμορφη εξάπλωση πάνω στη μεμβράνη PET. Το γεγονός αυτό διακρίνεται από την 1^η ημέρα, όπου τα MSCs στη μεμβράνη PET έχουν καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς της, διατηρώντας την ομαλή ατρακτοειδή μορφολογία τους και σχηματίζοντας σπειροειδή ιστό. Η ομαλή ανάπτυξή τους συνεχίζεται μέχρι και την 3^η ημέρα, όπου έχει επιτευχθεί πλήρης συρροή. Προκύπτει δηλαδή ανάλογη συμπεριφορά των κυττάρων στη μεμβράνη PET εντός του μικροθαλάμου με εκείνη εντός του πιάτου 24 πηγαδιών. Αντιθέτως,

πάνω στη μεμβράνη PDMS παρατηρείται ανομοιομορφία στην οργάνωση των κυττάρων την 1^η ημέρα, τα οποία εμφανίζουν την τάση να συνενωθούν αφήνοντας περιοχές ακάλυπτες. Τις επόμενες ημέρες μέχρι την 3^η, αποκαλύπτεται η συστηματική τήρηση των περιοχών αυτών κενών από ιστό, με τα MSCs να αποφεύγουν την εξάπλωσή τους σε αυτές, προτιμώντας αντί αυτού να αναπτυχθούν καθ' ύψος. Οι εικόνες φθορισμού παρουσιάζουν με μεγαλύτερη ευκρίνεια αυτές τις παρατηρήσεις. Έτσι, ενώ στη μεμβράνη PET παρατηρείται ομοιόμορφη εξάπλωση των σημασμένων MSCs την 1^η και 3^η ημέρα, στη μεμβράνη PDMS είναι διακριτός ο διαχωρισμός απολύτως σκοτεινών περιοχών από τις φθορίζουσες. Μάλιστα την 3^η ημέρα, το φαινόμενο είναι περισσότερο έντονο με την αύξηση του πληθυσμού των MSCs, καθώς εμφανίζεται κατά τόπους μεγαλύτερη πυκνότητα κυττάρων σε σχέση και με τη μεμβράνη PET, ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων, ενώ συνεχίζουν να υπάρχουν οι ίδιες σκοτεινές περιοχές χωρίς κύτταρα.

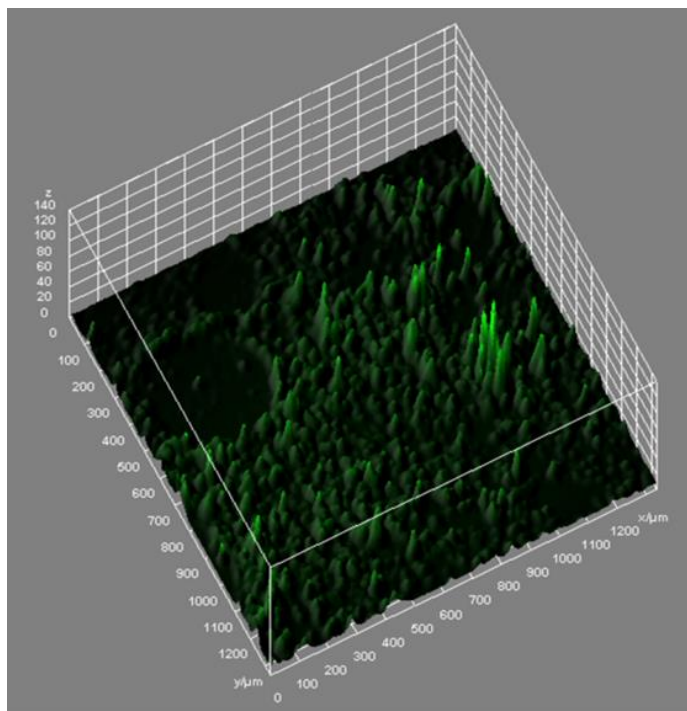
Προς ποσοτικό χαρακτηρισμό των παρατηρήσεών μας, από την ανάλυση των εικόνων φθορισμού, η μέση επιφάνεια κάλυψης με MSCs (Σχήμα 7.11) την 1^η ημέρα προέκυψε $1.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ για τη μεμβράνη PDMS και $2.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ και για την PET, δηλαδή περίπου 1.5 φορές μεγαλύτερη. Την 3^η ημέρα, η μεμβράνη PDMS είχε μέση κάλυψη $2.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, έναντι $4.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ στην PET, επαυξημένη κατά σχεδόν 1.7 φορές. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν σε ποσοστά κάλυψης 15% και 26%, για τη μεμβράνη PDMS και PET, αντίστοιχα, τουλάχιστον δηλαδή 10% μεγαλύτερη κάλυψη στην PET. Επαληθεύεται έτσι, η μεγαλύτερη επιφανειακή εξάπλωση των MSCs στη μεμβράνη PET. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις πάχους του σχηματιζόμενου ιστού στις δύο μεμβράνες, οι οποίες την 3^η ημέρα έδωσαν τιμές $74.4 \pm 3.6 \mu\text{m}$ και $59.5 \pm 5.8 \mu\text{m}$ στη μεμβράνη PDMS και PET, αντίστοιχα. Να σημειωθεί πως στη μεμβράνη PDMS, λόγω μη ύπαρξης συνεχούς ιστού, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τοπικά, όπου υπήρχε ιστός. Το μεγαλύτερο πάχος ιστού στη μεμβράνη PDMS επιβεβαιώνει ποσοτικά την καθ' ύψος συσσώρευση των MSCs.



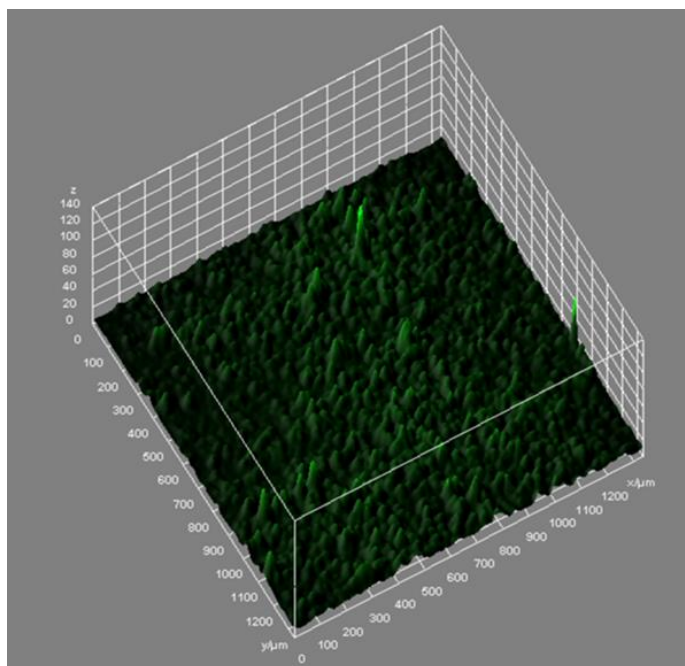
Σχήμα 7. 11. Μέση επιφάνεια κάλυψης με MSCs (μm^2) στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με ενσωματωμένη πορώδη μεμβράνη PDMS και PET, κατά την 1^η και 3^η ημέρα. Αν και στις δύο μεμβράνες εμφανίζεται αύξηση της επιφανειακής κάλυψης από την 1^η στην 3^η ημέρα, η μεμβράνη PET παρουσιάζει μεγαλύτερη εξάπλωση των MSCs, σχεδόν διπλάσια σε σχέση με τη μεμβράνη PDMS την 3^η ημέρα.

Ως προς τις εντοπιζόμενες ασυνέχειες αυτές στον ιστό της μεμβράνης PDMS, οφείλονται πιθανόν στην παρουσία υπολειμμάτων CF_x σε αυτή, που προέρχονται από την απόθεση του υδρόφοβου υμενίου CHF_3 στο φορέα PDMS, πάνω στον οποίο βρισκόταν κατά την κατασκευή της (βλ. Κεφάλαιο 3). Η ύπαρξή τους υποδηλώνει τη μη προσκόλληση κολλαγόνου, και κατ'επέκταση κυττάρων, καθώς είναι γνωστό ότι οι ομάδες φθοράνθρακα ($-CF_x$) αποτρέπουν την προσκόλλησή τους [11]. Πράγματι, στη μεμβράνη PDMS οι περιοχές με τα υδρόφοβα υπολείμματα παραμένουν σταθερά με τις ημέρες ακάλυπτες από MSCs. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.12 η 3D κατανομή του ιστού πάνω στα δύο είδη μεμβρανών την 3^η ημέρα. Οι συγκεκριμένες κατανομές προέκυψαν με χρήση του λογισμικού ImageJ από χαρακτηριστικές για κάθε μεμβράνη εικόνες φθορισμού. Στη μεμβράνη PDMS διακρίνονται σχηματισμένες εκτεταμένες κυκλικές σκοτεινές περιοχές, το πλήθος τουλάχιστον 2, σε αντίθεση με τη μεμβράνη PET όπου υπάρχει φθορισμός σχεδόν σε όλη την επιφάνεια. Επιπλέον, οι φθορίζουσες περιοχές στη μεμβράνη PDMS εμφανίζουν μεγαλύτερες υψομετρικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τη μεμβράνη PET, ενδεικτικό της ανομοιογενούς ανάπτυξης των MSCs και της επέκτασής τους καθ'όψος.

a.

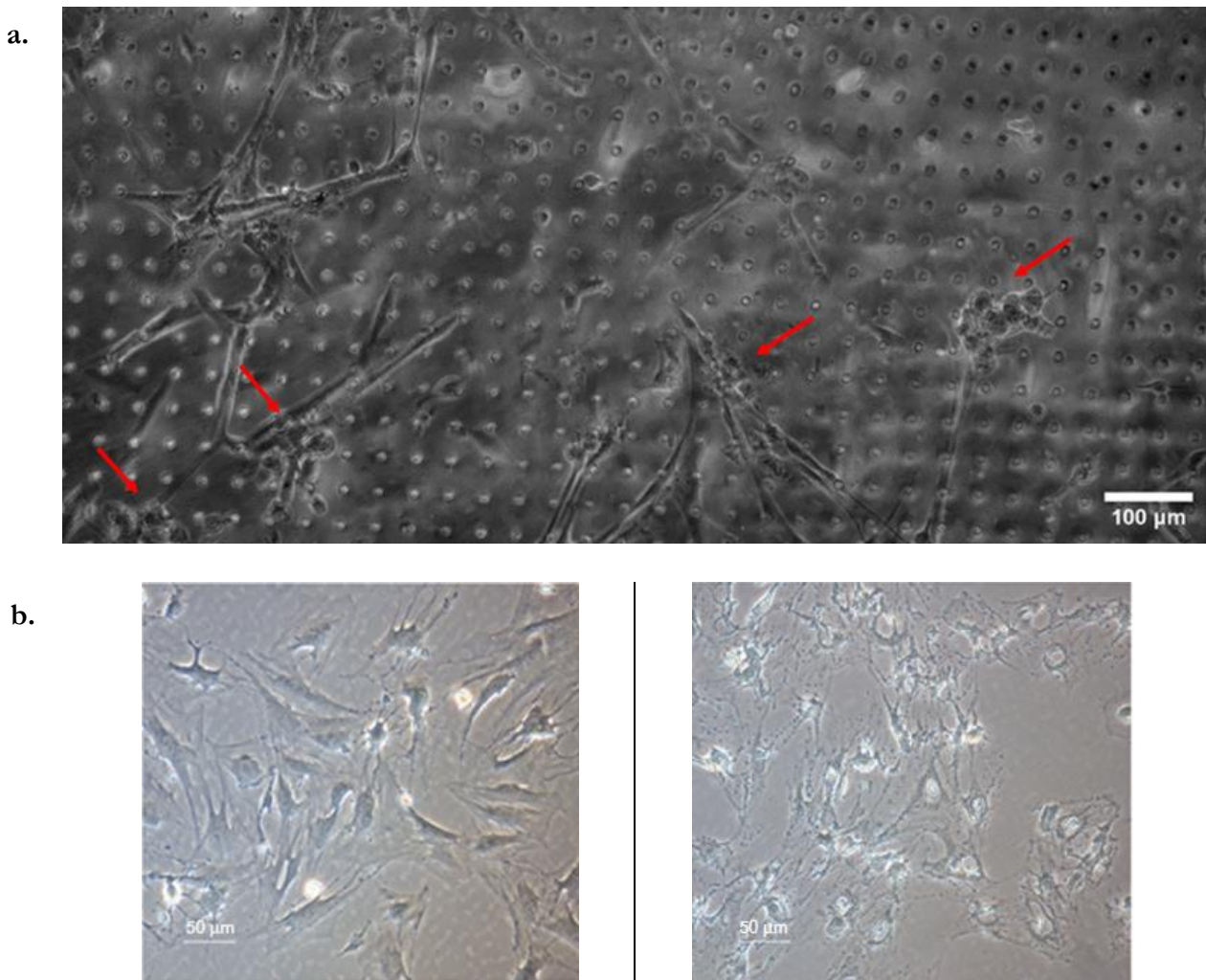


b.



Σχήμα 7. 12. 3D κατανομή ιστού στρώματος από την καλλιέργεια MSCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας πάνω στην πορώδη μεμβράνη α) PDMS, και β) PET την 3^η ημέρα, με βάση αντίστοιχες χαρακτηριστικές εικόνες φθορισμού. Στη μεμβράνη PDMS εμφανίζονται εκτεταμένες σκοτεινές περιοχές, ενδεικτικές απουσίας ιστού, και τοπικά μεγαλύτερες υψομετρικές διαφορές κατανομής ιστού λόγω αποφυγής επέκτασης σε περιοχές με υπολείμματα CF_x. Στη μεμβράνη PET σχεδόν σε όλη η επιφάνεια εντοπίζεται φθορίζων ιστός, που αποδεικνύει την ομοιόμορφη ανάπτυξη των MSCs σε αυτή.

Παρατήρηση την 5^η ημέρα της μεμβράνης PDMS της μικροδιάταξης στο συνεστιακό μικροσκόπιο Aurox, επιβεβαίωσε τις προαναφερόμενες παρατηρήσεις, όπως φαίνεται από την οπτική εικόνα (μεγέθυνση 10x) του Σχήματος 7.13a. Είναι έκδηλη η ύπαρξη αραιών περιοχών κενών από ιστό, η δημιουργία συνενώσεων MSCs, και η ανάπτυξή τους σε διαφορετικά ύψη. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ορισμένα MSCs εμφανίζουν αποπτωτική εικόνα. Ειδικότερα, η απόπτωση χαρακτηρίζεται ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που σε αντίθεση με τον τελευταίο, είναι μια ενεργή και εξαιρετικά ρυθμιζόμενη διαδικασία ως αμυντικός μηχανισμός για τη διατήρηση της εσωτερικής περιβαλλοντικής ομοιόστασης [12]. Συντελείται μια σειρά από μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στο κύτταρο, εκ των οποίων οι μορφολογικές περιλαμβάνουν τη σμίκρυνση και στρωγγυλοποίηση των κυττάρων, τη συμπύκνωση του πυρήνα, τη μετέπειτα διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και τέλος, τη διάρρηξη του κυττάρου σε επιμέρους σώματα (αποπτωτικά σώματα). Στο Σχήμα 7.13b, απεικονίζονται χαρακτηριστικές εικόνες αποπτωτικών MSCs από τη βιβλιογραφία [13], και κατ' αντιστοιχία, στο Σχήμα 7.13a υποδεικνύονται με βέλη MSCs στρωγγυλοποιημένου σχήματος στη μεμβράνη PDMS με εμφανή σημάδια απόπτωσης.



Σχήμα 7. 13. a) Εικόνα συνεστιακού μικροσκοπίου των MSCs στη μεμβράνη PDMS κατά την 5^η ημέρα καλλιέργειας. Τα MSCs δε δημιούργησαν συνεχή ιστό, ενώ σε κάποιες περιοχές υπήρξαν σημάδια απόπτωσης (κόκκινα βέλη). b) Εικόνες απόπτωσης MSCs κατά την επώασή τους με διάλυμα νανοπολυμερούς χαμηλής τοξικότητας, και συγκεκριμένα, πολυαιθυλενιμίνης₆₀₀-β-κυκλοδεξτρίνης (polyethylenimine₆₀₀-β-cyclodextrin/PEI₆₀₀-β-CyD) (αριστερά) και υψηλού μοριακού βάρους (25 kDa) πολυαιθυλενιμίνης (PEI₂₅kDa) (δεξιά)[13].

Η ύπαρξη υδρόφοβων υπολειμμάτων στη μεμβράνη PDMS ως τμήμα της κατασκευαστικής της διαδικασίας, και η δυσκολία ενδεχόμενης απομάκρυνσής τους, σε συνδυασμό με τα παραπάνω εξαγόμενα συμπεράσματα για την ανάπτυξη των MSCs, μάς οδηγεί στην καταλληλότητα της μεμβράνης PET προς ενσωμάτωση στη μικροδιάταξη. Για το λόγο αυτό, όσα πειράματα ακολούθούν πραγματοποιήθηκαν σε μικροδιάταξεις με τη μεμβράνη PET.

7.2.4 Συγκριτική μελέτη καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητική τροφοδοσία

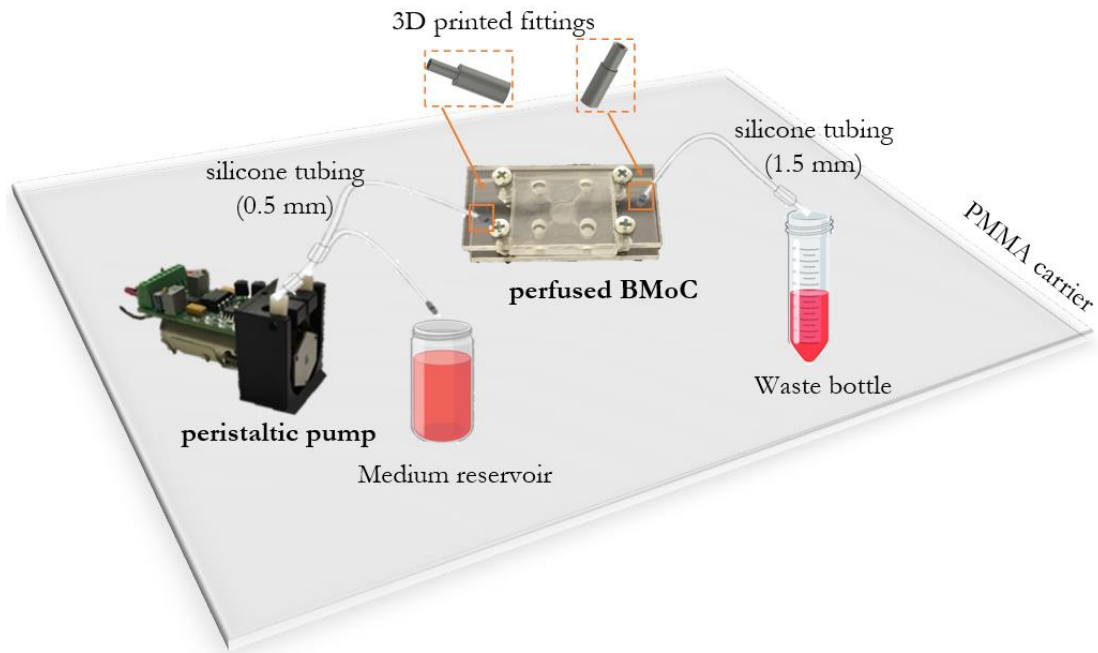
Στη συγκεκριμένη ενότητα επιχειρείται η σύγκριση των δύο μικροδιατάξεων μυελού των οστών, υπό ροή και παθητική τροφοδοσία, ως προς την ικανότητά τους να συντηρήσουν μια βιώσιμη καλλιέργεια MSCs και να δημιουργήσουν υγιή στρωματικό ιστό. Και οι δύο διατάξεις, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, είναι κατασκευασμένα με την εμπορική μεμβράνη PET. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις UC-MSCs, μια χαμηλή 1.1×10^5 cells/mL και μια υψηλή 6.4×10^5 cells/mL, με τα MSCs να έχουν προγενέστερα σημανθεί με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική diO πριν την είσοδό τους στους επικαλυμένους με κολλαγόνο μικροθαλάμους καλλιέργειας των δύο μικροδιατάξεων. Η μικροδιάταξη υπό ροή συνδέθηκε με περισταλτική μικροαντλία ροής περίπου 13 $\mu\text{L}/\text{min}$ (13.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) (αναλυτικά η χρησιμοποιηθείσα διάταξη στην ακόλουθη παράγραφο), ενώ η παθητικής τροφοδοσίας βυθίστηκε σε τρυβλίο 35 mm με θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεωνόταν σχεδόν καθημερινά, αναλόγως των πειραματικών αναγκών. Οι δύο μικροδιατάξεις τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα και παρατηρούνταν καθημερινά στο μικροσκόπιο Leica DM IRE2.

7.2.5.1 Χρησιμοποιηθείσα διάταξη και συνδεσμολογία για τη μικροδιάταξη υπό ροή

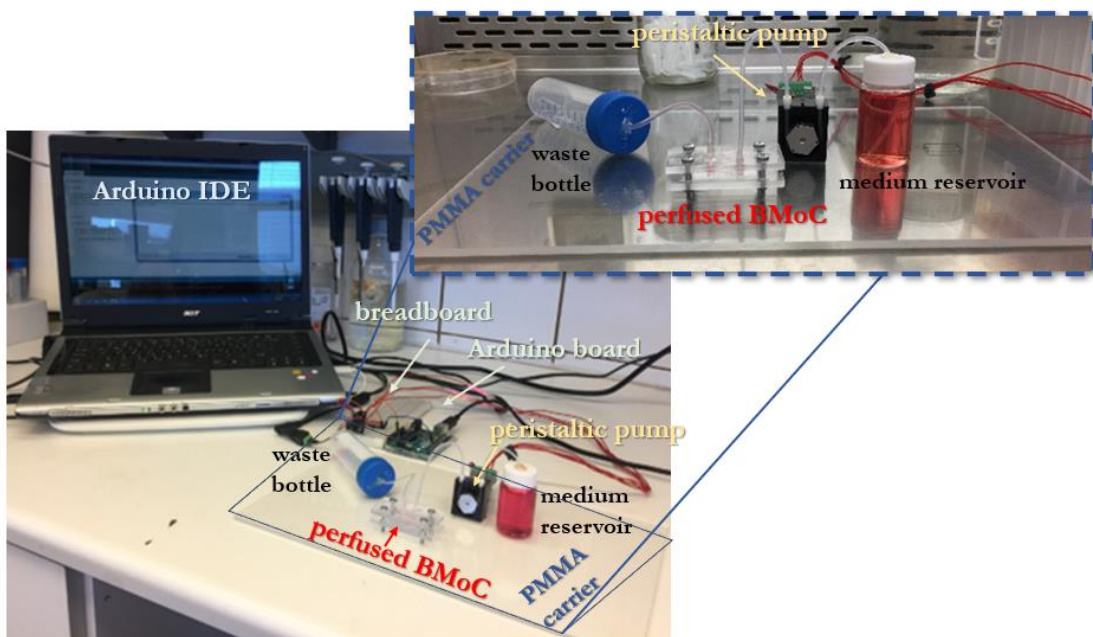
Στο Σχήμα 7.14a αποδίδεται σχηματικά η πειραματική διάταξη και συνδεσμολογία της μικροδιάταξης υπό ροή με την περισταλτική αντλία υπολογιστικά ελεγχόμενης ροής. Συγκεκριμένα, η μικροδιάταξη είναι τοποθετημένη στην κατάλληλα σχεδιασμένη συσκευή συγκράτησης (chip holder) πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) (βλ. Κεφάλαιο 3), και συνδέεται στην είσοδο και την έξοδο του μικροθαλάμου τροφοδοσίας με την μικροαντλία P625/900 και το φιαλίδιο αποβλήτων (50 mL), αντίστοιχα. Η σύνδεση πραγματοποιείται μέσω των κατασκευασμένων με 3D εκτύπωση ειδικών προσαρμογών (fittings) (βλ. Κεφάλαιο 3), που εφαρμόζουν σε σωληνάκια σιλικόνης εξωτερικής διαμέτρου 2 mm και εσωτερικής 0.5 mm στην είσοδο της μικροδιάταξης, και αντίστοιχων διαμέτρων 3.5 mm και 1.5 mm στην έξοδό του. Η συνδεσμολογία ολοκληρώνεται με την αντλία να συνδέεται στο άλλο άκρο της με το φιαλίδιο τροφοδοσίας (20 mL). Το όλο σύστημα τοποθετείται πάνω σε δίσκο PMMA διαστάσεων $32 \times 20 \text{ cm}^2$, ώστε να διευκολύνεται η μετακίνησή του.

Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, η αντλία συνδέεται με τη διαμεσολάβηση πλακέτας breadboard με την πλακέτα Arduino, και έτσι μέσω του προγραμματιστικού περιβάλλοντος (IDE) Arduino, πραγματοποιείται έλεγχος της ροής. Στο Σχήμα 7.14b φαίνεται η διάταξη σε σύνδεση με τον υπολογιστή, και σε μεγέθυνση παρουσιάζεται η συνδεσμολογία της. Τέλος κατά την πειραματική διαδικασία, ο δίσκος PMMA με την αντλία και τη μικροδιάταξη τοποθετούνται εντός του επωαστήρα, ενώ οι πλακέτες και ο υπολογιστής στην κορυφή, και στα πλαϊνά του επωαστήρα, αντίστοιχα.

a.



b.

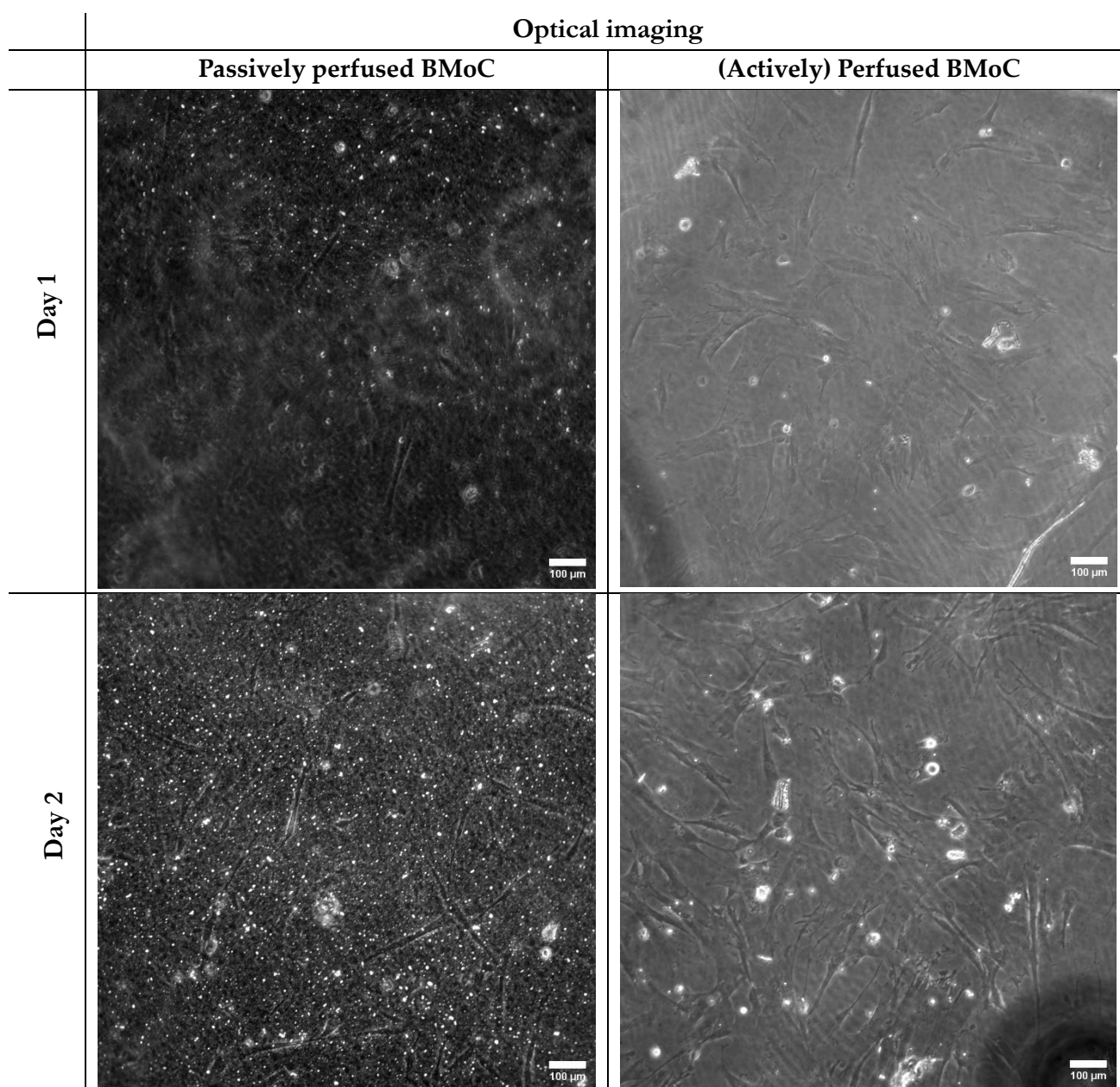


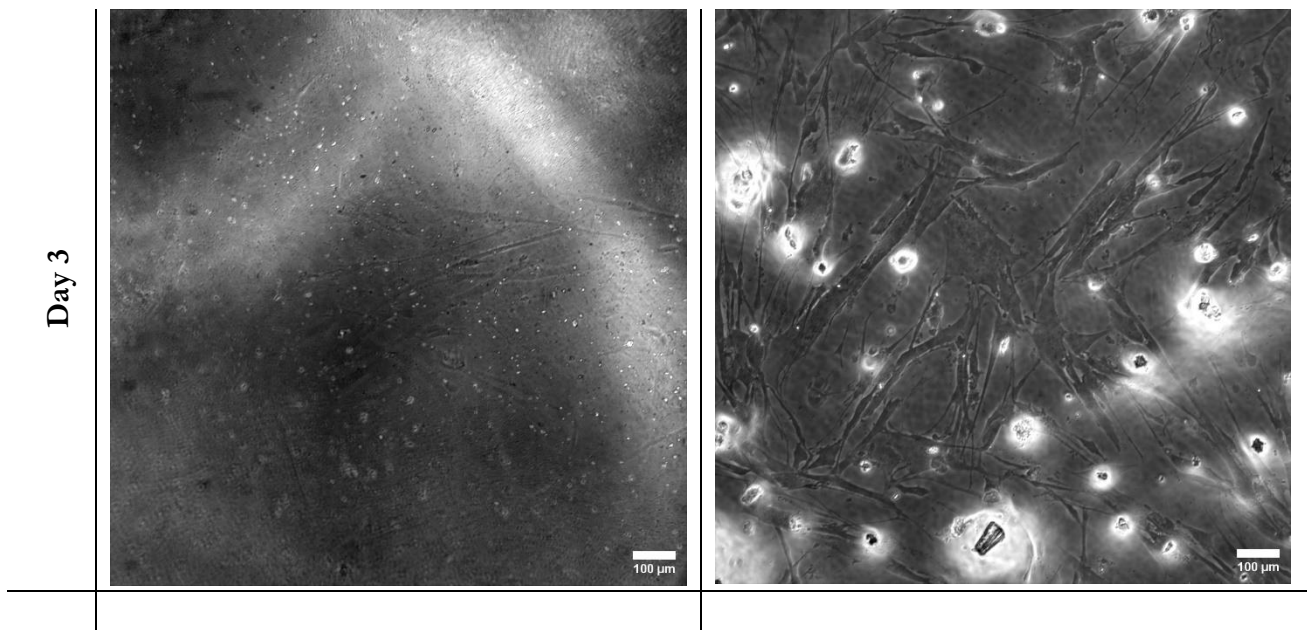
Σχήμα 7. 14. a) Σχηματική αναπαράσταση της χρησιμοποιηθείσας διάταξης και συνδεσμολογίας για την υπό ροή λειτουργία της μικροδιάταξης μυελού των οστών σε ψηφίδα (perfused BMOc). Η μικροδιάταξη διαθέτει ειδικά κατασκευασμένους με 3D εκτύπωση προσαρμογείς για τη σύνδεσή της με περισταλτική αντλία και το φιαλίδιο αποβλήτων (50 mL) (waste bottle), με σωληνάκια σιλικόνης εσωτερικής διαμέτρου 0.5 mm και 1.5 mm, αντίστοιχα. Η άντληση θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται από το φιαλίδιο τροφοδοσίας (20 mL) (medium reservoir) παρέχοντας ροή 13 $\mu\text{L}/\text{min}$ στη μικροδιάταξη. Όλο το σύστημα τοποθετείται σε δίσκο PMMA 32 x 20 cm^2 (PMMA carrier) για ευχέρεια μετακινήσεων. b) Φωτογραφία σύνδεσης της διάταξης με υπολογιστή προς ρύθμιση της ροής. Η αντλία συνδέεται με πλακέτα Arduino (Arduino board) που ελέγχει μέσω του προγραμματιστικού περιβάλλοντος (IDE) Arduino την εφαρμοζόμενη ροή. Σε μεγέθυνση φωτογραφία της πειραματικής διάταξης τοποθετημένης στο δίσκο PMMA.

i) Χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων

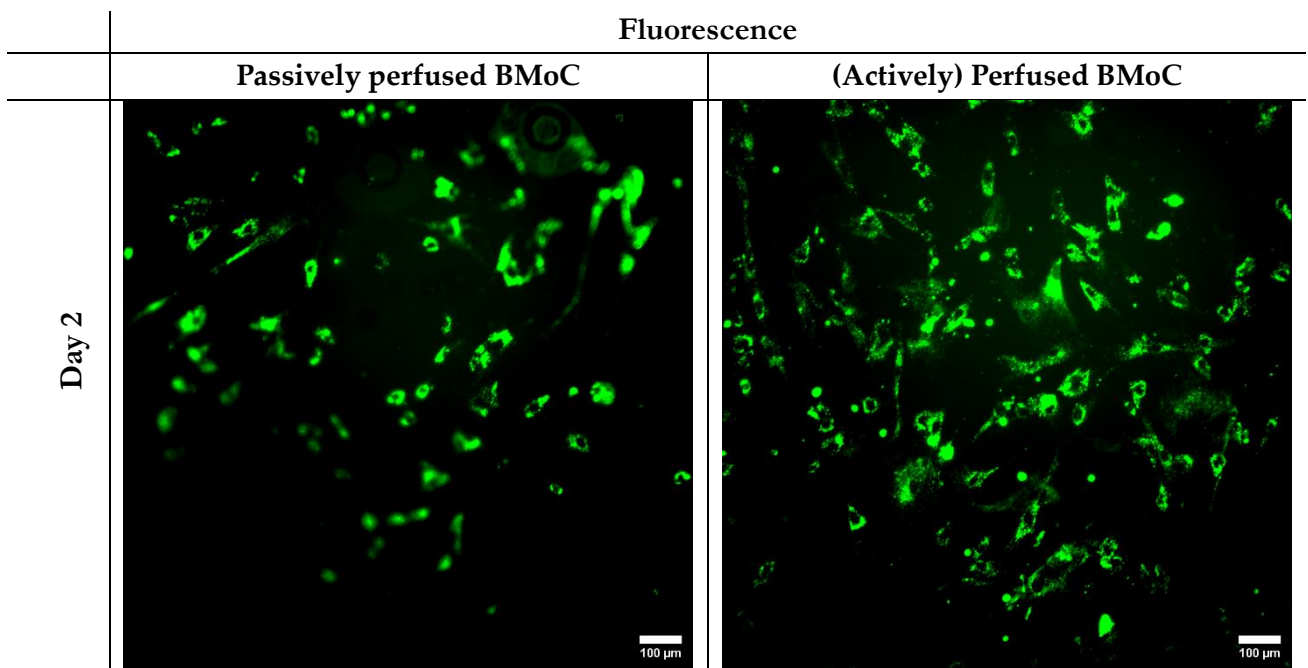
Οι δύο μικροδιατάξεις με UC-MSCs κυτταρικού περάσματος 7 και αρχικής συγκέντρωσης 1.1×10^5 cells/mL παρατηρήθηκαν για 3 ημέρες με οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού. Η μικροδιατάξη ενεργούς τροφοδοσίας διατηρήθηκε και την 4^η ημέρα προς παρατήρηση στο συνεστιακό Aurox.

