



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ – ΤΜΗΜΑ
ΧΗΜΕΙΑΣ

*Μελέτη της απόκρισης καρκινικών κυττάρων σε
πορώδη βιοπολυμερή ακτινοβολημένα με laser
βραχέων παλμών.*

Πτυχιακή Εργασία

Μπουμπουλάκη Ευαγγελία (ΑΜ:1780)

Υπεύθυνη: Δρ. Ρανέλλα Ανθή

Υπεύθυνο μέλος ΔΕΠ Τμήματος Χημείας: Καθ. Δημάδης
Κωνσταντίνος

Ηράκλειο , 2018



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων της σειράς CAL51 σε πορώδη ικρίωματα, τα οποία παρασκευάστηκαν με τη χρήση ενός KrF 248nm Excimer Laser και με την αξιοποίηση του φυσικοχημικού φαινομένου της φωτοαποδόμησης πάνω στο βιοπολυμερές της χιτοζάνης. Σε πρώτη φάση έγιναν προσπάθειες να αποσαφηνιστεί η φύση της επίδρασης του παλμικού laser πάνω στα ικρίωματα χιτοζάνης. Έτσι, αφού τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, μελετήθηκαν ως προς την απόκριση τους στο νερό καθώς επίσης και ως προς την απορρόφηση τους στην περιοχή υπεριώδους – ορατού του φάσματος. Οι παραπάνω μελέτες έγιναν πάντα σε σύγκριση με μη ακτινοβολημένες επιφάνειες, και έδειξαν μεγάλη αύξηση τόσο της υδροφιλικότητας, όσο και της απορρόφησης ακτινοβολίας από τις επιφάνειες που είχαν υποστεί ακτινοβολία. Ως προς την απόκριση των κυττάρων CAL51, έγιναν πειράματα κυτταροκαλλιέργειας διάρκειας 1,3 και 7 ημερών και διερευνήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων που θα μπορούσε να τοποθετηθεί στα υποστρώματα χιτοζάνης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων προέκυψαν με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και έδειξαν ότι η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων CAL51 πάνω στα ικρίωματα χιτοζάνης δεν πραγματοποιείται σε ικανοποιητικό βαθμό. Τα πειράματα αυτά έγιναν ως συνέχεια προηγούμενης μελέτης που είχε ως στόχο τόσο τη διευκρίνιση της επίδρασης της ακτινοβολίας σε δείγματα χιτοζάνης, όσο και την διερεύνηση του εάν η τροποποιημένη επιφάνεια του πολυμερούς μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό κυτταρικών ιστών.²⁶

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Μηχανική ιστών	4
1.2 Βιοπολυμερή στη Μηχανική Ιστών.....	5
1.3 Καρκίνος – Γενικά Στοιχεία	5
1.4 Το φαινόμενο της φωτοαποδόμησης.....	6
1.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)	7
1.6 Μικροσκοπία φθορισμού	8
1.7 Φασματοσκοπία Απορρόφησης UV - Vis	9
1.8 Προηγούμενες μελέτες	10
1.9 Στόχος της εργασίας	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1 Προετοιμασία υμενίων χιτοζάνης	12
2.2 Ακτινοβολήση υμενίων χιτοζάνης	13
2.3 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός δειγμάτων στο SEM.....	15
2.4 Μετρήσεις διαβρεξιμότητας ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας χιτοζάνης	15
2.5 Χαρακτηρισμός με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης UV-Vis	16
2.6 Καλλιέργεια κυττάρων	16
2.7 Μέτρηση κυττάρων και επίστρωση στα δείγματα χιτοζάνης	18
2.8 Μονιμοποίηση δειγμάτων για παρατήρηση στο SEM	19
2.9 Χρώση πυρήνων κυττάρων.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3.1 Μορφολογικός χαρακτηρισμός δειγμάτων στο SEM	22
3.2 Μετρήσεις διαβρεξιμότητας ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας χιτοζάνης	23
3.3 Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός δειγμάτων χιτοζάνης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης UV-Vis.....	25
3.4 Παρατήρηση κυτταρικής απόκρισης στο SEM	27
3.5 Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων – Χρώση πυρήνων με DAPI.....	31
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μηχανική ιστών

Η μηχανική ιστών εφαρμόζει τις αρχές της επιστήμης της βιολογίας, της φυσικής, της χημείας αλλά και της μηχανικής και αποσκοπεί στη βελτίωση – διόρθωση της λειτουργίας βιολογικών ιστών και κατ' επέκταση οργάνων, όταν αυτά δεν επιτελούν σωστά το ρόλο τους λόγω κάποιας υφιστάμενης παθολογικής κατάστασης.

Το διεπιστημονικό αυτό πεδίο περιλαμβάνει την κατασκευή τρισδιάστατων κυρίως δομών που καλούνται κριώματα. Τα κριώματα οφείλουν να μην εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα και να διαθέτουν μορφολογία παρόμοια με αυτήν της εξωκυττάριας μήτρας, του χώρου δηλαδή που περιβάλλει *in vivo* τους βιολογικούς ιστούς. Μπορούν στη συνέχεια να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα ανάπτυξης διαφόρων κυτταρικών ιστών. Όταν η ανάπτυξη του ιστού στο κριώμα κριθεί ικανοποιητική, αυτό εισάγεται στον άνθρωπο με σκοπό την αντικατάσταση του αντίστοιχου παθολογικού ιστού. Μια άλλη τακτική, είναι η εφαρμογή των κριωμάτων για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών προς τους πάσχοντες ιστούς. Στα πλεονεκτήματα των παραπάνω προσεγγίσεων συγκαταλέγεται η αντιμετώπιση ποικίλων προβλημάτων όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος αλλά και η εισαγωγή φαρμάκων που παραμένουν αδρανή μέχρι να φτάσουν στους επιθυμητούς ιστούς, προκαλώντας έτσι μικρότερης έκτασης παρενέργειες.¹

Η *in vitro* ανάπτυξη κυτταρικών ιστών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ικανοποιητικών μοντέλων για τη μελέτη βιολογικών λειτουργιών καθώς επίσης και τη μελέτη απόκρισης των βιολογικών ιστών σε διάφορα προς μελέτη ερεθίσματα όπως είναι τυχόν φαρμακευτικές ενώσεις, καλλυντικά σκευάσματα κλπ. Σε συνδυασμό με τη χρήση άλλων τεχνικών όπως τα υπολογιστικά μοντέλα, είναι εφικτό να μειωθεί σημαντικά η χρήση πειραματοζώων.²

Η εφαρμογή των αρχών της μηχανικής ιστών έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τα οστά, το δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία αλλά και ζωτικά όργανα όπως είναι η καρδιά και το ήπαρ. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος τεχνικών και υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν,

κάτι που προσδίδει στο πεδίο αυτό ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες προοπτικές για μελλοντική έρευνα.³

1.2 Βιοπολυμερή στη μηχανική ιστών

Μια μεγάλη κατηγορία υλικών που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη μηχανική ιστών είναι τα βιοπολυμερή. Τέτοια υλικά είναι το κολλαγόνο, η ελαστίνη, η ζελατίνη, η χιτοζάνη, η αγαρόζη, το υαλουρονικό οξύ κ.ά. Στα πλεονεκτήματα των βιοπολυμερών συγκαταλέγεται το γεγονός ότι καθώς έχουν εκτεταμένη παρουσία στα βιολογικά συστήματα, και πολλά από αυτά και στον άνθρωπο, εμφανίζουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα και είναι συμβατά με τους βιολογικούς ιστούς. Η σταδιακή βιοαποικοδόμιση των πολυμερών αυτών δεν παράγει βλαβερά παραπροϊόντα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβες στον οργανισμό. Το βασικό πρόβλημα που συναντάται στην εφαρμογή των υλικών αυτών είναι ότι από μηχανικής άποψης δεν διαθέτουν ικανοποιητικές ιδιότητες. Η σταθερότητα τους σε υδατικό μέσο είναι περιορισμένη, ενώ το κόστος υψηλής καθαρότητας τέτοιων βιοπολυμερών είναι μεγάλο λόγω της δυσκολίας παραγωγής τους.⁴

Γίνονται τα τελευταία χρόνια προσπάθειες για τη βελτίωση της λειτουργικότητας των βιολογικών πολυμερών. Αυτές περιλαμβάνουν τη χημική τροποποίηση τους με ενώσεις, ώστε να επιτευχθεί η σύνθεση υβριδικών υλικών με επιθυμητές ιδιότητες. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως στόχο την προστασία συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες του εκάστοτε βιοπολυμερούς. Κατάλληλοι τροποποιητές μπορούν να είναι καρβοξυλικά οξέα, φουράνια, αλκοόλες και αλδεΐδες.⁵

Υπάρχουν ποικίλες μορφές με τις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα βιοπολυμερή στη βιοϊατρική. Αυτές περιλαμβάνουν τα 2D και 3D ικρίωματα, την ενσωμάτωση σε νανοσωματίδια και τη σύνθεση υδρογελών για εφαρμογές στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων.^{6,7}

1.3 Καρκίνος – Γενικά Στοιχεία

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και γενικότερη συμπεριφορά των κυττάρων. Μπορεί να προσβάλει όλα τα ζωτικά όργανα και η εμφάνιση του σχετίζεται με περιβαλλοντικούς και κληρονομικούς παράγοντες. Μόνο στις ΗΠΑ περίπου το 25% των θανάτων οφείλονται σε κάποια μορφή καρκίνου ενώ ο αριθμός των πασχόντων ολοένα και αυξάνεται. Ανάμεσα στις μορφές καρκίνου που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη θνησιμότητα είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του ήπατος, του προστάτη για τους άντρες, του μαστού και των ωοθηκών για τις γυναίκες.⁸