Στο Σχήμα 7.15 απεικονίζονται χαρακτηριστικά εικόνες οπτικού από την 1^η έως την 3^η ημέρα, και στο Σχήμα 7.16 εικόνες φθορισμού από τη 2^η και 3^η ημέρα (μεγέθυνσης 10x). Επιπλέον, μετά από ανάλυση των εικόνων φθορισμού αποδίδεται στο Σχήμα 7.17 box-and-whisker γράφημα της επιφάνειας του μικροθαλάμου (μm^2) της μικροδιατάξης που καταλαμβάνουν τα MSCs, συγκριτικά για τα δύο μικροδιατάξεις τη 2^η και 3^η ημέρα.

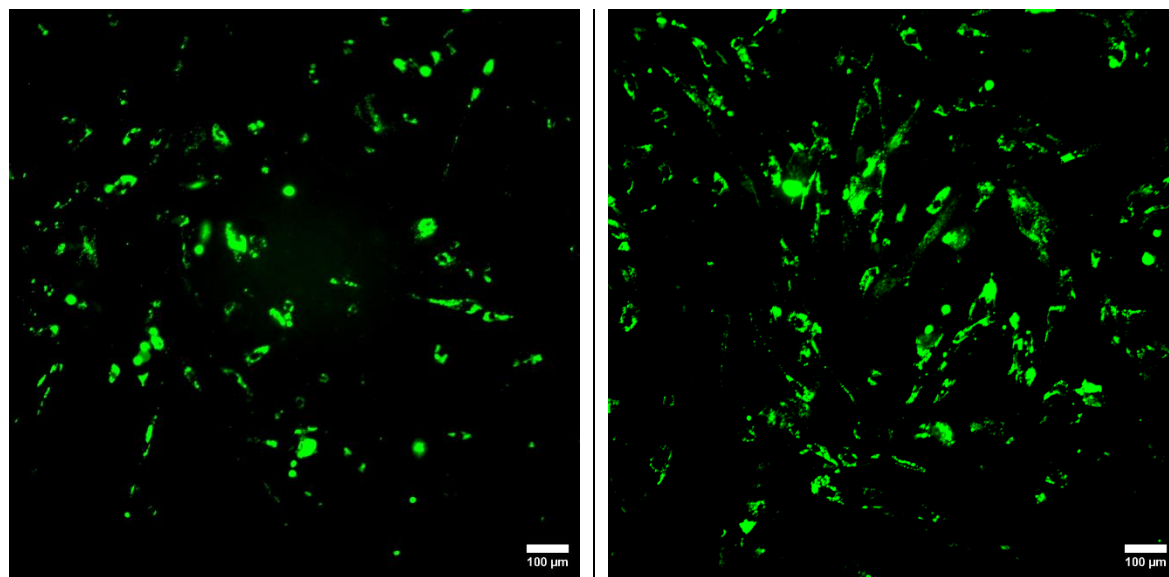




Σχήμα 7. 15. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) καλλιέργειας MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητική τροφοδοσία μέχρι την 3^η ημέρα. Τα MSCs εμφανίζουν αριθμητική υπεροχή στη μικροδιάταξη υπό ροή όλες τις ημέρες, ενώ την 3^η ημέρα φαίνεται να ανακόπτεται η ανάπτυξή τους και στις δύο μικροδιατάξεις (όπως επιβεβαιώνεται ποσοτικά από τις παρακάτω εικόνες φθορισμού).



Day 3



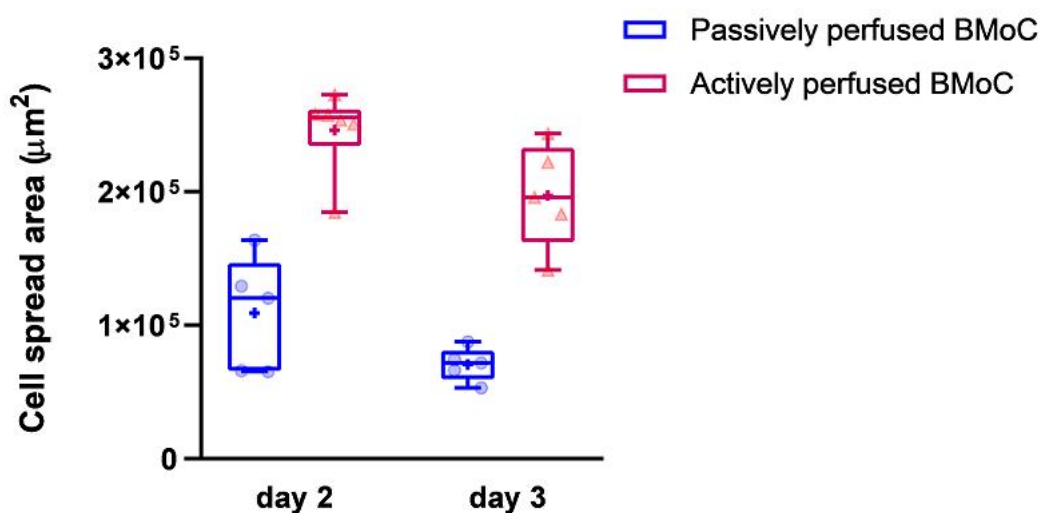
Σχήμα 7. 16. Εικόνες φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) χρονικής εξέλιξης καλλιέργειας MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητική τροφοδοσία από την 1^η μέχρι την 3^η ημέρα. Τα MSCs είναι περισσότερα σε πλήθος στη μικροδιάταξη υπό ροή.

Καταρχάς, θα πρέπει να σημειωθεί, όπως διακρίνεται και από το διαφορετικό υπόβαθρο των οπτικών εικόνων των δύο μικροδιατάξεων του Σχήματος 7.15, ότι τα MSCs αναπτύσσονται σε διαφορετικό υπόστρωμα σε καθεμία από τις δύο διατάξεις, και συγκεκριμένα, στην παθητικής τροφοδοσίας πάνω στη μεμβράνη PET, ενώ στην ενεργούς τροφοδοσίας πάνω στο γυαλί. Επιπλέον, ένα γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από τις εικόνες αυτές είναι ότι στη διάταξη δυναμικής τροφοδοσίας διακρίνεται μεγαλύτερος πληθυσμός MSCs σε σχέση με της παθητικής όλες τις ημέρες. Ειδικότερα, από την 1^η στη 2^η ημέρα παρουσιάζεται μικρή πληθυσμιακή αύξηση των κυττάρων και στις δύο διατάξεις, γεγονός όμως που ανακόπτεται μεταβαίνοντας από τη 2^η στην 3^η ημέρα. Μάλιστα, την 3^η ημέρα τα MSCs είναι εμφανώς στρεσαρισμένα και στις δύο διατάξεις, έχοντας απωλέσει σε αρκετές περιπτώσεις την ατρακτοειδή μορφολογία τους, αποκτώντας ένα στενόμακρο νηματοειδές σχήμα.

Καλύτερη εικόνα της ανάπτυξης των κυττάρων στις δύο μικροδιατάξεις, μπορεί να αποκτηθεί από τις εικόνες φθορισμού του Σχήματος 7.16. Πράγματι, με το φθορισμό γίνεται περισσότερο ευδιάκριτη η παρουσία MSCs στη μεμβράνη PET της μικροδιάταξης παθητικής τροφοδοσίας, και επιβεβαιώνεται η αριθμητική τους υπεροχή στην ενεργούς τροφοδοσίας ανά τις ημέρες.

Προς ποσοτικό προσδιορισμό της πληθυσμιακής τους εξέλιξης τη 2^η και 3^η ημέρα, παρατηρούμε το γράφημα box-and-whisker του Σχήματος 7.17. Το συγκεκριμένο γράφημα απεικονίζει την κατανομή όλων των τιμών των περιοχών εξάπλωσης των MSCs, προερχόμενων από κάθε εικόνα φθορισμού, καθώς και τη μέση περιοχή εξάπλωσης, για κάθε ημέρα και μικροδιάταξη. Είναι εμφανές ότι στη μικροδιάταξη ενεργούς τροφοδοσίας, όλες οι τιμές περιοχής εξάπλωσης MSCs παραμένουν σταθερά μεγαλύτερες από εκείνες της μικροδιάταξης παθητικής τροφοδοσίας και τις δύο ημέρες, σημειώνοντας μέσες τιμές $2.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ τη 2^η ημέρα και $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ την 3^η ημέρα, που αντιστοιχούν σε ποσοστά κάλυψης 14% και 11%, αντίστοιχα. Στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας οι μέσες τιμές για τη 2^η και 3^η ημέρα είναι $1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ και $0.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, με αντίστοιχα ποσοστά 6% και 4%. Με άλλα λόγια, η μέση περιοχή εξάπλωσης των MSCs είναι κατά περίπου 56% μικρότερη στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας την 2^η ημέρα, ποσοστό που αυξάνεται στο 64%

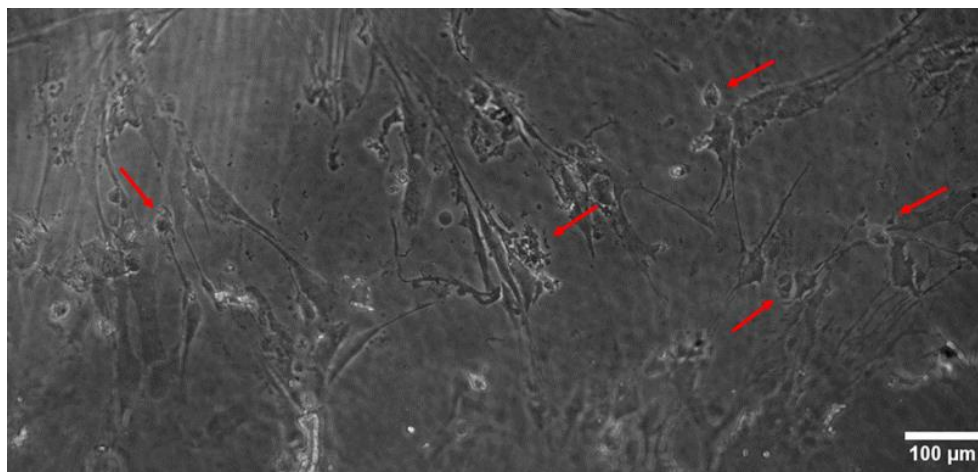
την 3^η ημέρα. Για κάθε μικροδιάταξη ξεχωριστά, η μείωση στη μέση περιοχή εξάπλωσης των MSCs από την 2^η στην 3^η ημέρα είναι περίπου 20% για τη μικροδιάταξη υπό ροή και περίπου 35% για τη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας. Η μείωση αυτή στην περιοχή εξάπλωσης των MSCs συμβαδίζει με την ποιοτική παρατήρηση της στρεσαρισμένης εικόνας των κυττάρων και σηματοδοτεί την παύση στην ανάπτυξή τους, και πολύ πιθανά το θάνατο ενός ποσοστού αυτών.



Σχήμα 7. 17. Περιοχή κάλυψης με MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις υπό ροή (ενεργός) και παθητική τροφοδοσία κατά τη 2^η και 3^η ημέρα. Η περιοχή κάλυψης μειώνεται από τη 2^η στην 3^η ημέρα και στις δύο μικροδιατάξεις, γεγονός που αποδίδεται σε σημαντικό ποσοστό στην αρχική χαμηλή συγκέντρωση εισόδου των MSCs. Και τις δύο ημέρες, η μικροδιάταξη υπό ροή εμφανίζει μεγαλύτερη κάλυψη λόγω μεγαλύτερης συχνότητας ανανέωσης του θρεπτικού υλικού. (n= 5, αριθμός των κουκκίδων/τριγώνων που φαίνονται στο σχήμα.)

Επιβαρυντικός παράγοντας στην ανάπτυξη των κυττάρων υπήρξε η αρκετά χαμηλή αρχική συγκέντρωση εισόδου τους στις μικροδιατάξεις, η χαμηλότερη που έχει δοκιμαστεί στα πλαίσια της εν λόγω διδακτορικής έρευνας. Η καλύτερη πληθυσμιακή απόκριση των MSCs στη μικροδιάταξη υπό ροή μπορεί να αιτιολογηθεί από το γεγονός ότι υπήρξε συνεχής τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό μέσω της αντλίας, ενώ στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας, η τροφοδοσία πραγματοποιείται μέσω διάχυσης από το τρυβλίο στο οποίο είναι βυθισμένη. Έτσι, η ανανέωση του θρεπτικού υλικού στο μικροθάλαμο καλλιέργειας της μικροδιάταξης υπό ροή πραγματοποιείται με μεγαλύτερη συχνότητα, ευνοώντας έτσι τη συντήρηση και αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού. Παρ' όλα αυτά, η ενεργός τροφοδοσία εμφανίστηκε με συνοδά προβλήματα, την παρουσία φυσαλίδων, σε συμφωνία με όσα αποδείχτηκαν στο Κεφάλαιο 5. Συγκεκριμένα, φυσαλίδες εισήλθαν ήδη από την προετοιμασία της μικροδιάταξης, πριν ακόμη την είσοδο των MSCs, ενώ μια εκτεταμένη φυσαλίδα δημιουργήθηκε στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας την 1^η ημέρα παρατήρησης των MSCs, αλλά και στο μικροθάλαμο καλλιέργειας την 3^η ημέρα, είτε λόγω επικοινωνίας με το μικροθάλαμο τροφοδοσίας, είτε λόγω δημιουργίας βαθμίδων πίεσης κατά τη διάρκεια πειραματικών χειρισμών. Έτσι, ενώ η συνεχής τροφοδοσία κατόρθωσε να συντηρήσει σε υψηλότερο πληθυσμιακό επίπεδο τα MSCs, η αναπόφευκτη είσοδος φυσαλίδων με το πέρασμα των ημερών δυσχέρυνε την επιβίωσή τους. Χαρακτηριστικά, παρατίθεται η εικόνα συνεστιακού

μικροσκοπίου των MSCs στη μικροδιάταξη υπό ροή την 4^η ημέρα στο Σχήμα 7.18, όπου τα κύτταρα είναι εμφανώς στρεσαρισμένα και παρουσιάζουν σημάδια απόπτωσης (κόκκινα βέλη). Κρίνεται συνεπώς απαραίτητη η επανάληψη του πειράματος σε υψηλότερη συγκέντρωση, προς περισσότερα ευκρινή συμπεράσματα, όπως αυτό που ακολουθεί.

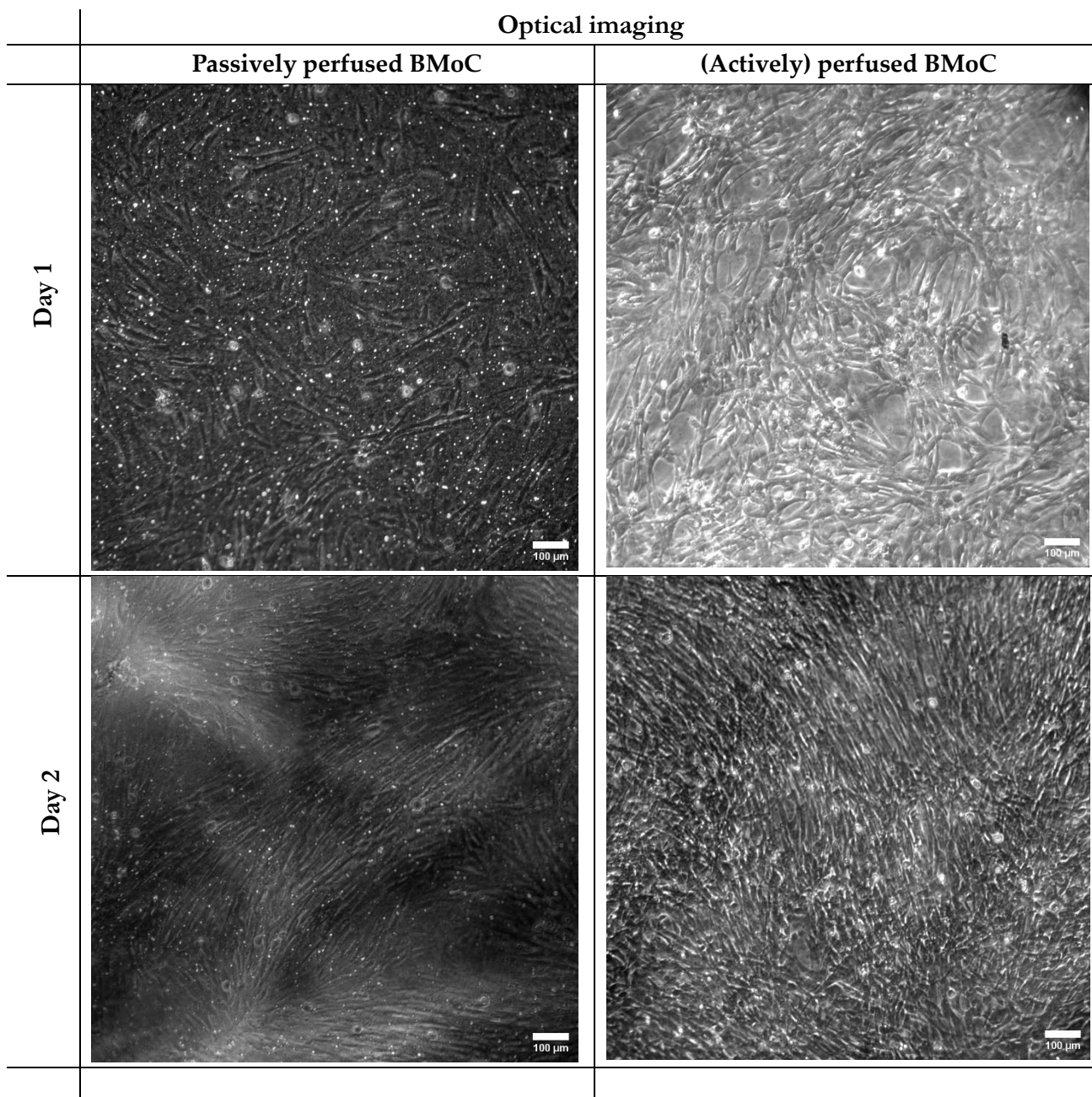


Σχήμα 7. 18. Εικόνα συνεστιακού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) των MSCs χαμηλής συγκέντρωσης (1.1×10^5 cells/mL) στη μικροδιάταξη υπό ροή την 4^η ημέρα. Πολλά MSCs έχουν απωλέσει την ατρακτοειδή μορφολογία τους, με ορισμένα να έχουν επιμηκυνθεί, ενώ άλλα έχουν στρογγυλοποιηθεί και διαχωριστεί σε επιμέρους σώματα ως ένδειξη απόπτωσης (κόκκινα βέλη).

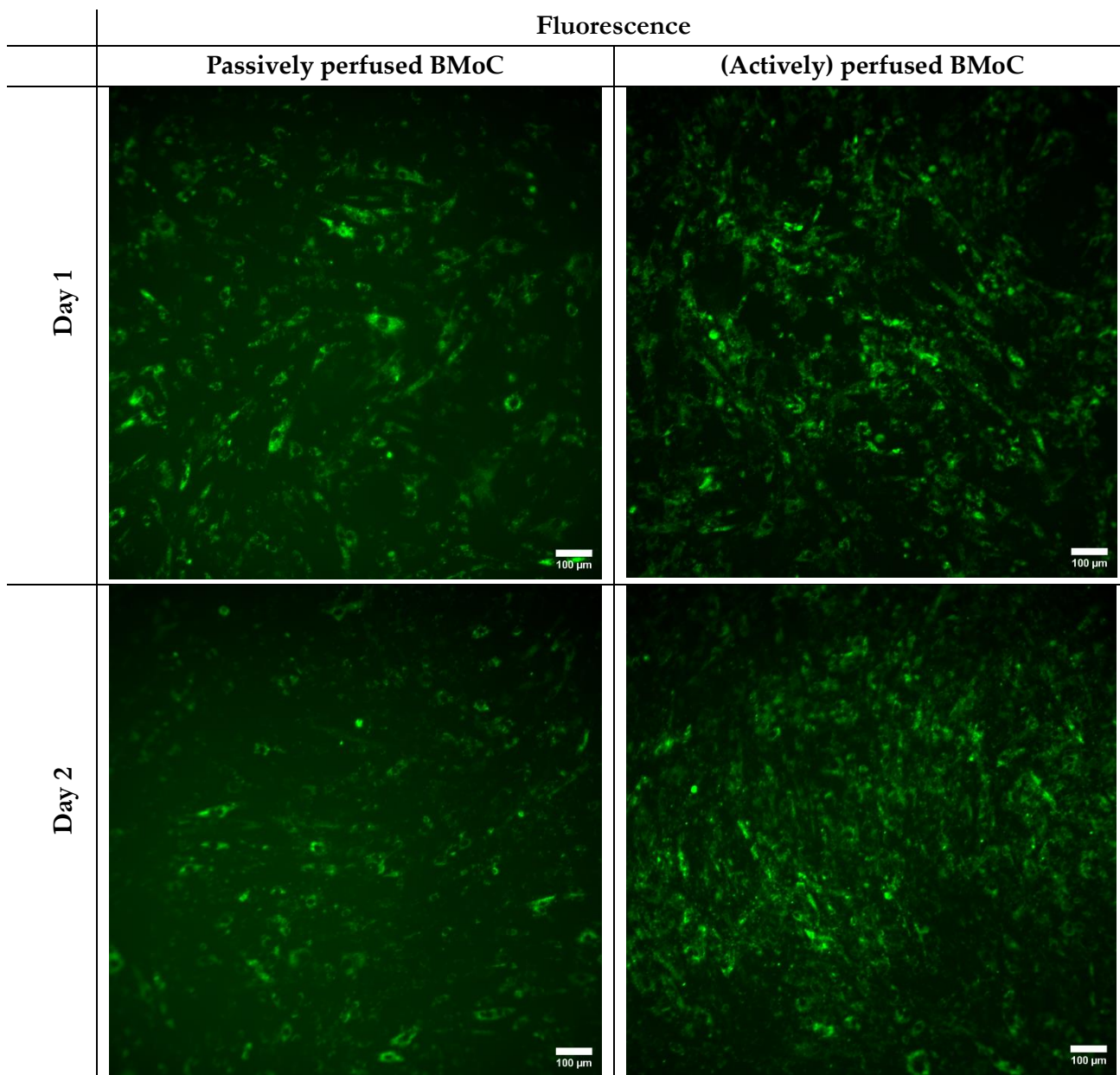
ii) Υψηλή συγκέντρωση κυττάρων

Αυξάνοντας την αρχική συγκέντρωση των UC-MSCs στα 6.4×10^5 cells/mL, σχεδόν δηλαδή εξαπλάσια σε σχέση με την προηγούμενη (1.1×10^5 cells/mL), οι δύο μικροδιατάξεις μελετήθηκαν για 2 ημέρες, οι οποίες, όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω, ήταν αρκετές για να φθάσουν τα κύτταρα σχεδόν σε πλήρη συρροή και στα δύο συστήματα.

Παρατίθενται στα Σχήματα 7.19 και 7.20, εικόνες οπτικού μικροσκοπίου και φθορισμού των MSCs (μεγέθυνσης 10x), αντίστοιχα, καθώς και στο Σχήμα 7.21 το box-and-whisker γράφημα της επιφάνειας του μικροθαλάμου (μm^2) της κάθε μικροδιάταξης που καλύπτεται από MSCs έως τη 2^η ημέρα.



Σχήμα 7. 19. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) καλλιέργειας MSCs υψηλής συγκέντρωσης (6.4×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητικής τροφοδοσίας διάρκειας 2 ημερών. Τα MSCs εμφανίζονται υγιή και στις δύο μικροδιατάξεις, με μεγαλύτερη ομοιομορφία ανάπτυξης στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας.



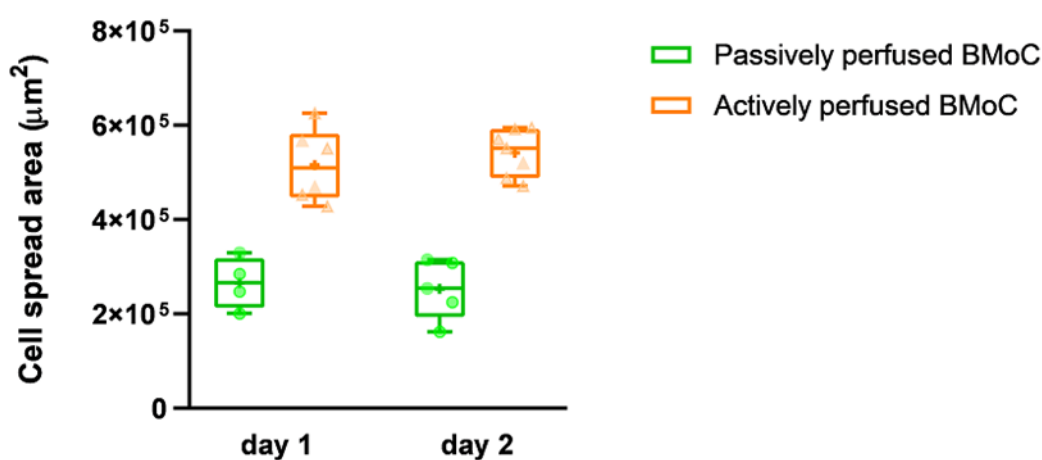
Σχήμα 7. 20. Εικόνες φθορισμού (μεγέθυνσης 10x) χρονικής εξέλιξης καλλιέργειας MSCs υψηλής συγκέντρωσης (6.4×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις μυελού των οστών υπό ροή και παθητικής τροφοδοσίας μέχρι τη 2^η ημέρα. Στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας τα MSCs είναι πληθυσμιακά περισσότερα και παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση τοπικής συσσώρευσης και καθ' ύψος επέκτασης.

Καταρχάς, από τις εικόνες οπτικού (Σχήμα 7.19) τα MSCs παρουσιάζονται υγιή και με το αναμενόμενο ατρακτοειδές σχήμα τους και στις δύο μικροδιατάξεις και τις 2 ημέρες. Ως προς την οργάνωσή τους, είναι περισσότερο ομοιόμορφη στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας, γεγονός που διακρίνεται και από τις εικόνες φθορισμού (Σχήμα 7.20). Τόσο την 1^η, όσο και τη 2^η ημέρα τα MSCs στη μικροδιάταξη υπό ροή εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση κατά τόπους συσσώρευσης και ανάπτυξης καθ' ύψος. Μάλιστα, στις εικόνες φθορισμού το γεγονός αυτό διακρίνεται από την ύπαρξη περιοχών με αυξημένη ένταση φθορισμού λόγω της

πυκνής συγκέντρωσης κυττάρων. Τη 2^η ημέρα, παρατηρείται σχεδόν 100% επιφανειακή συρροή των MSCs και στις δύο μικροδιατάξεις.

Υπολογισμός της επιφάνειας εξάπλωσης των MSCs από το σύνολο των εικόνων φθορισμού απέδωσε μεγαλύτερες τιμές για τη μικροδιάταξη δυναμικής τροφοδοσίας και τις δύο ημέρες, όπως προκύπτει από το box-and-whisker γράφημα. Από την κατανομή των τιμών των επιφανειών κάλυψης, είναι εμφανές ότι στη μικροδιάταξη υπό ροή όλες είναι μεγαλύτερες από εκείνες της μικροδιάταξης παθητικής τροφοδοσίας. Ειδικότερα, στη μικροδιάταξη υπό ροή οι μέσες επιφάνειες εξάπλωσης είναι $5.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ την 1^η ημέρα και $5.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ τη 2^η, καλύπτοντας 29% και 30% της επιφάνειας απεικόνισης. Στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας, οι μέσες επιφάνειες εξάπλωσης είναι $2.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ και $2.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, με αντίστοιχα ποσοστά κάλυψης 15% και 14%, για την 1^η και 2^η ημέρα. Επομένως, η μέση επιφάνεια εξάπλωσης στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας είναι περίπου 48% μικρότερη την 1^η ημέρα και 53% τη 2^η. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάποιες αναδιπλώσεις στη μεμβράνη PET της μικροδιάταξης παθητικής τροφοδοσίας, εμπόδισαν την εστίαση σε ένα επίπεδο σε ορισμένες φωτογραφίες φθορισμού, μειώνοντας μερικώς τον καταμετρούμενο φθορισμό. Σε κάθε περίπτωση όμως, βάσει και της δια ζώσης παρατήρησης, η μέση επιφάνεια κάλυψης ήταν μεγαλύτερη στη μικροδιάταξη υπό ροή, με ενδεχομένως κάποια μείωση στην ποσοστιαία διαφορά (48% και 53%).

Υπενθυμίζεται εδώ, ότι οι υπολογιζόμενες επιφάνειες και ποσοστά εξάπλωσης MSCs είναι μικρότερες από τις πραγματικά παρατηρούμενες, καθώς κατά τις μετρήσεις φθορισμού, δεν συνυπολογίζεται ο φθορισμός από τα κατώτερα στρώματα, και επιπλέον, οι περιοχές φθορισμού επιλέγονται κατά προσέγγιση. Έτσι, και στις δύο μικροδιατάξεις ήδη από την 1^η ημέρα το μεγαλύτερο ποσοστό της επιφάνειας του μικροθαλάμου έχει καλυφθεί λόγω της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης. Για το λόγο αυτό, δε σημειώνεται και σημαντική αύξηση στην επιφάνεια κάλυψης από την 1^η στη 2^η ημέρα. Μάλιστα, στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας η μέση επιφάνεια κάλυψης υπολογίζεται μειωμένη τη 2^η ημέρα, κάτι που δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Ακόμη, παρά την παρατηρούμενη σχεδόν πλήρη επιφανειακή συρροή των MSCs και στις δύο μικροδιατάξεις, η μονότονα αυξημένη ένταση φθορισμού στη μικροδιάταξη υπό ροή, υποδεικνύει μεγαλύτερη καθ' ύψος επέκταση των MSCs και συνυπολογισμό φθορισμού προερχόμενο από τα ανώτερα στρώματα.



Σχήμα 7. 21. Περιοχή κάλυψης MSCs υψηλής συγκέντρωσης (6.4×10^5 cells/mL) στις μικροδιατάξεις υπό ροή (ενεργούς) και παθητικής τροφοδοσίας μέχρι τη 2^η ημέρα. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης εισόδου των MSCs, δεν

παρατηρείται σημαντική διαφορά στην επιφάνεια κάλυψης από την 1^η στη 2^η ημέρα. Και τις δύο ημέρες, τα MSCs καλύπτουν μεγαλύτερη επιφάνεια στη μικροδιάταξη υπό ροή. (n= 5 - 7, αριθμός των κουκίδων/τριγώνων που φαίνονται στο σχήμα.)

Συνεπώς, με το εν λόγω πείραμα σε υψηλότερη συγκέντρωση MSCs επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα του πειράματος με τη χαμηλότερη συγκέντρωση, ότι στη μικροδιάταξη υπό ροή ευνοείται η γρηγορότερη ανάπτυξη των κυττάρων, λόγω της μεγαλύτερης συχνότητας της ανανέωσης του θρεπτικού υλικού στο μικροθάλαμο καλλιέργειας. Παρ' όλα αυτά όμως, δε θα πρέπει να αμελείται ότι και τα δύο πειράματα ήταν μικρής χρονικής διάρκειας (το μέγιστο 3 ημερών), γεγονός που δεν επιτρέπει να αναδειχθεί η πραγματική επίδραση του φαινομένου δημιουργίας φυσαλίδων. Ακόμη όμως και στο συγκεκριμένο πείραμα, διάρκειας 2 ημερών, δημιουργήθηκε φυσαλίδα στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας από την 1^η ημέρα. Το γεγονός αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει τις παρατηρήσεις του Κεφαλαίου 5, όπου εντοπίστηκε εισόδος φυσαλίδων σε μικροθαλάμους υπό ροή στο τέλος της 1^{ης} ημέρας. Είναι χαρακτηριστικό, ότι για τη συγκαλλιέργεια MSCs και HSCs απαιτείται χρόνος τουλάχιστον 6 ημερών (συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου καλλιέργειας των MSCs πριν την εισαγωγή των HSCs). Σε χρόνους τέτοιου μεγέθους, η δημιουργία φυσαλίδων στη μικροδιάταξη υπό ροή θα ανέκοπτε τη συγκαλλιέργεια, καθιστώντας αδύνατη τη δημιουργία ενός λειτουργικού αιματοποιητικού οργανοειδούς μυελού των οστών.

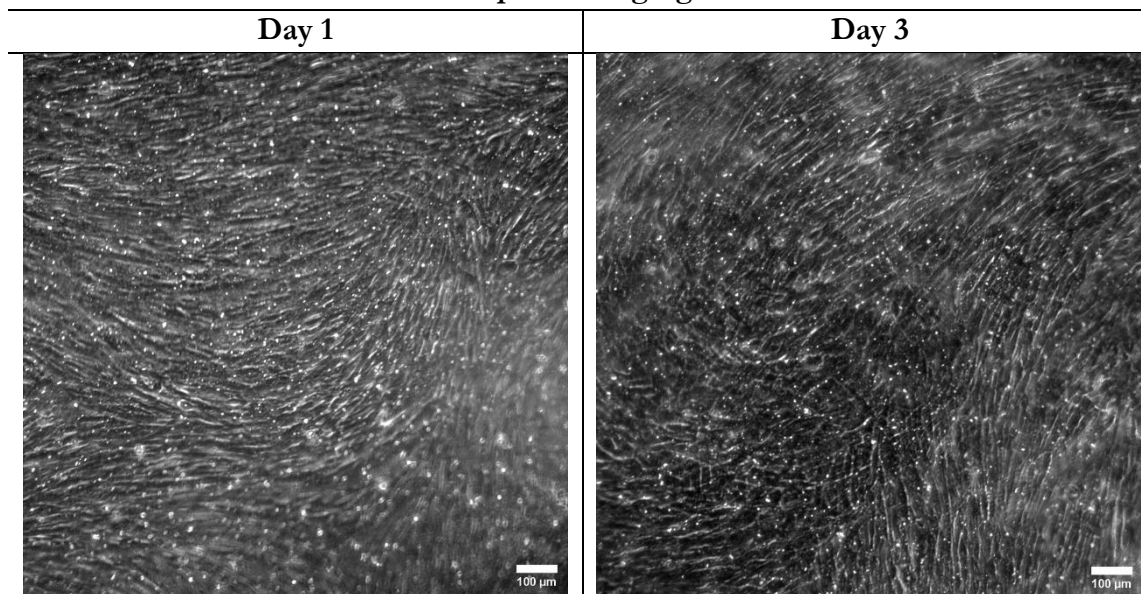
Καταλήγοντας, δεδομένου ότι πρωταρχική μέριμνα είναι η σταθερή και βιώσιμη ανάπτυξη των MSCs αντί της ταχύτερης εξάπλωσής τους, αιτιολογείται για μία ακόμη φορά η επιλογή της μικροδιάταξης παθητικής τροφοδοσίας για την συγκαλλιέργεια MSCs και HSCs.

7.3 Συγκαλλιέργεια MSCs και HSPCs στη μικροδιάταξη μυελού των οστών παθητικής τροφοδοσίας

Πραγματοποιήθηκε πείραμα συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας μπορεί να υποστηρίξει την ομαλή συνύπαρξη των δύο ειδών κυττάρων και κυρίως, να συντηρήσει τον πληθυσμό των HSPCs. Στην κατεύθυνση της αμιγώς *in vitro* δημιουργίας της αιμοποιητικής περιοχής, προηγήθηκε καλλιέργεια των UC-MSCs αρχικής συγκέντρωσης 6.4×10^5 cells/mL για 2 ημέρες εντός της μικροδιάταξης για το φυσιολογικό σχηματισμό της μήτρας που θα υποστηρίξει τα HSPCs. Την 3^η ημέρα, όταν τα MSCs είχαν φθάσει περίπου 80% συρροή, προστέθηκαν τα HSPCs ($CD34^+$) αρχικής συγκέντρωσης 2.5×10^5 cells/mL και παρέμειναν σε συγκαλλιέργεια με τα MSCs για 3 ημέρες. Προγενέστερα, τα MSCs και τα HSPCs είχαν σημειωθεί με την πράσινη χρωστική diO, και την κόκκινη diI, αντίστοιχα. Για την τροφοδοσία της μικροδιάταξης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό StemSpan™ H3000, εμπλουτισμένο με κυτταροκίνες (IL-3, SCF, Flt3-Ligand, GCSF), συγκέντρωσης 10 ng/mL η καθεμία. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο για τη λήψη εικόνων οπτικού και φθορισμού.

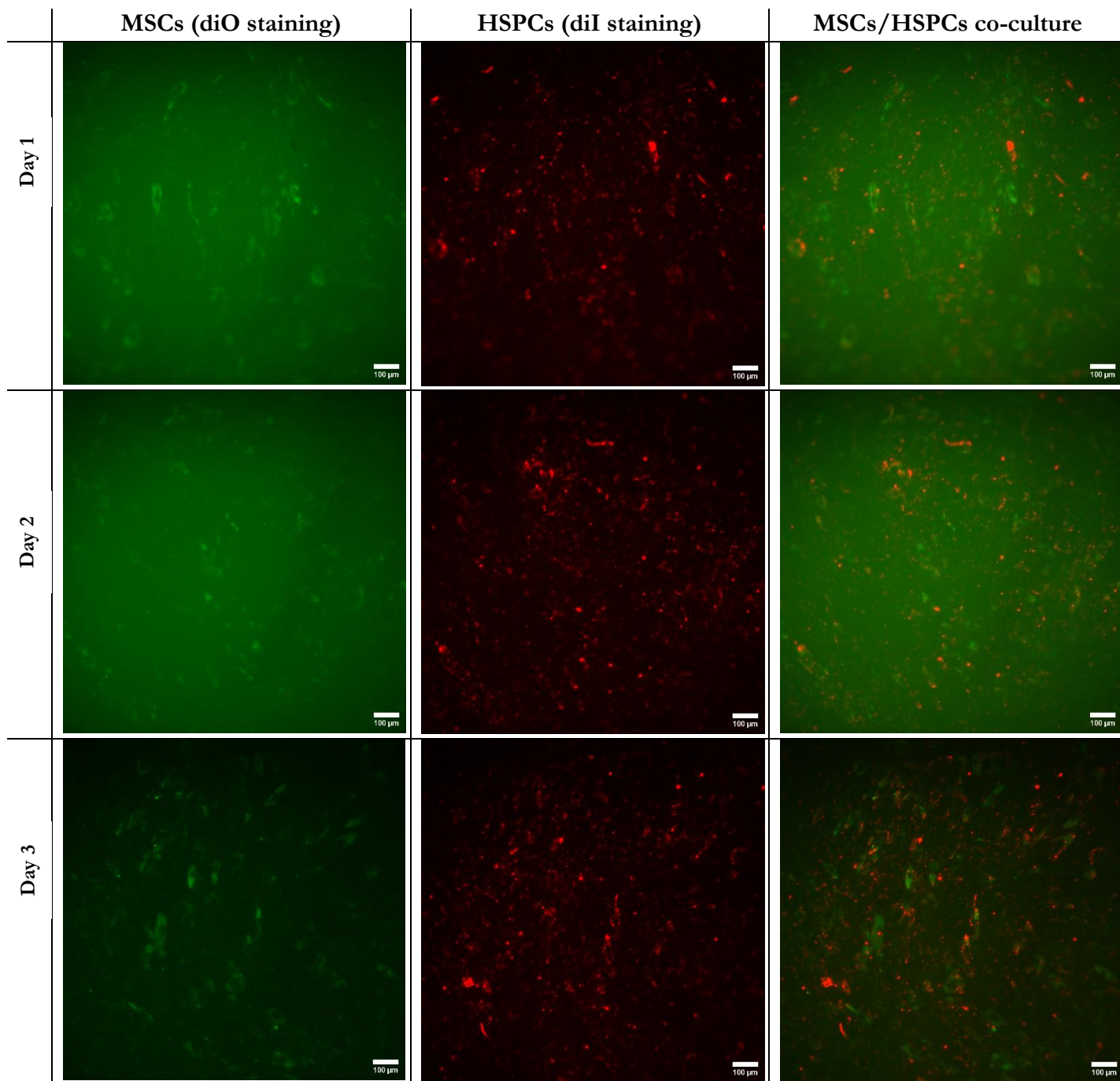
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά στο Σχήμα 7.22 χαρακτηριστικές οπτικές εικόνες από τη συγκαλλιέργεια την 1^η και 3^η ημέρα. Όπως είναι εμφανές, ήδη από την 1^η ημέρα τα MSCs έχουν φθάσει 100% συρροή, χωρίς να μπορεί να εξαχθεί κάποιο ποσοτικό συμπέρασμα για τη μεταβολή του πληθυσμού τους, ενώ επιπλέον, δεν μπορούν να διακριθούν τα HSPCs. Για το λόγο αυτό, ο χαρακτηρισμός θα πραγματοποιηθεί μέσω ανάλυσης των εικόνων φθορισμού.

Optical imaging

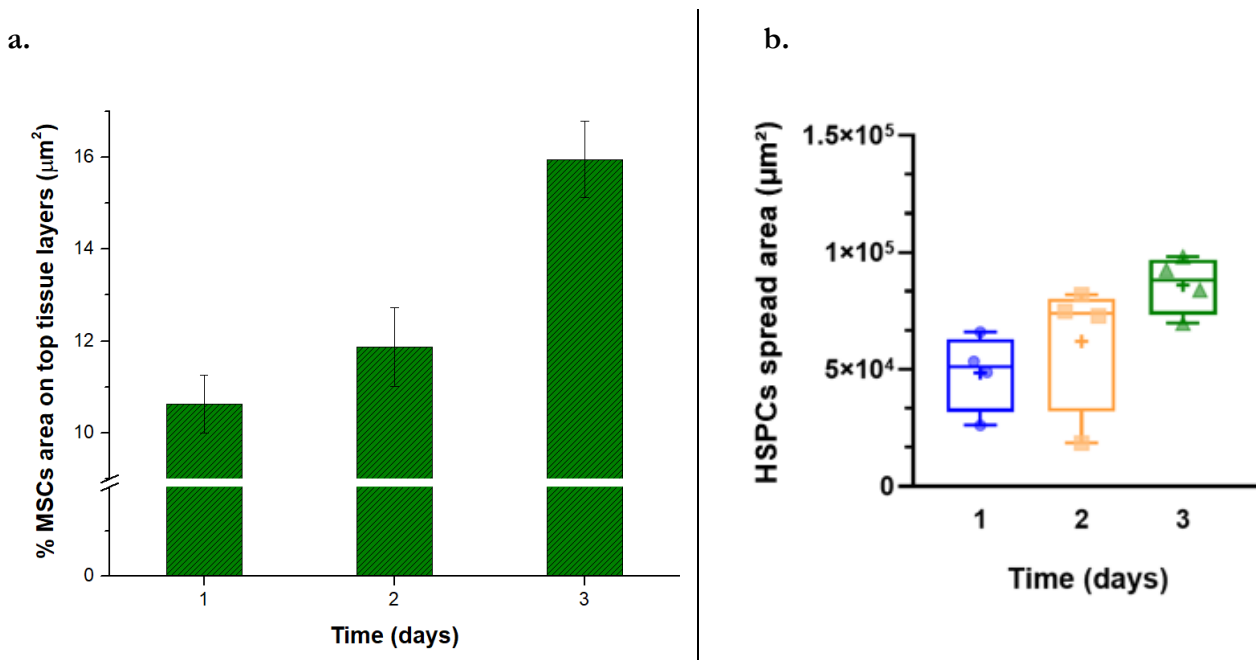


Σχήμα 7. 22. Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνσης 10x) συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs από την 1^η και την 3^η ημέρα. Τα MSCs βρίσκονται σε πλήρη συρροή.

Στο Σχήμα 7.23 απεικονίζονται εικόνες φθορισμού της συγκαλλιέργειας και ξεχωριστά των MSCs, HSPCs που τις συνθέτουν από την 1^η έως την 3^η ημέρα συγκαλλιέργειας. Τα MSCs, όπως φαίνεται, παρουσιάζονται υγιή, κανονικού ατρακτοειδούς σχήματος, αν και είναι φαινομενικά λίγα τα κύτταρα που διακρίνονται. Δεδομένου ότι, όπως αποδείχθηκε στις οπτικές εικόνες του παραπάνω Σχήματος 7.22, τα MSCs έχουν αποκτήσει πλήρη συρροή, τα κύτταρα που τελικά είναι πιο φωτεινά και ευδιάκριτα, προέρχονται από ανώτερα στρώματα ιστού στρώματος, με εκείνα των κατώτερων στρωμάτων να δημιουργούν ένα περισσότερο σκοτεινό υπόβαθρο. Το γεγονός αυτό, ήταν περισσότερο εμφανές κατά την ανάλυση των εικόνων με το ImageJ, όπου η διαφορά στην ένταση φθορισμού μεταξύ ανώτερων και κατώτερων στρωμάτων ήταν τέτοια, που ο φθορισμός των κατώτερων στρωμάτων ήταν χαμηλότερος από το οριζόμενο υπόβαθρο, με αποτέλεσμα τη μέτρηση του προερχόμενου φθορισμού μόνο από τα ανώτερα στρώματα. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση τουλάχιστον 5 εικόνων φθορισμού ανά ημέρα για τον υπολογισμό του ποσοστού της επιφάνειας του μικροθαλάμου που καλύπτεται από MSCs στα ανώτερα στρώματα ιστού (% MSCs area on top tissue layers), η μέση τιμή των οποίων, συνοδευόμενη από το τυπικό της σφάλμα για τις ημέρες 1 έως 3, απεικονίζεται στο διάγραμμα του Σχήματος 7.24a. Ξεινώνοντας από μια κάλυψη περίπου 10% την 1^η ημέρα, αυξάνεται στο 16% την 3^η ημέρα, αποδεικνύοντας έτσι σταδιακή επιφανειακή εξάπλωση του ιστού στα ανώτερα στρώματα, και έμμεσα, την καθ' ύψος επέκταση του ιστού.



Σχήμα 7. 23. Εικόνες φθορισμού συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs (μεγέθυνσης 10x) από την 1^η έως την 3^η ημέρα. Παρατίθενται και οι συνιστώσες εικόνες φθορισμού των MSCs και HSPCs για την κάθε εικόνα συγκαλλιέργειας. Τα MSCs και τα HSPCs φαίνονται να αυξάνουν τον πληθυσμό τους ανά τις ημέρες και να συνυπάρχουν ομαλά μεταξύ τους.



Σχήμα 7. 24. Ανάλυση εικόνων φθορισμού συγκαλλιέργειας MSCs/HSPCs διάρκειας 3 ημερών. a) Ποσοστό κάλυψης των ανώτερων στρωμάτων ιστού από MSCs ανά τις ημέρες. Παρατηρείται αύξηση του ποσοστού κάλυψης, γεγονός που αποδεικνύει τη σταδιακή εξάπλωση των MSCs στα ανώτερα στρώματα. b) Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών επιφάνειας κάλυψης με HSPCs (µm²) μέχρι και την 3^η ημέρα. Τα HSPCs αυξάνουν ομαλά τον πληθυσμό τους ανά τις ημέρες, ενδεικτικό υγιούς συνύπαρξης με τα MSCs σε συγκαλλιέργεια. (n= 5 αριθμός των κουκίδων/τριγώνων που φαίνονται στο σχήμα).

Εστιάζοντας στα HSPCs, μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για την κατάστασή τους. Συγκεκριμένα, φαίνεται να διατηρούνται και να πολλαπλασιάζονται ανά τις ημέρες, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν βρίσκονται σε στρεσογόνες συνθήκες, αλλά σε περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξή τους. Προς ποσοτικοποίηση αυτού, αντίστοιχη ανάλυση των εικόνων φθορισμού (τουλάχιστον 5) των HSPCs ανά τις ημέρες, οδήγησε στο Σχήμα 7.24b, όπου απεικονίζεται το διάγραμμα box-and-whisker με τις διάφορες τιμές επιφάνειας κάλυψης με HSPCs (µm²) μέχρι και την 3^η ημέρα. Παρατηρείται μια γνησίως αύξουσα συμπεριφορά της επιφάνειας κάλυψης, και όπως φαίνεται από την κατανομή των διαφόρων τιμών για κάθε ημέρα ξεχωριστά, στην πλειονότητά τους αυξάνονται από μέρα σε μέρα. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε τις μέσες τιμές, που ξεκινούν από περίπου $4.9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ την 1^η ημέρα, αυξάνονται σε $6.2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ τη 2^η, και καταλήγουν σε $8.6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ την 3^η ημέρα, αυξανόμενη κατά περίπου 76% σε σχέση με την 1^η ημέρα. Τα αντίστοιχα ποσοστά κάλυψης είναι 2.7%, 3.5%, και 4.8%. Η εξάπλωση αυτή των HSPCs, αποδεικνύει την υγιή τους κατάσταση.

Συμπερασματικά, τα MSCs και τα HSPCs συνυπάρχουν ομαλά σε συγκαλλιέργεια. Τα MSCs δημιουργούν φυσιολογικά ιστό στρώματος που υποστηρίζει την ανάπτυξη των HSPCs, αποδεικνύοντας την ικανότητα της αμιγώς *in vitro* και απουσία ικτριωμάτων συντήρησης της συγκαλλιέργειας. Ακόμη, η διατήρηση ενός πληθυσμού των HSPCs αποτελεί μία ελπιδοφόρα ένδειξη για τη δημιουργία οργανοειδούς. Συγκεκριμένα, προϋποθέσεις για τη δημιουργία αιμοποιητικού οργανοειδούς μυελού των οστών είναι: α) η συντήρηση του αρχέγονου φαινότυπου των HSPCs, και β) η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε μεταγενέστερες κυτταρικές σειρές. Η ικανοποίηση των δύο αυτών προϋποθέσεων θα πρέπει να μελετηθεί συγκριτικά με αντίστοιχη 2D

συγκαλλιέργεια σε πιάτα, ώστε από τις μεταξύ τους διαφοροποιήσεις, να μπορέσει να αναδειχθεί η δυνατότητα on-chip δημιουργίας οργανοειδούς, μια μελέτη που θα επιμεληθεί από τη Δρ. Μ. Γρηγορίου, I.I.B.E.A.A. Συνεπώς, τα εν λόγω αποτελέσματα αναδεικνύουν την αμιγώς *in vitro* και απουσία ικτριωμάτων συγκαλλιέργεια των MSCs/HSPCs, στην κατεύθυνση της δημιουργίας ενός οργανοειδούς μυελού των οστών. Συστήνεται περαιτέρω η διατήρηση της συγκαλλιέργειας περίπου 7 ημέρες και η απόδειξη της δυνατότητας των HSPCs να διαφοροποιούνται.

7.4 Συμπεράσματα

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο εξετάζει την κατασκευασμένη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας ως προς την ικανότητά της να συντηρεί την καλλιέργεια κυττάρων, με σκοπό τη δημιουργία ενός οργανοειδούς μυελού των οστών.

Στα πλαίσια της ανάγκης χαρακτηρισμού των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν μικροθάλαμοι καλλιέργειας ως πρώιμη πλατφόρμα μελέτης της σήμανσης των MSCs με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική diO. Προέκυψε επιτυχής απεικόνιση του φθορισμού των MSCs με αραιώση 1:100, η οποία επιβεβαίωσε την ευνοϊκή και περισσότερο οργανωμένη ανάπτυξή τους σε μικροθαλάμους προκατεργασμένους με πλάσμα αέρα και επικαλυμένους με λεπτή στρώση κολλαγόνου.

Σε μικροθαλάμους καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε επίσης μια πρώτη καλλιέργεια MSCs μυελού των οστών από υγιή και ασθενή δότη ΣΕΛ. Τα ασθενή MSCs εμφάνισαν βραδεία ανάπτυξη σε σχέση με τα υγιή, παρά την προέλευση των υγιών από ηλικιωμένο δότη. Παρότι τα αποτελέσματα είναι ασφαλή, συνιστάται επανάληψη με MSCs από υγιείς και ασθενείς δότες παραπλήσιας ηλικίας, ώστε να επικυρωθούν τα εξαγόμενα συμπεράσματα.

Αιολούθως, παρουσιάστηκε η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας, όπου ο ανώτερος μικροθάλαμος χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των κυττάρων και διαχωρίζεται μέσω πορώδους μεμβράνης από το κατώτερο επίπεδο, έναν διαμπερή κύλινδρο, που χρησιμεύει ως δεξαμενή τροφοδοσίας. Η δεξαμενή παραμένει βυθισμένη σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό, από όπου γίνεται η μέσω διάχυσης ανανέωσή του στο μικροθάλαμο καλλιέργειας μέσω της μεμβράνης. Ο μικροθάλαμος καλλιέργειας και η δεξαμενή τροφοδοσίας είναι από PDMS, ενώ η πορώδης μεμβράνη εξετάστηκε αν θα είναι εμπορική PET ή κατασκευασμένη από PDMS.

Στο πλαίσιο αυτό, αποδείχθηκε αρχικά η βιοσυμβατότητα της μεμβράνης PET ύστερα από καλλιέργεια των MSCs σε μεμβράνες PET εντός πιάτου 24 πηγαδιών, ενώ επιπλέον, αναδείχθηκε ταχύτερη και περισσότερο οργανωμένη κυτταρική εξάπλωση κατά την επικάλυψή τους με κολλαγόνο. Στη συνέχεια, συγκρίθηκε η ανάπτυξη των MSCs στη μεμβράνη PET και τη μεμβράνη PDMS, οι οποίες εντάχθηκαν σε μικροδιατάξεις παθητικής τροφοδοσίας. Τα MSCs παρουσίασαν περισσότερο ομοιόμορφη εξάπλωση στη μεμβράνη PET, σε αντίθεση με τη μεμβράνη PDMS, όπου η ύπαρξη υπολειμμάτων CF_x κατά την κατασκευή της, οδήγησε στη δημιουργία ασυνεχειών στο στρωματικό ιστό. Συνεπώς, η εμπορική μεμβράνη PET αποδείχθηκε ως καταλληλότερη για ενσωμάτωση στη μικροδιάταξη.

Έτσι, η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας ελέγχθηκε σε σχέση με το μικροδιάταξη υπό ροή (ενεργούς τροφοδοσίας) ως προς την καλλιέργεια των MSCs χαμηλής και υψηλότερης συγκέντρωσης, με τις δύο μικροδιατάξεις να διαθέτουν την εμπορική μεμβράνη PET. Βασική διαφοροποίηση των δύο είναι το υπόστρωμα ανάπτυξης των κυττάρων, όπου στο ενεργούς τροφοδοσίας είναι το γυαλί, ενώ στο παθητικής τροφοδοσίας η μεμβράνη PET. Ως προς τα αποτελέσματα που προκύπτουν και από τις δύο συγκεντρώσεις καλλιέργειας, η μικροδιάταξη ενεργούς τροφοδοσίας ευνόησε την ταχύτερη ανάπτυξη των MSCs λόγω συχνότερης ανανέωσης του θρεπτικού υλικού στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, ενώ στη μικροδιάταξη

παθητικής τροφοδοσίας τα MSCs αναπτύχθηκαν περισσότερο ομοιόμορφα στη μεμβράνη PET σε σχέση με το γυαλί. Ακόμη, στη μικροδιάταξη υπό ροή σημειώθηκε δημιουργία φυσαλίδων, όπου όμως, λόγω μικρής πειραματικής διάρκειας (μέγιστο 3 ημερών), το πρόβλημα δεν αναδείχθηκε σε όλο του το μέγεθος. Συγκεκριμένα, οι φυσαλίδες δεν ανέκοψαν τη ροή τροφοδοσίας, όμως δημιουργήθηκαν από την 1^η ημέρα στο μικροθάλαμο τροφοδοσίας, ενώ τις επόμενες ημέρες, εντοπίστηκαν και στο μικροθάλαμο καλλιέργειας. Έτσι, θέτοντας ως προτεραιότητα τη σταθερή και βιώσιμη ανάπτυξη των MSCs, και δεδομένου ότι η παρουσία φυσαλίδων θα αποτελούσε τροχοπέδη στην εισαγωγή των HSPCs, οδηγούμαστε σε επιλογή της μικροδιάταξης παθητικής τροφοδοσίας για τη μακροπρόθεσμη συντήρηση ενός αιμοποιητικού οργανοειδούς μυελού των οστών, σε συμφωνία με τα συμπεράσματα του Κεφαλαίου 5.

Με βάση τα παραπάνω, στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας πραγματοποιήθηκε συγκαλλιέργεια MSCs/HSPCs διάρκειας 3 ημερών. Πρόκειται για ένα εγχείρημα με θετική έκβαση, καθώς τα δύο είδη κυττάρων συνυπήρξαν ομαλά και πολλαπλασίασαν τον πληθυσμό τους. Τα MSCs φάνηκε να διαμορφώνουν φυσιολογικά τη 3D υποστηρικτική μήτρα για τη φιλοξενία των HSPCs, χωρίς την ανάγκη ενσωμάτωσης τεχνητών ικτριωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στην κατεύθυνση απόδειξης της αμιγώς *in vitro* και απουσία ικτριωμάτων δημιουργίας του αιμοποιητικού οργανοειδούς μυελού των οστών. Περαιτέρω χρειάζεται να διατηρηθεί η συγκαλλιέργεια περίπου για μία εβδομάδα, για τη διερεύνηση της ικανότητας των HSPCs να διαφοροποιούνται, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του οργανοειδούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η εν λόγω διδακτορική διατριβή ασχολήθηκε με την κατασκευή μικροδιάταξης για τη φιλοξενία και ανάπτυξη μυελού των οστών, την επιφανειακή της τροποποίηση για την ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης, τη μελέτη της μεθόδου τροφοδοσίας της, ενεργούς ή παθητικής, και τέλος, τη δοκιμασία της κατά την καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών, και συγκεκριμένα, MSCs μόνων τους, και σε συγκαλλιέργεια με HSPCs. Πιο αναλυτικά, τα συμπεράσματα της διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

1) Καταλήξαμε σε μία μικροδιάταξη 2⁷⁵ γενιάς, με διαστάσεις των μικροθαλάμων και της διάρθρωσης των επιπέδων της ώστε να επιτευχθεί καλύτερος/ευκολότερος κατασκευαστικός και πειραματικός έλεγχος. Συγκεκριμένα, η μικροδιάταξη αποτελείται από δύο κυλινδρικούς μικροθαλάμους PDMS, διαχωριζόμενους μεταξύ τους από μια πορώδη μεμβράνη, ενώ το σύνολο της διάταξης σφραγίζεται από κάτω με γυαλί. Ο άνω μικροθάλαμος χρησιμοποιείται για την τροφοδοσία με θρεπτικό υλικό, και ο κάτω για την καλλιέργεια κυττάρων, τα οποία παρατηρούνται οπτικά μέσω του γυαλιού.

Η μικροδιάταξη PDMS κατασκευάστηκε με χρήση λιθογραφίας μαλακής ύλης, και συγκεκριμένα, της τεχνικής αντιγραφής μήτρας (replica molding), χρησιμοποιώντας εκμαγεία αλουμινίου, σχηματοποιημένα με υπολογιστικά ελεγχόμενη μικρομηχανική CNC. Ως προς την πορώδη μεμβράνη, προτάθηκε επιτυχής και επαναλήψιμη μεθοδολογία κατασκευής της από PDMS, προερχόμενη από εκμαγείο Si, εγχαραγμένο με διεργασία Bosch για τη δημιουργία ψηλών μικροκολώνων λόγου ασυμμετρίας 4:1, με κατάλληλη σχετική υδροφοβοποίηση του ώστε να διευκολύνεται η αποκόλληση της μεμβράνης από αυτό, καθώς και με ενίσχυση της μηχανικής της αντοχής. Για τη συγκόλληση της μικροδιάταξης, και συγκεκριμένα, των επιπέδων PDMS μεταξύ τους και με το γυαλί, χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία πλάσματος αέρα.

2) Προτάθηκε μια γρήγορη και απλή μέθοδος επιφανειακής τροποποίησης της μικροδιάταξης PDMS για τη βελτίωση της κυτταρικής προσκόλλησης και ανάπτυξης, ώστε να αντιμετωπιστεί η υδροφοβικότητα του υλικού. Η μέθοδος αυτή είναι μονοβηματική και στηρίζεται στην προκατεργασία με πλάσμα αέρα των επιφανειών PDMS πριν την επίστρωση κολλαγόνου στο εσωτερικό των μικροθαλάμων. Η κατεργασία πλάσματος υπεισέρχεται ούτως ή άλλως στην κατασκευαστική διαδικασία σφράγισης της μικροδιάταξης, κατά την απευθείας έκθεση των επιπέδων προς συγκόλληση στο πλάσμα, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο ότι δεν απαιτούνται πρόσθετα στάδια πριν από την επικάλυψη της διάταξης με κολλαγόνο. Ανάλυση XPS απέδειξε ότι το πλάσμα αέρα προκαλεί οξείδωση της επιφάνειας PDMS, ενώ μετρήσεις γωνιών επαφής εμφάνισαν ομοιόμορφη υπερυδροφιλοποίηση των επιφανειών PDMS αμέσως μετά την επίστρωση κολλαγόνου ($5.6^\circ \pm 1.4^\circ$). Επιπλέον, μεταγενέστερη μέτρηση γωνιών επαφής επιφανειών PDMS ενεργοποιημένων με πλάσμα αέρα, καθώς και λεπτών στρωμάτων SiO₂, επικαλυμένων αμέσως μετά (2 h) με κολλαγόνο, είχε ως αποτέλεσμα τη μονιμοποίηση της υδροφιλικότητάς τους ακόμη και την 7^η ημέρα ($44.4^\circ \pm 2.2^\circ$ και $56.8^\circ \pm 0.3^\circ$, αντίστοιχα) αποθήκευσης στον αέρα. Έτσι, αποδείχθηκε ότι διατηρείται η υδροφιλικότητα του εσωτερικού του μικροθαλάμου καλλιέργειας της μικροδιάταξης, αποτελούμενου από αντίστοιχα υλικά, PDMS και γυαλί.

3) Μελετήθηκε ενδελεχώς το φαινόμενο δημιουργίας φυσαλίδων κατά την ενεργό τροφοδοσία μικρορευστονικών διατάξεων, τόσο σε χαμηλές (0.04 – 0.2 μL/min), όσο και σε υψηλές ροές (6.0 – 13.6 μL/min). Προτιμήθηκε η λειτουργία υπό υψηλές ροές, ώστε να μπορεί να υποστηριχτεί η μακροπρόθεσμη καλλιέργεια και ανάπτυξη των κυττάρων. Προέκυψε ότι η δημιουργία φυσαλίδων αποτελεί εγγενές φαινόμενο

του ίδιου του μικρορρευστονικού συστήματος, και συγκεκριμένα, της διάταξης μαζί με τα εξαρτήματά της και τη χρησιμοποιούμενη συνδεσμολογία, και του ίδιου του υλικού PDMS, ενώ επηρεάζουν σημαντικά παράμετροι, όπως η θερμοκρασία και η μεταβολή πίεσης κατά μήκος της ροής. Επιχειρήθηκε η εφαρμογή βελτιωτικών ενεργειών, αναφέροντας χαρακτηριστικά, την υδροφιλοποίηση του PDMS, τη βελτίωση της συνδεσμολογίας και την ελάττωση της βαθμίδας θερμοκρασίας μεταξύ του φιαλιδίου τροφοδοσίας και της μικροδιάταξης. Με τις ενέργειες αυτές, σημειώθηκε σημαντική βελτίωση στην επιφάνεια κάλυψης με φυσαλίδες στους μεγάλους χρόνους, και συγκεκριμένα, μόλις 25% κάλυψη, έναντι 100% απουσία των βελτιώσεων, στο τέλος μίας ημέρας, δηλαδή 75% μείωση στην επιφάνεια κάλυψης.

4) Αναπτύχθηκε μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων κατά την εφαρμογή ροής θρεπτικού υλικού. Λόγω της πολυπλοκότητας κατασκευής της μεμβράνης επιλέχθηκε για λόγους ευκολίας η ενσωμάτωση εμπορικής μεμβράνης πολυεστέρα PET. Έτσι, η μικροδιάταξη αποτελείται από τον άνω κυλινδρικό μικροθάλαμο καλλιέργειας PDMS, διαχωριζόμενο με την ενδιάμεση μεμβράνη PET από την κάτω δεξαμενή τροφοδοσίας, έναν διαμπερή κύλινδρο PDMS εμβαπτισμένο μέσα σε στατικό θρεπτικό υγρό. Η οπτική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε μέσω της γυάλινης οροφής του πάνω θαλάμου.

Σύγκριση της απόδοσης της εμπορικής μεμβράνης PET σε σχέση με την κατασκευασμένη PDMS, ως τμήματα των μικροδιατάξεων παθητικής τροφοδοσίας, ανέδειξε περισσότερο ομοιόμορφη ανάπτυξη MSCs στην PET, καθώς υπολείμματα CF_x στη μεμβράνη PDMS δημιούργησαν ασυνέχειες στον ιστό. Με αυτό τον τρόπο, επικυρώθηκε και εκ του αποτελέσματος η επιλογή της εμπορικής μεμβράνης.

Η μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας εξετάστηκε συγκριτικά με τη μικροδιάταξη ενεργούς τροφοδοσίας (2^{ης} γενιάς) ως προς την ικανότητά της να συντηρεί την καλλιέργεια MSCs. Στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας παρατηρήθηκε περισσότερο ομοιόμορφη ανάπτυξη των MSCs, ενώ στην ενεργούς ταχύτερη, χωρίς όμως να συνυπολογίζεται σε όλο της το μέγεθος η επίδραση των φυσαλίδων λόγω μικρής διάρκειας του πειράματος (3 ημέρες). Η ανάγκη διαμόρφωσης ομοιόμορφου στρωματικού ιστού για την υποστήριξη των HSPCs και η αποφυγή κάθε πιθανότητας εισόδου φυσαλίδων στο μικροθάλαμο καλλιέργειας, αναδεικνύει την επιλογή της μικροδιατάξης παθητικής τροφοδοσίας.

5) Τέλος, πραγματοποιήθηκε συγκαλλιέργεια MSCs/HSPCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας με ενσωματωμένη την εμπορική μεμβράνη PET. Πρόκειται για μια δοκιμή συγκαλλιέργειας, η οποία, αν και περιορίστηκε σε οπτική παρατήρηση διατήρησης και ανάπτυξης του ιστού με μετρήσεις φθορισμού απέδειξε ομαλή συνύπαρξη των δύο ειδών κυττάρων και αύξηση του πληθυσμού τους. Ειδικότερα ως προς τα HSPCs, φάνηκε υγιής συντήρησή τους ανά τις ημέρες, και σταδιακή αύξηση του αριθμού τους, όπως αποδείχθηκε ποσοτικά από τις μετρήσεις φθορισμού. Η συγκαλλιέργεια MSCs/HSPCs εκκινήθηκε και διατηρήθηκε αμιγώς *in vitro* στη μικροδιάταξη, και χωρίς υποβοήθηση από τεχνητά ικρίωματα ή γέλη, χρησιμοποιώντας φυσιολογικά τη 3D μήτρα που διαμόρφωσαν τα MSCs. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά και προς την κατεύθυνση της *in vitro* δημιουργίας και συντήρησης της ανθρώπινης περιαγγειακής αιμοποιητικής περιοχής του μυελού των οστών.

Συνολικά, οι πρωτοτυπίες που εισήγαγε η παρούσα διατριβή συνοψίζονται παρακάτω:

- Επιτυχής και επαναλήψιμη κατασκευαστική ολοκλήρωση μικροδιάταξης μυελού των οστών (μικροδιάταξη 2^{ης} γενιάς), με τη χρήση κυρίως μεθόδων λιθογραφίας μαλακής ύλης (τεχνική αντιγραφής μήτρας) και σφράγισης με τεχνολογία πλάσματος χαμηλής πίεσης (πλάσμα αέρα). Πρόκειται για την 1^η ολοκληρωμένη μικροδιάταξη με χρήση των εν λόγω τεχνικών εντός Ελλάδας.

- Πρόταση μεθοδολογίας κατασκευής πορώδους μεμβράνης PDMS, μιας κοινώς αποδεκτά απαιτητικής διαδικασίας, που απαιτεί την επιτυχή έκβαση ενός συνόλου διεργασιών. Η επιτυχία της διαδικασίας έγκειται στα δύο παρακάτω στοιχεία:
 - ✓ Σύλληψη της λογικής σχετικής υδροφοβοποίησης εκμαγείου Si και φορέα της μεμβράνης, και συγκεκριμένα απόθεσης περισσότερο υδρόφοβου υμενίου στο εκμαγείο σε σχέση με το φορέα, ώστε να προτιμηθεί απομάκρυνση της μεμβράνης από το εκμαγείο αντί του φορέα της. Το κρίσιμο αυτό στάδιο ήταν επιτυχές χάρη στην επιστράτευση τεχνολογίας πλάσματος υψηλού κενού, και συγκεκριμένα, πλάσματος C_4F_8 για την απόθεση υμενίου στο εκμαγείο, και πλάσματος CHF_3 για το υμένιο στο φορέα.
 - ✓ Ενίσχυση της μηχανικής αντοχής της μεμβράνης, με το διπλασιασμό του πάχους της (20 μm), αύξηση του ποσοστού του διασταυρωτή (αναλογία 3:1 βάσης-διασταυρωτή), και αύξηση του χρόνου και της θερμοκρασίας θέρμανσής της (100°C για 2.5 h).

Η κατασκευή της μεμβράνης είναι επαναλήψιμη (έχει ολοκληρωθεί τουλάχιστον 4 φορές), ενώ η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του εκμαγείου της Si (τουλάχιστον 8 φορές) επιταχύνει την παραγωγική της διαδικασία και μειώνει το κόστος.

- Πρόταση μονοβηματικής, απλής μεθόδου επιφανειακής τροποποίησης των βασισμένων σε PDMS μικροδιατάξεων πριν την επιστροφή κολλαγόνου, στηριζόμενη στην κατεργασία με πλάσμα αέρα.
 - ✓ Σε αντίθεση με την πλειονότητα των υπαρχουσών εργασιών, η κατεργασία αυτή δεν απαιτεί κάποιο επιπλέον βήμα, αλλά είναι ενσωματωμένη στο στάδιο της σφράγισης της μικροδιάταξης.
 - ✓ Εκθέτοντας σε πλάσμα τις επιφάνειες PDMS και αμέσως μετά (2 h) επιστρώνοντας τις με κολλαγόνο, σημειώνεται το υψηλότερο επίπεδο υδροφιλοποίησης σε κατάσταση ξηρασίας, τόσο την ίδια μέρα, όσο και 7 ημέρες μετά την κατεργασία, σε σχέση με τις υπόλοιπες μελέτες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει τη δημιουργία ενός σταθερού στρώματος PDMS-κολλαγόνου τουλάχιστον μέχρι την 7^η ημέρα, ευνοώντας έτσι, την παραμονή και ανάπτυξη των κυττάρων μακροπρόθεσμα.
 - ✓ Στην κατεύθυνση της βιολογικής εφαρμογής, η εν λόγω πρόταση, αποτελεί ένα από τα λίγα εγχειρήματα που δοκιμάζουν on-chip την προτεινόμενη μέθοδο κατεργασίας σε σχέση με τη συνεισφορά της στην κυτταρική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, καλλιέργεια MSCs σε προκατεργασμένους με πλάσμα αέρα και επικαλυμένους με κολλαγόνο μικροθαλάμους για 5 ημέρες, απέδειξε ενίσχυση της ανάπτυξής τους σε στρωματικό ιστό, καταλήγοντας σε 100% επιφανειακή κάλυψη, την υψηλότερα καταγραφόμενη από τις αντίστοιχες μελέτες.