Η θεραπεία του καρκίνου αποτελεί ένα πολύπλοκο ζήτημα καθώς λόγω της ανεξέλεγκτης συμπεριφοράς των καρκινικών ιστών, δεν παρατηρείται πάντα η επιθυμητή απόκριση στην όποια θεραπεία. Επίσης πολλά από τα ευρέως διαδεδομένα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η σισπλατίνη και τα παράγωγα της εμφανίζουν εκτεταμένες παρενέργειες προσβάλλοντας και τους υγιείς ιστούς του οργανισμού. Με δεδομένη την επέκταση της νόσου στις μέρες μας γίνονται πολλές προσπάθειες για την εύρεση εναλλακτικών προσεγγίσεων στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου. Πέρα από τη διαρκή επιθυμία για σύνθεση νέων φαρμακευτικών ενώσεων, υπάρχει ο στόχος για την ανάπτυξη συστημάτων στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς και για την περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την καρκινογένεση με κύριο στόχο την πρόληψη αυτής. ⁹

1.4 Το φαινόμενο της Φωτοαποδόμησης

Η τεχνική παραγωγής των ικριωμάτων που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία στηρίχτηκε στο φαινόμενο της φωτοαποδόμησης. Η παρατήρηση του φαινομένου γίνεται όταν κάποιο υλικό δέχεται ακτινοβολία παλμών laser πολύ μικρής διάρκειας (βραχέων παλμών). Η πρώτη περιγραφή του φαινομένου έγινε το 1982 ενώ στις μέρες μας οι εφαρμογές της φωτοαποδόμησης επεκτείνονται σε πεδία όπως η ιατρική, τη συντήρηση έργων τέχνης κ.ά.

Κατά την εφαρμογή του παλμού λειζερ στην επιφάνεια του πολυμερούς συμβαίνουν διάφορες φυσικοχημικές μεταβολές οι μηχανισμοί των οποίων δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί μέχρι σήμερα. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας από το υλικό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται απότομα η θερμοκρασία στην ακτινοβολούμενη περιοχή. Τα παραπάνω οδηγούν σε εκτίναξη ποσότητας του υλικού που εξαρτάται από την ισχύ της ακτινοβολίας που εφαρμόζουμε. Το υλικό, δηλαδή ουσιαστικά αποικοδομείται υπό την επίδραση ακτινοβολίας. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι τόσο μεγάλη που μια από τις ιατρικές εφαρμογές της είναι στην αποκατάσταση προβλημάτων της όρασης μέσω laser. Είναι δηλαδή εφικτό οι παλμοί να δράσουν με ακρίβεια σε μια πολύ μικρή επιφάνεια χωρίς να προκαλέσουν μακροπρόθεσμες επιπτώσεις.

Το βάθος που θα επιδράσει ο παλμός μεταβάλλεται ανάλογα με το πάχος του υλικού, αλλά και με την πυκνότητα ενέργειας της παλμικής ακτινοβολίας. Για κάθε υλικό υπάρχει μια τιμή ενέργειας που καλείται «κατώφλι». Εάν ξεπεραστεί το «κατώφλι» αυτό, το υλικό αποδομείται πλήρως και δημιουργείται στο σημείο αυτό κρατήρας. Σε κάποιες τιμές όμως, το ωστικό κύμα που απελευθερώνεται οδηγεί στο σχηματισμό μιας ανυψωμένης πορώδους επιφάνειας (foaming). Μια τέτοια δομή, θα μπορούσε να έχει μεγάλη προσροφητική ικανότητα και σε μεγάλο βαθμό κατευθυνόμενα χαρακτηριστικά. Η δυνατότητα παραγωγής δομών με ελεγχόμενη τοπογραφία και πορώδη δομή καθιστά τη φωτοαποδόμηση ανταγωνιστική τεχνική

στην προσπάθεια κατασκευής υλικών με βιομιμικές ιδιότητες. Οι παραγόμενες, δηλαδή, δομές έχουν μορφολογία η οποία μοιάζει με αυτή της εξωκυττάριας μήτρας και βρίσκουν διάφορες εφαρμογές στο πεδίο των βιοϊατρικών επιστημών.
10,11

1.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)

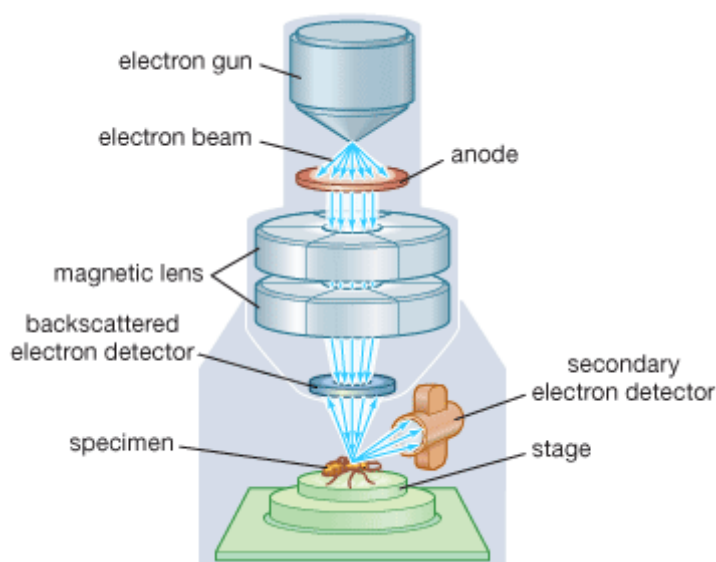
Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης αποτελεί μια τεχνική παρατήρησης δειγμάτων με πολλές προοπτικές. Χρησιμοποιείται με επιτυχία σε χαρακτηρισμούς που σχετίζονται με την επιστήμη της αρχαιολογίας, την εγκληματολογία, την επιστήμη υλικών, την πληροφορική, τη βιολογία και την ιατρική. Το βασικό πλεονέκτημα ενός μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων είναι ότι η απεικόνιση οποιουδήποτε δείγματος στο SEM είναι πολύ μεγάλης ανάλυσης και μπορεί να δώσει λεπτομερέστατες πληροφορίες για τη σύσταση και τη μορφολογία του. Οι εικόνες που προκύπτουν από ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνουν την τρισδιάστατη διευθέτηση των μικροδομών του εκάστοτε δείγματος, κάτι που συντελεί επίσης στη μεγάλη διακριτική ικανότητα των μικροσκοπίων αυτών. Το βάθος της επιφάνειας που μπορεί να απεικονιστεί στο SEM μπορεί να είναι από 1 nm έως 5μm, ενώ η μεγέθυνση που μπορεί να επιλεγεί μπορεί να είναι από x10 έως x500000.

Η λειτουργία των SEM στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των δειγμάτων με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Τα δείγματα τοποθετούνται στο θάλαμο του μικροσκοπίου και δημιουργείται κενό αέρος. Έπειτα, από μια λυχνία βολφραμίου εκπέμπεται μια δέσμη ηλεκτρονίων με ενέργεια που ποικίλει ανάλογα με το εκάστοτε μικροσκόπιο και τις ρυθμίσεις αυτού. Το κενό στο θάλαμο των δειγμάτων είναι απαραίτητο για να εξασφαλιστεί ότι τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας θα αλληλεπιδράσουν μόνο με την επιθυμητή επιφάνεια και όχι με τα μόρια του αέρα. Μια τέτοια αλληλεπίδραση θα λειτουργούσε παρεμποδιστικά στη μελέτη των δειγμάτων. Για τον ίδιο λόγο είναι αναγκαίο τα δείγματα να είναι πλήρως απομακρυσμένα από την υγρασία.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάλυση υλικών στο SEM είναι αυτά να έχουν ηλεκτρικά αγώγιμη επιφάνεια. Εάν ένα δείγμα δεν είναι ηλεκτρικά αγώγιμο κατά τη σάρωση με τα ηλεκτρόνια φορτίζεται, κάτι που δυσχαιρένει τη μετατροπή του σήματος σε εικόνα. Τα υλικά που δεν είναι από τη φύση τους ηλεκτρικά αγώγιμα

υπόκεινται σε μια διαδικασία που ονομάζεται sputter-coating. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την εφαρμογή μιας λεπτής στρώσης από ιόντα κάποιου αγώγιμου μετάλλου στην επιφάνεια του υλικού. Κάποια από τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται ευρέως για το σκοπό αυτό είναι ο χρυσός (Au), η πλατίνα (Pt), το παλλάδιο (Pd), το ιρίδιο (Ir) και το ασήμι (Ag).

Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με το υλικό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων σημάτων όπως είναι: τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που παράγονται από την επιφάνεια λόγω της ανελαστικής σκέδασης της πρωτογενούς δέσμης ηλεκτρονίων σε αυτήν, τα πρωτογενή ηλεκτρόνια που ανακλώνται πάνω στην επιφάνεια του δείγματος και οι εκπεμπόμενες ακτίνες - X. Κατάλληλοι ανιχνευτές συλλέγουν τα σήματα αυτά, ακολουθεί η ενίσχυση τους και η μετατροπή τους σε εικόνα με κατάλληλο λογισμικό.¹²



Εικόνα 1: Οργανολογία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης¹³

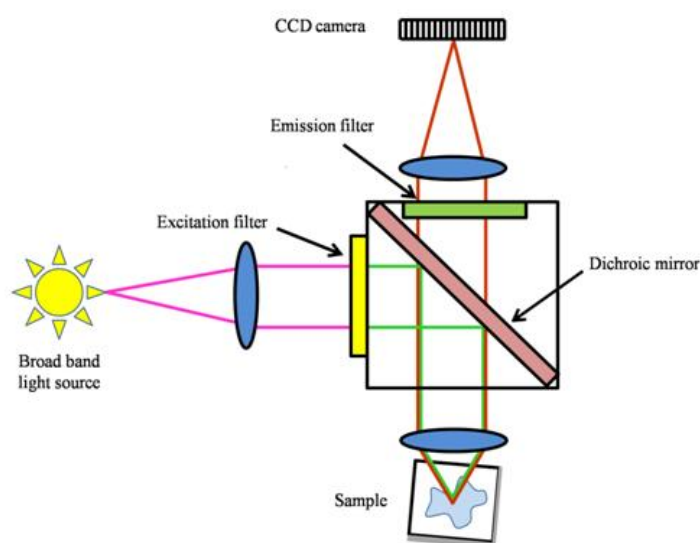
1.6 Μικροσκοπία Φθορισμού

Ο φθορισμός είναι ένα φυσικοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο κάποια μόρια ή άτομα όταν απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, διεγείρονται κατά την και μεταβαίνουν σε υψηλότερη ενεργειακά κατάσταση. Κατά την αποδιέγερση τους παρατηρείται εκπομπή φωτονίου μεγαλύτερου μήκους κύματος.

Η ιδιότητα αυτή αξιοποιείται από τη μικροσκοπία φθορισμού, με σκοπό την παρατήρηση δειγμάτων τα οποία φθορίζουν. Βιολογικά δείγματα χρωματίζονται με κατάλληλες χρωστικές, οι οποίες προσδένονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα σημεία

και έτσι γίνονται παρατηρήσιμα σε μικροσκοπία φθορισμού. Ένα μικροσκόπιο φθορισμού, είναι σε θέση να απεικονίσει δομές με μέγεθος έως 0,2 μm , μια διακριτική ικανότητα που θεωρείται μεγάλη και ικανή για την εξαγωγή αρκετών πληροφοριών από το δείγμα.¹⁴

Η οργανολογία ενός μικροσκοπίου φθορισμού περιλαμβάνει μια πηγή ακτινοβολίας ευρέος φάσματος, από την οποία απομονώνεται δέσμη ορισμένου μήκους κύματος από κατάλληλα φίλτρα. Η δέσμη αυτή εστιάζεται στο δείγμα και το παραγόμενο σήμα ανιχνεύεται και δίνει πληροφορίες για τις φθορίζουσες οντότητες του δείγματος.

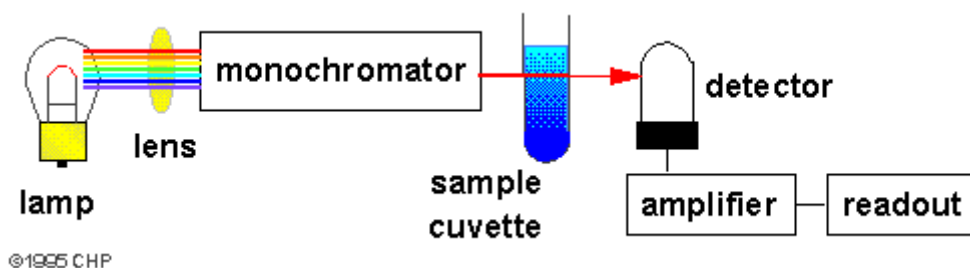


Εικόνα 2: Οργανολογία μικροσκοπίου φθορισμού¹⁵

1.7 Φασματοσκοπία UV-Vis

Η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού είναι μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεγάλου εύρους υλικών. Ανάλογα με τον εκάστοτε εξοπλισμό, μπορούν να αναλυθούν δείγματα που βρίσκονται σε υγρή, αέρια ή στερεή κατάσταση.

Το φασματοφωτόμετρο εκπέμπει πολυχρωματική ακτινοβολία, η οποία αναλύεται σε μονοχρωματική καθώς περνάει από το μονοχρωμάτορα. Στη συνέχεια, η δέσμη κατευθύνεται προς το δείγμα. Ένα ποσοστό της δέσμης απορροφάται, ένα άλλο ποσοστό ανακλάται και ένα άλλο ποσοστό διέρχεται από το δείγμα. Με τη χρήση κατάλληλου ανιχνευτή συλλέγεται το σήμα, κατόπιν ενισχύεται και προσαρμόζεται με αποτέλεσμα την εξαγωγή του φάσματος απορρόφησης του δείγματος.



Εικόνα 3: Βασική διάταξη για τη φασματοσκοπία απορρόφησης¹⁷

Η απόκριση ενός υλικού στην ακτινοβολία αυτή εξαρτάται από παράγοντες όπως η χημική του σύσταση και η συγκέντρωση του. Μπορεί να βοηθήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικών με τη δομή, την κινητική συμπεριφορά και τη γενικότερη σύσταση διαφόρων υλικών.

Η φασματοφωτομετρία UV-VIS είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος ανάλυσης με πολλά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων διακρίνονται τα εξής: απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος το οποίο δεν καταστρέφεται κατά την ανάλυση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά, μπορεί να αναλυθεί ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα και τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Οι εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν το χαρακτηρισμό δειγμάτων, τη μελέτη της τροποποίησης αυτών, την ανίχνευση και την ταυτοποίηση συγκεκριμένων χημικών ενώσεων.^{16, 18}

Τι έχει βρει η ομάδα πριν με τα reference? Γενικά τι υπάρχει με αυτά τα υλικά και αυτά τα κυτταρα ή γενικά καρκινικά κυτταρα με δομημένη επιφάνεια χιτοζάνης.

1.8 Προηγούμενες Μελέτες

Σε προηγούμενα πειράματα έγινε προσπάθεια δημιουργίας της πορώδους δομής που περιγράφεται στην παρούσα εργασία σε δείγματα χιτοζάνης, αμύλου και σε μείγμα των δύο βιοπολυμερών αυτών. Αυτό επετεύχθη για όλα τα υλικά, αλλά μόνο στα δείγματα χιτοζάνης κατέστη δυνατή η εφαρμογή σε καλλιέργειες. Η μελέτη του επαγόμενου από laser φθορισμού έδειξε αύξηση του φθορισμού της ακτινοβολημένης επιφάνειας των δειγμάτων, κάτι που αποδόθηκε στις φυσικοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν στο υλικό κατά την ακτινοβολήση. Βρέθηκε ότι υπάρχει επιλεκτική προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς ινοβλαστών NIH -3T3 πάνω στα σημεία του ικριώματος στα οποία είχε χτυπήσει το laser. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο λόγω του ότι η πορώδης δομή που προέκυψε στο υλικό, παρομοιάζει την εξωκυττάρια μήτρα, ευνοώντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Αναφορικά με τη συσχέτιση καρκινικών κυττάρων με δομές που περιέχουν χιτοζάνη, έχει βρεθεί ότι η χιτοζάνη όταν περιέχεται σε νανοσωματίδια παρεμποδίζει το μεταβολισμό καρκινικών κυττάρων, ενώ αντίθετα δεν επιδρά αρνητικά σε φυσιολογικούς ιστούς. Έτσι, σε σύζευξη με διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα, προτείνεται ότι θα μπορούσε να λειτουργήσει υποβοηθητικά στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου μέσω στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς.¹⁹ Επίσης, βρέθηκε από διαφορετική ερευνητική ομάδα ότι η προσθήκη χιτοζάνης σε τρεις διαφορετικές καρκινικές σειρές του μαστού παρεμποδίζει την ανάπτυξη, πιθανόν μέσω αλληλεπίδρασης με το DNA των κυττάρων.²⁰

1.9 Σκοπός της παρούσας εργασίας

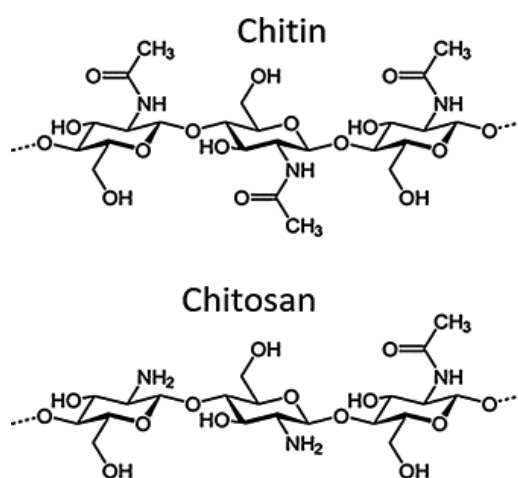
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θα επιχειρηθεί ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των ακτινοβολημένων με παλμικό λέιζερ υμενίων βιοπολυμερούς. Συγκεκριμένα, θα συγκριθεί η υδροφιλικότητα ακτινοβολημένης και μη επιφάνειας, με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης θα μελετηθεί η μορφολογία αυτής και με τη βοήθεια φασματοσκοπικών τεχνικών θα μελετηθεί η επίδραση της ακτινοβόλησης σε μικροσκοπικό – μοριακό επίπεδο. Στη συνέχεια, θα μελετηθεί η απόκριση καρκινικών κυττάρων στα παραγόμενα ικρίωματα χιτοζάνης με απώτερο σκοπό τη δημιουργία ενός *in vitro* μοντέλου μελέτης καρκινικών ιστών καθώς επίσης και στη σύνθεση υλικών με βάση τη χιτοζάνη που μπορούν να μεταφέρουν στοχευμένα φαρμακευτικές ενώσεις σε καρκινικούς ιστούς.