Συμπερασματικά, η κατεργασία πλάσματος αποτελεί μια απλή και αποτελεσματική μέθοδο τροποποίησης των βασισμένων σε PDMS μικροδιατάξεων για την ακινητοποίηση κολλαγόνου, και γενικότερα πρωτεϊνών ECM, με στόχο την ομαλή και μακροπρόθεσμη καλλιέργεια MSCs.
- Συγκαλλιέργεια HSPCs/MSCs για πρώτη φορά χωρίς τη χρήση τεχνητών ικτριωμάτων ή γέλης με τα MSCs να διαμορφώνουν φυσιολογικά τη 3D μήτρα για την ομαλή συνύπαρξη με τα HSPCs.

Κλείνοντας, παρουσιάζονται ορισμένες προτάσεις επέκτασης της διατριβής ακολούθως:

- 1) Διατήρηση συγκαλλιέργειας MSCs και HSPCs στη μικροδιάταξη παθητικής τροφοδοσίας τουλάχιστον για μία εβδομάδα, ώστε να αποδειχθεί η δημιουργία οργανοειδούς αιμοποιητικού μυελού των οστών. Ειδικότερα, θα πρέπει να αποδειχθεί η ικανότητα των HSPCs να

διαφοροποιούνται σε μεταγενέστερες κυτταρικές σειρές, και συγκεκριμένα, σε κύτταρα της μυελικής σειράς (π.χ. ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα κ.λ.π.). Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε σύγκριση με συμβατική 2D κυτταροκαλλιέργεια, ώστε να αναδειχθεί η διαφοροποίηση της καλλιέργειας στη μικροδιάταξη. Για την απεικόνιση των διαφόρων ειδών κυττάρων, θα προηγηθεί σήμανσή τους με τις αντίστοιχες φθορίζουσες χρωστικές, επιτρέποντας έτσι την καθημερινή παρατήρησή τους σε συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο, αλλά και σε συνεστιακό (Axio) την τελευταία ημέρα. Επιπλέον, η ανίχνευση των διαφοροποιημένων κυττάρων θα πραγματοποιηθεί με κυτταρομετρία ροής, και συγκεκριμένα, με τη μέθοδο ταξινόμησης κυττάρων ενεργοποιημένων με φθορισμό (fluorescence-activated cell sorting/FACS). Η μελέτη αυτή θα επιμεληθεί από τη Δρ. Μ. Γρηγορίου, Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.

- 2) Μελέτη (case study) Συστηματικού Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ). Η μικροδιάταξη μυελού των οστών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αυτοάνοσης νόσου του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου (ΣΕΛ), με χρήση κυττάρων από το μυελό των οστών ενηλίκων. Αρχικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί αναγνωριστικό πείραμα με τη χρήση MSCs ομφάλιου λώρου (UC-MSCs), για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασής τους με ορό αίματος ασθενή με ΣΕΛ. Μετέπειτα, θα πραγματοποιηθεί μετάβαση σε κύτταρα μυελού ενήλικα, όπου θα συγκαλλιερηθούν ασθενή MSCs με HSPCs. Για την αναγνώριση της συνεισφοράς των HSPCs στην ασθένεια, θα πραγματοποιηθεί παράλληλη συγκαλλιέργεια υγιών MSCs με HSPCs, ώστε να εντοπιστεί η διαφοροποίηση.

Η επιλογή του ΣΕΛ ως περίπτωση μελέτης για το μικροεργαστήριο μυελού αποδίδεται στα κοινά αιματολογικά του συμπτώματα [1], γεγονός που καθιστά ένα *in vitro* κατασκευασμένο οργανοειδές μυελού των οστών, μία αξιόπιστη πλατφόρμα μελέτης της παθογένειάς του. Συγκεκριμένα ερωτήματα που θα μπορούσαν να απαντηθούν είναι το κατά πόσο οι παθογένειες της νόσου μπορούν να ανιχνευθούν ήδη από τις διαφοροποιημένες γενιές των HSPCs, όπως για παράδειγμα, από τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα, καθώς και ενδεχόμενη συμβολή των HSPCs στη θεραπεία της νόσου [2].

- 3) Η μικροδιάταξη υπό ροή (ενεργούς τροφοδοσίας) μπορεί να δοκιμαστεί εκ νέου για τη δημιουργία και συντήρηση αιμοποιητικού μυελού των οστών, δεδομένου ότι ευνοεί τη γρήγορη κυτταρική ανάπτυξη. Βασικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη για τη λειτουργία της, είναι η αντιμετώπιση της εισόδου φυσαλίδων. Όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 5, η παγίδα που ενσωματώθηκε αποδίδει σε μικρούς χρόνους της τάξης των ωρών, γεγονός που δεν επαρκεί για καλλιέργεια οργανοειδούς που απαιτεί χρόνους της τάξης των ημερών. Αιτία αυτής της δυσλειτουργίας της ήταν πρωταρχικά η μικρή διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης της παγίδας (παρά τις υποδείξεις του κατασκευαστή), και η χρήση μη βέλτιστων προσαρμογών (με κενούς χώρους παγίδευσης αέρα στην είσοδο και έξοδο τους). Συστήνεται επομένως, η επαναλειτουργία της μικροδιάταξης με ενσωματωμένη την παγίδα, η οποία θα συνδεθεί με αντλία κενού για τη δημιουργία υποπίεσης στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης της προς εκτόνωση των φυσαλίδων, ενώ επιπλέον, θα συνδεθεί με κατάλληλους προσαρμογείς στην είσοδο και έξοδό της. Εναλλακτικά, μπορεί να δοκιμαστεί η αλλαγή του σχεδίου της ίδιας της μικροδιάταξης, ώστε να φέρει on-chip ενσωματωμένη την παγίδα φυσαλίδων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την εργασία των Lee et al. [3].
- 4) Μελλοντική δυνατότητα κατασκευής μικροδιάταξης με ενσωματωμένους τρεις μικροθαλάμους καλλιέργειας στην ίδια συσκευή, προς επιτάχυνση (πολλαπλά ταυτόχρονα πειράματα) και συγκριτική μελέτη πειραμάτων. Όπως αναλύθηκε και στο Κεφάλαιο 6, η μικροδιάταξη στο άνω επίπεδο τροφοδοσίας διαθέτει κοινό προθάλαμο θρεπτικού υλικού, που καταλήγει σε τρεις μικροθαλάμους, οι οποίοι επικοινωνούν με τους μικροθαλάμους καλλιέργειας του κάτω επιπέδου μέσω μεμβρανών.
- 5) Σε παρόμοιους θαλάμους, θα ήταν πολύ χρήσιμη η ενσωμάτωση αισθητήρων για την παρακολούθηση χρήσιμων βιοδεικτών κατά την διάρκεια της ανάπτυξης ή διατήρησης του οργάνου. Η ανάπτυξη

τέτοιων συστημάτων θα έδινε τη δυνατότητα αυτοματοποίησης των μικροδιατάξεων και θα επέτρεπε την *in situ* συλλογή δεδομένων για τη δοκιμή νέων φαρμάκων και τη χαρτογράφηση ή και θεραπεία ασθενειών. Τα συστήματα αυτά προσφέρονται ως διαγνωστικές πλατφόρμες σε πραγματικό χρόνο και στο σημείο φροντίδας, και προωθούν την εξατομικευμένη ιατρική.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Κατασκευή πορώδους μεμβράνης με εγχάραξη με laser (laser ablation)

Εδώ παρατίθεται λεπτομερώς η μελέτη άμεσης κατασκευής της πορώδους μεμβράνης με εγχάραξη πολυμερικών υποστρωμάτων με laser, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάστηκαν συνοπτικά στην παράγραφο 3.5 του Κεφαλαίου 3.

3.5.1 Υπόστρωμα πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) PDMS

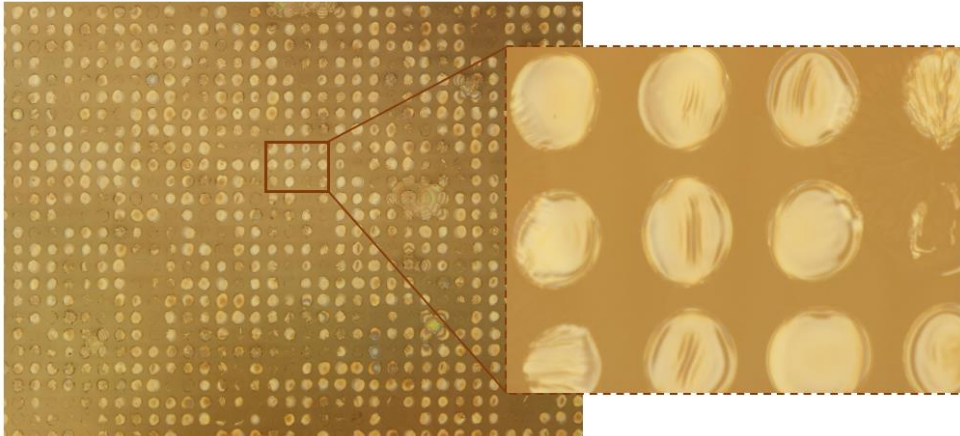
Στην ενότητα αυτή, παρουσιάζεται η προσπάθεια παραγωγής πορώδους μεμβράνης PDMS με εγχάραξη με laser ως μια πιθανώς πιο άμεση μέθοδος. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη δια περιστροφής λεπτού υμενίου PDMS, πάχους περίπου 10 μm στις γνωστές συνθήκες (στροφές 7 000 rpm, επιτάχυνση 1 500 rpm/s, χρόνος 30 s) πάνω σε γυαλιά μικροσκοπίου διαστάσεων 2.5 x 2.5 cm². Για να εξασφαλιστεί η μετέπειτα αποκόλλησή του PDMS, τα γυαλιά χρειάστηκε να αδρανοποιηθούν χημικά. Έτσι, προηγήθηκε ενεργοποίησή τους σε πλάσμα οξυγόνου στον αντιδραστήρα MET επαγωγικής σύζευξης για ισχύ 800 W, πίεση 1.33 Pa, χρόνο 5 min και χωρίς τάση πόλωσης, και ακολούθησε δια περιστροφής επικάλυψη λεπτού υδρόφοβου υμενίου εμπορικού Teflon (1% w/w) (στροφές 7 000 rpm, επιτάχυνση 1 500 rpm/s, χρόνος 30 s). Χρησιμοποιήθηκαν δύο γυαλιά προς αποφυγή στατιστικών σφαλμάτων.

Για την εγχάραξη χρησιμοποιήθηκε σύστημα παλμικού laser Galvo, ακτινοβολίας μήκους κύματος 532 nm, παραγόμενου ρεύματος 36 A, ενός παλμού με πλάτος 1.2 μs και ενέργεια 2 -3 J/cm². Επιπλέον, προκειμένου να επιτευχθεί το σχέδιο της μεμβράνης με διάκεντρο οπών στα 40 μm, ορίστηκε ταχύτητα σάρωσης 2 m/s για συχνότητα 50 kHz ($\frac{2 \times 10^6 \mu\text{m/s}}{5 \times 10^4 / \text{s}} \mu\text{m} = 40 \mu\text{m}$). Το σύστημα Galvo διαθέτει φακό που αποδίδει εστιακό σημείο ελάχιστης διαμέτρου 15 μm, που όμως λόγω θερμικών φαινομένων, ιδιαίτερα εμφανή σε πολυμερικά υποστρώματα, ανέρχεται περίπου στα 20 μm.

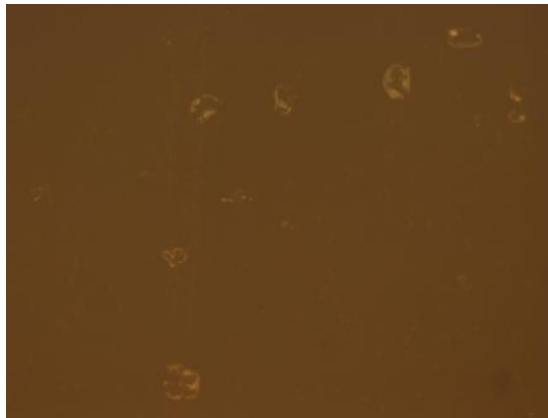
Τα αποτελέσματα της εγχάραξης των επιστρωμένων με PDMS γυαλιών-φορέων φαίνονται στις εικόνες μεγέθυνσης 10x και 100x οπτικού μικροσκοπίου του Σχήματος Π1a. Είναι εμφανής η δημιουργία μιας συστοιχίας κυκλοειδών δομών, σχεδίου που προσομοιώνει εκείνο της μεμβράνης, με δομές όμως μεγαλύτερης μέσης διαμέτρου στα $27.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$. Επίσης, δεν έχουν εγχαραχθεί όλες οι δομές, ενώ από όσες έχουν εγχαραχθεί, αρκετές δεν είναι ομοιόμορφες αλλά έχουν ακανόνιστο σχήμα. Επιπλέον, η χρωματική διαφοροποίηση στο εσωτερικό των δομών είναι ενδεικτική ύπαρξης διαφορετικών επιπέδων εγχάραξης.

Προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο οι δομές αυτές αντιστοιχούν σε διανοιγμένες οπές στο λεπτό υμένιο PDMS, ακολούθησε συγκόλλησή του με το επίπεδο PDMS του μικροθαλάμου καλλιέργειας. Το υμένιο αποκολλήθηκε πλήρως από το γυαλί και συγκολλήθηκε με το μικροθάλαμο, οπότε και παρατηρήθηκε οπτικά η πλευρά του υμενίου που ήταν εκτεθειμένη στον αέρα και όχι σε επαφή με το γυαλί. Όπως φαίνεται στο Σχήμα Π1b, η παρατήρηση ανέδειξε πλήρη απουσία μικροδομών στο υμένιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αρχικώς παρατηρούμενες δομές μετά την εγχάραξη, πραγματοποιήθηκαν σε υποκείμενα επίπεδα, δηλαδή είτε στο υμένιο Teflon είτε στο γυαλί, είτε και στα δύο. Με αυτό το συμπέρασμα υπόψη, η εικόνα του υμενίου (Σχήμα Π1b) παρουσιάζει κάποια υπολείμματα Teflon ή αποτυπώματα δομών που εγχάραχθηκαν σε υποκείμενα επίπεδα.

a.



b.



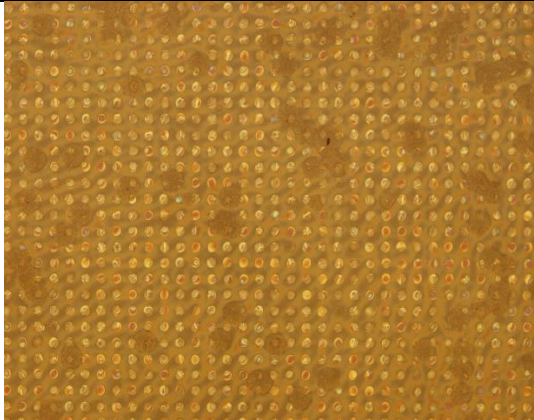
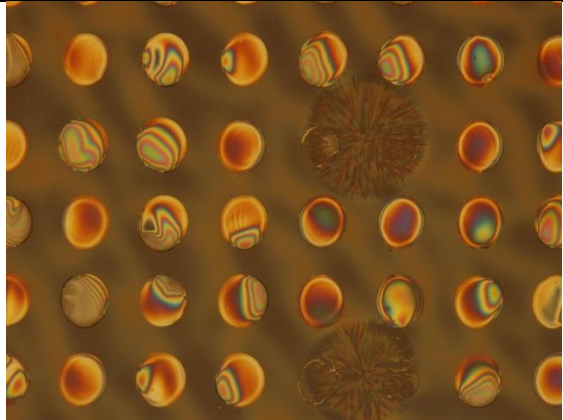


Σχήμα Π1. Εγχάραξη με laser γυαλιού-φορέα με λεπτή επίστρωση PDMS πάχους $\approx 10 \mu\text{m}$. a) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου 10x και σε μεγέθυνση εικόνα 100x των δομών μέσης διαμέτρου $\approx 28 \mu\text{m}$ από την εγχάραξη σε υποκείμενα του PDMS επίπεδα. b) Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 50x της επίστρωσης PDMS μετά την συγκόλλησή της με άλλο επίπεδο PDMS, όπου δε διακρίνεται διάνοιξη οπών.

Το PDMS είναι έντονα διαπερατό σε όλη την περιοχή του φάσματος από το εγγύς υπεριώδες μέχρι το εγγύς υπέρυθρο, που περιλαμβάνει και την περιοχή του ορατού, στην οποία ανήκει και το μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιήθηκε (532 nm) [1]. Όμως, η εγχάραξη της επιφάνειας του PDMS με laser μηκών κύματος αυτής της περιοχής του φάσματος είναι δυνατή χάρη σε χημικές τροποποιήσεις που συντελούνται στα κατώτερα στρώματα του PDMS που προσβάλλει το laser, όπως για παράδειγμα θραύσεις διαμοριακών δεσμών. Η συσσώρευση αυτών των αλλοιώσεων αλλάζει συνολικά τις οπτικές ιδιότητες του υλικού και τελικά αυξάνει την απορρόφησή του στην επιπτόμενη ακτινοβολία, προκαλώντας έτσι την επιφανειακή του εγχάραξη [2]. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από το μήκος κύματος του laser ακτινοβολήσης και τη ροή ενέργειας, και απαιτεί τη χρήση πολλαπλών παλμών. Ιδιαίτερα για ακτινοβολήση στα 532 nm, εγχάραξη του PDMS έχει παρατηρηθεί μετά τον 8^ο παλμό και για ροή ενέργειας 10 J/cm^2 , ενώ οι απαιτούμενοι παλμοί αυξάνονται όσο μειώνεται η ενέργεια, φθάνοντας ενδεικτικά τον 11^ο και 16^ο παλμό για ροές 9 και 7 J/cm^2 , αντίστοιχα [2]. Τέλος, η διαδικασία αυτή απαιτεί σχετικά μεγάλα πάχη PDMS, ώστε οι αλλοιώσεις των κατώτερων στρωμάτων του να είναι επαρκείς για να προκαλέσουν συσσωρευτικά ελάττωση της διαπερατότητας στο

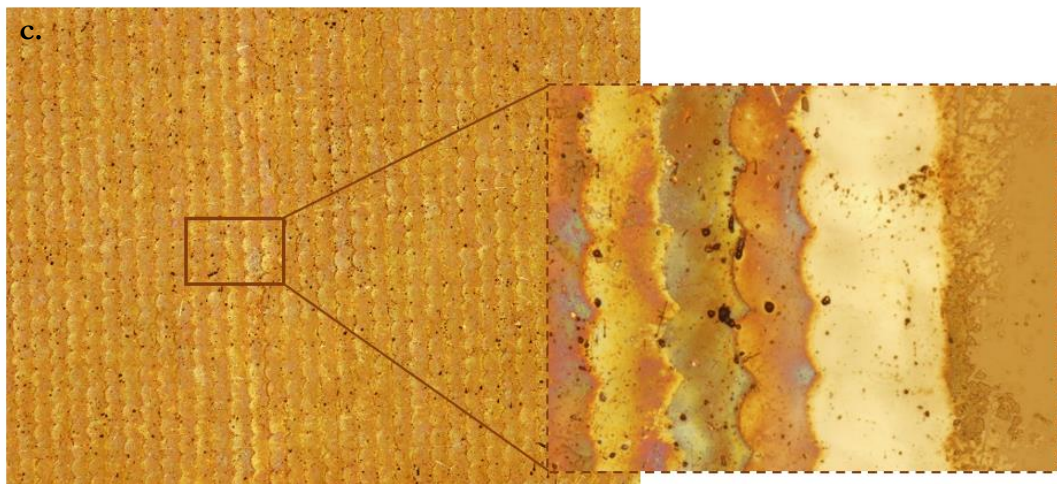
ακτινοβολούμενο μήκος κύματος. Χαρακτηριστικά, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί στη βιβλιογραφία για πάχος 170 μm [2]. Επομένως, λόγω διαπερατότητας του PDMS στα 532 nm, τη χρησιμοποίηση ενός παλμού μικρής ροής ενέργειας 2 – 3 J/cm² και του μικρού πάχους του υμενίου, μπορεί να αιτιολογηθεί η αδυναμία εγχάραξης του.

Ακολούθησε παρατήρηση των γυαλιών-φορέων του υμενίου μετά την απομάκρυνση του υμενίου PDMS σε οπτικό μικροσκόπιο (Πίνακας Π1, μεγέθυνσης 10x και 50x), από την πλευρά της εναπομεινουσας επιστρώσης Teflon. Παρουσιάζονται να είναι σχεδόν αμετάβλητες σε σχέση με την αρχική παρατήρηση των γυαλιών αμέσως μετά την εγχάραξη (Σχήμα Π1a), γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία εγχάραξης στο PDMS. Μετέπειτα εμβάπτιση των γυαλιών σε διάλυμα piranha H₂O₂ : H₂SO₄ (αναλογία 1:1) για 15 min προς απομάκρυνση του Teflon έδωσε τις εικόνες του Πίνακας Π1, αντίστοιχα μεγέθυνσης 10x και 50x, όπου διακρίνεται εμφανής εγχάραξη στο γυαλί, που όμως δε διαθέτει την αρχικώς παρατηρούμενη μορφή συστοιχίας μικροδομών, αλλά χαρακτηρίζεται από συνεχείς γραμμές, διακοπτόμενες από κυκλοειδείς δομές στα σημεία στόχευσης. Από τη διαφοροποίηση αυτή στη μορφή, συνάγεται ότι η εγχάραξη είχε πραγματοποιηθεί και στο επίπεδο του Teflon.

Πίνακας Π1. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x και 50x του γυαλιού-φορέα μετά την απομάκρυνση του λεπτού υμενίου PDMS και μετά από εμβάπτισή του σε διάλυμα piranha για την αφαίρεση της επιστρώσης Teflon. Η διαφοροποίηση στις δομές στο γυαλί μετά την αφαίρεση του Teflon, υποδηλώνει εξαρχής δημιουργία τους στο τελευταίο.

Μεγέθυνση	10x	50x
Απομάκρυνση υμενίου PDMS		
Υγρή εγχάραξη piranha		

Πραγματοποιήθηκε επανάληψη της εγχάραξης, αυτή τη φορά σε γυαλιά που δεν είχαν επιστρωθεί με PDMS, είτε ως είχαν (απλό γυαλί), είτε με την επίστρωση Teflon. Η εγχάραξη πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες με τις αρχικές, με μόνη διαφοροποίηση στο πλάτος παλμού που ορίστηκε στα 2 μs . Για λόγους στατιστικής, εξετάστηκαν 2 γυαλιά ανά περίπτωση. Στο Σχήμα Π2 που ακολουθεί παρουσιάζονται εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μετά την εγχάραξη των γυαλιών, των απλών (a,b) και με την επίστρωση Teflon (c). Και στις δύο περιπτώσεις, είναι εμφανής η εμφάνιση δομών, αλλά στην πίσω πλευρά από εκείνη της ακτινοβολήσης, από όπου προέρχονται και οι εικόνες. Η από πάνω πλευρά του γυαλιού δεν εμφάνισε κάποια σχηματοποίηση (Σχήμα Π2b). Τα απλά γυαλιά παρουσιάζουν παρεμφερή εικόνα σε σχέση με εκείνα της προηγούμενης εγχάραξης μετά την εμβάπτισή τους σε διάλυμα piranha, με τη διαφοροποίηση ότι εδώ είναι περισσότερο διακριτές οι γραμμές ακτινοβολήσης. Τα γυαλιά με την επίστρωση Teflon, διαθέτουν με τη σειρά τους παρεμφερή μορφολογική εικόνα με τα απλά γυαλιά, καθώς και στις δύο περιπτώσεις, η πίσω επιφάνεια που σχηματοποιείται είναι το γυαλί.



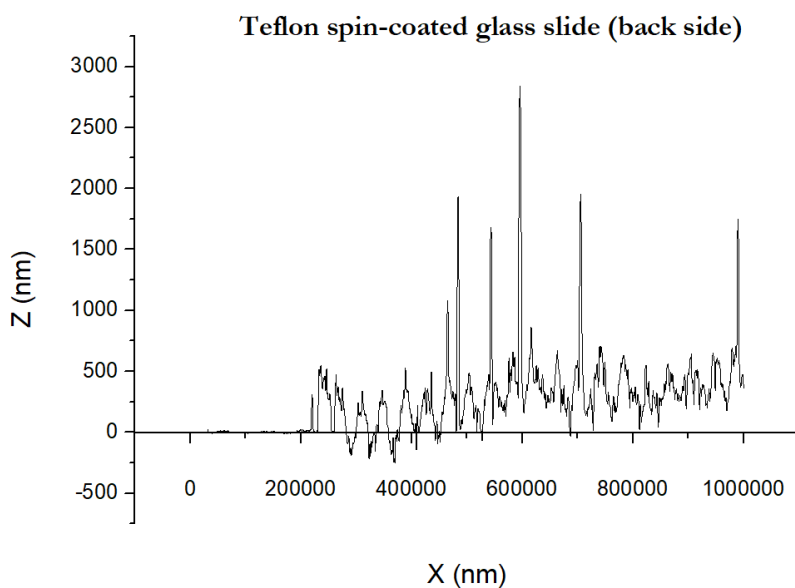
Σχήμα Π2. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x γυαλιού μετά από εγχάραξη με laser a) της πλευράς ακτινοβολήσης και b) της πίσω πλευράς από εκείνη της ακτινοβολήσης. Δεν πραγματοποιήθηκε εγχάραξη στην πλευρά ακτινοβολήσης. c) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου 10x και σε μεγέθυνση 50x της πίσω πλευράς της ακτινοβολήσης

γυαλιού επιστρωμένου με Teflon. Παρατηρείται παρόμοια εικόνα σχηματοποίησης της πίσω πλευράς των γυαλιών και στις δύο περιπτώσεις, με και χωρίς την επιστρωση Teflon.

Προς περαιτέρω εξέταση, η πίσω πλευρά του γυαλιού που είχε επιστρωθεί με Teflon, μετρήθηκε σε προφιλόμετρο ακίδας XP-2 (Ambios Technology). Μετά τη σάρωση επαρκούς διαδρομής (≈ 10 mm), προέκυψε συστηματική ανύψωση κατά περίπου 400 nm από την επιφάνεια του γυαλιού και μια περιοδική εγχάραξη της τάξης των 80 nm (περιοχές κάτω από το επίπεδο του γυαλιού) που ενδεχομένως να είναι και θόρυβος. Το Σχήμα Π3 παρουσιάζει το εξαγόμενο προφίλ του γυαλιού.

Να σημειωθεί εδώ, ότι τα γυαλιά κατά τη διαδικασία της εγχάραξης, ήταν σε κάθε περίπτωση τοποθετημένα πάνω σε φορέα δισιδίου Si. Συνεπώς, πιθανολογείται ότι το υπόστρωμα πυριτίου, απορρόφησε την ακτινοβολία και προκάλεσε τοπική απόθεση (sputtering) στην πίσω πλευρά των γυαλιών που ήταν σε επαφή με αυτό (και ενδεχόμενη εγχάραξη). Πάντως, το γεγονός ότι το προφίλ του γυαλιού δεν είναι σχηματοποιημένο, αλλά είναι της μορφής “V”, παραπέμπει περισσότερο σε απόθεση.

Συνολικά, κατά την επανάληψη της εγχάραξης, παρατηρήθηκε αυτή η σχηματοποίηση στην πίσω πλευρά των γυαλιών, κάτι που δεν είχε παρατηρηθεί κατά την πρώτη απόπειρα. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται σε λανθασμένη εστίαση στο επίπεδο της επιφάνειας των γυαλιών πριν την έναρξη της εγχάραξης στο επαναληπτικό πείραμα.

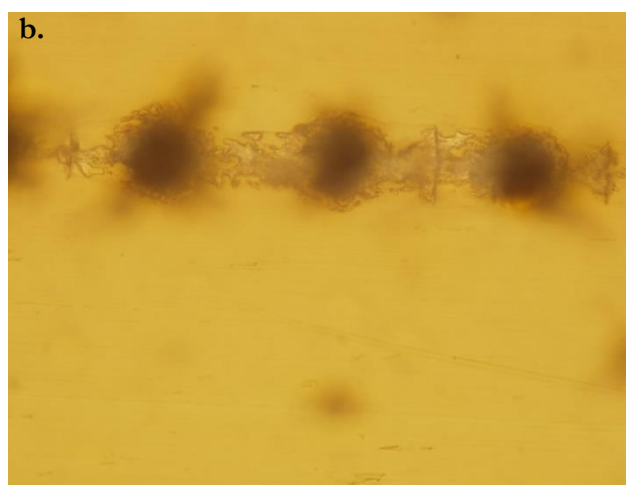
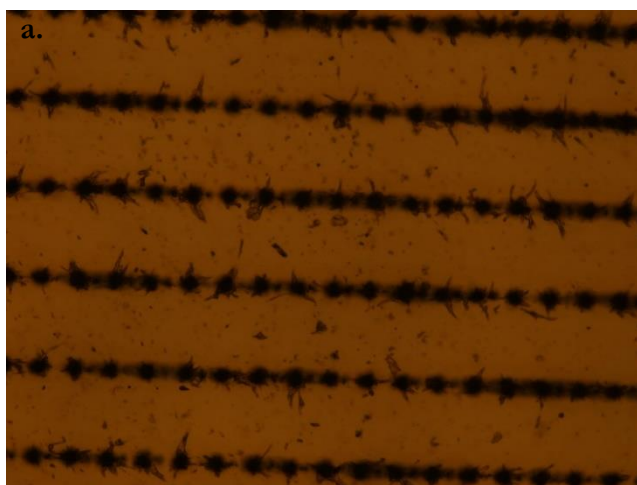


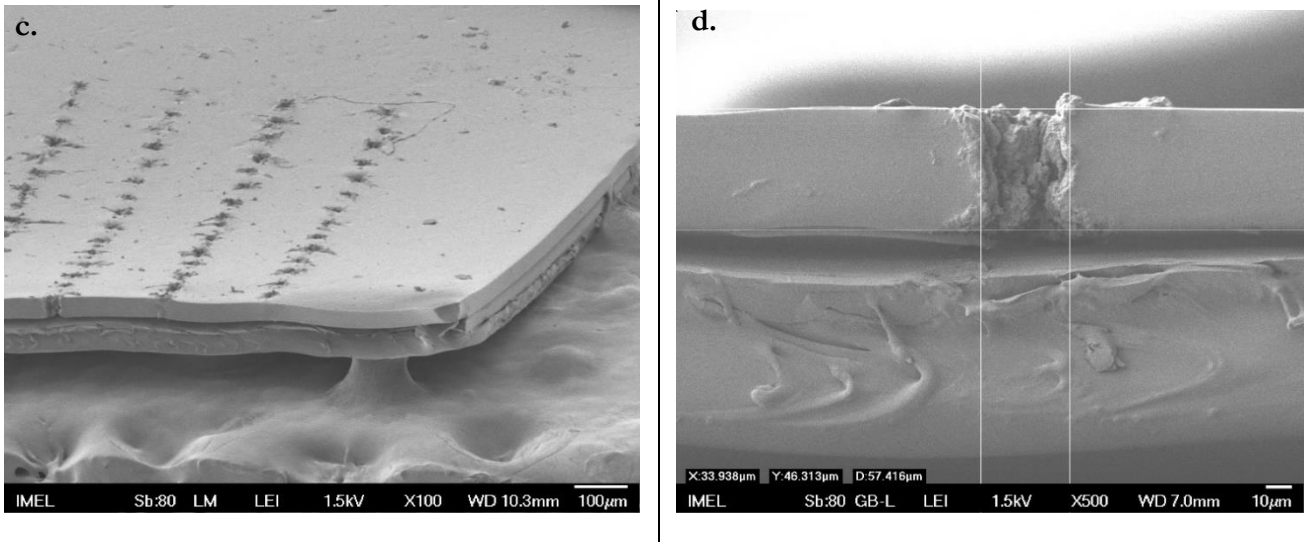
Σχήμα Π3. Χαρακτηρισμός τοπογραφίας πίσω πλευράς ακτινοβόλησης γυαλιού επιστρωμένου με Teflon με χρήση προφιλόμετρου ακίδας. Η ανύψωση περίπου 400 nm υποδεικνύει πιθανή απόθεση από το φορέα Si του γυαλιού κατά την εγχάραξη.

3.5.2 Υπόστρωμα εμπορικής ταινίας Kapton®

Μετά την αδυναμία διάνοιξης οπών στη λεπτή επιστρωση PDMS, διερευνήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο Therm-X® IT-7270K ως υλικό για τη μεμβράνη και εξετάστηκε η δυνατότητα εγχάραξης του με το ίδιο σύστημα laser Galvo. Το Therm-X® IT-7270K είναι ταινία Kapton® (DuPont™) επικαλυμμένη στις δύο όψεις με θερμοσκληρυνόμενη σιλικόνη Therm-X® ευαίσθητη στην πίεση. Είναι χρώματος κεχριμπαρένιου, συνολικού πάχους (μαζί με την επιστρωση σιλικόνης) στα 90 μm , και ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι και 180°C. Οι ταινίες κόπηκαν σε μεγέθη 4 mm x 12.8 mm πριν τη δοκιμή τους.

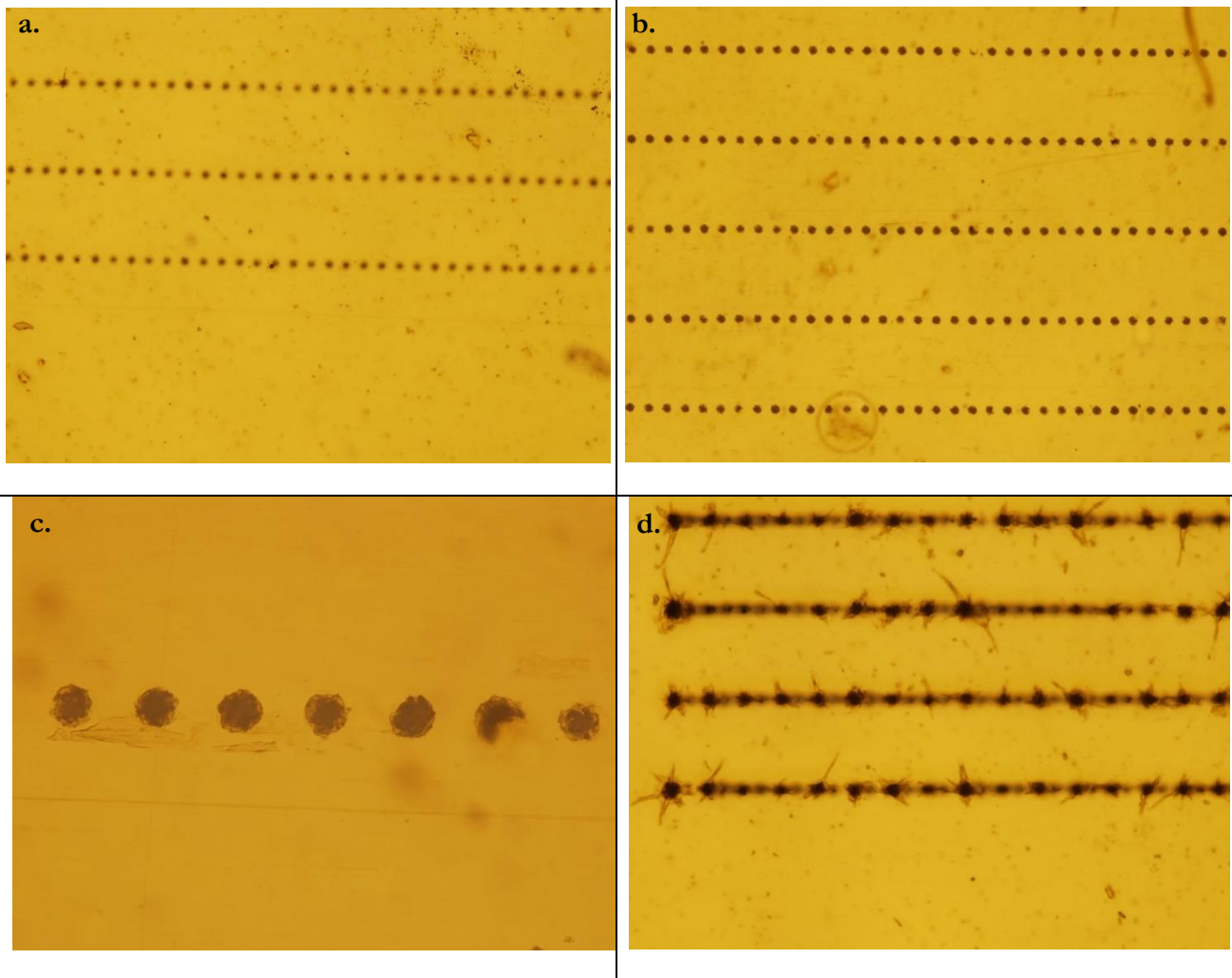
Για την εγχάραξη του χρησιμοποιήθηκε laser στα 532 nm, ρεύματος 36 A και με πλάτος παλμού 2 μs , ενώ διατηρήθηκε ταχύτητα σάρωσης 2 m/s και συχνότητα 50 kHz, ώστε να επιτευχθεί διάκεντρος οπών 40 μm . Δοκιμάστηκαν διάφορες ενέργειες εγχάραξης μεταβάλλοντας το επίπεδο του πολωτή σε ένα εύρος από 300° έως 330°, όπου η αύξηση της κλίσης του ισοδυναμούσε με αύξηση στην ενέργεια. Επιπλέον, δοκιμάστηκαν τρεις τρόποι λειτουργίας, ο πρώτος με χρήση ενός παλμού ανά σημείο στόχευσης, ο δεύτερος με χρήση πολλαπλών παλμών ανά σημείο, και ο τρίτος με χρήση πολλαπλών σαρώσεων περνώντας από τα ίδια σημεία. Ξεινώντας με ένα παλμό ανά σημείο και με τη μέγιστη ενέργεια, δηλαδή για 330° κλίση πολωτή, παρατηρήθηκε εγχάραξη του υλικού στα σημεία στόχευσης με εμφανή όμως θερμική αλλοίωση και απόθεση του υλικού περιμετρικά του κέντρου των σημείων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες μεγέθυνσης 10x και 50x οπτικού μικροσκοπίου του Σχήματος Π4(a,b), με την εικόνα μεγέθυνσης 10x να απεικονίζει την επιφάνεια του υλικού ($z = 0$) και την 50x το μέγιστο βάθος εγχάραξης. Στην επιφάνεια του υλικού μετρήθηκε μέση διάμετρος οπών $24.4 \pm 1.4 \mu\text{m}$, ενώ ιδιαίτερα από την 50x μεγαλύτερου βάθους είναι εμφανές ότι έχει χαθεί η διακριτότητα των οπών και στη θέση τους έχουν δημιουργηθεί γραμμές συνεχούς εγχάραξης. Προς καλύτερη παρατήρηση, λήφθηκαν εικόνες SEM, που αντίστοιχα παρουσιάζονται στο Σχήμα Π4(c,d). Η εικόνα μεγέθυνσης 100x υπό κλίση 60° αποδεικνύει τη διάνοιξη οπών στην επιφάνεια του Kapton®, που όμως όπως επιβεβαιώνεται και από την εικόνα μεγαλύτερης μεγέθυνσης 500x (υπό 90°), το βάθος τους είναι περίπου 46 μm , με σημαντική καθετότητα τοιχωμάτων, που όμως δε διαπερνά όλο το υλικό.





Σχήμα Π4. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου εμπορικής ταινίας Kapton® εγχαραγμένης με ένα παλμό ανά σημείο και για 330° κλίση πολωτή a) μεγέθυνσης 10x στην επιφάνεια και b) 50x στο μεγαλύτερο βάθος εγχάραξης. Εικόνες SEM της ταινίας c) υπό κλίση 60° και d) υπό κλίση 90°, όπου φαίνεται ότι η εγχάραξη δεν έχει δημιουργήσει διαμπερείς οπές (διάνοιξη περίπου 46 μm από σύνολο 90 μm).

Συνεχίζοντας με μείωση της ενέργειας για 310° κλίση πολωτή και ένα παλμό ανά σημείο, μειώθηκαν σαφώς οι θερμικές αλλοιώσεις, όμως δεν παρατηρήθηκε διάνοιξη οπών στην επιφάνεια του υλικού, όπως φαίνεται από την εικόνα οπτικού μικροσκοπίου του Σχήματος Π5a, παρά μόνο στο χαμηλότερο επίπεδο εγχάραξης, όπως είναι εμφανές στο Σχήμα Π5b. Όμως, ακόμη και στο χαμηλότερο επίπεδο εγχάραξης, ενώ οι οπές σε αυτή την περίπτωση είναι διακριτές, δεν είναι όλες πλήρως διανοιγμένες (Σχήμα Π5c). Ακόμη και για ενδιάμεση ενέργεια που αντιστοιχεί σε επίπεδο πολωτή στις 320°, σημαντικός αριθμός οπών συνεχίζουν να μη διανοίγονται στην επιφάνεια του Kapton®, χωρίς όμως να αποφεύγονται οι θερμικές αλλοιώσεις (Σχήμα Π5d). Συμπερασματικά, στην εγχάραξη με ένα παλμό ανά σημείο, χρειάζεται υψηλή ενέργεια, αντίστοιχη των 330° κλίση πολωτή, ώστε να υπάρξει συνεχής διάνοιξη οπών από την επιφάνεια του υλικού μέχρι ένα συγκεκριμένο βάθος.

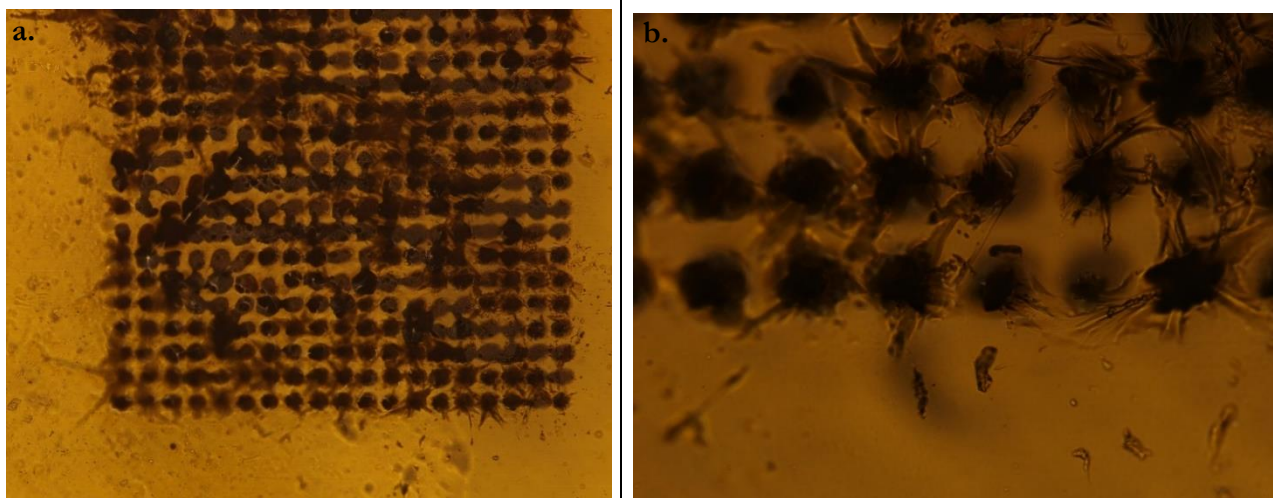


Σχήμα Π15. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου ταινίας Krypton® εγχαραγμένης με ένα παλμό ανά σημείο και για 310° κλίση πολωτή a) στην επιφάνεια της ταινίας μεγέθυνσης 10x, b) μεγέθυνσης 10x και c) μεγέθυνσης 50x στο χαμηλότερο βάθος εγχάραξης. Δεν εγχαράσσεται η επιφάνεια της ταινίας, ενώ ακόμη και στο επίπεδο εγχάραξης δε διανοίγονται όλες οι οπές. d) Εικόνα της ταινίας Krypton® για 320° κλίση πολωτή μεγέθυνσης 10x, όπου δεν έχουν διανοιχθεί όλες οι οπές στην επιφάνεια.

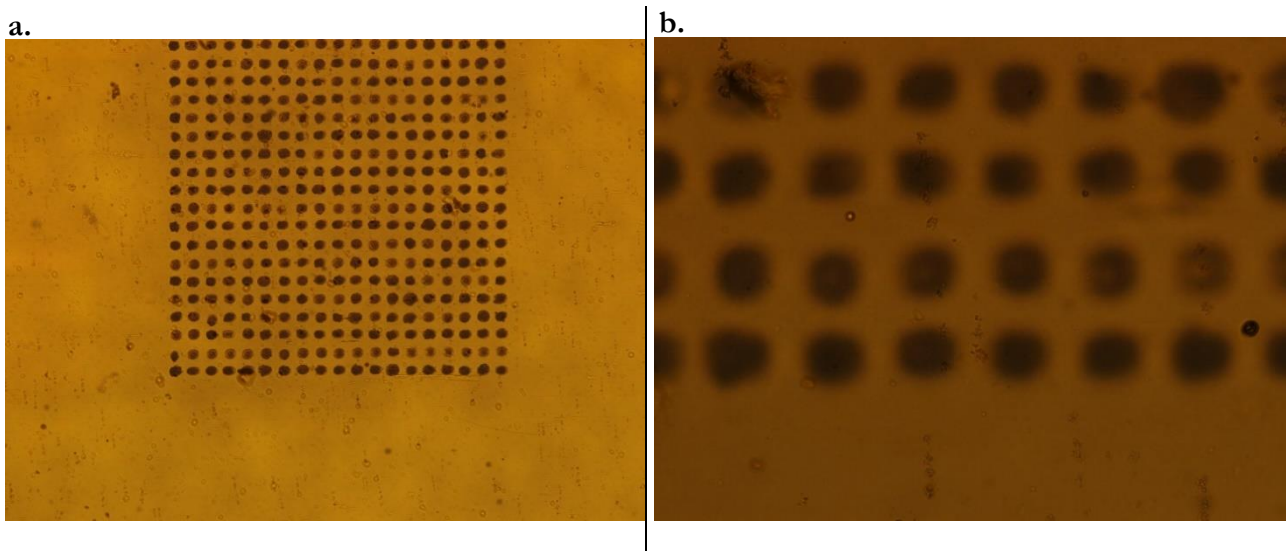
Δοκιμάστηκε στη συνέχεια, ο δεύτερος τρόπος λειτουργίας, με χρήση πολλαπλών παλμών ανά σημείο. Μειώθηκε έτσι η ενέργεια, μεταβάλλοντας το επίπεδο πολωτή στις 310°, και αυξήθηκαν οι παλμοί στους 20 ανά σημείο στόχευσης. Προέκυψαν αρκετά έντονα θερμικά αποτελέσματα με αλληλοεπικαλύψεις οπών, ιδιαίτερα σε χαμηλότερο επίπεδο εγχάραξης, όπως φαίνεται σε μια γενική εποπτεία του αποτελέσματος στο Σχήμα Π6α. Παρ'όλα αυτά, εστίαση στην επιφάνεια του υλικού ($z = 0$) (Σχήμα Π6b), αποδεικνύει ότι δεν έχουν διανοιχθεί όλες οι οπές, με παράλληλα εμφανείς αρκετές αποθέσεις υλικού.

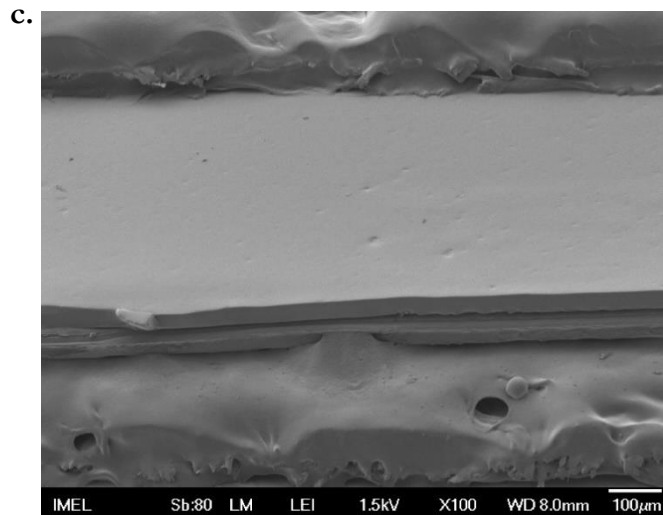
Διατήρηση του αριθμού των παλμών στους 20, με παράλληλη μείωση της ενέργειας για επίπεδο πολωτή στις 305°, έδωσε περισσότερο ομαλό σχέδιο συστοιχίας διακριτών οπών, όπως φαίνεται στην εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 10x (Σχήμα Π7a). Όμως, εστίαση στην επιφάνεια (Σχήμα Π7b) καταδεικνύει απουσία εγχάραξης στο επίπεδο $z = 0$. Παρατήρηση SEM του Σχήματος Π7c επιβεβαίωσε την απουσία διάτρητων οπών, ενώ στη θέση τους εντοπίζονται αχνά αποτυπώματα εγχάραξης.

Περαιτέρω αύξηση των παλμών στους 30 και για ίδια ενέργεια (επίπεδο πολωτή 305°), δεν κατόρθωσε αντίστοιχα να εγχραράξει στην επιφάνεια (δεν απεικονίζεται).



Σχήμα Π6. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου ταινίας Karton® εγχραραγμένης με 20 παλμούς ανά σημείο και για 310° κλίση πολωτή a) μεγέθυνσης 10x σε ενδιάμεσο επίπεδο εγχάραξης, με διακριτές θερμικές αλλοιώσεις και b) μεγέθυνσης 50x στην επιφάνεια, όπου δεν έχουν διανοιχθεί όλες οι οπές.





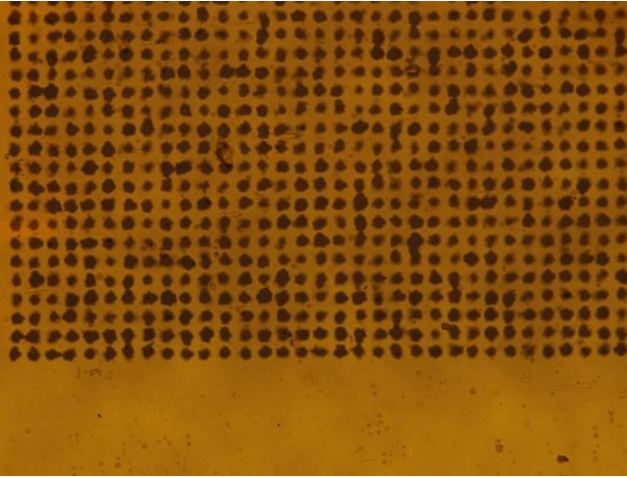
Σχήμα Π7. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου ταινίας Krypton® εγχαραγμένης με 20 παλμούς ανά σημείο και για 305° κλίση πολωτή α) μεγέθυνσης 10x σε ενδιάμεσο επίπεδο εγχάραξης, και β) μεγέθυνσης 50x στην επιφάνεια, που δεν έχει εγχαραχθεί. γ) Εικόνα SEM υπό κλίση 60° που αποδεικνύει ότι δεν εγχαραχθηκε η επιφάνεια της ταινίας.

Επομένως, η αύξηση του πλήθους των παλμών ανά σημείο, δεν είναι επαρκής για τη διάτρηση οπών στην επιφάνεια του Krypton®. Θα πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή ενέργεια για την εμφάνιση αποτελεσμάτων, με την αύξηση όμως της ενέργειας να προκαλεί παράλληλα αλλοιώσεις στο υλικό.

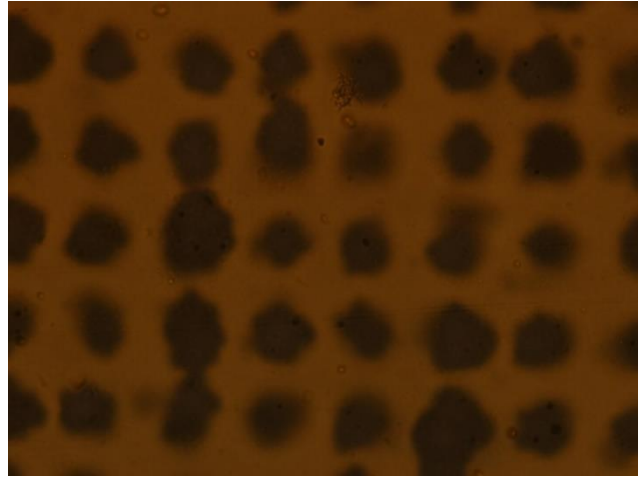
Προχωρώντας στον τελευταίο τρόπο λειτουργίας, δηλαδή την εφαρμογή πολλαπλών σαρώσεων της επιφάνειας, ξεινήσαμε από ενέργεια για επίπεδο πολωτή στις 305° και για αριθμό σκαναρισμάτων 10 (Σχήμα Π8α). Προέκυψε επαρκώς διακριτή συστοιχία σημείων εγχάραξης, που όμως δεν αντιστοιχεί στην επιφάνεια του υλικού (Σχήμα Π8β). Εστίαση στο επίπεδο εγχάραξης (Σχήμα Π8γ), απεικονίζει την ανομοιομορφία των διανοιγμένων οπών με παράλληλη εμφάνιση κατά τόπους αλληλοεπικαλύψεων.

Αύξηση της ενέργειας για επίπεδο πολωτή 310° και διατήρηση 10 σαρώσεων κατόρθωσε να διανοίξει οπές στην επιφάνεια, δημιουργώντας όμως έντονες θερμικές αλλοιώσεις (Σχήμα Π9α). Οι αλλοιώσεις αυτές σε χαμηλότερο επίπεδο (Σχήμα Π9β) εμφανίζονται να δημιουργούν την εντύπωση ενός συνεχούς εγχάραξης με μεγαλύτερα βάθη στα σημεία στόχευσης. Εικόνες SEM επιβεβαίωσαν τη διάτρηση της επιφάνειας για παρατήρηση υπό κλίση 60° (Σχήμα Π9γ) και τη διάνοιξη διαμπερών οπών μέχρι βάθους περίπου 50 μm από την παρατήρηση υπό 90° (Σχήμα Π9δ), που όμως δεν έχουν κάθετα τοιχώματα και δεν διαπερνούν όλο το υλικό. Επομένως, η αύξηση της ενέργειας υπήρξε καταλυτική για να εγχαραχθεί η επιφάνεια του υλικού.

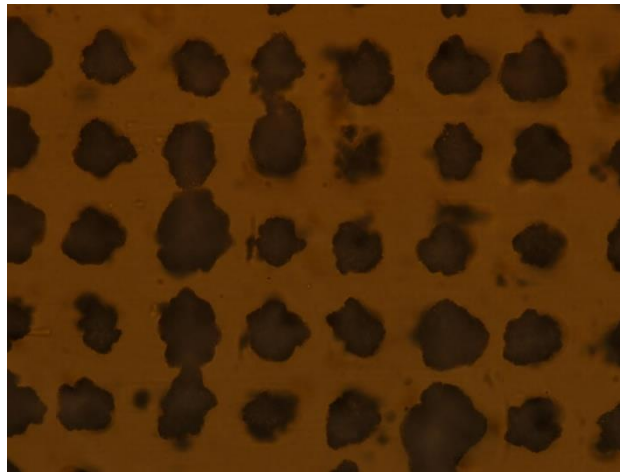
a.



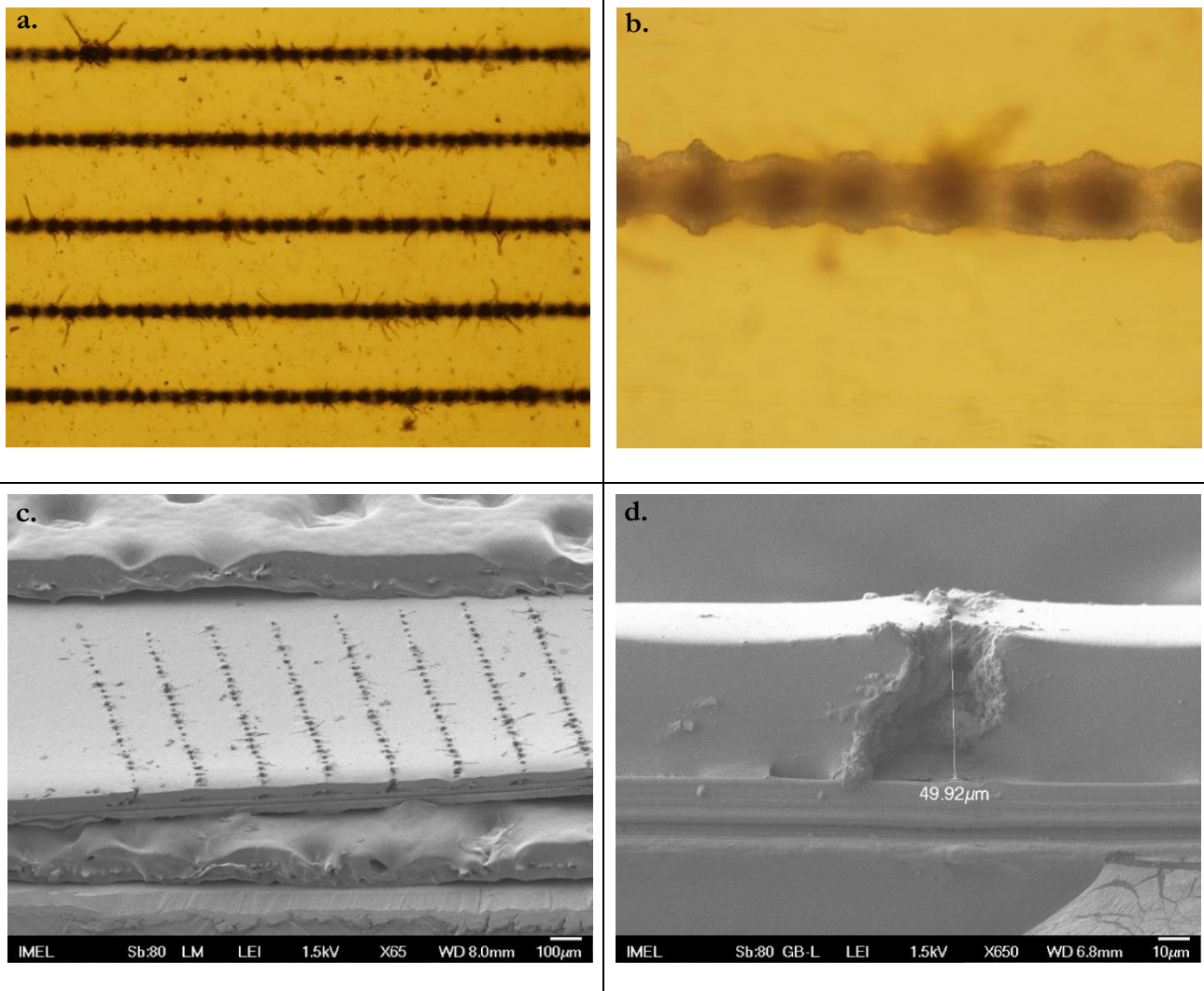
b.



c.



Σχήμα Π18. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου ταινίας Karton® εγχαραγμένης με laser με 10 σαρώσεις και για 305° κλίση πολωτή a) μεγέθυνσης 10x, b) μεγέθυνσης 50x στην επιφάνεια της ταινίας που δεν έχει εγχαραχθεί, και c) μεγέθυνσης 50x στο χαμηλότερο επίπεδο εγχάραξης.



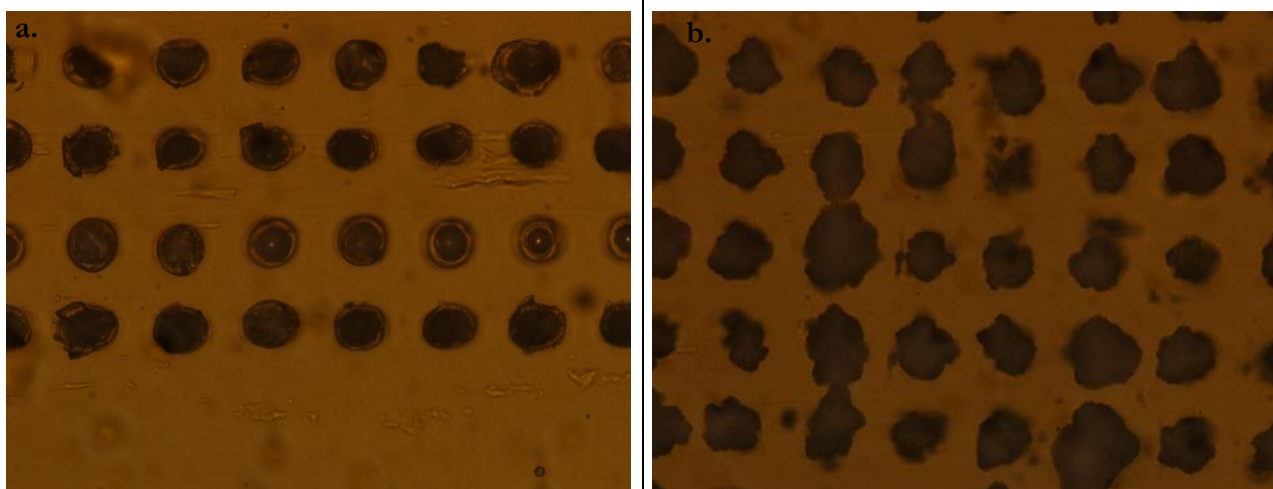
Σχήμα Π19. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου από την εγχάραξη με laser εμπορικής ταινίας Karton® με 10 σαρώσεις και για 310° επίπεδο πολωτή α) μεγέθυνσης 10x στην επιφάνεια, όπου διακρίνεται η δημιουργία διάτρητων οπών, και β) μεγέθυνσης 50x σε μεγαλύτερο βάθος εγχάραξης, με τις θερμικές αλλοιώσεις και αλληλεπικαλύψεις οπών να είναι εμφανείς . Εικόνες SEM της ταινίας γ) υπό κλίση 60° και δ) υπό κλίση 90° , από όπου φαίνεται ότι η εγχάραξη έχει ξεκιήσει από την επιφάνεια και φθάνει μέχρι βάθους περίπου $50 \mu\text{m}$ (σε σύνολο $90 \mu\text{m}$).

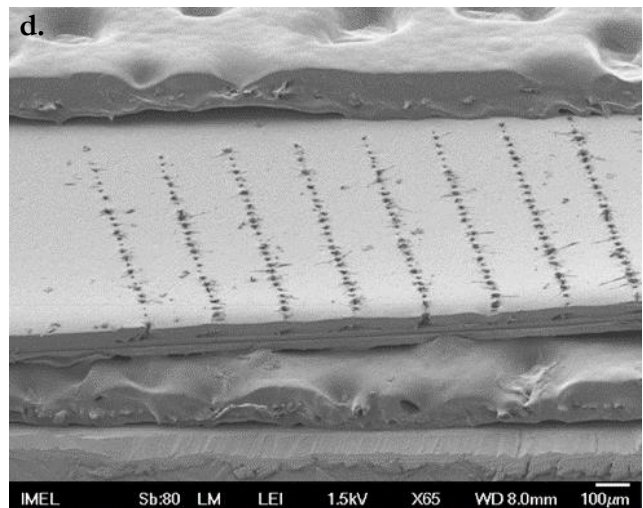
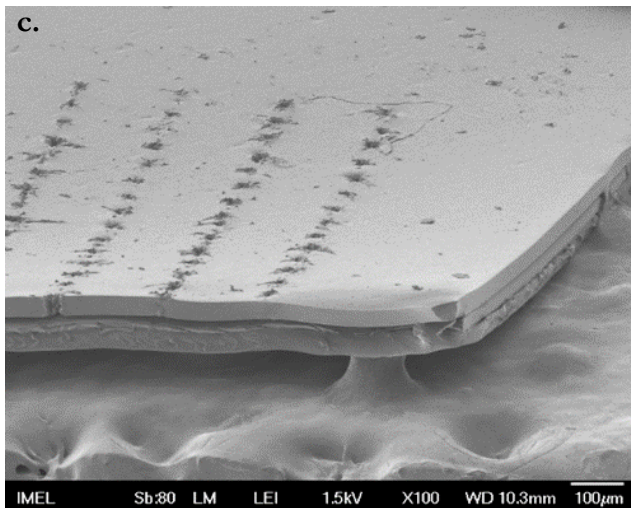
Από το σύνολο των τρόπων λειτουργίας εγχάραξης με laser του Karton®, συμπεραίνεται ότι για να πραγματοποιηθεί εγχάραξη στην επιφάνειά του, ο σημαντικότερος παράγοντας είναι η διοχέτευση κατάλληλης ενέργειας. Για τον κάθε τρόπο λειτουργίας υπάρχει ένα κατώφλι ενέργειας, κάτω από το οποίο δεν είναι δυνατή η εγχάραξη της επιφάνειας, ακόμη κι αν για παράδειγμα αυξηθεί το πλήθος των παλμών ή σαρώσεων. Συγκεκριμένα, για χρήση ενός παλμού ανά σημείο, επειδή ο μόνος παράγοντας που καθορίζει τη διάνοιξη είναι η ενέργεια, απαιτείται η υψηλότερη ενέργεια, για επίπεδο πολωτή 330° . Για χρήση πολλαπλών παλμών, όσο και σαρώσεων, το κατώφλι αυτό είναι χαμηλότερο, για επίπεδο πολωτή 310° , καθώς επιδρούν επικουρικά στην εγχάραξη οι παλμοί και οι σαρώσεις.

Από το σύνολο των τρόπων λειτουργίας, η χρήση πολλαπλών παλμών φαίνεται να είναι λιγότερο αποδοτική, καθώς για σημαντικό πλήθος παλμών 20 και ενέργεια όχι ιδιαίτερα υψηλή για επίπεδο πολωτή 310° , τα

φαινόμενα αλλοίωσης του υλικού είναι αρκετά έντονα. Επειδή με περαιτέρω αύξηση παλμών για την ίδια ενέργεια δε θα σημειωθεί δραματική αύξηση στο πλήθος των διανοιγμένων οπών, απαιτείται αύξηση στην ενέργεια. Όμως τα ήδη έντονα θερμικά φαινόμενα αποτρέπουν μια τέτοια, αποδεικνύοντας έτσι την αδυναμία δημιουργίας διάτρητου πλέγματος με το συγκεκριμένο τρόπο λειτουργίας.

Η χρήση πολλαπλών σαρώσεων φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στην εγχάραξη σε σχέση με τους πολλαπλούς παλμούς, καθώς με πλήθος μόλις 10 σαρώσεων και ενέργεια για επίπεδο πολωτή 310°, διανοίγονται όλες οι οπές με βάθος εγχάραξης περίπου 50 μm. Ως τρόπος λειτουργίας υπολείπεται των πολλαπλών παλμών μόνο ως προς την εμφάνιση μεγαλύτερης ανομοιομορφίας και εκκεντρότητας των σημείων εγχάραξης, που οδηγεί σε αρκετές αλληλοεπικαλύψεις. Χαρακτηριστικά, παραθέτουμε εικόνες από το επίπεδο εγχάραξης του υλικού με τους δύο τρόπους για κοινή ενέργεια, με επίπεδο πολωτή 305°, και αντίστοιχα 10 σαρώσεις και 20 παλμούς (Σχήμα Π10a,b). Ακόμη και για το μισό πλήθος σαρώσεων (10) (Σχήμα Π10b) σε σχέση με το πλήθος των παλμών (20) (Σχήμα Π10a), η μεγαλύτερη ανομοιομορφία της εγχάραξης είναι έδηλη. Συγκρίνοντας στη συνέχεια με τον τρόπο εγχάραξης με ένα παλμό, οι επιτυχείς προσπάθειες διάνοιξης οπών, δηλαδή για ενέργεια που αντιστοιχεί σε επίπεδο πολωτή 330° για την εγχάραξη με ένα παλμό (Σχήμα Π10c), και για ενέργεια αντίστοιχη επιπέδου πολωτή 310° με 10 σαρώσεις (Σχήμα Π10d), προκύπτουν παρεμφερή αποτελέσματα. Και για τους δύο τρόπους, εμφανίζονται σημαντικές θερμικές αλλοιώσεις και αποθέσεις υλικού, με ελαφρώς πιο έντονες για τις πολλαπλές σαρώσεις. Τα βάθη εγχάραξης είναι σχεδόν ίσα, με περίπου 3-4 μm πιο μεγάλα βάθη για τις σαρώσεις, που έχουν όμως λιγότερο κάθετα τοιχώματα χωρίς αυτό βέβαια να επηρέαζε πιθανή χρήση της μεμβράνης.





Σχήμα Π10. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης 50x από το επίπεδο εγχάραξης με laser ταινίας Kapton® ενέργειας επιπέδου πολωτή 305° a) με 20 παλμούς ανά σημείο και b) 10 σαρώσεις. Λιγότερο διακριτές δομές με τις πολλαπλές σαρώσεις και με περισσότερες αλληλοεπικαλύψεις. Εικόνες SEM υπό κλίση 60° στην επιφάνεια της ταινίας μετά από εγχάραξη με laser c) ενός παλμού με επίπεδο πολωτή 330° d) 10 σαρώσεων με επίπεδο πολωτή 310°. Και στις δύο περιπτώσεις, εγχαράσσεται η επιφάνεια σε παρόμοια βάρη $\approx 50 \mu\text{m}$.

Συμπερασματικά, σε κανένα από τους τρόπους που δοκιμάστηκαν δεν επιτεύχθηκε διάτρηση όλου του πάχους του Kapton®, παρά μόνο κατά μέγιστο των $50 \mu\text{m}$, από το σύνολο των $90 \mu\text{m}$. Θα μπορούσε ενδεχομένως να δοκιμαστεί ει νέου η εγχάραξη με laser ως μέθοδος παρασκευής πορώδους μεμβράνης για μικρότερο πάχος υλικού, που να μην ξεπερνά τα $50 \mu\text{m}$, και συγκεκριμένα, μόνο με χρήση ενός παλμού ή πολλαπλών σαρώσεων. Σε κάθε περίπτωση πάντως, επειδή όπως προαναφέρθηκε, ο σημαντικότερος παράγοντας στη διάτρηση του υλικού είναι η επαρκής ενέργεια, δεν θα είναι δυνατόν να αποφευχθούν οι θερμικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, η εξαγόμενη μέση διάμετρος των οπών είναι κατ'ελάχιστο κοντά στα $25 \mu\text{m}$ (συγκεκριμένα, $24.4 \pm 1.4 \mu\text{m}$ για την εγχάραξη με ένα παλμό και πολωτή στις 330°), που ξεπερνά το μέσο μέγεθος MSCs 10 – 12 μm , αλλά θα μπορούσε ενδεχομένως να δοκιμαστεί πειραματικά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΣΦΡΑΓΙΔΩΝ PDMS ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΔΟΜΗΜΕΝΕΣ ΜΗΤΡΕΣ ΠΥΡΙΤΙΟΥ (bSi)

Αναπτύχθηκε διεργασία κατασκευής πολυμερικής σφραγίδας πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS) (PDMS stamp) με χρήση μικροδομημένης μήτρας πυριτίου (black silicon – bSi) με κατεργασία laser. Οι μήτρες πυριτίου κατασκευάστηκαν από τη Δρ. Μαρία Κανίδη, στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής, με υπεύθυνη τη Δρ. Μαρία Κάνδουλα, Ερευνήτρια Α' Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.). Στο Σχήμα Π1 απεικονίζεται φωτογραφία των μητρών πυριτίου (επιφάνειας έως και $2 \times 2 \text{ cm}^2$) που χρησιμοποιήθηκαν.