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Προετοιμασία υμενίων χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από μονάδες D - γλυκοζαμίνης και N- ακετυλο - D- γλυκοζαμίνης ενωμένες με β (1-4) δεσμό. Είναι αδιάλυτη σε ουδέτερο pH αλλά διαλυτή σε pH < 6 λόγω πρωτονίωσης των αμινομάδων. Αποτελεί το από-ακετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης, ενός βιοπολυμερούς που συναντάται στον εξωσκελετό των αρθροπόδων. Η δομή της χιτοζάνης και της χιτίνης φαίνονται στην εικόνα 4. Η παραγωγή της χιτοζάνης από τη χιτίνη μπορεί να γίνει είτε με ενζυμική κατεργασία είτε με την επίδραση ισχυρής βάσης.²¹



Εικόνα 4: Η δομή της χιτοζάνης και της χιτίνης²²

Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα χιτοζάνης συγκέντρωσης 2% w/v. Διαλύθηκαν 0,2 gr στερεής χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (Sigma – Aldrich) σε 0,2ml CH₃COOH και 9,8 ml H₂O. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε είναι υψηλής καθαρότητας και η διάλυση έγινε με τη βοήθεια ανάδευσης.

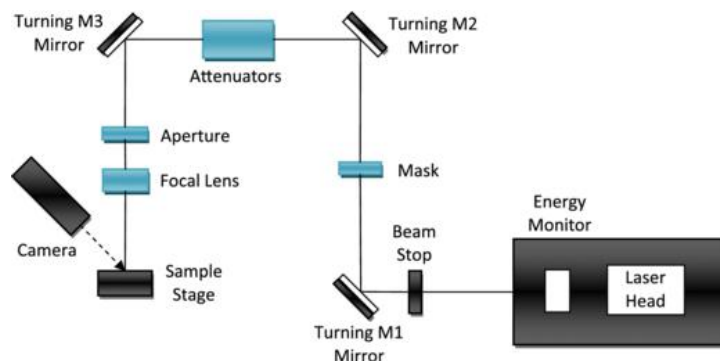
Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα χιτοζάνης σε καλυπτρίδες διαμέτρου 13 mm. Συγκεκριμένα, σε κάθε καλυπτρίδα προστέθηκε 1 σταγόνα διαλύματος χιτοζάνης με τη βοήθεια πιπέτας και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν για 1 περίπου ημέρα σε απαγωγό εστία. Για να αποφευχθεί η πιθανότητα καταστροφής του υμενίου κατά την ακτινοβόληση, λόγω της επίδρασης του laser, αφού απομακρύνθηκε πλήρως ο

διαλύτης, προστέθηκε ακόμα από μια σταγόνα διαλύματος χιτοζάνης στα δείγματα και αυτά αφέθηκαν και πάλι να στεγνώσουν πλήρως για 1 ημέρα.

2.2 Ακτινοβολήση υμενίων χιτοζάνης

Για την ακτινοβολήση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα laser τύπου διεγερμένου διμερούς (excited dimer – excimer). Συγκεκριμένα, περιέχει ένα διμερές αλογόνου (φθόριο) και ευγενούς αερίου (κρυπτό). Τα αέρια αυτά, όταν μεταβληθούν κατάλληλα οι συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας στο θάλαμο, σχηματίζουν ένα διεγερμένο διμερές, αποτελούμενο και από τα δύο στοιχεία. Η διάσπαση του διμερούς έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ενέργειας. Για το συγκεκριμένο laser η μετάβαση αυτή οδηγεί στην εκπομπή ενέργειας στην περιοχή του υπεριώδους, στα 248 nm.²³ Συντομογραφικά το laser αυτό αναφέρεται ως KrF excimer, ονομασία που προκύπτει από τα ονόματα των χημικών στοιχείων που περιέχει και το ακρωνύμιο που περιγράφει τον τύπο του. Στα πλεονεκτήματα ενός τέτοιου laser συγκαταλέγεται η δυνατότητα επεξεργασίας υλικών με πολύ μεγάλη ακρίβεια και η όσο το δυνατόν μικρότερη θερμική και μηχανική καταπόνηση των προς ακτινοβολήση δειγμάτων.²⁴

Πριν από την ακτινοβολήση πραγματοποιείται ευθυγράμμιση του KrF laser (Lambda-Physik Compex 210i, 248 nm, 20 ns FWHM) και κατεύθυνση της δέσμης στη βάση στερέωσης των δειγμάτων.



Εικόνα5: Η διάταξη του KrF laser²⁵

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάλληλη βάση στη διάταξη του laser, η οποία ήταν παρόμοια με αυτή της εικόνας 5 και ακτινοβολήθηκαν με πυκνότητα ενέργειας fluence= 1 J/cm² καθώς έπειτα από διάφορες δοκιμές βρέθηκε ότι η τιμή αυτή επιτρέπει τη δημιουργία της επιθυμητής πορώδους επιφάνειας χωρίς να καταστρέφει το υλικό.

Η επίδραση των παλμών του laser είναι δυνατόν να γίνει ορατή με γυμνό μάτι. Εάν η πυκνότητα ενέργειας που χρησιμοποιείται είναι πολύ μικρή για το εκάστοτε υλικό δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη μεταβολή στο υμένιο. Εάν οι παλμοί έχουν ενέργεια σε ένα επιτρεπτό εύρος ανάλογα με το υλικό, η επιφάνεια στο σημείο αυτό γίνεται λευκή και ελαφρώς υπερυψωμένη (εικόνα 6). Στην περίπτωση όπου εφαρμόζονται

παλμοί ιδιαίτερα υψηλής ενέργειας, το υλικό φωτοαποδομείται πλήρως, δηλαδή ουσιαστικά καταστρέφεται, κάτι που γίνεται αντιληπτό και από το σχηματισμό κρατήρα στην επιφάνεια του υμενίου.



Εικόνα 6: Ακτινοβολημένο υμένιο χιτοζάνης

Για τους κατάλληλους υπολογισμούς με σκοπό τη ρύθμιση της ενέργειας παλμών στην παραπάνω επιθυμητή τιμή χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη σχέση: $fluence \left(\frac{mJ}{cm^2} \right) = \frac{Vp(mV) \cdot 100}{14.6 \cdot SS}$, όπου Vp η τάση του εφαρμοζόμενου παλμού, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη βοήθεια παλμογράφου και SS το εμβαδόν της επιφάνειας στην οποία επιδρά ο παλμός του laser. Το εμβαδόν αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστεί με τη χρήση ειδικού χαρτιού το οποίο μαυρίζει στο σημείο εφαρμογής του παλμού και τη μετέπειτα μέτρηση του εμβαδού της σκιασμένης επιφάνειας στο χαρτί.

Η ακτινοβολήση δεν πραγματοποιήθηκε σε όλη την επιφάνεια του υμενίου για δύο λόγους: σε αυτή την περίπτωση αυξάνεται η καταπόνηση του υλικού και είναι πιο πιθανόν να μην είναι πλέον λειτουργικό και επίσης επιδιώχθηκε να παραμείνει μη ακτινοβολημένη επιφάνεια για να υπάρχει μέτρο σύγκρισης ως προς τη μορφολογία, τις ιδιότητες και την κυτταρική απόκριση.

Ενώ η χιτοζάνη είναι γενικά αδιάλυτη στο νερό, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα μετά από την ακτινοβολήση διαλυόταν σε υδατικό διάλυμα. Κάτι τέτοιο αποδίδεται στις φυσικοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν στο υλικό κατά την ακτινοβολήση και πιθανώς σχετίζεται με την οξειδωση του πολυμερούς.²⁶ Βρέθηκε ότι έπειτα από παραμονή των δειγμάτων σε διάλυμα αιθανόλης 70% v/v για 3 ημέρες τα δείγματα εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη σταθερότητα στο νερό. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο καθώς το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας είναι υδατικό διάλυμα, ως επέκταση του περιβάλλοντος χώρου των βιολογικών ιστών. Εάν, λοιπόν τα υμένια καταστρέφονται έπειτα από σύντομη αλληλεπίδραση με το νερό, εκ των πραγμάτων δεν μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω για βιολογικές εφαρμογές.

2.3 Μορφολογικός χαρακτηρισμός

Προκειμένου να παρατηρηθεί η μορφολογία των υμενίων χιτοζάνης έπειτα από την ακτινοβόληση, αυτά παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) (JEOL JSM-6390 LV, 15 kV). Πριν από την παρατήρηση, τα δείγματα έπρεπε να είναι πλήρως στεγνά και να δεχτούν μια λεπτή επίστρωση ιόντων Au/Pd, πάχους 12 nm για χρονικό διάστημα 44'' ώστε να αποκτήσουν αγωγή επιφάνεια. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που είχαν προηγουμένως ακτινοβοληθεί για να είναι εφικτή η σύγκριση της μορφολογίας ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας.

Για τη μελέτη της μορφολογίας των δειγμάτων έπειτα από παραμονή μιας εβδομάδας σε 1 ml διαλύματος DMEM +20%FBS +1%P/S, θερμοκρασία 37⁰ C και πίεση 5% CO₂, αφαιρέθηκαν τα δείγματα από το διάλυμα, δέχτηκαν 2 πλύσεις με SCB διάρκειας 10 λεπτών η καθεμία και αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό απαγωγό εστία για 1 ημέρα. Πριν από όλη τη διαδικασία είχαν τοποθετηθεί για 3 ημέρες σε διάλυμα αιθανόλης 70% ώστε να αποκτήσουν οι δομές την επιθυμητή σταθερότητα στο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν 1 ημέρα από την αιθανόλη. Έπειτα, επιστρώθηκαν και αυτά τα δείγματα με ιόντα Au/Pd, όπως περιγράφεται παραπάνω και παρατηρήθηκαν στο SEM.