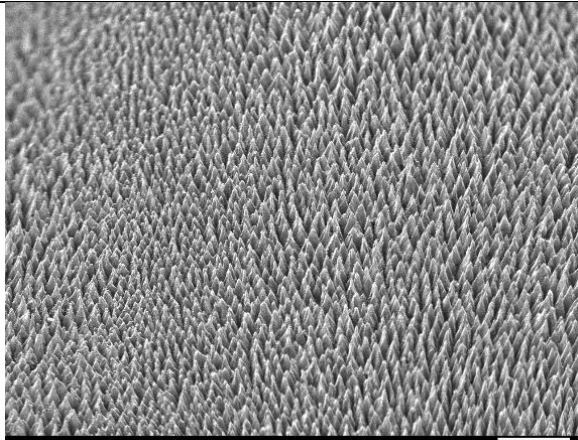
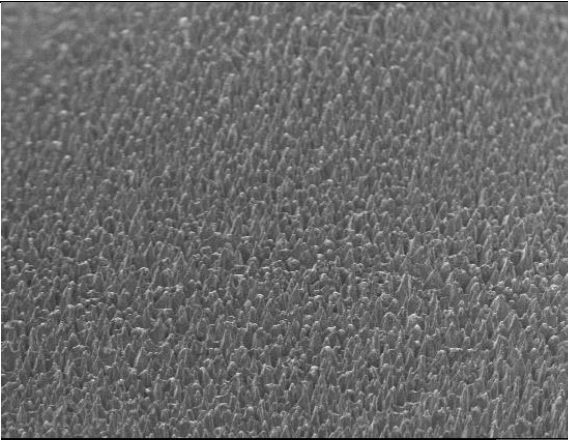
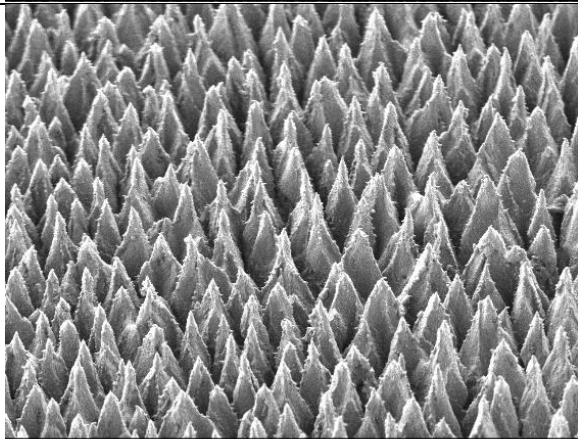
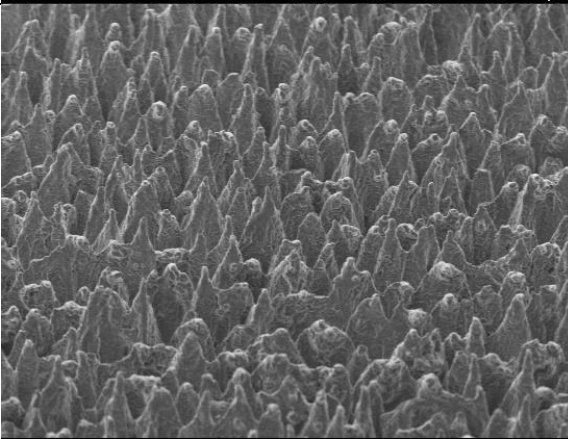


Σχήμα Π1. Φωτογραφία των μικροδομημένων μητρών πυριτίου (black silicon – bSi) σε κοινό υπόστρωμα, κατασκευασμένων με εγχάραξη laser. Οι μήτρες bSi χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πολυμερικών σφραγίδων πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS).

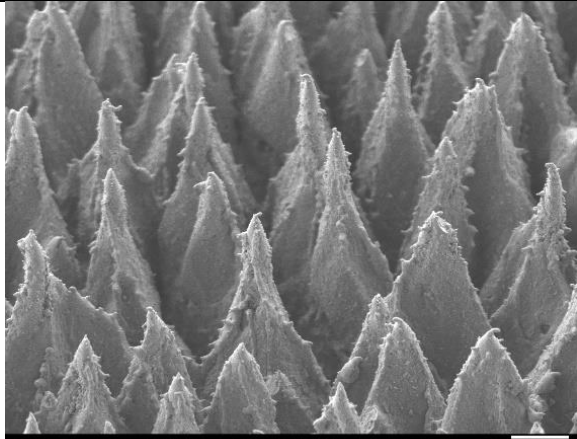
Για την κατασκευή των πολυμερικών σφραγίδων, προηγήθηκε υδροφοβοποίηση των μητρών πυριτίου με απόθεση λεπτού στρώματος φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου τριφθορομεθανίου (CHF_3) στον αντιδραστήρα πλάσματος RIE στις συνήθεις συνθήκες κατεργασίας, και συγκεκριμένα, ισχύ 50 W, πίεση 50 mTorr, ροή αερίου 50 sccm, και χρόνο 6 min. Οι σφραγίδες PDMS κατασκευάστηκαν με λιθογραφία μαλακής ύλης, και συγκεκριμένα, με τεχνική αντιγραφής μήτρας (REM). Συνοπτικά, οι μήτρες bSi τοποθετήθηκαν σε 3'' γυάλινο τρυβλίο, όπου πραγματοποιήθηκε έγχυση του προπολυμερούς PDMS (μίγματος 10:1), κατάλληλου όγκου ώστε να επιτευχθεί τελικό πάχος 2 mm των πολυμερικών σφραγίδων. Ακολούθησε θέρμανση στους 70°C για 6 h προς πολυμερισμό του ελαστομερούς. Σε μετέπειτα απόπειρα απομάκρυνσης του PDMS από τη μήτρα, προέκυψε ανεμπόδιση απόσπασή του, οφειλόμενη σημαντικά στην επιτυχή υδροφοβοποίηση της μήτρας. Ως αποτέλεσμα, παράχθηκαν σφραγίδες PDMS (PDMS stamps), που έφεραν τις συμπληρωματικές δομές των μητρών προέλευσης bSi.

Στον Πίνακα Π1 παρατίθενται εικόνες SEM των μητρών bSi μετά τη χρήση τους, καθώς και των σφραγίδων PDMS που προέκυψαν για χαρακτηριστικές μεγεθύνσεις 150x, 500x, και 1 200x. Να σημειωθεί εδώ, ότι δεν είναι απαραίτητη η αντιστοίχιση των εικόνων των σφραγίδων PDMS με τις μήτρες bSi της ίδιας μεγέθυνσης. Αρχικά, παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις, ότι οι δομές των μητρών bSi μετά τη χρήση δεν έχουν αλλοιωθεί, διατηρώντας την κωνικότητά τους, γεγονός που αποδεικνύει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μητρών. Ως προς τις παραγόμενες σφραγίδες PDMS, είναι εμφανές ότι αναπαράγουν επιτυχώς το αρνητικό μοτίβο των μητρών τους σε όλη την έκτασή τους, χωρίς ωστόσο να εμφανίζουν το ίδιο οξείες κορυφές με τις γενέτειρες μήτρες. Εντοπίζονται μάλιστα περιπτώσεις αλληλοεπικάλυψης των κορυφών, οι οποίες όμως πιθανώς να οφείλονται στην ύπαρξη τοπογραφίας στη βάση των μικροδομών των μητρών.

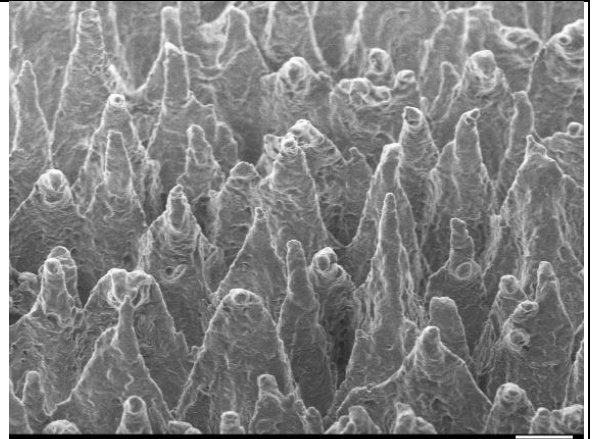
Πίνακας Π1. Εικόνες SEM μητρών πυριτίου bSi μετά τη χρήση τους και των προερχόμενων σφραγίδων πολυ(διμεθυλοσιλοξάνης) (PDMS) που προέκυψαν με λιθογραφία μαλακής ύλης (τεχνική αντιγραφής μήτρας REM). Οι μήτρες bSi έχουν παραμείνει άθικτες, ενώ οι σφραγίδες PDMS αποδίδουν ικανοποιητικά τις συμπληρωτικές μικροδομές των μητρών, οι οποίες όμως εμφανίζουν μικρότερη οξύτητα, ενδεχομένως λόγω ύπαρξης τραχύτητας στη βάση των μητρών.

Μεγέθυνση	Μήτρες πυριτίου bSi	Πολυμερικές στάμπες PDMS
150x	 NML Sb:99 SEM LEI 3.0kV X150 WD 12.6mm 100µm	 NML Sb:99 SEM LEI 2.0kV X150 WD 13.0mm 100µm
500x	 NML Sb:99 SEM LEI 3.0kV X500 WD 12.5mm 10µm	 NML Sb:99 SEM LEI 2.0kV X500 WD 13.1mm 10µm

1200x



NML Sb:99 SEM LEI 3.0kV X1,200 WD 12.5mm 10µm



NML Sb:99 SEM LEI 2.0kV X1,200 WD 13.0mm 10µm

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής

1. Zeniou, A., **Kefallinou, D.**, Xenogiannopoulou E., Dimitrakellis P., Tserepi A., Dimoulas A., Gogolides E. Atmospheric plasma functionalization of closed microfluidic devices, ChemPlusChem (expected December 2023).
2. **Kefallinou, D.**; Grigoriou, M.; Tsounidi, D.; Raptis, I.; Constantoudis, V.; Tserepi, A. Enhanced and stabilized mesenchymal stem cell growth inside plasma pre-treated and collagen-coated PDMS-based microfluidic chambers. Surface and Coatings Technology 2023, 466, 129658. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2023.129658>.
3. **Kefallinou, D.**; Grigoriou, M.; Boumpas, D. T.; Gogolides, E.; Tserepi, A. Fabrication of a 3D microfluidic cell culture device for bone marrow-on-a-chip. Micro and Nano Engineering 2020, 9, 100075. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2020.100075>.
4. **Kefallinou, D.**; Ellinas, K.; Speliotis, T.; Stamatakis, K.; Gogolides, E.; Tserepi, A. Optimization of Antibacterial Properties of “Hybrid” Metal-Sputtered Superhydrophobic Surfaces. Coatings 2020, 10, 25. <https://doi.org/10.3390/coatings10010025>.

Συμμετοχή σε συνέδρια

1. Carbyne-enriched coating of micro and nanotextured PMMA surfaces for enhanced durability and antibacterial effect (poster), D. Nioras, **D. Kefallinou**, D. Ioannou, A. Brigadin, A. Tserepi, E. Gogolides, 10th International Conference “Micro Nano 2023”, 2-5 November 2023, NCSR “Demokritos”, Athens, Greece.
2. Durable micro and nanotextured surfaces for antibacterial control (poster), D. Nioras, **D. Kefallinou**, D. Ioannou, A. Brigadin, A. Tserepi, E. Gogolides, Micro and Nano Engineering Conference 2023, 25-28 September, Berlin, Germany.
3. Sensors integrated in Organ-on-a-Chip microfluidic platforms (poster), D. Valadorou, M.-K. Filippidou, D. Tsounidi, **D. Kefallinou**, P. S. Petrou, S. Chatzandroulis, A. Tserepi, 9th International Conference "Micro Nano 2022", 4-6 November 2022, Xanthi, Greece.
4. Carbyne films on nanostructured surfaces: A new class of hard carbon materials for sensing and antibacterial action (poster), D. Ioannou, D. Nioras, **D. Kefallinou**, G. Tasios, D. Papadopoulou, A. Lukin, A. Brigadin, A. Tserepi, E. Gogolides, 9th International Conference "Micro & Nano 2022", 4-6 November 2022, Xanthi, Greece.
5. Enhanced mesenchymal stem cell growth inside collagen-coated bone marrow-on-a-chip platforms (poster), **D. Kefallinou**, M. Grigoriou, D. Boumpas, E. Gogolides, A. Tserepi, 48th Micro and Nano Engineering - Euroensors conference (MNE-ES2022), 19-23 September 2022, Leuven, Belgium.
6. PDMS surface functionalization for enhanced mesenchymal stem cell growth in bone marrow-on-a-chip platforms (oral), **D. Kefallinou**, Maria Grigoriou, Dimitrios T. Boumpas, Evangelos Gogolides, Angeliki Tserepi, Athens Conference on Advances in Chemistry, 26 June - 1 July 2022, Athens, Greece.

7. *In vitro* bone marrow tissue development in 3D microfluidic cell culture chambers towards bone marrow-on-a-chip (poster), **D. Kefallinou**, M. Grigoriou, A. Zeniou, D.T. Boumpas, E. Gogolides, A. Tserepi, 45th Micro- and Nano Engineering conference (MNE 2019), 23-26 September 2019, Rhodes, Greece.

8. Open and Closed Microfluidic Wall Modifications and in-situ Reactions via a new Atmospheric Plasma Apparatus (poster), A. Zeniou, **D. Kefallinou**, N. Vourdas, A. Tserepi, E. Gogolides, 45th Micro- and Nano Engineering conference (MNE 2019), 23-26 September 2019, Rhodes, Greece.

Τιμητικές προσκλήσεις

- Πρόσκληση σε συνέντευξη στο περιοδικό Micro and Nano Engineering της Elsevier, από τον Sam Jarman (SciencePOD, Elsevier's science writer) για το άρθρο "Fabrication of a 3D microfluidic cell culture device for bone marrow-on-a-chip", Micro and Nano Engineering 2020.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Κεφάλαιο 1

- [1] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*. 442 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- [2] N. Convery, N. Gadegaard, 30 years of microfluidics, *Micro and Nano Engineering*. 2 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mne.2019.01.003>.
- [3] O. Geschke, H. Klank, P. Telleman, eds., Learning from the experiences of microelectronics, in: *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Denmark, 2004: pp. 1–4.
- [4] S.C. Terry, J.H. Herman, J.B. Angell, A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer, *IEEE Trans Electron Devices*. 26 (1979). <https://doi.org/10.1109/T-ED.1979.19791>.
- [5] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sens Actuators B Chem*. 1 (1990). [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-I](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-I).
- [6] M.A. Northrup, M.T. Ching, R.M. White, R.T. Watson, DNA amplification with a microfabricated reaction chamber, in: *Transducer '93-The 7th Int. Conf. on Solid- State Sensors and Actuators*, Yokohama, 1993: pp. 925–926.
- [7] P.S. Dittrich, A. Manz, Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery, *Nat Rev Drug Discov*. 5 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrd1985>.
- [8] Lab on Chip PCR - LOC PCR (1), (2023).
- [9] E.K. Sackmann, A.L. Fulton, D.J. Beebe, The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature*. 507 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13118>.
- [10] M.H. Wu, S. Bin Huang, G. Bin Lee, Microfluidic cell culture systems for drug research, *Lab Chip*. 10 (2010). <https://doi.org/10.1039/b921695b>.
- [11] H. Becker, L.E. Locascio, Polymer microfluidic devices, *Talanta*. 56 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00594-X).
- [12] M.L. Coluccio, G. Perozziello, N. Malara, E. Parrotta, P. Zhang, F. Gentile, T. Limongi, P.M. Raj, G. Cuda, P. Candeloro, E. Di Fabrizio, Microfluidic platforms for cell cultures and investigations, *Microelectron Eng*. 208 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mee.2019.01.004>.
- [13] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg, R.M.T. Fleming, Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices, *Biosens Bioelectron*. 63 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>.
- [14] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Anal Chem*. 70 (1998). <https://doi.org/10.1021/ac980656z>.
- [15] Y. Xia, G.M. Whitesides, SOFT LITHOGRAPHY, *Annu. Rev. Mater. Sci*. 28 (1998) 153–84. www.annualreviews.org.
- [16] H.T.G. van Lintel, F.C.M. van De Pol, S. Bouwstra, A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon, *Sensors and Actuators*. 15 (1988). [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(88\)87005-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(88)87005-7).
- [17] D.J. Harrison, A. Manz, H. Lüdi, H.M. Widmer, Z. Fan, Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip, *Anal Chem*. 64 (1992). <https://doi.org/10.1021/ac00041a030>.
- [18] A. Tajeddin, N. Mustafaoglu, Design and fabrication of organ-on-chips: Promises and challenges, *Micromachines (Basel)*. 12 (2021). <https://doi.org/10.3390/mi12121443>.

- [19] S.K. Sia, G.M. Whitesides, Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies, *Electrophoresis*. 24 (2003). <https://doi.org/10.1002/elps.200305584>.
- [20] J. Zhou, A.V. Ellis, N.H. Voelcker, Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices, *Electrophoresis*. 31 (2010). <https://doi.org/10.1002/elps.200900475>.
- [21] B.E. Slentz, N.A. Penner, E. Lugowska, F. Regnier, Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane), *Electrophoresis*. 22 (2001). [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200109\)22:17<3736::AID-ELPS3736>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200109)22:17<3736::AID-ELPS3736>3.0.CO;2-Y).
- [22] M.T. Yang, J. Fu, Y.K. Wang, R.A. Desai, C.S. Chen, Assaying stem cell mechanobiology on microfabricated elastomeric substrates with geometrically modulated rigidity, *Nat Protoc*. 6 (2011). <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.189>.
- [23] M.A. Unger, H.P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake, Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, *Science* (1979). 288 (2000). <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.113>.
- [24] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M.R. Tam, B.H. Weigl, Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature*. 442 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature05064>.
- [25] M. Murtagh, K. Blondeel, R.W. Peeling, J. Kiarie, I. Toskin, The relevance of target product profiles for manufacturers, experiences from the World Health Organization initiative for point-of-care testing for sexually transmitted infections, *Archives of Public Health*. 79 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13690-021-00708-y>.
- [26] S. Battat, D.A. Weitz, G.M. Whitesides, An outlook on microfluidics: The promise and the challenge, *Lab Chip*. 22 (2022). <https://doi.org/10.1039/d1lc00731a>.
- [27] A. Jahn, W.N. Vreeland, M. Gaitan, L.E. Locascio, Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing, *J Am Chem Soc*. 126 (2004). <https://doi.org/10.1021/ja0318030>.
- [28] A.M. Ghaemmaghami, M.J. Hancock, H. Harrington, H. Kaji, A. Khademhosseini, Biomimetic tissues on a chip for drug discovery, *Drug Discov Today*. 17 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.029>.
- [29] K. Wang, K. Man, J. Liu, Y. Liu, Q. Chen, Y. Zhou, Y. Yang, Microphysiological Systems: Design, Fabrication, and Applications, *ACS Biomater Sci Eng*. 6 (2020). <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01667>.
- [30] Y. Imamura, T. Mukohara, Y. Shimono, Y. Funakoshi, N. Chayahara, M. Toyoda, N. Kiyota, S. Takao, S. Kono, T. Nakatsura, H. Minami, Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer, *Oncol Rep*. 33 (2015). <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>.
- [31] A.D. Van Der Meer, A. Van Den Berg, Organs-on-chips: Breaking the in vitro impasse, *Integrative Biology*. 4 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2ib00176d>.
- [32] J.H. Sung, M.L. Shuler, Microtechnology for mimicking in vivo tissue environment, *Ann Biomed Eng*. 40 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0491-2>.
- [33] X. Chen, Y.S. Zhang, X. Zhang, C. Liu, Organ-on-a-chip platforms for accelerating the evaluation of nanomedicine, *Bioact Mater*. 6 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.09.022>.
- [34] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors, *Assay Drug Dev Technol*. 12 (2014). <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- [35] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H.K. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2236>.
- [36] F. Bonnier, M.E. Keating, T.P. Wróbel, K. Majzner, M. Baranska, A. Garcia-Munoz, A. Blanco, H.J. Byrne, Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models, *Toxicology in Vitro*. 29 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>.
- [37] B.M. Baker, C.S. Chen, Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues, *J Cell Sci*. 125 (2012). <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>.

- [38] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, J. De Boer, Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends Biotechnol.* 31 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>.
- [39] K. Bialkowska, P. Komorowski, M. Bryszewska, K. Milowska, Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application, *Int J Mol Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>.
- [40] R. Lehmann, C.M. Lee, E.C. Shugart, M. Benedetti, R.A. Charo, Z. Gartner, B. Hogan, J. Knoblich, C.M. Nelson, K.M. Wilson, Human organoids: A new dimension in cell biology, *Mol Biol Cell.* 30 (2019). <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-03-0135>.
- [41] J. Clinton, P. McWilliams-Koepfen, Initiation, Expansion, and Cryopreservation of Human Primary Tissue-Derived Normal and Diseased Organoids in Embedded Three-Dimensional Culture, *Curr Protoc Cell Biol.* 82 (2019). <https://doi.org/10.1002/cpcb.66>.
- [42] O. Frey, P.M. Misun, D.A. Fluri, J.G. Hengstler, A. Hierlemann, Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis, *Nat Commun.* 5 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms5250>.
- [43] J. Jang, H.G. Yi, D.W. Cho, 3D Printed Tissue Models: Present and Future, *ACS Biomater Sci Eng.* 2 (2016). <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00129>.
- [44] Y. Goldstein, S. Spitz, K. Turjeman, F. Selinger, Y. Barenholz, P. Ertl, O. Benny, D. Bavli, S. Valkai, F. Walter, A. Kincses, Breaking the Third Wall: Implementing 3D-Printing Techniques to Expand the Complexity and Abilities of Multi-Organ-on-a-Chip Devices, *Micromachines (Basel).* 12 (2021) 627. <https://doi.org/10.3390/mi12060627>.
- [45] M.L. Shuler, A. Ghanem, D. Quick, M.C. Wong, P. Miller, A self-regulating cell culture analog device to mimic animal and human toxicological responses, *Biotechnol Bioeng.* 52 (1996). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19961005\)52:1<45::aid-bit5>3.3.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19961005)52:1<45::aid-bit5>3.3.co;2-0).
- [46] A. Akhtar, The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation, *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics.* 24 (2015). <https://doi.org/10.1017/S0963180115000079>.
- [47] H.J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D.E. Ingber, Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow, *Lab Chip.* 12 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2lc40074j>.
- [48] N. Azizpour, R. Avazpour, D.H. Rosenzweig, M. Sawan, A. Ajji, Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip, *Micromachines (Basel).* 11 (2020). <https://doi.org/10.3390/mi11060599>.
- [49] A. Geraili, P. Jafari, M.S. Hassani, B.H. Araghi, M.H. Mohammadi, A.M. Ghafari, S.H. Tamrin, H.P. Modarres, A.R. Kolahchi, S. Ahadian, A. Sanati-Nezhad, Controlling Differentiation of Stem Cells for Developing Personalized Organ-on-Chip Platforms, *Adv Healthc Mater.* 7 (2018). <https://doi.org/10.1002/adhm.201700426>.
- [50] D. Huh, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends Cell Biol.* 21 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>.
- [51] E.W. Esch, A. Bahinski, D. Huh, Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery, *Nat Rev Drug Discov.* 14 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrd4539>.
- [52] M. Bouhifd, H.T. Hogberg, A. Kleensang, A. Maertens, L. Zhao, T. Hartung, Mapping the human toxome by systems toxicology, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 115 (2014). <https://doi.org/10.1111/bcpt.12198>.
- [53] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, Guidance for Industry: Product Development Under the Animal Rule, 2014.
- [54] A. Williamson, S. Singh, U. Fernekorn, A. Schober, The future of the patient-specific Body-on-a-chip, *Lab Chip.* 13 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3lc50237f>.
- [55] S.A.M. Shaegh, F. De Ferrari, Y.S. Zhang, M. Nabavina, N.B. Mohammad, J. Ryan, A. Pourmand, E. Laukaitis, R.B. Sadeghian, A. Nadhman, S.R. Shin, A.S. Nezhad, A. Khademhosseini, M.R. Dokmeci, A microfluidic optical platform for real-time monitoring of pH and oxygen in microfluidic bioreactors and organ-on-chip devices, *Biomicrofluidics.* 10 (2016). <https://doi.org/10.1063/1.4955155>.

- [56] S. Cho, A. Islas-Robles, A.M. Nicolini, T.J. Monks, J.Y. Yoon, In situ, dual-mode monitoring of organ-on-a-chip with smartphone-based fluorescence microscope, *Biosens Bioelectron.* 86 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.015>.
- [57] S. Torino, B. Corrado, M. Iodice, G. Coppola, Pdms-based microfluidic devices for cell culture, *Inventions.* 3 (2018). <https://doi.org/10.3390/inventions3030065>.
- [58] A. Tserepi, E. Gogolides, K. Tsougeni, V. Constantoudis, E.S. Valamontes, Tailoring the surface topography and wetting properties of oxygen-plasma treated polydimethylsiloxane, *J Appl Phys.* 98 (2005). <https://doi.org/10.1063/1.2136421>.
- [59] T.E. Winkler, M. Feil, E.F.G.J. Stronkman, I. Matthiesen, A. Herland, Low-cost microphysiological systems: Feasibility study of a tape-based barrier-on-chip for small intestine modeling, *Lab Chip.* 20 (2020). <https://doi.org/10.1039/d0lc00009d>.
- [60] A. Piruska, I. Nikcevic, S.H. Lee, C. Ahn, W.R. Heineman, P.A. Limbach, C.J. Seliskar, The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation, *Lab Chip.* 5 (2005). <https://doi.org/10.1039/b508288a>.
- [61] S.B. Campbell, Q. Wu, J. Yazbeck, C. Liu, S. Okhovatian, M. Radisic, Beyond Polydimethylsiloxane: Alternative Materials for Fabrication of Organ-on-a-Chip Devices and Microphysiological Systems, *ACS Biomater Sci Eng.* 7 (2021). <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00640>.
- [62] K. Efimenko, W.E. Wallace, J. Genzer, Surface modification of Sylgard-184 poly(dimethyl siloxane) networks by ultraviolet and ultraviolet/ozone treatment, *J Colloid Interface Sci.* 254 (2002). <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8594>.
- [63] E. Holczer, P. Fürjes, Effects of embedded surfactants on the surface properties of PDMS; applicability for autonomous microfluidic systems, *Microfluid Nanofluidics.* 21 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10404-017-1916-5>.
- [64] G.T. Roman, C.T. Culbertson, Surface engineering of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices using transition metal sol-gel chemistry, *Langmuir.* 22 (2006). <https://doi.org/10.1021/la053085w>.
- [65] B. Giri, *Laboratory Methods in Microfluidics*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2017.
- [66] C. Iliescu, H. Taylor, M. Avram, J. Miao, S. Franssila, A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon, *Biomicrofluidics.* 6 (2012). <https://doi.org/10.1063/1.3689939>.
- [67] J.D. Stucki, O.T. Guenat, A microfluidic bubble trap and oscillator, *Lab Chip.* 15 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5lc00592b>.
- [68] M.R. Haq, Y.K. Kim, J. Kim, J. Ju, S.M. Kim, Fabrication of all glass microfluidic device with superior chemical and mechanical resistances by glass molding with vitreous carbon mold, *Journal of Micromechanics and Microengineering.* 29 (2019). <https://doi.org/10.1088/1361-6439/ab1f99>.
- [69] R.O. Rodrigues, R. Lima, H.T. Gomes, A.M.T. Silva, Polymer microfluidic devices: An overview of fabrication methods, *U.Porto Journal of Engineering.* 1 (2015). https://doi.org/10.24840/2183-6493_001.001_0007.
- [70] H. Hiram, T. Satoh, S. Sugiura, K. Shin, R. Onuki-Nagasaki, T. Kanamori, T. Inoue, Glass-based organ-on-a-chip device for restricting small molecular absorption, *J Biosci Bioeng.* 127 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.019>.
- [71] R.T. Turgeon, M.T. Bowser, Micro free-flow electrophoresis: Theory and applications, *Anal Bioanal Chem.* 394 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2656-5>.
- [72] C.W. Tsao, L. Hromada, J. Liu, P. Kumar, D.L. DeVoe, Low temperature bonding of PMMA and COC microfluidic substrates using UV/ozone surface treatment, *Lab Chip.* 7 (2007). <https://doi.org/10.1039/b618901f>.
- [73] E. Gencturk, S. Mutlu, K.O. Ulgen, Advances in microfluidic devices made from thermoplastics used in cell biology and analyses, *Biomicrofluidics.* 11 (2017). <https://doi.org/10.1063/1.4998604>.

- [74] H. Becker, C. Gärtner, Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems, *Anal Bioanal Chem.* 390 (2008). <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1692-2>.
- [75] D. Schaffarczyk, J. Knaus, G. Peeters, D. Scholl, A. Schwitalla, C. Koslowski, H. Cölfen, Polyetheretherketone implant surface functionalization technologies and the need for a transparent quality evaluation system, *Polym Int.* 70 (2021). <https://doi.org/10.1002/pi.6162>.
- [76] Z. Ahmad, K.D. Kumar, M. Saroop, N. Preschilla, A. Biswas, J.R. Bellare, A.K. Bhowmick, Highly transparent thermoplastic elastomer from isotactic polypropylene and styrene/ethylene-butylene/styrene triblock copolymer: Structure-property correlations, *Polym Eng Sci.* 50 (2010). <https://doi.org/10.1002/pen.21540>.
- [77] H. Becker, C. Gärtner, Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications, *Electrophoresis.* 21 (2000). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7).
- [78] K. Ren, J. Zhou, H. Wu, Materials for microfluidic chip fabrication, *Acc Chem Res.* 46 (2013). <https://doi.org/10.1021/ar300314s>.
- [79] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J Adv Res.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [80] J.H. Sung, J. Yu, D. Luo, M.L. Shuler, J.C. March, Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model, *Lab Chip.* 11 (2011). <https://doi.org/10.1039/c0lc00273a>.
- [81] M. Tenje, F. Cantoni, A.M. Porras Hernández, S.S. Searle, S. Johansson, L. Barbe, M. Antfolk, H. Pohlitz, A practical guide to microfabrication and patterning of hydrogels for biomimetic cell culture scaffolds, *Organs-on-a-Chip.* 2 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ooc.2020.100003>.
- [82] M. Cabodi, N.W. Choi, J.P. Gleghorn, C.S.D. Lee, L.J. Bonassar, A.D. Stroock, A microfluidic biomaterial, *J Am Chem Soc.* 127 (2005). <https://doi.org/10.1021/ja054820t>.
- [83] H. Omidian, K. Park, Introduction to Hydrogels, in: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5919-5_1.
- [84] M.C. Catoira, L. Fusaro, D. Di Francesco, M. Ramella, F. Boccafoschi, Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications, *J Mater Sci Mater Med.* 30 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.
- [85] C.B. Goy, R.E. Chaile, R.E. Madrid, Microfluidics and hydrogel: A powerful combination, *React Funct Polym.* 145 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104314>.
- [86] X. Zhang, L. Li, C. Luo, Gel integration for microfluidic applications, *Lab Chip.* 16 (2016). <https://doi.org/10.1039/c6lc00247a>.
- [87] K.H. Jeong, D. Park, Y.C. Lee, Polymer-based hydrogel scaffolds for skin tissue engineering applications: a mini-review, *Journal of Polymer Research.* 24 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1278-4>.
- [88] N.Y.C. Lin, K.A. Homan, S.S. Robinson, D.B. Kolesky, N. Duarte, A. Moisan, J.A. Lewis, Renal reabsorption in 3D vascularized proximal tubule models, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116 (2019). <https://doi.org/10.1073/pnas.1815208116>.
- [89] M.P.; van der M.A.D.; van den B.A.; S.D.; S.L.I. Tibbe, Membranes for organs-on-chips, in: *Biomedical Membranes And (Bio)Artificial Organs*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2017: pp. 295–321.
- [90] C. Liu, W. Qiao, C. Wang, H. Wang, Y. Zhou, S. Gu, W. Xu, Y. Zhuang, J. Shi, H. Yang, Effect of poly (lactic acid) porous membrane prepared via phase inversion induced by water droplets on 3T3 cell behavior, *Int J Biol Macromol.* 183 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.197>.
- [91] T. Pasman, D. Grijpma, D. Stamatialis, A. Poot, Flat and microstructured polymeric membranes in organs-on-chips, *J R Soc Interface.* 15 (2018). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0351>.

- [92] O.Y.F. Henry, R. Villenave, M.J. Cronce, W.D. Leineweber, M.A. Benz, D.E. Ingber, Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function, *Lab Chip*. 17 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7lc00155j>.
- [93] B.M. Maoz, A. Herland, O.Y.F. Henry, W.D. Leineweber, M. Yadid, J. Doyle, R. Mannix, V.J. Kujala, E.A. Fitzgerald, K.K. Parker, D.E. Ingber, Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities, *Lab Chip*. 17 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7lc00412e>.
- [94] W.F. Quirós-Solano, N. Gaio, C. Silvestri, G. Pandraud, R. Dekker, P.M. Sarro, Metal and polymeric strain gauges for Si-based, monolithically fabricated organs-on-chips, *Micromachines (Basel)*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/mi10080536>.
- [95] X. Liu, B. Lin, Materials Used in Microfluidic Devices, in: *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Springer, New York, NY, USA, 2008: pp. 1065–1068.
- [96] B. Bhushan, Introduction to Nanotechnology, in: *Springer Handbook of Nanotechnology*, Berlin/Heidelberg, Germany, 2010: pp. 1–13.
- [97] C.A. Hesh, Y. Qiu, W.A. Lam, Vascularized microfluidics and the blood-endothelium interface, *Micromachines (Basel)*. 11 (2020). <https://doi.org/10.3390/mi11010018>.
- [98] D. Qin, Y. Xia, G.M. Whitesides, Soft lithography for micro- and nanoscale patterning, *Nat Protoc*. 5 (2010) 491–502. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.234>.
- [99] D. Sticker, M. Rothbauer, S. Lechner, M.T. Hehenberger, P. Ertl, Multi-layered, membrane-integrated microfluidics based on replica molding of a thiol-ene epoxy thermoset for organ-on-a-chip applications, *Lab Chip*. 15 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5lc01028d>.
- [100] A. Kumar, G.M. Whitesides, Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching, *Appl Phys Lett*. 63 (1993). <https://doi.org/10.1063/1.110628>.
- [101] Y. Xia, J.J. McClelland, R. Gupta, D. Qin, X.M. Zhao, L.L. Sohn, R.J. Celotta, G.M. Whitesides, Replica molding using polymeric materials: A practical step toward nanomanufacturing, *Advanced Materials*. 9 (1997). <https://doi.org/10.1002/adma.19970090211>.
- [102] X.M. Zhao, Y. Xia, G.M. Whitesides, Fabrication of three-dimensional micro-structures: microtransfer molding, *Advanced Materials*. 8 (1996). <https://doi.org/10.1002/adma.19960081016>.
- [103] E. Kim, Y. Xia, G.M. Whitesides, Polymer microstructures formed by moulding in capillaries, *Nature*. 376 (1995). <https://doi.org/10.1038/376581a0>.
- [104] E. Kim, Y. Xia, X.M. Zhao, G.M. Whitesides, Solvent-assisted microcontact molding: A convenient method for fabricating three-dimensional structures on surfaces of polymers, *Advanced Materials*. 9 (1997). <https://doi.org/10.1002/adma.19970090814>.
- [105] J.A. Rogers, K.E. Paul, R.J. Jackman, G.M. Whitesides, Using an elastomeric phase mask for sub-100 nm photolithography in the optical near field, *Appl Phys Lett*. 70 (1997). <https://doi.org/10.1063/1.118988>.
- [106] S. Jeon, E. Menard, J.U. Park, J. Maria, M. Meitl, J. Zaumseil, J.A. Rogers, Three-dimensional nanofabrication with rubber stamps and conformable photomasks, *Advanced Materials*. 16 (2004). <https://doi.org/10.1002/adma.200400593>.
- [107] W.R. Childs, R.G. Nuzzo, Decal transfer microlithography: A new soft-lithographic patterning method, *J Am Chem Soc*. 124 (2002). <https://doi.org/10.1021/ja020942z>.
- [108] Q. Xu, R.M. Rioux, M.D. Dickey, G.M. Whitesides, Nanoskiving: A new method to produce arrays of nanostructures, *Acc Chem Res*. 41 (2008). <https://doi.org/10.1021/ar700194y>.
- [109] D. Qin, Y. Xia, G.M. Whitesides, Rapid prototyping of complex structures with feature sizes larger than 20 μm , *Advanced Materials*. 8 (1996). <https://doi.org/10.1002/adma.19960081110>.