2.4 Μετρήσεις διαβρεξιμότητας ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας χιτοζάνης

Οι γωνίες επαφής ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας με το νερό μετρήθηκαν με σκοπό τη σύγκριση των δύο τιμών ως προς την υδροφιλικότητα / υδροφοβικότητα και την εκτίμηση της τροποποίησης της δομής της χιτοζάνης κατά την ακτινοβόληση ως προς την απόκριση του υλικού στο νερό.

Συγκεκριμένα, προετοιμάστηκαν υμένια στα οποία είχε τοποθετηθεί ίδια ποσότητα διαλύματος χιτοζάνης (50 μl) και κάποια από αυτά ακτινοβολήθηκαν με ομοιόμοφο τρόπο και στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας τους. Προκειμένου να μην διαλυθούν λόγω της αλληλεπίδρασης με το νερό παρέμειναν σε διάλυμα αιθανόλης 70% v/v για 3 ημέρες και αφέθηκαν να στεγνώσουν για τουλάχιστον 1 ημέρα μέχρι τη χρήση τους. Στο κάθε είδος δείγματος τοποθετήθηκε μια σταγόνα 4 μl από υπερκάθαρο, απιονισμένο νερό με τη χρήση μικροπιπέτας και λήφθηκαν οι εικόνες της αλληλεπίδρασης της σταγόνας με το στερεό υλικό. Η επεξεργασία των εικόνων και η εξαγωγή της γωνίας επαφής της χιτοζάνης με το νερό έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ.

2.5 Χαρακτηρισμός με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης UV-Vis

Για τη μελέτη των δειγμάτων με τη φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis παρασκευάστηκαν και πάλι υμένα με ίδια ποσότητα χιτοζάνης και ακτινοβολήθηκαν ομοιόμορφα στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς τους. Έπειτα ελήφθη το φάσμα απορρόφησης τους με τη χρήση ενός φασματομέτρου PerkinElmer Lambda-950. Τα δείγματα σαρώθηκαν στην περιοχή 200-800 nm ανά 1 nm, δηλαδή στην περιοχή του ορατού και σε τμήμα του υπεριώδους φάσματος. Για να καλυφθούν οι περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκαν λυχνίες αλογόνου και δευτερίου από το όργανο. Αξίζει να σχολιασθεί ότι το όργανο εμφανίζει μειωμένη ακρίβεια στην περιοχή κοντά στα 200 nm.

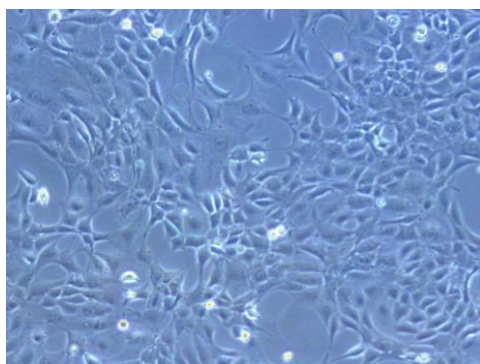
Μετρήθηκε η επί τοις εκατό διαπερατότητα %T, η επί τοις εκατό ανακλαστικότητα %R και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η επί τοις εκατό απορρόφηση %A από τη σχέση $100 - \%T - \%R$. Η προσέγγιση αυτή προτιμήθηκε έναντι της απευθείας μέτρησης της απόλυτης απορρόφησης με σκοπό τη μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Μετρήθηκε και απευθείας η απόλυτη απορρόφηση $A(\text{au})$ και βρέθηκε ότι συμφωνούν τα δύο φάσματα. Πριν από τη σάρωση κάθε δείγματος έγινε αφαίρεση των απορροφήσεων που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάλυση. Συγκεκριμένα, κατά τη σάρωση για την A και την %T, αφαιρέθηκε η απορρόφηση που προκαλείται από την καλυπτρίδα πάνω στην οποία βρίσκεται το πολυμερές, ενώ κατά τη σάρωση για την %R αφαιρέθηκε ως υπόβαθρο ο περιβάλλοντας χώρος του δείγματος. Καθώς τα υμένα αφέθηκαν σε απαγωγό εστία για να απομακρυνθεί ο διαλύτης, θεωρείται ότι δεν περιέχουν νερό ή οξικό οξύ και κατά συνέπεια η παρεμπόδιση από τις ενώσεις αυτές θεωρείται αμελητέα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή των φασμάτων απορρόφησης ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προσομοίωσης OriginLab.

2.6 Καλλιέργεια κυττάρων

Παράλληλα με τις προσπάθειες αποσαφήνισης της επίδρασης της φωτοαποδόμησης στο υλικό της χιτοζάνης, οι δομές δοκιμάστηκαν ως υποστρώματα ανάπτυξης κυτταρικών ιστών. Η χιτοζάνη είναι ένα βιοπολυμερές με ποικίλες βιοϊατρικές εφαρμογές και ο γενικότερος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν η εφαρμοζόμενη τεχνική επεξεργασίας μπορεί να δώσει δομές αξιοποιήσιμες τόσο στην *in vitro* μελέτη καρκινικών ιστών, όσο και σε συστήματα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων.

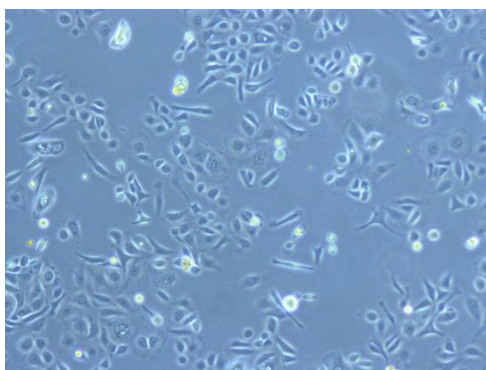
Σε πρώτη φάση για τα πειράματα εφαρμογής κυττάρων στα υποστρώματα χιτοζάνης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NIH-3T3, η μορφολογία της οποίας φαίνεται στην εικόνα 7. Πρόκειται για μια κυτταρική σειρά εμβρυικών ινοβλαστών ποντικών και χρησιμοποιείται ευρέως ως πρότυπη κυτταρική σειρά για βιολογικά πειράματα με ινοβλάστες. Προηγούμενες μελέτες εμφανίζουν ότι υπάρχει επιλεκτική προσκόλληση

των ινοβλαστών στην ακτινοβολημένη επιφάνεια χιτοζάνης. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η πιθανή κυτταροτοξικότητα των δειγμάτων.²⁶



Εικόνα 7: Η μορφολογία των κυττάρων NIH -3T3

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι η CAL51 Cell Line (εικόνα 8). Πρόκειται για σειρά καρκίνου του μαστού που απομονώθηκε από το μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα γυναίκας 45 ετών η οποία είχε υποστεί συνδιασμό ακτινο- και χημοθεραπείας και εγχείρηση.



Εικόνα 8: Η μορφολογία των κυττάρων CAL51

Θεωρείται ότι ανήκουν στην ευρεία κατηγορία των επιθηλιακών κυττάρων.²⁷

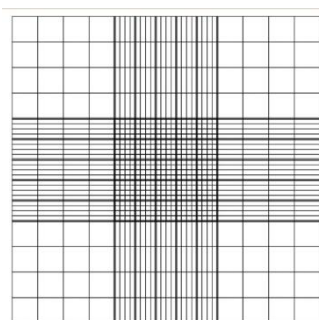
Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο το Dulbecco's MEM (4.5 g/L glucose), εμπλουτισμένο με 20% εμβρυικό ορό βοός (FBS) και 1% πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης (PS) για την αποφυγή μολύνσεων της καλλιέργειας. Το ίδιο μέσο χρησιμοποιήθηκε και για τους ινοβλάστες, με τη διαφορά ότι σε αυτό είχε προστεθεί 10% FBS. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα (Thermo Scientific) ρυθμισμένο σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂. Πριν από κάθε πείραμα που περιλάμβανε καλλιέργεια κυττάρων ο χώρος και τα υλικά αποστειρώνονταν υπό λυχνία UV για 20-30 λεπτά. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν ανά χρονικό διάστημα 3-5 ημερών κατόπιν παρατήρησης του δοχείου καλλιέργειας σε μικροσκόπιο. Στόχος ήταν η επιφάνεια του δοχείου να έχει καλυφθεί κατά 70-80% με κύτταρα. Το στρώμα των κυττάρων αποσπάστηκε με διάλυμα 0.05% trypsin/EDTA (Gibco) και ολιγόλεπτη παραμονή σε θερμοκρασία 37 °C. Έπειτα, προστέθηκε στο δοχείο ποσότητα θρεπτικού μέσου λίγο μεγαλύτερη από αυτή της

θρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως ώστε να αναιρεθεί η δράση του ενζύμου της θρυψίνης. Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στα 1200g επί 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 25 °C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 1-3 ml θρεπτικού διαλύματος και προέκυψε το εναιώρημα των κυττάρων έπειτα από ανάδευση.

Με σκοπό την ανακαλλιέργεια του κυτταρικού πληθυσμού προστέθηκαν 200-300 μl από το παραπάνω εναιώρημα σε ένα δοχείο καλλιέργειας που περιείχε ήδη 5 ml θρεπτικού διαλύματος. Το δοχείο τοποθετήθηκε στον επωαστήρα και παρατηρούνταν σε συχνά χρονικά διαστήματα για να ελεγχθεί η πρόοδος της καλλιέργειας.

2.7 Μέτρηση κυττάρων και επίστρωση στα δείγματα χιτοζάνης

Στα πειράματα που περιλάμβαναν την επίστρωση κυττάρων στα δείγματα χιτοζάνης ήταν απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων για να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Για τον υπολογισμό αυτού του αριθμού χρησιμοποιήθηκε το αιματοκυτταρόμετρο. Πρόκειται για ειδική αντικειμενοφόρο η οποία φέρει χαραγμένη τη δομή που περιγράφεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9: Η δομή του αιματοκυτταρόμετρου ²⁸

Καθένα από τα μεγάλα λευκά τετράγωνα (4x4) έχει εμβαδόν 1 mm², ενώ έπειτα από την ένωση της επιφάνειας με το ειδικό τζάμι κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει όγκο 10⁻⁴ ml.

Από το κυτταρικό εναιώρημα που προέκυψε από την ανακαλλιέργεια, τοποθετήθηκαν περίπου 20 μl στο αιματοκυτταρόμετρο, ανάμεσα στην καλυπτρίδα και στην αντικειμενοφόρο που περιέχει τη δομή με το σταυρό. Καταμετρήθηκαν τα κύτταρα που βρίσκονταν εντός των λευκών τετραγώνων και όχι στις γραμμές που τα χωρίζουν από το σταυρό ή τον εξωτερικό χώρο και προέκυψαν 4 τιμές. Ο μέσος όρος των 4 αυτών τιμών πολλαπλασιάζεται *10⁴ και έτσι ο μετρούμενος αριθμός κυττάρων ανάγεται σε αυτόν που αντιστοιχεί σε όγκο 1 ml.

Οι απαραίτητοι υπολογισμοί για την προσθήκη κυτταρικού εναιωρήματος σταθερής συγκέντρωσης στα δείγματα ακολουθούν το νόμο της αραιώσης σύμφωνα με τον οποίο ισχύει: $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$, όπου C_1 η μετρούμενη συγκέντρωση των κυττάρων,

C_2 η συγκέντρωση των κυττάρων που θέλουμε να προσθέσουμε στα δείγματα, V_2 ο συνολικός όγκος του κυτταρικού διαλύματος που θέλουμε να διαθέτει τη γνωστή συγκέντρωση C_2 .

Τα δείγματα χιτοζάνης τοποθετήθηκαν προηγουμένως σε αποστειρωμένα πιάτα (plates) καλλιέργειας 24 θέσεων έπειτα προστέθηκε 1 ml κυτταρικού διαλύματος σε κάθε δείγμα και επωάστηκαν για 1,3,7 ημέρες.

Σε κάθε πείραμα υπήρχε το control δείγμα το οποίο ήταν καλυπτρίδα διαμέτρου 13 mm χωρίς κάποιο άλλο υλικό πάνω της. Η ύπαρξη του control δείγματος είναι απαραίτητη ώστε να ελέγχεται η ανάπτυξη των προς μελέτη κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες, παράλληλα με το πείραμα. Για τα αρχικά πειράματα ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 10^5 κύτταρα / ml διαλύματος. Στα πειράματα με την καρκινική σειρά CAL51 χρησιμοποιήθηκε αρχικά η συγκέντρωση $5 \cdot 10^4$ κύτταρα / ml, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι παραμένουν ελάχιστα κύτταρα στα υμένα χιτοζάνης και έτσι επιλέχθηκε η συγκέντρωση 10^5 κύτταρα / ml ανά δείγμα ως βέλτιστη.

2.8 Μονιμοποίηση δειγμάτων για παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης

Η απεικόνιση των δειγμάτων χιτοζάνης με καρκινικά κύτταρα στο SEM επιτρέπει την παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων σε συσχέτιση με την τοπογραφία του υλικού.

Για να παρατηρηθούν οι επιστρωμένες με κύτταρα πολυμερικές επιφάνειες είναι απαραίτητο να υποστούν τα δείγματα μονιμοποίηση. Η επεξεργασία αυτή αφυδατώνει σταδιακά τα δείγματα και σταματάει τις μεταβολικές διεργασίες που πραγματοποιούν τα κύτταρα, διατηρώντας ταυτόχρονα σταθερή τη δομή και τη θέση τους πάνω στο δείγμα.

Ως μονιμοποιητές χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια όπως η γλουταραλδεΐδη (GDA) και η παραφορμαλδεΐδη (PFA). Ο μονιμοποιητής αντιδρά ομοιοπολικά με διάφορα βιολογικά μακρομόρια που συναντώνται στους ιστούς και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση τους.²⁹

Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει σε συσκευές ξήρανσης κρίσιμου σημείου που περιέχουν υγρό CO_2 . Για τα συγκεκριμένα πολυμερικά δείγματα, ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η διαδικασία αυτή τα καταστρέφει σε μεγάλο βαθμό αφενός λόγω της ευαισθησίας της χιτοζάνης και αφετέρου λόγω της πολύ μεγάλης πίεσης που αναπτύσσεται στο εσωτερικό της συσκευής. Συγκεκριμένα, πολλά από τα δείγματα που έγινε προσπάθεια να μονιμοποιηθούν με την τεχνική αυτή απέκτησαν πλήρως επίπεδη επιφάνεια στην οποία μετά από τη διαδικασία δεν υπήρχαν καθόλου κύτταρα.

Εναλλακτικά δοκιμάστηκε ένα πρωτόκολλο που στηριζόταν στην ξήρανση μέσω της εξάτμισης του αντιδραστήριου hexamethyldisilazane (HDMS) το οποίο θεωρείται πιο απλό στη χρήση του από τη συσκευή ξήρανσης κρίσιμου σημείου και πιο φιλικό προς τα βιολογικά δείγματα.³⁰

Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού διαλύματος από τα δείγματα
2. Δύο πλύσεις των δειγμάτων με Sodium cacodylate buffer (SCB) διάρκειας 7 λεπτών η καθεμία
3. Μονιμοποίηση με διάλυμα 2% GDA / 2% PFA για 30 λεπτά
4. Δύο πλύσεις με SCB για 7 λεπτά η καθεμία
5. Σταδιακή αφυδάτωση με προσθήκη αιθανόλης 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% για 7 – 10 λεπτά. Τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν για 1 νύχτα στο ψυγείο έπειτα από την προσθήκη της 70% αιθανόλης και η διαδικασία να συνεχιστεί την επόμενη ημέρα
6. Σταδιακή προσθήκη του HDMS, αρχικά σε μείγμα αναλογίας 1:1 με 100% αιθανόλη. Έγιναν 2 πλύσεις διάρκειας 30 λεπτών η καθεμία με το μείγμα HDMS – αιθανόλης
7. Προσθήκη HDMS με 2 πλύσεις διάρκειας 20 λεπτών

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν κρύα κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης, ενώ και τα δείγματα τοποθετούνταν στο ψυγείο τα χρονικά διαστήματα της παραμονής.

Καθώς παρατηρήθηκε τα πολυμερικά δείγματα ξεκολλούσαν από τις καλυπτρίδες έπειτα από το παραπάνω πρωτόκολλο, έγινε προσπάθεια να μειωθεί ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στο HDMS με αφορμή προηγούμενη μελέτη που χρησιμοποιεί τη συγκεκριμένη τεχνική μονιμοποίησης για δείγματα που περιέχουν χιτοζάνη, ωστόσο το πρωτόκολλο χρήζει περαιτέρω βελτίωσης για την εφαρμογή του στα δείγματα μας.³¹ Η φθορά αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται στην παραμονή των δειγμάτων στο HDMS καθώς η αποκόλληση των υμενίων από τις καλυπτρίδες και η δημιουργία ρωγμών σε κάποια από αυτά έγινε αντιληπτή κατά τη διάρκεια των σταδίων 6 και 7 του παραπάνω πρωτοκόλλου. Έπειτα από την αφαίρεση των δειγμάτων από το HDMS, αυτά αφέθηκαν να στεγνώσουν πλήρως για 1 ημέρα και για να παρατηρηθούν στο SEM επιστρώθηκαν με μια λεπτή επίστρωση ιόντων Au/Pd.

2.9 Χρώση πυρήνων κυττάρων

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων και την διερεύνηση της προτίμησης των κυττάρων CAL51 στις ακτινοβολημένες ή μη ακτινοβολημένες επιφάνειες χιτοζάνης.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) που είναι μια χρωστική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα που σχετίζονται με κυτταροκαλλιέργειες. Το DAPI έχει την ιδιότητα να προσδένεται ισχυρά στο DNA και να εκπέμπει μέγιστα ακτινοβολία στα εκπέμπει μέγιστα στα 461 nm (μπλε χρώμα). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε μικροσκόπιο φθορισμού να παρατηρείται ο πυρήνας των κυττάρων με έντονο μπλε χρώμα έπειτα από τη χρώση.
32

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση των κυττάρων και τη χρώση των πυρήνων των ζωντανών κυττάρων με DAPI και είναι το εξής:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από το δείγμα.
2. Δύο πλύσεις με μη αποστειρωμένο διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS) για 5 λεπτά η καθεμία
3. Επώαση σε διάλυμα του μονιμοποιητή paraformaldehyde (PFA) 4% για 15 λεπτά
4. Δύο πλύσεις με PBS
5. Προσθήκη διαλύματος triton 0.1% το οποίο φτιάχνεται πριν τη χρήση από αρχικό διάλυμα 1% σε διαλύτη PBS. Το διάλυμα αυτό καθιστά την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή με αποτέλεσμα να μπορεί να περάσει η χρωστική στον ενδοκυττάριο χώρο.
6. Δύο πλύσεις με PBS
7. Προσθήκη διαλύματος PBS – BSA 2% και επώαση για 30 λεπτά
8. Πλύση με PBS
9. Προσθήκη μιας σταγόνας από τη χρωστική πάνω στο δείγμα