- [110] O. Sahin, M. Ashokkumar, P.M. Ajayan, Micro- and nanopatterning of biomaterial surfaces, in: B. Preetha, M.S. Sreekala, T. Sabu (Eds.), *Fundamental Biomaterials: Metals*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, United Kingdom, 2018: pp. 67–78.
- [111] J. del Barrio, C. Sánchez-Somolinos, Light to Shape the Future: From Photolithography to 4D Printing, *Adv Opt Mater.* 7 (2019). <https://doi.org/10.1002/adom.201900598>.
- [112] M.R. Marinescu, M. Avram, C. Parvulescu, C. Voitincu, V. Tucureanu, A. Matei, Considerations regarding the use of SU-8 photoresist in MEMS technique, *Revista de Tehnologii Neconventionale.* (2018) 10–14.
- [113] D. Huh, B.D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Yuan Hsin, D.E. Ingber, Reconstituting organ-level lung functions on a chip, *Science* (1979). 328 (2010). <https://doi.org/10.1126/science.1188302>.
- [114] D. Huh, H.J. Kim, J.P. Fraser, D.E. Shea, M. Khan, A. Bahinski, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, Microfabrication of human organs-on-chips, *Nat Protoc.* 8 (2013) 2135–2157. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.137>.
- [115] Dow Corning Corporation, Product Information Sylgard® 184 Silicone Elastomer, 2014.
- [116] M. Mrksich, G.M. Whitesides, Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 25 (1996). <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.25.060196.000415>.
- [117] D.B. Weibel, A. Lee, M. Mayer, S.F. Brady, D. Bruzewicz, J. Yang, W.R. Diluzio, J. Clardy, G.M. Whitesides, Bacterial printing press that regenerates its Ink: Contact-printing bacteria using hydrogel stamps, *Langmuir.* 21 (2005). <https://doi.org/10.1021/la047173c>.
- [118] M.M. Stevens, M. Mayer, D.G. Anderson, D.B. Weibel, G.M. Whitesides, R. Langer, Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps, *Biomaterials.* 26 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.001>.
- [119] C.S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, D.E. Ingber, Geometric control of cell life and death, *Science* (1979). 276 (1997). <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1425>.
- [120] A. Agarwal, J.A. Goss, A. Cho, M.L. McCain, K.K. Parker, Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies, *Lab Chip.* 13 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3lc50350j>.
- [121] S.P. Sheehy, A. Grosberg, P. Qin, D.J. Behm, J.P. Ferrier, M.A. Eagleson, A.P. Nesmith, D. Krull, J.G. Falls, P.H. Campbell, M.L. McCain, R.N. Willette, E. Hu, K.K. Parker, Toward improved myocardial maturity in an organ-on-chip platform with immature cardiac myocytes, *Exp Biol Med.* 242 (2017). <https://doi.org/10.1177/1535370217701006>.
- [122] B.D. Gates, G.M. Whitesides, Replication of Vertical Features Smaller than 2 nm by Soft Lithography, *J Am Chem Soc.* 125 (2003). <https://doi.org/10.1021/ja0367647>.
- [123] Y. Xia, E. Kim, X.M. Zhao, J.A. Rogers, M. Prentiss, G.M. Whitesides, Complex optical surfaces formed by replica molding against elastomeric masters, *Science* (1979). 273 (1996). <https://doi.org/10.1126/science.273.5273.347>.
- [124] D. Huh, Y.S. Torisawa, G.A. Hamilton, H.J. Kim, D.E. Ingber, Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips, *Lab Chip.* 12 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2lc40089h>.
- [125] Y. Nakao, H. Kimura, Y. Sakai, T. Fujii, Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device, *Biomicrofluidics.* 5 (2011). <https://doi.org/10.1063/1.3580753>.
- [126] M.A. Eddings, M.A. Johnson, B.K. Gale, Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices, *Journal of Micromechanics and Microengineering.* 18 (2008). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/6/067001>.
- [127] K. Haubert, T. Drier, D. Beebe, PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system, *Lab Chip.* 6 (2006). <https://doi.org/10.1039/b610567j>.
- [128] J.S. Go, S. Shoji, A disposable, dead volume-free and leak-free in-plane PDMS microvalve, *Sens Actuators A Phys.* 114 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.sna.2003.12.028>.

- [129] M.A. Eddings, B.K. Gale, A PDMS-based gas permeation pump for on-chip fluid handling in microfluidic devices, *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 16 (2006). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/11/021>.
- [130] S. Satyanarayana, R.N. Karnik, A. Majumdar, Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices, *Journal of Microelectromechanical Systems*. 14 (2005). <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2004.839334>.
- [131] S.H. Ng, R.T. Tjeung, Z. Wang, Hot embossing on polymethyl methacrylate, in: *Proceedings of the Electronic Packaging Technology Conference, EPTC, 2006*. <https://doi.org/10.1109/EPTC.2006.342784>.
- [132] H. Becker, U. Heim, Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures, *Sens Actuators A Phys*. 83 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0924-4247\(00\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S0924-4247(00)00296-X).
- [133] J. Ko, D. Park, S. Lee, B. Gumuscu, N.L. Jeon, Engineering Organ-on-a-Chip to Accelerate Translational Research, *Micromachines (Basel)*. 13 (2022). <https://doi.org/10.3390/mi13081200>.
- [134] C.M. Leung, P. de Haan, K. Ronaldson-Bouchard, G.A. Kim, J. Ko, H.S. Rho, Z. Chen, P. Habibovic, N.L. Jeon, S. Takayama, M.L. Shuler, G. Vunjak-Novakovic, O. Frey, E. Verpoorte, Y.C. Toh, A guide to the organ-on-a-chip, *Nature Reviews Methods Primers*. 2 (2022). <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>.
- [135] Y. Lee, J.W. Choi, J. Yu, D. Park, J. Ha, K. Son, S. Lee, M. Chung, H.Y. Kim, N.L. Jeon, Microfluidics within a well: An injection-molded plastic array 3D culture platform, *Lab Chip*. 18 (2018). <https://doi.org/10.1039/c8lc00336j>.
- [136] S. Lee, H. Kang, D. Park, J. Yu, S.K. Koh, D. Cho, D.H. Kim, K.S. Kang, N.L. Jeon, Modeling 3D Human Tumor Lymphatic Vessel Network Using High-Throughput Platform, *Adv Biol*. 5 (2021). <https://doi.org/10.1002/adbi.202000195>.
- [137] J. Ko, J. Ahn, S. Kim, Y. Lee, J. Lee, D. Park, N.L. Jeon, Tumor spheroid-on-a-chip: A standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis, *Lab Chip*. 19 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9lc00140a>.
- [138] D. Park, K. Son, Y. Hwang, J. Ko, Y. Lee, J. Doh, N.L. Jeon, High-throughput microfluidic 3D cytotoxicity assay for cancer immunotherapy (CACI-ImpacT platform), *Front Immunol*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01133>.
- [139] N. Shin, Y. Kim, J. Ko, S.W. Choi, S. Hyung, S.E. Lee, S. Park, J. Song, N.L. Jeon, K.S. Kang, Vascularization of iNSC spheroid in a 3D spheroid-on-a-chip platform enhances neural maturation, *Biotechnol Bioeng*. 119 (2022). <https://doi.org/10.1002/bit.27978>.
- [140] M. Virumbrales-Muñoz, J.M. Ayuso, A. Lacueva, T. Randelovic, M.K. Livingston, D.J. Beebe, S. Oliván, D. Pereboom, M. Doblare, L. Fernández, I. Ochoa, Enabling cell recovery from 3D cell culture microfluidic devices for tumour microenvironment biomarker profiling, *Sci Rep*. 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42529-8>.
- [141] A. V. Nielsen, M.J. Beauchamp, G.P. Nordin, A.T. Woolley, 3D Printed Microfluidics, *Annual Review of Analytical Chemistry*. 13 (2020). <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-091619-102649>.
- [142] B. Lee, S. Kim, J. Ko, S.R. Lee, Y. Kim, S. Park, J. Kim, S. Hyung, H.Y. Kim, N.L. Jeon, 3D micromesh-based hybrid bioprinting: multidimensional liquid patterning for 3D microtissue engineering, *NPG Asia Mater*. 14 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00355-x>.
- [143] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, M. Xing, 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances, *Bioact Mater*. 3 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>.
- [144] P.S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, M.R. Dokmeci, Bioinks for 3D bioprinting: An overview, *Biomater Sci*. 6 (2018). <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>.
- [145] A.A. Yazdi, A. Popma, W. Wong, T. Nguyen, Y. Pan, J. Xu, 3D printing: an emerging tool for novel microfluidics and lab-on-a-chip applications, *Microfluid Nanofluidics*. 20 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1715-4>.

- [146] J.W. Stansbury, M.J. Idacavage, 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities, in: *Dental Materials*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.018>.
- [147] B.N. Johnson, K.Z. Lancaster, I.B. Hogue, F. Meng, Y.L. Kong, L.W. Enquist, M.C. McAlpine, 3D printed nervous system on a chip, *Lab Chip*. 16 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5lc01270h>.
- [148] H. Lee, S. Chae, J.Y. Kim, W. Han, J. Kim, Y. Choi, D.W. Cho, Cell-printed 3D liver-on-a-chip possessing a liver microenvironment and biliary system, *Biofabrication*. 11 (2019). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaf9fa>.
- [149] M.B. Esch, T.L. King, M.L. Shuler, The role of body-on-a-chip devices in drug and toxicity studies, *Annu Rev Biomed Eng*. 13 (2011). <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124629>.
- [150] K.J. Jang, A.P. Mehr, G.A. Hamilton, L.A. McPartlin, S. Chung, K.Y. Suh, D.E. Ingber, Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment, *Integrative Biology (United Kingdom)*. 5 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>.
- [151] F. An, Y. Qu, Y. Luo, N. Fang, Y. Liu, Z. Gao, W. Zhao, B. Lin, A Laminated Microfluidic Device for Comprehensive Preclinical Testing in the Drug ADME Process, *Sci Rep*. 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep25022>.
- [152] Z. Ma, J. Wang, P. Loskill, N. Huebsch, S. Koo, F.L. Svedlund, N.C. Marks, E.W. Hua, C.P. Grigoropoulos, B.R. Conklin, K.E. Healy, Self-organizing human cardiac microchambers mediated by geometric confinement, *Nat Commun*. 6 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms8413>.
- [153] C. Franco, H. Gerhardt, Tissue engineering: Blood vessels on a chip, *Nature*. 488 (2012). <https://doi.org/10.1038/488465a>.
- [154] B. Ataç, I. Wagner, R. Horland, R. Lauster, U. Marx, A.G. Tonevitsky, R.P. Azar, G. Lindner, Skin and hair on-a-chip: In vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion, *Lab Chip*. 13 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3lc50227a>.
- [155] Y.S. Torisawa, C.S. Spina, T. Mammoto, A. Mammoto, J.C. Weaver, T. Tat, J.J. Collins, D.E. Ingber, Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro, *Nat Methods*. 11 (2014) 663–669. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2938>.
- [156] L.M. Griep, F. Wolbers, B. De Wagenaar, P.M. Ter Braak, B.B. Weksler, I.A. Romero, P.O. Couraud, I. Vermes, A.D. Van Der Meer, A. Van Den Berg, BBB on CHIP: Microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function, *Biomed Microdevices*. 15 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9699-7>.
- [157] J.H. Sung, Y.I. Wang, N. Narasimhan Sriram, M. Jackson, C. Long, J.J. Hickman, M.L. Shuler, Recent Advances in Body-on-a-Chip Systems, *Anal Chem*. 91 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05293>.
- [158] K. Ronaldson-Bouchard, G. Vunjak-Novakovic, Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development, *Cell Stem Cell*. 22 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.011>.
- [159] B. Zhang, M. Radisic, Organ-on-A-chip devices advance to market, *Lab Chip*. 17 (2017). <https://doi.org/10.1039/c6lc01554a>.
- [160] P. Zamprogno, S. Wüthrich, S. Achenbach, G. Thoma, J.D. Stucki, N. Hobi, N. Schneider-Daum, C.M. Lehr, H. Huwer, T. Geiser, R.A. Schmid, O.T. Guenat, Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane, *Commun Biol*. 4 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01695-0>.
- [161] E. Moradi, S. Jalili-Firoozinezhad, M. Solati-Hashjin, Microfluidic organ-on-a-chip models of human liver tissue, *Acta Biomater*. 116 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.041>.
- [162] F. Yu, R. Deng, W. Hao Tong, L. Huan, N. Chan Way, A. Islambadhan, C. Iliescu, H. Yu, A perfusion incubator liver chip for 3D cell culture with application on chronic hepatotoxicity testing, *Sci Rep*. 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13848-5>.
- [163] Y. Du, N. Li, H. Yang, C. Luo, Y. Gong, C. Tong, Y. Gao, S. Lü, M. Long, Mimicking liver sinusoidal structures and functions using a 3D-configured microfluidic chip, *Lab Chip*. 17 (2017). <https://doi.org/10.1039/c6lc01374k>.

- [164] S. Kim, S.C. ai Lesherperez, B.C. houl C. Kim, C. Yamanishi, J.M. Labuz, B. Leung, S. Takayama, Pharmacokinetic profile that reduces nephrotoxicity of gentamicin in a perfused kidney-on-a-chip, *Biofabrication*. 8 (2016). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/015021>.
- [165] S. Musah, A. Mammoto, T.C. Ferrante, S.S.F. Jeanty, M. Hirano-Kobayashi, T. Mammoto, K. Roberts, S. Chung, R. Novak, M. Ingram, T. Fatanat-Didar, S. Koshy, J.C. Weaver, G.M. Church, D.E. Ingber, Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip, *Nat Biomed Eng*. 1 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0069>.
- [166] L. Wang, T. Tao, W. Su, H. Yu, Y. Yu, J. Qin, A disease model of diabetic nephropathy in a glomerulus-on-a-chip microdevice, *Lab Chip*. 17 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7lc00134g>.
- [167] R. Visone, M. Gilardi, A. Marsano, M. Rasponi, S. Bersini, M. Moretti, Cardiac meets skeletal: What's new in microfluidic models for muscle tissue engineering, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21091128>.
- [168] A. Grosberg, P.W. Alford, M.L. McCain, K.K. Parker, Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: Heart on a chip, *Lab Chip*. 11 (2011). <https://doi.org/10.1039/c1lc20557a>.
- [169] A. Marsano, C. Conficconi, M. Lemme, P. Occhetta, E. Gaudiello, E. Votta, G. Cerino, A. Redaelli, M. Rasponi, Beating heart on a chip: A novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues, *Lab Chip*. 16 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5lc01356a>.
- [170] Z. Li, J. Hui, P. Yang, H. Mao, Microfluidic Organ-on-a-Chip System for Disease Modeling and Drug Development, *Biosensors (Basel)*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12060370>.
- [171] B.T. Hawkins, T.P. Davis, The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease, *Pharmacol Rev*. 57 (2005). <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>.
- [172] N.J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nat Rev Neurosci*. 7 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- [173] S. Jeong, S. Kim, J. Buonocore, J. Park, C.J. Welsh, J. Li, A. Han, A three-dimensional arrayed microfluidic blood-brain barrier model with integrated electrical sensor array, *IEEE Trans Biomed Eng*. 65 (2018). <https://doi.org/10.1109/TBME.2017.2773463>.
- [174] T.E. Park, N. Mustafaoglu, A. Herland, R. Hasselkus, R. Mannix, E.A. FitzGerald, R. Prantil-Baun, A. Watters, O. Henry, M. Benz, H. Sanchez, H.J. McCrea, L.C. Goumnerova, H.W. Song, S.P. Palecek, E. Shusta, D.E. Ingber, Hypoxia-enhanced Blood-Brain Barrier Chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies, *Nat Commun*. 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10588-0>.
- [175] Y. Zhao, R.K. Kankala, S. Bin Wang, A.Z. Chen, Multi-organs-on-chips: Towards long-term biomedical investigations, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24040675>.
- [176] B. Zhang, A. Korolj, B.F.L. Lai, M. Radisic, Advances in organ-on-a-chip engineering, *Nat Rev Mater*. 3 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0034-7>.
- [177] A. Choe, S.K. Ha, I. Choi, N. Choi, J.H. Sung, Microfluidic Gut-liver chip for reproducing the first pass metabolism, *Biomed Microdevices*. 19 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0143-2>.
- [178] K. Schimek, S. Frentzel, K. Luettich, D. Bovard, I. Rüttschle, L. Boden, F. Rambo, H. Erfurth, E.M. Dehne, A. Winter, U. Marx, J. Hoeng, Human multi-organ chip co-culture of bronchial lung culture and liver spheroids for substance exposure studies, *Sci Rep*. 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64219-6>.
- [179] A. Skardal, S. V. Murphy, M. Devarasetty, I. Mead, H.W. Kang, Y.J. Seol, Y.S. Zhang, S.R. Shin, L. Zhao, J. Aleman, A.R. Hall, T.D. Shupe, A. Kleensang, M.R. Dokmeci, S. Jin Lee, J.D. Jackson, J.J. Yoo, T. Hartung, A. Khademhosseini, S. Soker, C.E. Bishop, A. Atala, Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform, *Sci Rep*. 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08879-x>.
- [180] C.D. Edington, W.L.K. Chen, E. Geishecker, T. Kassis, L.R. Soenksen, B.M. Bhushan, D. Freake, J. Kirschner, C. Maass, N. Tsamandouras, J. Valdez, C.D. Cook, T. Parent, S. Snyder, J. Yu, E. Suter, M. Shockley, J. Velazquez, J.J.

- Velazquez, L. Stockdale, J.P. Papps, I. Lee, N. Vann, M. Gamboa, M.E. Labarge, Z. Zhong, X. Wang, L.A. Boyer, D.A. Lauffenburger, R.L. Carrier, C. Communal, S.R. Tannenbaum, C.L. Stokes, D.J. Hughes, G. Rohatgi, D.L. Trumper, M. Cirit, L.G. Griffith, Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies, *Sci Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22749-0>.
- [181] C.W. McAleer, C.J. Long, D. Elbrecht, T. Sasserath, L.R. Bridges, J.W. Rumsey, C. Martin, M. Schnepper, Y. Wang, F. Schuler, A.B. Roth, C. Funk, M.L. Shuler, J.J. Hickman, Multi-organ system for the evaluation of efficacy and off-target toxicity of anticancer therapeutics, *Sci Transl Med.* 11 (2019). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav1386>.
- [182] A. Raic, T. Naolou, A. Mohra, C. Chatterjee, C. Lee-Thedieck, 3D models of the bone marrow in health and disease: Yesterday, today, and tomorrow, *MRS Commun.* 9 (2019). <https://doi.org/10.1557/mrc.2018.203>.
- [183] S. Lindsey, E.T. Papoutsakis, The importance of physiologically inspired physicochemical parameters on hematopoietic stem-cell maintenance and lineage-specific differentiation in ex vivo cultures, in: *Stem Cells: From Mechanisms to Technologies*, 2011. https://doi.org/10.1142/9789814317931_0006.
- [184] J. Kim, H. Lee, Š. Selimović, R. Gauvin, H. Bae, Organ-On-A-Chip: Development and Clinical Prospects Toward Toxicity Assessment with an Emphasis on Bone Marrow, *Drug Saf.* 38 (2015). <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0284-x>.
- [185] M.A. Walasek, R. van Os, G. de Haan, Hematopoietic stem cell expansion: Challenges and opportunities, *Ann N Y Acad Sci.* 1266 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06549.x>.
- [186] S.H. Cheshier, S.J. Morrison, X. Liao, I.L. Weissman, In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3120>.
- [187] S. Watcham, I. Kucinski, B. Gottgens, New insights into hematopoietic differentiation landscapes from single-cell RNA sequencing, *Blood.* 133 (2019). <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-835355>.
- [188] R. Yamamoto, Y. Morita, J. Oeohara, S. Hamanaka, M. Onodera, K.L. Rudolph, H. Ema, H. Nakauchi, XClonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells, *Cell.* 154 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.007>.
- [189] Q.L. Hao, J. Zhu, M.A. Price, K.J. Payne, L.W. Barsky, G.M. Crooks, Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood, *Blood.* 97 (2001). <https://doi.org/10.1182/blood.V97.12.3683>.
- [190] M.G. Manz, T. Miyamoto, K. Akashi, I.L. Weissman, Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002). <https://doi.org/10.1073/pnas.172384399>.
- [191] B.K. Tusi, S.L. Wolock, C. Weinreb, Y. Hwang, D. Hidalgo, R. Zilionis, A. Waisman, J.R. Huh, A.M. Klein, M. Socolovsky, Population snapshots predict early haematopoietic and erythroid hierarchies, *Nature.* 555 (2018). <https://doi.org/10.1038/nature25741>.
- [192] U. Lindner, J. Kramer, J. Rohwedel, P. Schlenke, Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology?, *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 37 (2010). <https://doi.org/10.1159/000290897>.
- [193] J.P. Lévesque, J. Hendy, Y. Takamatsu, P.J. Simmons, L.J. Bendall, Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by gcsf or cyclophosphamide, *Journal of Clinical Investigation.* 111 (2003). <https://doi.org/10.1172/JCI15994>.
- [194] J.P. Levesque, F. Liu, P.J. Simmons, T. Betsuyaku, R.M. Senior, C. Pham, D.C. Link, Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice, *Blood.* 104 (2004). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1589>.
- [195] Y. Katayama, M. Battista, W.M. Kao, A. Hidalgo, A.J. Peired, S.A. Thomas, P.S. Frenette, Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow, *Cell.* 124 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.041>.
- [196] J.P. Lévesque, Y. Takamatsu, S.K. Nilsson, D.N. Haylock, P.J. Simmons, Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell

- mobilization by granulocyte colony-stimulating factor, *Blood*. 98 (2001). <https://doi.org/10.1182/blood.V98.5.1289>.
- [197] S.K. Nilsson, H.M. Johnston, G.A. Whitty, B. Williams, R.J. Webb, D.T. Denhardt, I. Bertoncello, L.J. Bendall, P.J. Simmons, D.N. Haylock, Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells, *Blood*. 106 (2005). <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4422>.
- [198] S. Méndez-Ferrer, T. V. Michurina, F. Ferraro, A.R. Mazloom, B.D. MacArthur, S.A. Lira, D.T. Scadden, A. Ma'ayan, G.N. Enikolopov, P.S. Frenette, Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche, *Nature*. 466 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09262>.
- [199] P.H. Krebsbach, S.A. Kuznetsov, P. Bianco, P. Gehron Robey, Bone marrow stromal cells: Characterization and clinical application, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 10 (1999). <https://doi.org/10.1177/10454411990100020401>.
- [200] A.M. Parfitt, M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, P.J. Meunier, S.M. Ott, R.R. Recker, Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee, *Journal of Bone and Mineral Research*. 2 (1987). <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>.
- [201] A.J. Lilly, W.E. Johnson, C.M. Bunce, The haematopoietic stem cell niche: New insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour, *Stem Cells Int.* (2011). <https://doi.org/10.4061/2011/274564>.
- [202] N. Baryawno, D. Przybylski, M.S. Kowalczyk, Y. Kfoury, N. Severe, K. Gustafsson, K.D. Kokkaliaris, F. Mercier, M. Tabaka, M. Hofree, D. Dionne, A. Papazian, D. Lee, O. Ashenberg, A. Subramanian, E.D. Vaishnav, O. Rozenblatt-Rosen, A. Regev, D.T. Scadden, A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia, *Cell*. 177 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.040>.
- [203] C. Baccin, J. Al-Sabah, L. Velten, P.M. Helbling, F. Grünschläger, P. Hernández-Malmierca, C. Nombela-Arrieta, L.M. Steinmetz, A. Trumpp, S. Haas, Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization, *Nat Cell Biol*. 22 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0439-6>.
- [204] A.N. Tikhonova, I. Dolgalev, H. Hu, K.K. Sivaraj, E. Hoxha, Á. Cuesta-Domínguez, S. Pinho, I. Akhmetzyanova, J. Gao, M. Witkowski, M. Guillaumot, M.C. Gutkin, Y. Zhang, C. Marier, C. Diefenbach, S. Kousteni, A. Heguy, H. Zhong, D.R. Fooksman, J.M. Butler, A. Economides, P.S. Frenette, R.H. Adams, R. Satija, A. Tsrigris, I. Aifantis, The bone marrow microenvironment at single-cell resolution, *Nature*. 569 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1104-8>.
- [205] G.S. Rosalem, L.A.G. Torres, E.B. de Las Casas, F.A.S. Mathias, J.C. Ruiz, M.G.R. Carvalho, Microfluidics and organ-on-a-chip technologies: A systematic review of the methods used to mimic bone marrow, *PLoS One*. 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243840>.
- [206] F. Frassoni, N.G. Testa, B.I. Lord, The relative spatial distribution of erythroid progenitor cells (BFUe and CFUe) in the normal mouse femur, *Cell Prolif*. 15 (1982). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1982.tb01062.x>.
- [207] M. Maloney, R. Lamela, M. Dorie, H. Patt, Concentration gradient of blood stem cells in mouse bone marrow--an open question, *Blood*. 51 (1978). <https://doi.org/10.1182/blood.v51.3.521.bloodjournal513521>.
- [208] B. Lord, N. Testa, J. Hendry, The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur, *Blood*. 46 (1975). <https://doi.org/10.1182/blood.v46.1.65.bloodjournal46165>.
- [209] S.K. Nilsson, H.M. Johnston, J.A. Coverdale, Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: Inferences for the localization of stem cell niches, *Blood*. 97 (2001). <https://doi.org/10.1182/blood.V97.8.2293>.
- [210] Y. Kunisaki, I. Bruns, C. Scheiermann, J. Ahmed, S. Pinho, D. Zhang, T. Mizoguchi, Q. Wei, D. Lucas, K. Ito, J.C. Mar, A. Bergman, P.S. Frenette, Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence, *Nature*. 502 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12612>.

- [211] C. Lo Celso, H.E. Fleming, J.W. Wu, C.X. Zhao, S. Miake-Lye, J. Fujisaki, D. Côté, D.W. Rowe, C.P. Lin, D.T. Scadden, Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche, *Nature*. 457 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature07434>.
- [212] Q. Wei, P.S. Frenette, Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny, *Immunity*. 48 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.024>.
- [213] D. Li, W. Xue, M. Li, M. Dong, J. Wang, X. Wang, X. Li, K. Chen, W. Zhang, S. Wu, Y. Zhang, L. Gao, Y. Chen, J. Chen, B.O. Zhou, Y. Zhou, X. Yao, L. Li, D. Wu, W. Pan, VCAM-1+ macrophages guide the homing of HSPCs to a vascular niche, *Nature*. 564 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0709-7>.
- [214] M. Zhao, J.M. Perry, H. Marshall, A. Venkatraman, P. Qian, X.C. He, J. Ahamed, L. Li, Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells, *Nat Med*. 20 (2014). <https://doi.org/10.1038/nm.3706>.
- [215] N. Di Maggio, E. Piccinini, M. Jaworski, A. Trumpp, D.J. Wendt, I. Martin, Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems, *Biomaterials*. 32 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.041>.
- [216] F. Chen, Y. Han, Y. Kang, Bone marrow niches in the regulation of bone metastasis, *Br J Cancer*. 124 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01329-6>.
- [217] S.S. Lim, A.R. Bayakly, C.G. Helmick, C. Gordon, K.A. Easley, C. Drenkard, The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002-2004: The Georgia lupus registry, *Arthritis and Rheumatology*. 66 (2014). <https://doi.org/10.1002/art.38239>.
- [218] C.S. Yee, L. Su, V. Toescu, R. Hickman, D. Situnayake, S. Bowman, V. Farewell, C. Gordon, Birmingham SLE cohort: Outcomes of a large inception cohort followed for up to 21 years, *Rheumatology (United Kingdom)*. 54 (2014). <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu412>.
- [219] H. Lastrup, A. Voss, A. Green, P. Junker, Occurrence of systemic lupus erythematosus in a Danish community: An 8-year prospective study, *Scand J Rheumatol*. 38 (2009). <https://doi.org/10.1080/03009740802419073>.
- [220] A. Kaul, C. Gordon, M.K. Crow, Z. Touma, M.B. Urowitz, R. van Vollenhoven, G. Ruiz-Irastorza, G. Hughes, Systemic lupus erythematosus, *Nat Rev Dis Primers*. 2 (2016) 16039.
- [221] Y. Deng, B.P. Tsao, Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era, *Nat Rev Rheumatol*. 6 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.176>.
- [222] R.G. Lahita, The Early Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus, *J Womens Health*. 1 (2009) 117–121.
- [223] D.S. Pisetsky, G. Gilkeson, E.W. St. Clair, SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS Diagnosis and Treatment, *Medical Clinics*. 81 (1997).
- [224] S.M. Benseler, E.D. Silverman, Systemic Lupus Erythematosus, *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 33 (2007) 471–498. <https://doi.org/10.1016/j.RDC.2007.07.008>.
- [225] A. Buxboim, K. Rajagopal, A.E.X. Brown, D.E. Discher, How deeply cells feel: Methods for thin gels, *Journal of Physics Condensed Matter*. 22 (2010). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/19/194116>.
- [226] M.R. Nelson, K. Roy, Bone-marrow mimicking biomaterial niches for studying hematopoietic stem and progenitor cells, *J Mater Chem B*. 4 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5tb02644j>.
- [227] W. Zhang, W.Y. Lee, D.S. Siegel, P. Toliás, J. Zilberberg, Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma, *Tissue Eng Part C Methods*. 20 (2014) 663–670. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0490>.
- [228] W. Zhang, Y. Gu, Q. Sun, D.S. Siegel, P. Toliás, Z. Yang, W.Y. Lee, J. Zilberberg, Ex vivo maintenance of primary human multiple myeloma cells through the optimization of the osteoblastic niche, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125995>.

- [229] S. Bersini, J.S. Jeon, G. Dubini, C. Arrigoni, S. Chung, J.L. Charest, M. Moretti, R.D. Kamm, A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone, *Biomaterials*. 35 (2014) 2454–2461. <https://doi.org/10.1016/j.BIOMATERIALS.2013.11.050>.
- [230] A. Marturano-Kruik, M.M. Nava, K. Yeager, A. Chramiec, L. Hao, S. Robinson, E. Guo, M.T. Raimondi, G. Vunjak-Novakovic, Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115 (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1714282115>.
- [231] Y.S. Torisawa, T. Mammoto, E. Jiang, A. Jiang, A. Mammoto, A.L. Watters, A. Bahinski, D.E. Ingber, Modeling Hematopoiesis and Responses to Radiation Countermeasures in a Bone Marrow-on-a-Chip, *Tissue Eng Part C Methods*. 22 (2016). <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0507>.
- [232] J.N. Thon, L. Mazutis, S. Wu, J.L. Sylman, A. Ehrlicher, K.R. Machlus, Q. Feng, S. Lu, R. Lanza, K.B. Neeves, D.A. Weitz, J.E. Italiano, Platelet bioreactor-on-a-chip, *Blood*. 124 (2014). <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-574913>.
- [233] P. Wuchter, R. Saffrich, S. Giselbrecht, C. Nies, H. Lorig, S. Kolb, A.D. Ho, E. Gottwald, Microcavity arrays as an in vitro model system of the bone marrow niche for hematopoietic stem cells, *Cell Tissue Res*. 364 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2348-8>.
- [234] S. Sieber, L. Wirth, N. Cavak, M. Koenigsmark, U. Marx, R. Lauster, M. Rosowski, Bone marrow-on-a-chip: Long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment, *J Tissue Eng Regen Med*. 12 (2017) 479–489. <https://doi.org/10.1002/term.2507>.
- [235] S. Sieber, A. Winter, J. Wachsmuth, R. David, M. Stecklum, L. Hellmeyer, L. Ewart, U. Marx, R. Lauster, M. Rosowski, Bone marrow-on-a-chip: Emulating the human bone marrow, *BioRxiv*. (2018).
- [236] S.S. Kotha, B.J. Hayes, K.T. Phong, M.A. Redd, K. Bomszyk, A. Ramakrishnan, B. Torok-Storb, Y. Zheng, Engineering a multicellular vascular niche to model hematopoietic cell trafficking, *Stem Cell Res Ther*. 9 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0808-2>.
- [237] D.B. Chou, V. Frisimantas, Y. Milton, R. David, P. Pop-Damkov, D. Ferguson, A. MacDonald, Ö. Vargel Bölükbaşı, C.E. Joyce, L.S. Moreira Teixeira, A. Rech, A. Jiang, E. Calamari, S. Jalili-Firoozinezhad, B.A. Furlong, L.R. O’Sullivan, C.F. Ng, Y. Choe, S. Marquez, K.C. Myers, O.K. Weinberg, R.P. Hasserjian, R. Novak, O. Levy, R. Prantil-Baun, C.D. Novina, A. Shimamura, L. Ewart, D.E. Ingber, On-chip recapitulation of clinical bone marrow toxicities and patient-specific pathophysiology, *Nat Biomed Eng*. 4 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0495-z>.
- [238] A. Sharipol, M.L. Lesch, C.A. Soto, B.J. Frisch, Bone Marrow Microenvironment-On-Chip for Culture of Functional Hematopoietic Stem Cells, *Front Bioeng Biotechnol*. 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.855777>.
- [239] J. Aleman, S.K. George, S. Herberg, M. Devarasetty, C.D. Porada, A. Skardal, G. Almeida-Porada, Deconstructed Microfluidic Bone Marrow On-A-Chip to Study Normal and Malignant Hemopoietic Cell–Niche Interactions, *Small*. 15 (2019). <https://doi.org/10.1002/smll.201902971>.
- [240] M.R. Nelson, D. Ghoshal, J.C. Mejías, D. Frey Rubio, E. Keith, K. Roy, A Multi-Niche Microvascularized Human Bone-Marrow-on-a-Chip, *BioRxiv*. (2019).
- [241] D.E. Glaser, M.B. Curtis, P.A. Sariano, Z.A. Rollins, B.S. Shergill, A. Anand, A.M. Deely, V.S. Shirure, L. Anderson, J.M. Lowen, N.R. Ng, K. Weilbaecher, D.C. Link, S.C. George, Organ-on-a-chip model of vascularized human bone marrow niches, *Biomaterials*. 280 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121245>.
- [242] B. Wielockx, T. Grinenko, P. Mirtschink, T. Chavakis, Hypoxia pathway proteins in normal and malignant hematopoiesis, *Cells*. 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/cells8020155>.
- [243] A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia, Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nat Rev Immunol*. 8 (2008). <https://doi.org/10.1038/nri2395>.

- [244] A.J. Olaharski, H. Uppal, M. Cooper, S. Platz, T.S. Zabka, K.L. Kolaja, In vitro to in vivo concordance of a high throughput assay of bone marrow toxicity across a diverse set of drug candidates, *Toxicol Lett.* 188 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.012>.