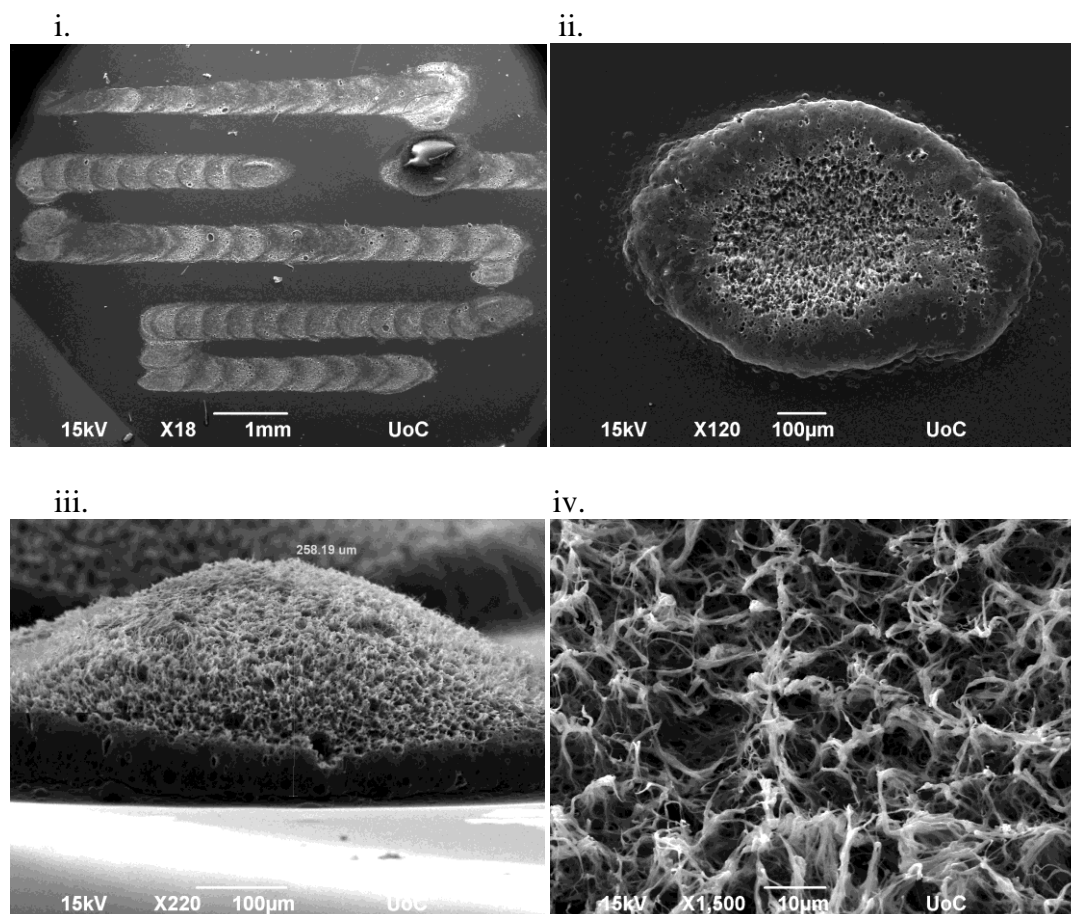
Ακολουθεί η κάλυψη των δειγμάτων με καλυπτρίδες ώστε να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη κατανομή της χρωστικής στην επιφάνεια τους. Είναι επιτρεπτή η φύλαξη των δειγμάτων στο ψυγείο, μέχρι αυτά να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Μορφολογικός χαρακτηρισμός δειγμάτων στο SEM

Οι παρακάτω εικόνες δείχνουν τη μορφολογία ακτινοβολημένων δειγμάτων χιτοζάνης, όπως αυτή φαίνεται στο μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μεγεθύνσεις καθώς επίσης και πλάγια λήψη υπό γωνία 45° για να παρατηρηθούν τα δείγματα με μεγαλύτερη ακρίβεια.



Εικόνα 10: Ακτινοβολημένη επιφάνεια χιτοζάνης σε διαφορετικές μεγεθύνσεις στο SEM

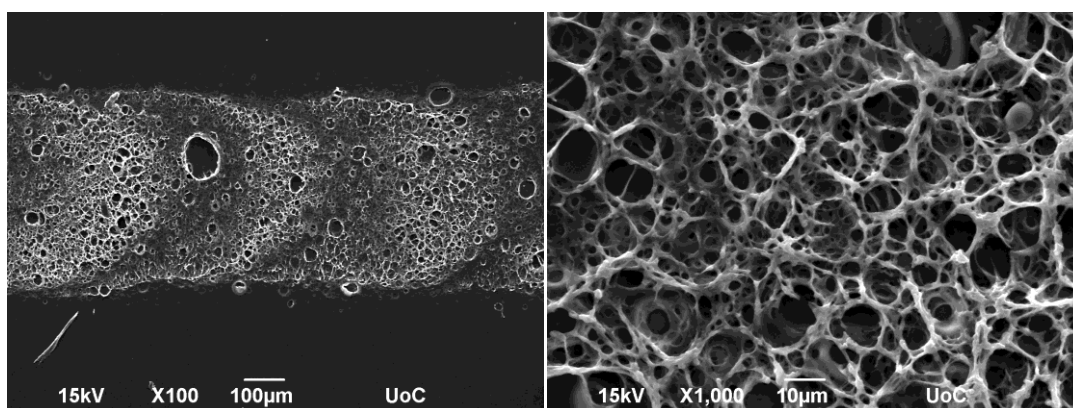
Η επίδραση της ακτινοβολίας laser στα υμένα χιτοζάνης φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες. Τόσο στην πανοραμική εικόνα (εικόνα 10i) φαίνεται η ύπαρξη πόρων και διακρίνεται η διαφορετική μορφολογία σε σύγκριση με την μη ακτινοβολημένη περιοχή, η οποία παραμένει επίπεδη, χωρίς κάποια διακριτά χαρακτηριστικά. Η

εικόνα 10iii, η οποία έχει ληφθεί υπό γωνία 45° δείχνει επίσης ξεκάθαρα ότι η επιφάνεια που έχει ακτινοβοληθεί έχει ανυψωθεί.

Στόχος της οποιασδήποτε τροποποίησης ενός υλικού για κάποιο συγκεκριμένο σκοπό είναι αυτή να διατηρείται στις επιθυμητές συνθήκες. Έτσι, δεν θα ήταν επιθυμητό οι δομές της εικόνας 10 να καταστρέφονται κατά τη διάρκεια πειραμάτων κυτταροκαλλιέργειας. Έπειτα από επώαση των δειγμάτων στις πρότυπες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων για χρονικό διάστημα 7 ημερών όπως περιγράφεται στο τμήμα 2.3, προέκυψαν οι ακόλουθες εικόνες στο SEM

i.

ii.



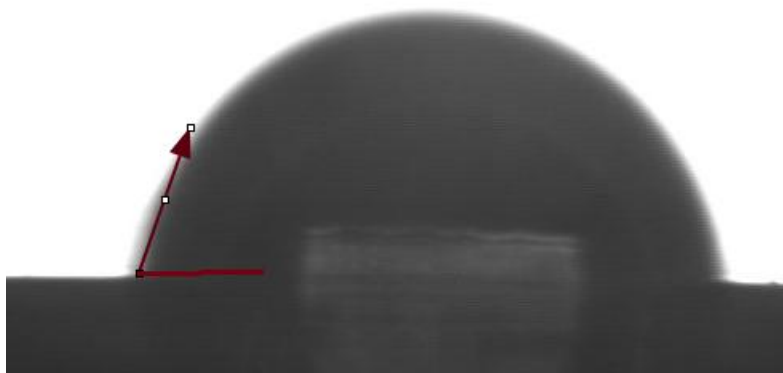
Εικόνα 11: Ακτινοβολημένο υμένιο χιτοζάνης έπειτα από παραμονή 7 ημερών σε συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων σε διαφορετικές μεγεθύνσεις

Παρατηρείται ότι διατηρείται η επιθυμητή πορώδης δομή που αποκτούν τα δείγματα έπειτα από την ακτινοβολή τους. Κάποια από τα δείγματα ξεκόλλησαν από την καλυπτρίδα τους στο στάδιο αυτό, κάτι που πιθανώς να οφείλεται στο λεπτό πάχος του υλικού και κατ' επέκταση στη μηχανική φθορά αυτού κατά την ακτινοβολή.

3.2 Μετρήσεις διαβρεξιμότητας ακτινοβολημένης και μη ακτινοβολημένης επιφάνειας χιτοζάνης

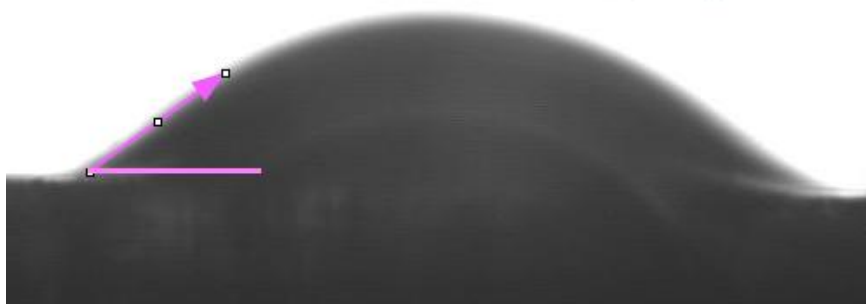
Οι παρακάτω εικόνες λήφθηκαν έπειτα από την τοποθέτηση μιας σταγόνας απιονισμένου, υπερκάθαρου νερού σε ακτινοβολημένη και μη ακτινοβολημένη επιφάνεια χιτοζάνης.