Κεφάλαιο 2

- [1] Darwin microfluidics Culture patch product information, <https://darwin-microfluidics.com/products/culture-patch-for-organ-on-chip?variant=14406555533357>Culture patch (accessed May 10, 2023).
- [2] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E.M. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy.* 8 (2006). <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

Κεφάλαιο 3

- [1] J.H. Sung, C. Kam, M.L. Shuler, A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip, *Lab Chip.* 10 (2010) 446–455. <https://doi.org/10.1039/b917763a>.
- [2] W. Zhang, W.Y. Lee, D.S. Siegel, P. Toliás, J. Zilberberg, Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma, *Tissue Eng Part C Methods.* 20 (2014) 663–670. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0490>.
- [3] Y.S. Torisawa, C.S. Spina, T. Mammoto, A. Mammoto, J.C. Weaver, T. Tat, J.J. Collins, D.E. Ingber, Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro, *Nat Methods.* 11 (2014) 663–669. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2938>.
- [4] X. Cai, Z. Jiang, X. Zhang, T. Gao, K. Xue, X. Zhang, Thermal property improvement of polytetrafluoroethylene nanocomposites with graphene nanoplatelets, *RSC Advances.* 8 (2018) 11367–11374. [10.1039/c8ra01047a](https://doi.org/10.1039/c8ra01047a).
- [5] J.G. Kaufman, Fire Resistance of Aluminum and Aluminum Alloys and Measuring the Effects of Fire Exposure on the Properties of Aluminum Alloys, in: ASM International, 2016.
- [6] D. Qin, Y. Xia, G.M. Whitesides, Soft lithography for micro- and nanoscale patterning, *Nat Protoc.* 5 (2010) 491–502. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.234>.
- [7] Y. Xia, G.M. Whitesides, SOFT LITHOGRAPHY, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28 (1998) 153–84. www.annualreviews.org.
- [8] The Dow Chemical Company, <https://www.dow.com/en-us/pdp.sylgard-184-silicone-elastomer-kit.01064291z.html#tech-content>, (2017).
- [9] D. Huh, H.J. Kim, J.P. Fraser, D.E. Shea, M. Khan, A. Bahinski, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, Microfabrication of human organs-on-chips, *Nat Protoc.* 8 (2013) 2135–2157. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.137>.
- [10] A. Zeniou, K. Ellinas, A. Olziersky, E. Gogolides, Ultra-high aspect ratio Si nanowires fabricated with plasma etching: Plasma processing, mechanical stability analysis against adhesion and capillary forces and oleophobicity, *Nanotechnology.* 25 (2014). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/3/035302>.
- [11] Z. Wang, A.A. Volinsky, N.D. Gallant, Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument, *J Appl Polym Sci.* 131 (2014). <https://doi.org/10.1002/app.41050>.
- [12] I.D. Johnston, D.K. McCluskey, C.K.L. Tan, M.C. Tracey, Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering, *Journal of Micromechanics and Microengineering.* 24 (2014). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/24/3/035017>.

- [13] K. Fateh-Alavi, M.E. Núñez, S. Karlsson, U.W. Gedde, The effect of stabilizer concentration on the air-plasma-induced surface oxidation of crosslinked polydimethylsiloxane, *Polym Degrad Stab.* 78 (2002) 17–25. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00114-3).
- [14] D. Bodas, C. Khan-Malek, Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation, *Sens Actuators B Chem.* 123 (2007) 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.08.037>.
- [15] H. Hillborg, J.F. Ankner, U.W. Gedde, G.D. Smith, H.K. Yasuda, K. Wikström, Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques, *Polymer (Guildf).* 41 (2000) 6851–6863. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00039-2).
- [16] K. Terpilowski, D. Rymuszka, Surface properties of glass plates activated by air, oxygen, nitrogen and argon plasma, *Glass Physics and Chemistry.* 42 (2016) 535–541. <https://doi.org/10.1134/S1087659616060195>.
- [17] L. Xiong, P. Chen, Q. Zhou, Adhesion promotion between PDMS and glass by oxygen plasma pre-treatment, *J Adhes Sci Technol.* 28 (2014) 1046–1054. <https://doi.org/10.1080/01694243.2014.883774>.
- [18] M.A. Eddings, M.A. Johnson, B.K. Gale, Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices, *Journal of Micromechanics and Microengineering.* 18 (2008). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/6/067001>.
- [19] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis.* 21 (2000) 27–40. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C).

Κεφάλαιο 4

- [1] E.K. Sackmann, A.L. Fulton, D.J. Beebe, The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature.* 507 (2014) 181–189. <https://doi.org/10.1038/nature13118>.
- [2] S.K. Sia, G.M. Whitesides, Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies, *Electrophoresis.* 24 (2003) 3563–3576. <https://doi.org/10.1002/elps.200305584>.
- [3] J.M.K. Ng, I. Gitlin, A.D. Stroock, G.M. Whitesides, Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems, *Electrophoresis.* 23 (2002) 3461–3473. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200210\)23:20<3461::AID-ELPS3461>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200210)23:20<3461::AID-ELPS3461>3.0.CO;2-8).
- [4] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974–4984. <https://doi.org/10.1021/ac980656z>.
- [5] J.N. Lee, X. Jiang, D. Ryan, G.M. Whitesides, Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane), *Langmuir.* 20 (2004) 11684–11691. <https://doi.org/10.1021/la048562+>.
- [6] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell.* 126 (2006) 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- [7] S. Lavenus, J.C. Ricquier, G. Louarn, P. Layrolle, Cell interaction with nanopatterned surface of implants, *Nanomedicine.* 5 (2010) 937–947. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.54>.
- [8] J. Genzer, K. Efimenko, Creating long-lived superhydrophobic polymer surfaces through mechanically assembled monolayers, *Science (80-.).* 290 (2000) 2130–2133. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2130>.
- [9] T.S. Phely-Bobin, R.J. Muisener, J.T. Koberstein, F. Papadimitrakopoulos, Preferential self-assembly of surface-modified Si/SiO_x nanoparticles on UV/ozone micropatterned poly(dimethylsiloxane) films, *Adv. Mater.* 12 (2000) 1257–1261. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200009\)12:17<1257::AID-ADMA1257>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200009)12:17<1257::AID-ADMA1257>3.0.CO;2-7).
- [10] K. Efimenko, W.E. Wallace, J. Genzer, Surface modification of Sylgard-184 poly(dimethyl siloxane) networks by ultraviolet and ultraviolet/ozone treatment, *J. Colloid Interface Sci.* 254 (2002) 306–315. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8594>.

- [11] V. Barbier, M. Tatoulian, H. Li, F. Arefi-Khonsari, A. Ajdari, P. Tabeling, Stable modification of PDMS surface properties by plasma polymerization: Application to the formation of double emulsions in microfluidic systems, *Langmuir*. 22 (2006) 5230–5232. <https://doi.org/10.1021/la053289c>.
- [12] S.L. Peterson, A. McDonald, P.L. Gourley, D.Y. Sasaki, Poly(dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: Cell culture and flow studies with glial cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 72 (2005) 10–18. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30166>.
- [13] H.M.L. Tan, H. Fukuda, T. Akagi, T. Ichiki, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) for controlling biological cells' adhesion using a scanning radical microjet, *Thin Solid Films*. 515 (2007) 5172–5178. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2006.10.026>.
- [14] H.Y. Chen, Y. Elkasabi, J. Lahann, Surface modification of confined microgeometries via vapor-deposited polymer coatings, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 374–380. <https://doi.org/10.1021/ja057082h>.
- [15] H.Y. Chen, A.A. McClelland, Z. Chen, J. Lahann, Solventless adhesive bonding using reactive polymer coatings, *Anal. Chem.* 80 (2008) 4119–4124. <https://doi.org/10.1021/ac800341m>.
- [16] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6544–6554. <https://doi.org/10.1021/ac0346712>.
- [17] S. Hemmilä, J. V. Cauich-Rodríguez, J. Kreutzer, P. Kallio, Rapid, simple, and cost-effective treatments to achieve long-term hydrophilic PDMS surfaces, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 9864–9875. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.06.044>.
- [18] D. Wu, B. Zhao, Z. Dai, J. Qin, B. Lin, Grafting epoxy-modified hydrophilic polymers onto poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip to resist nonspecific protein adsorption, *Lab Chip*. 6 (2006) 942–947. <https://doi.org/10.1039/b600765a>.
- [19] D. Bodas, C. Khan-Malek, Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation, *Sensors Actuators, B Chem.* 123 (2007) 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.08.037>.
- [20] H. Hillborg A'b, U.W. Gedde A'b', Hydrophobicity recovery of polydimethylsiloxane after exposure to corona discharges, *Polymer (Guildf)*. 39 (1998) 1991–1998.
- [21] K. V. Christ, K.T. Turner, Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates, *J. Adhes. Sci. Technology*. 24 (2010) 2027–2058. <https://doi.org/10.1201/b12179-14>.
- [22] A. Siddique, T. Meckel, R.W. Stark, S. Narayan, Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 150 (2017) 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.011>.
- [23] D. Kang, J.H. Kim, Y.H. Jeong, J.Y. Kwak, S. Yoon, S. Jin, Endothelial monolayers on collagen-coated nanofibrous membranes: Cell-cell and cell-ECM interactions, *Biofabrication*. 8 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/025008>.
- [24] C. Somaiah, A. Kumar, D. Mawrie, A. Sharma, S.D. Patil, J. Bhattacharyya, R. Swaminathan, B.G. Jaganathan, Collagen promotes higher adhesion, survival and proliferation of mesenchymal stem cells, *PLoS One*. 10 (2015) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145068>.
- [25] Y. Hong, I. Koh, K. Park, P. Kim, On-Chip Fabrication of a Cell-Derived Extracellular Matrix Sheet, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (2017) 3546–3552. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00613>.
- [26] K. Ronaldson-Bouchard, G. Vunjak-Novakovic, Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development, *Cell Stem Cell*. 22 (2018) 310–324. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.011>.
- [27] H.C. Fuller, T.Y. Wei, M.R. Behrens, W.C. Ruder, The future application of organ-on-a-chip technologies as proving grounds for microbiorobots, *Micromachines*. 11 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/mi11100947>.
- [28] K.A. Kilian, B. Bugarija, B.T. Lahn, M. Mrksich, Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 4872–4877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903269107>.

- [29] D. Huh, B.D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Yuan Hsin, D.E. Ingber, Reconstituting organ-level lung functions on a chip, *Science* (80-.). 328 (2010) 1662–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>.
- [30] K.H. Benam, R. Villenave, C. Lucchesi, A. Varone, C. Hubeau, H.H. Lee, S.E. Alves, M. Salmon, T.C. Ferrante, J.C. Weaver, A. Bahinski, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro, *Nat. Methods*. 13 (2016) 151–157. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3697>.
- [31] H. Lodish, A. Berk, P. Zipursky, Lawrence Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W H Freeman & Co, New York, 2002.
- [32] S. Kuddannaya, Y.J. Chuah, M.H.A. Lee, N. V. Menon, Y. Kang, Y. Zhang, Surface chemical modification of poly(dimethylsiloxane) for the enhanced adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 9777–9784. <https://doi.org/10.1021/am402903e>.
- [33] A. Siddique, I. Pause, S. Narayan, L. Kruse, R.W. Stark, Endothelialization of PDMS-based microfluidic devices under high shear stress conditions, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 197 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111394>.
- [34] L. Bozec, G. Van Der Heijden, M. Horton, Collagen fibrils: Nanoscale ropes, *Biophys. J.* 92 (2007) 70–75. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.085704>.
- [35] Y.J. Chuah, S. Kuddannaya, M.H.A. Lee, Y. Zhang, Y. Kang, The effects of poly(dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 383–390. <https://doi.org/10.1039/c4bm00268g>.
- [36] M. Nishikawa, T. Yamamoto, N. Kojima, K. Kikuo, T. Fujii, Y. Sakai, Stable immobilization of rat hepatocytes as hemispheroids onto collagen-conjugated poly-dimethylsiloxane (PDMS) surfaces: Importance of direct oxygenation through PDMS for both formation and function, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 1472–1481. <https://doi.org/10.1002/bit.21690>.
- [37] S. Lopera, R.D. Mansano, Plasma-Based Surface Modification of Polydimethylsiloxane for PDMS-PDMS Molding, *ISRN Polym. Sci.* 2012 (2012) 1–5. <https://doi.org/10.5402/2012/767151>.
- [38] J.A. Juárez-Moreno, L.G. Brito-Argáez, A. Ávila-Ortega, A.I. Oliva, F. Avilés, J. V. Cauich-Rodríguez, Effect of the type of plasma on the polydimethylsiloxane/collagen composites adhesive properties, *Int. J. Adhes. Adhes.* 77 (2017) 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2017.03.010>.
- [39] J.A. Juárez-Moreno, A. Ávila-Ortega, A.I. Oliva, F. Avilés, J. V. Cauich-Rodríguez, Effect of wettability and surface roughness on the adhesion properties of collagen on PDMS films treated by capacitively coupled oxygen plasma, *Appl. Surf. Sci.* 349 (2015) 763–773. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.063>.
- [40] H.Hillborg, J.F.Ankner, U.W.Gedde, G.D.Smith, H.K.Yasuda, K.Wikström, Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques, *Polymer*. 41 (2000) 6851–6863. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00039-2).
- [41] R.A. Lawton, C.R. Price, A.F. Runge, W.J. Doherty, S.S. Saavedra, Air plasma treatment of submicron thick PDMS polymer films: Effect of oxidation time and storage conditions, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 253 (2005) 213–215. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.11.010>.
- [42] C.F. Chen, K. Wharton, Characterization and failure mode analyses of air plasma oxidized PDMS-PDMS bonding by peel testing, *RSC Adv.* 7 (2017) 1286–1289. <https://doi.org/10.1039/c6ra25947b>.
- [43] J.A. Jofre-Reche, J. Pulpytel, H. Fakhouri, F. Arefi-Khonsari, J.M. Martín-Martínez, Surface treatment of polydimethylsiloxane (PDMS) with atmospheric pressure rotating plasma jet. Modeling and optimization of the surface treatment conditions, *Plasma Processes and Polymers*. 13 (2016) 459–469. <https://doi.org/10.1002/ppap.201500118>.
- [44] S.M. Hong, S.H. Kim, J.H. Kim, H.I. Hwang, Hydrophilic surface modification of PDMS using atmospheric RF plasma, *J Phys Conf Ser.* 34 (2006) 656–661. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/34/1/108>.
- [45] H.T. Kim, O.C. Jeong, PDMS surface modification using atmospheric pressure plasma, in: *Microelectron Eng*, 2011: pp. 2281–2285. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2011.02.084>.

- [46] A. Zuchowska, P. Kwiatkowski, E. Jastrzebska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly(dimethylsiloxane) surface modified by proteins, *Electrophoresis*. 37 (2016) 536–544. <https://doi.org/10.1002/elps.201500250>.
- [47] W. Liao, Y. Hashimoto, Y. Honda, P. Li, Y. Yao, Z. Zhao, N. Matsumoto, Accelerated construction of an in vitro model of human periodontal ligament tissue: Vacuum plasma combined with fibronectin coating and a polydimethylsiloxane matrix, *PeerJ*. 2019 (2019). <https://doi.org/10.7717/peerj.7036>.
- [48] Y.J. Chuah, Z.T. Heng, J.S. Tan, L.M. Tay, C.S. Lim, Y. Kang, D.A. Wang, Surface modifications to polydimethylsiloxane substrate for stabilizing prolonged bone marrow stromal cell culture, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 191 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110995>.
- [49] W. Zhang, D.S. Choi, Y.H. Nguyen, J. Chang, L. Qin, Studying cancer stem cell dynamics on PDMS surfaces for microfluidics device design, *Sci Rep*. 3 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02332>.
- [50] S. Bersini, J.S. Jeon, G. Dubini, C. Arrigoni, S. Chung, J.L. Charest, M. Moretti, R.D. Kamm, A microfluidic 3D invitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone, *Biomaterials*. 35 (2014) 2454–2461. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.050>.
- [51] A. Bruce, R. Evans, R. Mezan, L. Shi, B.S. Moses, K.H. Martin, L.F. Gibson, Y. Yang, Three-dimensional microfluidic tri-culture model of the bone marrow microenvironment for study of acute lymphoblastic leukemia, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140506>.
- [52] M. Dabaghi, S. Shahriari, N. Saraei, K. Da, A. Chandiramohan, P.R. Selvaganapathy, J.A. Hirota, Surface modification of pdms-based microfluidic devices with collagen using polydopamine as a spacer to enhance primary human bronchial epithelial cell adhesion, *Micromachines (Basel)*. 12 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3390/mi12020132>.
- [53] K. Fateh-Alavi, M.E. Núñez, S. Karlsson, U.W. Gedde, The effect of stabilizer concentration on the air-plasma-induced surface oxidation of crosslinked polydimethylsiloxane, *Polym Degrad Stab*. 78 (2002) 17–25. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00114-3).
- [54] A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research*. 9 (1991) 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- [55] F.P. Barry, J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36 (2004) 568–584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>.
- [56] D. Kefallinou, M. Grigoriou, D.T. Boumpas, E. Gogolides, A. Tserepi, Fabrication of a 3D microfluidic cell culture device for bone marrow-on-a-chip, *Micro and Nano Engineering*. 9 (2020) 100075. <https://doi.org/10.1016/J.MNE.2020.100075>.
- [57] M. Kitsara, P. Petrou, D. Kontziampasis, K. Misiakos, E. Makarona, I. Raptis, K. Beltsios, Biomolecular layer thickness evaluation using White Light Reflectance Spectroscopy, *Microelectron Eng*. 87 (2010) 802–805. <https://doi.org/10.1016/J.MEE.2009.11.082>.
- [58] P. Louette, F. Bodino, J.-J. Pireaux, Poly(dimethyl siloxane) (PDMS) XPS Reference Core Level and Energy Loss Spectra, *Surface Science Spectra*. 12 (2005) 38–43. <https://doi.org/10.1116/11.20050908>.
- [59] T. Mundry, P. Surmann, T. Schurreit, Surface characterization of polydimethylsiloxane treated pharmaceutical glass containers by X-ray-excited photo- and Auger electron spectroscopy, *Fresenius J Anal Chem*. 368 (2000). <https://doi.org/10.1007/s002160000593>.
- [60] M.J. Owen, P.J. Smith, Plasma treatment of polydimethylsiloxane, *J Adhes Sci Technol*. 8 (1994) 1063–1075. <https://doi.org/10.1163/156856194X00942>.
- [61] M.C. Biesinger, X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference Pages, (n.d.).
- [62] D. Eon, L. De Poucques, M.C. Peignon, C. Cardinaud, G. Turban, A. Tserepi, G. Cordoyiannis, E.S. Valamontes, I. Raptis, E. Gogolides, Surface modification of Si-containing polymers during etching for bilayer lithography, *Microelectron Eng*. 61–62 (2002) 901–906. [https://doi.org/10.1016/S0167-9317\(02\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S0167-9317(02)00482-3).

- [63] S. Nomura, A. Hiltner, J.B. Lando, E. Baer, Interaction of water with native collagen, *Biopolymers*. 16 (1977). <https://doi.org/10.1002/bip.1977.360160202>.
- [64] X. Ye, Y. Zhou, Y. Sun, J. Chen, Z. Wang, Structure and infrared emissivity of collagen/SiO₂ composite, *Appl Surf Sci*. 254 (2008) 5975–5980. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2008.03.186>.

Κεφάλαιο 5

- [1] J.H. Kang, J.K. Park, Magnetophoretic continuous purification of single-walled carbon nanotubes from catalytic impurities in a microfluidic device, *Small*. 3 (2007). <https://doi.org/10.1002/smll.200700334>.
- [2] J.M. Karlsson, M. Gazin, S. Laakso, T. Haraldsson, S. Malhotra-Kumar, M. Mäki, H. Goossens, W. Van Der Wijngaert, Active liquid degassing in microfluidic systems, *Lab Chip*. 13 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3lc50778e>.
- [3] C. Born, Z. Zhang, M. Al-Rubeai, C.R. Thomas, Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress, *Biotechnol Bioeng*. 40 (1992). <https://doi.org/10.1002/bit.260400903>.
- [4] C. Lochovsky, S. Yasotharan, A. Günther, Bubbles no more: In-plane trapping and removal of bubbles in microfluidic devices, *Lab Chip*. 12 (2012). <https://doi.org/10.1039/c1lc20817a>.
- [5] C. Liu, J.A. Thompson, H.H. Bau, A membrane-based, high-efficiency, microfluidic debubbler, *Lab Chip*. 11 (2011). <https://doi.org/10.1039/c1lc20089e>.
- [6] S.F. Jones, G.M. Evans, K.P. Galvin, Bubble nucleation from gas cavities - A review, *Adv Colloid Interface Sci*. 80 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00074-8).
- [7] I. Pereiro, A. Fomitcheva Khartchenko, L. Petrini, G. V. Kaigala, Nip the bubble in the bud: A guide to avoid gas nucleation in microfluidics, *Lab Chip*. 19 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9lc00211a>.
- [8] T.F. Gross, G.F. Ludwig, P.F. Pelz, Experimental and theoretical investigation of nucleation from wall-bounded nuclei in a laminar flow, in: 16th International Symposium on Transport Phenomena and Dynamics of Rotating Machinery (ISROMAC 2016), Honolulu, United States, 2016. <https://hal.science/hal-01516643>.
- [9] H.B. Liu, H.Q. Gong, N. Ramalingam, Y. Jiang, C.C. Dai, K.M. Hui, Micro air bubble formation and its control during polymerase chain reaction (PCR) in polydimethylsiloxane (PDMS) microreactors, *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 17 (2007). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/10/018>.
- [10] X. Zhang, D.Y.C. Chan, D. Wang, N. Maeda, Stability of interfacial nanobubbles, *Langmuir*. 29 (2013). <https://doi.org/10.1021/la303837c>.
- [11] X.H. Zhang, A. Quinn, W.A. Ducker, Nanobubbles at the interface between water and a hydrophobic solid, *Langmuir*. 24 (2008). <https://doi.org/10.1021/la703475q>.
- [12] X. Zhu, R. Verzicco, X. Zhang, D. Lohse, Diffusive interaction of multiple surface nanobubbles: Shrinkage, growth, and coarsening, *Soft Matter*. 14 (2018). <https://doi.org/10.1039/c7sm02523h>.
- [13] P. Gravesen, J. Branebjerg, O.S. Jensen, Microfluidics-a review, *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 3 (1993) 168–182. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/3/4/002>.
- [14] S.F. Jones, G.M. Evans, K.P. Galvin, Bubble nucleation from gas cavities — a review, *Adv Colloid Interface Sci*. 80 (1999) 27–50. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00074-8).
- [15] X. Zhang, M.H. Uddin, H. Yang, G. Toikka, W. Ducker, N. Maeda, Effects of surfactants on the formation and the stability of interfacial nanobubbles, *Langmuir*. 28 (2012). <https://doi.org/10.1021/la301851g>.
- [16] B.H. Tan, H. An, C.D. Ohl, Surface Nanobubbles Are Stabilized by Hydrophobic Attraction, *Phys Rev Lett*. 120 (2018). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.120.164502>.
- [17] J. Hanwright, J. Zhou, G.M. Evans, K.P. Galvin, Influence of surfactant on gas bubble stability, *Langmuir*. 21 (2005). <https://doi.org/10.1021/la0502894>.

- [18] A. Olanrewaju, M. Beaugrand, M. Yafia, D. Juncker, Capillary microfluidics in microchannels: From microfluidic networks to capillary circuits, *Lab Chip*. 18 (2018). <https://doi.org/10.1039/c8lc00458g>.
- [19] P. Vulto, S. Podszun, P. Meyer, C. Hermann, A. Manz, G.A. Urban, Phaseguides: A paradigm shift in microfluidic priming and emptying, *Lab Chip*. 11 (2011). <https://doi.org/10.1039/c0lc00643b>.
- [20] A. Bismarck, W. Brostow, R. Chiu, H.E. Hagg Lobland, K.K.C. Ho, Effects of surface plasma treatment on tribology of thermoplastic polymers, in: *Polym Eng Sci*, 2008. <https://doi.org/10.1002/pen.21103>.
- [21] J.A. Juárez-Moreno, A. Ávila-Ortega, A.I. Oliva, F. Avilés, J. V. Cauich-Rodríguez, Effect of wettability and surface roughness on the adhesion properties of collagen on PDMS films treated by capacitively coupled oxygen plasma, *Appl Surf Sci*. 349 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.063>.
- [22] D. Bodas, C. Khan-Malek, Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation, *Sens Actuators B Chem*. 123 (2007) 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.08.037>.
- [23] K. Ren, J. Zhou, H. Wu, Materials for microfluidic chip fabrication, *Acc Chem Res*. 46 (2013). <https://doi.org/10.1021/ar300314s>.
- [24] N. Shenogina, R. Godawat, P. Keblinski, S. Garde, How wetting and adhesion affect thermal conductance of a range of hydrophobic to hydrophilic aqueous interfaces, *Phys Rev Lett*. 102 (2009). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.156101>.
- [25] M. Lessel, O. Bäumchen, M. Klos, H. Hähl, R. Fetzer, M. Paulus, R. Seemann, K. Jacobs, Self-assembled silane monolayers: An efficient step-by-step recipe for high-quality, low energy surfaces, *Surface and Interface Analysis*. 47 (2015). <https://doi.org/10.1002/sia.5729>.
- [26] R.L. Victor Jr., J.H. Stokes, Microfluidic connector, US-6319476-B1, 2001. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&s1=6319476.PN>. (accessed September 21, 2023).
- [27] C.H. Chiou, G. Bin Lee, Minimal dead-volume connectors for microfluidics using PDMS casting techniques, *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 14 (2004). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/14/11/008>.
- [28] I.B. Butler, M.A.A. Schoonen, D.T. Rickard, Removal of dissolved oxygen from water: A comparison of four common techniques, *Talanta*. 41 (1994) 211–215. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)80110-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(94)80110-X).
- [29] J.H. Sung, M.L. Shuler, Prevention of air bubble formation in a microfluidic perfusion cell culture system using a microscale bubble trap, *Biomed Microdevices*. 11 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9286-8>.
- [30] J.H. Sung, M.L. Shuler, A micro cell culture analog (CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs, *Lab Chip*. 9 (2009) 1385–1394. <https://doi.org/10.1039/b901377f>.
- [31] C. Huang, J.A. Wippold, D. Stratis-Cullum, A. Han, Eliminating air bubble in microfluidic systems utilizing integrated in-line sloped microstructures, *Biomed Microdevices*. 22 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10544-020-00529-w>.
- [32] W. Zheng, Z. Wang, W. Zhang, X. Jiang, A simple PDMS-based microfluidic channel design that removes bubbles for long-term on-chip culture of mammalian cells, *Lab Chip*. 10 (2010). <https://doi.org/10.1039/c005274d>.
- [33] Y. Wang, D. Lee, L. Zhang, H. Jeon, J.E. Mendoza-Elias, T.A. Harvat, S.Z. Hassan, A. Zhou, D.T. Eddington, J. Oberholzer, Systematic prevention of bubble formation and accumulation for long-term culture of pancreatic islet cells in microfluidic device, *Biomed Microdevices*. 14 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10544-011-9618-3>.
- [34] K.K.P. Lee, T. Matsu-Ura, A.E. Rosselot, T.R. Broda, J.M. Wells, C.I. Hong, An integrated microfluidic bubble pocket for long-term perfused three-dimensional intestine-on-a-chip model, *Biomicrofluidics*. 15 (2021). <https://doi.org/10.1063/5.0036527>.

- [35] Y.S. Torisawa, C.S. Spina, T. Mammoto, A. Mammoto, J.C. Weaver, T. Tat, J.J. Collins, D.E. Ingber, Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro, *Nat Methods*. 11 (2014) 663–669. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2938>.
- [36] S. Sieber, L. Wirth, N. Cavak, M. Koenigsmark, U. Marx, R. Lauster, M. Rosowski, Bone marrow-on-a-chip: Long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment, *J Tissue Eng Regen Med*. 12 (2018). <https://doi.org/10.1002/term.2507>.
- [37] S. Sieber, A. Winter, J. Wachsmuth, R. David, M. Stecklum, L. Hellmeyer, L. Ewart, U. Marx, R. Lauster, M. Rosowski, Bone marrow-on-a-chip: Emulating the human bone marrow, *BioRxiv*. (2018).
- [38] H.M. Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate, *Nature*. 423 (2003). <https://doi.org/10.1038/nature01657>.
- [39] R.Z. Lin, H.Y. Chang, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, *Biotechnol J*. 3 (2008). <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>.
- [40] P.R. Baraniak, T.C. McDevitt, Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential, *Cell Tissue Res*. 347 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1215-5>.
- [41] J.L. GRANT, B. SMITH, Bone marrow gas tensions, bone marrow blood flow, and erythropoiesis in man., *Ann Intern Med*. 58 (1963). <https://doi.org/10.7326/0003-4819-58-5-801>.
- [42] M. Fiegl, I. Samudio, K. Clise-Dwyer, J.K. Burks, Z. Mnjoyan, M. Andreeff, CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure, *Blood*. 113 (2009). <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-161539>.
- [43] Y. Ishikawa, T. Ito, Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture, *Eur J Haematol*. 40 (1988). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1988.tb00808.x>.
- [44] J.W. Snow, N. Abraham, M.C. Ma, N.W. Abbey, B. Herndier, M.A. Goldsmith, Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers, *Blood*. 99 (2002). <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.394>.
- [45] C. Mas-Bargues, J. Sanz-Ros, A. Román-Domínguez, M. Inglés, L. Gimeno-Mallench, M. El Alami, J. Viña-Almunia, J. Gambini, J. Viña, C. Borrás, Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine, *Int J Mol Sci*. 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20051195>.
- [46] J.Y. Lai, J.M. Jien, S.H. Lin, Gas permeation in polycarbonate membranes prepared by the wet-phase inversion method, *Chem Eng Sci*. 48 (1993). [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80251-K](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80251-K).
- [47] H.X. Rao, F.N. Liu, Z.Y. Zhang, Preparation and oxygen/nitrogen permeability of PDMS crosslinked membrane and PDMS/tetraethoxysilicone hybrid membrane, *J Memb Sci*. 303 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.07.002>.
- [48] B.S. Yilbas, M. Khaled, N. Abu-Dheir, N. Al-Aqeeli, S.A.M. Said, A.O.M. Ahmed, K.K. Varanasi, Y.K. Toumi, Wetting and other physical characteristics of polycarbonate surface textured using laser ablation, *Appl Surf Sci*. 320 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.09.052>.
- [49] K.Y. Song, H. Zhang, W.J. Zhang, A. Teixeira, Enhancement of the surface free energy of PDMS for reversible and leakage-free bonding of PDMS–PS microfluidic cell-culture systems, *Microfluid Nanofluidics*. 22 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10404-018-2152-3>.

Κεφάλαιο 6

- [1] E. Sutton, A. Juel, A. Kowalski, C.P. Fonte, Dynamics and friction losses of the flow of yield-stress fluids through 90° pipe bends, *Chem Eng Sci*. 251 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2022.117484>.

Κεφάλαιο 7

- [1] Y. Zeng, S.T. Wong, S.K. Teo, K.W. Leong, K.H. Chiam, E.K.F. Yim, Human mesenchymal stem cell basal membrane bending on gratings is dependent on both grating width and curvature, *Sci Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24123-6>.
- [2] Z. Weng, Y. Wang, T. Ouchi, H. Liu, X. Qiao, C. Wu, Z. Zhao, L. Li, B. Li, Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies, *Stem Cells Transl Med.* 11 (2022). <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac004>.
- [3] W. Wagner, A.D. Ho, M. Zenke, Different facets of aging in human mesenchymal stem cells, *Tissue Eng Part B Rev.* 16 (2010). <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0825>.
- [4] D. Gnani, S. Crippa, L. della Volpe, V. Rossella, A. Conti, E. Lettera, S. Ravis, M. Ometti, G. Frascini, M.E. Bernardo, R. Di Micco, An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program, *Aging Cell.* 18 (2019). <https://doi.org/10.1111/acel.12933>.
- [5] D.M. Carp, Y. Liang, Universal or Personalized Mesenchymal Stem Cell Therapies: Impact of Age, Sex, and Biological Source, *Cells.* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/cells11132077>.
- [6] C. Mas-Bargues, J. Sanz-Ros, A. Román-Domínguez, M. Inglés, L. Gimeno-Mallench, M. El Alami, J. Viña-Almunia, J. Gambini, J. Viña, C. Borrás, Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine, *Int J Mol Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20051195>.
- [7] R.J. Cheng, A.J. Xiong, Y.H. Li, S.Y. Pan, Q.P. Zhang, Y. Zhao, Y. Liu, T.N. Marion, Mesenchymal Stem Cells: Allogeneic MSC May Be Immunosuppressive but Autologous MSC Are Dysfunctional in Lupus Patients, *Front Cell Dev Biol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00285>.
- [8] H.J. Jin, Y.K. Bae, M. Kim, S.J. Kwon, H.B. Jeon, S.J. Choi, S.W. Kim, Y.S. Yang, W. Oh, J.W. Chang, Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy, *Int J Mol Sci.* 14 (2013). <https://doi.org/10.3390/ijms140917986>.
- [9] C. Mennan, J. Garcia, S. Roberts, C. Hulme, K. Wright, A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res Ther.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1202-4>.
- [10] C. Mennan, K. Wright, A. Bhattacharjee, B. Balain, J. Richardson, S. Roberts, Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord, *Biomed Res Int.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/916136>.
- [11] B. Finke, H. Testrich, H. Rebl, U. Walschus, M. Schlosser, C. Zietz, S. Staehlke, J.B. Nebe, K.D. Weltmann, J. Meichsner, M. Polak, Plasma-deposited fluorocarbon polymer films on titanium for preventing cell adhesion: A surface finishing for temporarily used orthopaedic implants, *J Phys D Appl Phys.* 49 (2016). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/23/234002>.
- [12] H. Tang, H. Luo, Z. Zhang, D. Yang, Mesenchymal Stem Cell-Derived Apoptotic Bodies: Biological Functions and Therapeutic Potential, *Cells.* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/cells11233879>.
- [13] H. Tong, C. Wang, Y. Huang, Q. Shi, J.C. Fernandes, K. Dai, G. Tang, X. Zhang, Polyethylenimine600- β -cyclodextrin: A promising nanopolymer for nonviral gene delivery of primary mesenchymal stem cells, *Int J Nanomedicine.* 8 (2013). <https://doi.org/10.2147/IJN.S43074>.

Κεφάλαιο 8

- [1] J. Nossent, A. Swaak, Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus, *QJM.* 80 (1991). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068611>.

- [2] Q. Wang, S. Qian, J. Li, N. Che, L. Gu, Q. Wang, Y. Liu, H. Mei, Combined transplantation of autologous hematopoietic stem cells and allogenic mesenchymal stem cells increases T regulatory cells in systemic lupus erythematosus with refractory lupus nephritis and leukopenia, *Lupus*. 24 (2015). <https://doi.org/10.1177/0961203315583541>.
- [3] K.K.P. Lee, T. Matsu-Ura, A.E. Rosselot, T.R. Broda, J.M. Wells, C.I. Hong, An integrated microfluidic bubble pocket for long-term perfused three-dimensional intestine-on-a-chip model, *Biomicrofluidics*. 15 (2021). <https://doi.org/10.1063/5.0036527>.

Παράρτημα Ι

- [1] A. Zahid, B. Dai, R. Hong, D. Zhang, Optical properties study of silicone polymer PDMS substrate surfaces modified by plasma treatment, *Mater Res Express*. 4 (2017). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa8645>.
- [2] N.E. Stankova, P.A. Atanasov, R.G. Nikov, R.G. Nikov, N.N. Nedyalkov, T.R. Stoyanchov, N. Fukata, K.N. Kolev, E.I. Valova, J.S. Georgieva, S.A. Armyanov, Optical properties of polydimethylsiloxane (PDMS) during nanosecond laser processing, *Appl Surf Sci*. 374 (2016) 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.10.016>.