69,21 degrees



Εικόνα 12: Γωνία επαφής μη ακτινοβολημένης επιφάνειας χιτοζάνης με το νερό

36,43 degrees



Εικόνα 13: Γωνία επαφής ακτινοβολημένης επιφάνειας χιτοζάνης με το νερό

Συνοπτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών είναι τα εξής:

- Γωνία επαφής μη ακτινοβολημένης επιφάνειας με το νερό: $69,21^\circ$
- Γωνία επαφής ακτινοβολημένης επιφάνειας με το νερό: $36,43^\circ$

Γενικότερα, η γωνία επαφής μιας υδρόφιλης επιφάνειας με το νερό είναι $\theta < 90^\circ$, ενώ η γωνία επαφής μιας υδρόφοβης επιφάνειας με το νερό είναι $\theta > 90^\circ$.

Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις προκύπτει ότι η χιτοζάνη παραμένει υδρόφιλη πριν και μετά την κατεργασία της με laser. Η υδροφιλικότητα της χιτοζάνης αποδίδεται στις ομάδες $-OH$, $-NH_2$ και CH_3ONH- που υπάρχουν εκατέρωθεν της ανθρακικής αλυσίδας. Οι ομάδες αυτές είναι πολικές και μπορούν να σχηματίσουν ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις με τα μόρια νερού, μεταξύ των οποίων είναι ο δεσμός υδρογόνου.

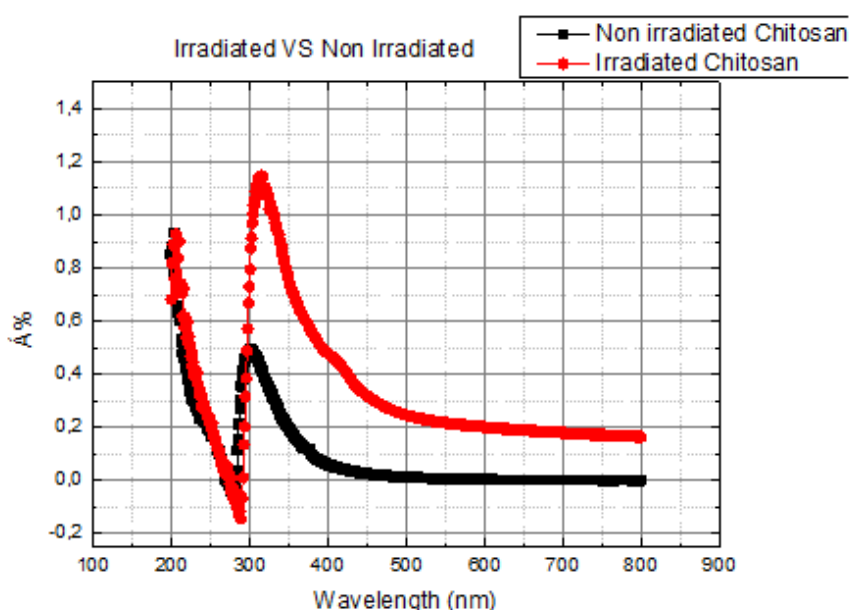
Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 12 και 13, η υδροφιλικότητα της ακτινοβολημένης επιφάνειας αυξάνεται σημαντικά καθώς η γωνία επαφής της με το

νερό σχεδόν υποδιπλασιάζεται. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να υποδηλώνει κάποια αναδιάταξη του πολυμερούς κατά την ακτινοβολία, η οποία αυξάνει την πολικότητα της επιφάνειας του υμενίου. Μια τέτοια τροποποίηση θα μπορούσε να είναι η επαγόμενη από την ακτινοβολία laser διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών αλλά και των δακτυλίων γλυκοζαμίνης του πολυμερούς.³³

Από μηχανικής άποψης, η αύξηση στην υδροφιλικότητα οφείλεται και στην αύξηση της τραχύτητας της επιφάνειας κατά την κατεργασία με laser. Όπως φαίνεται και στις εικόνες από το SEM, η μη ακτινοβολημένη επιφάνεια είναι επίπεδη, ενώ η ακτινοβολημένη επιφάνεια έχει γίνει ανυψωμένη και πορώδης. Είναι λοιπόν λογικό να υπάρχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση των μορίων του νερού στο δείγμα ακτινοβολημένης χιτοζάνης από ότι στο δείγμα μη ακτινοβολημένης χιτοζάνης.

3.3 Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός δειγμάτων χιτοζάνης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης UV-Vis

Το φάσμα απορρόφησης της χιτοζάνης, όπως προέκυψε από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατίθεται στη συνέχεια.



Εικόνα 14: Φάσμα απορρόφησης Χιτοζάνης

Πρέπει να σχολιαστεί ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή ως προς τα μήκη κύματος στα οποία απορροφά η χιτοζάνη. Αυτό σημαίνει ότι οι φυσικοχημικές μεταβολές που συντελούνται κατά την ακτινοβολία δεν τροποποιούν τις χρωμοφόρες ομάδες του πολυμερούς, οι οποίες και απορροφούν την ακτινοβολία.

Όπως φαίνεται, κατά την έναρξη της καταγραφής στα 200 nm, η απορρόφηση τόσο της ακτινοβολημένης όσο και της μη ακτινοβολημένης χιτοζάνης είναι αυξημένη και

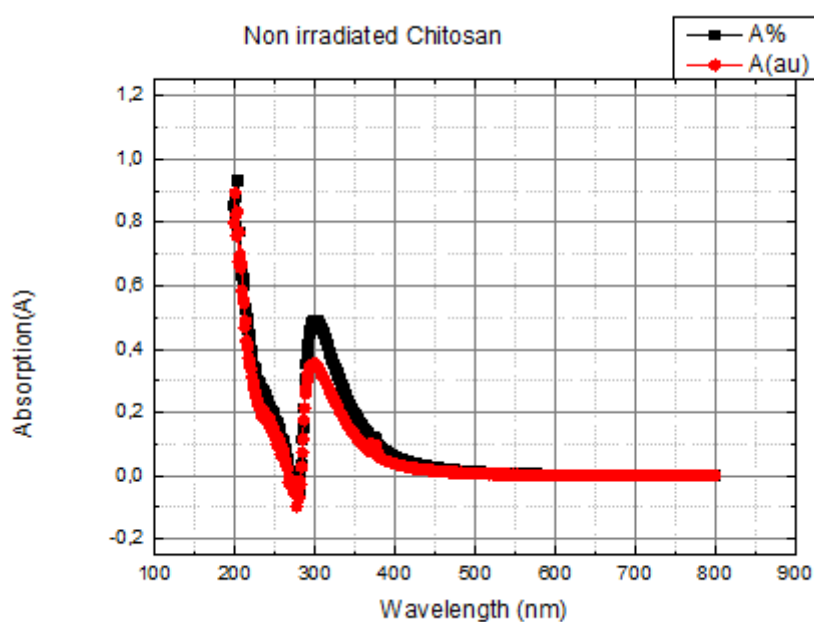
πλησιάζει τη μονάδα. Η απορρόφηση αυτή αποδίδεται στις ομάδες γλυκοζαμίνης και N- ακέτυλο- γλυκοζαμίνης που υπάρχουν στην πολυμερική αλυσίδα.³⁴

Παρατηρείται ισχυρή απορρόφηση στα 300 nm περίπου, η οποία όσον αφορά την ακτινοβολημένη επιφάνεια αυξάνεται κατά περίπου 1 μονάδα. Η απορρόφηση αυτή πιθανόν να οφείλεται στην οξείδωση του πολυμερούς της χιτοζάνης και να περιλαμβάνει το σχηματισμό ομάδων καρβονυλίου και καρβοξυλίου.^{34,35} Η οξείδωση αυτή είναι λογικό να γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό υπό την επίδραση της παλμικής ακτινοβολίας του laser.

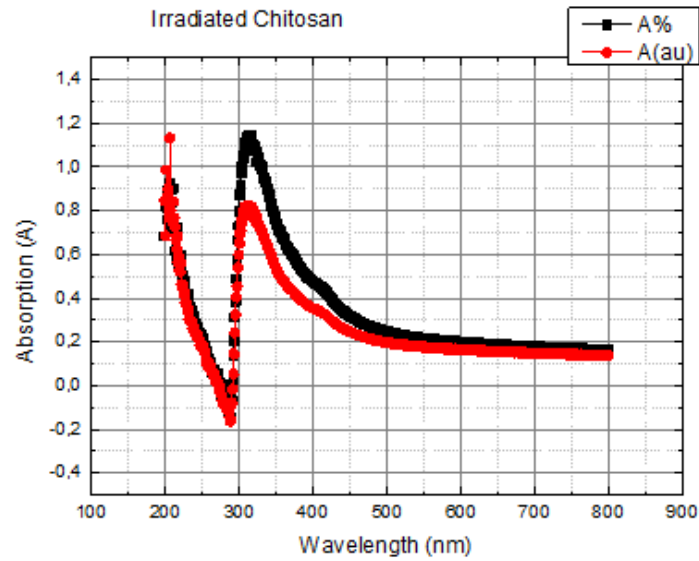
Δεν φαίνεται να υπάρχει απορρόφηση στην περιοχή 400-800 nm, ενώ η μικρή μπάντα κοντά στα 400 nm ίσως να σχετίζεται με θόρυβο κατά τη λήψη των φασμάτων.

Το φάσμα της εικόνας 14 προέκυψε έπειτα από σάρωση για την επί τοις εκατό διαπερατότητα και την επί τοις εκατό ανακλασιμότητα των δειγμάτων και τη μετέπειτα προσαρμογή των μετρήσεων με τη σχέση $100 - \%T - \%R$, ώστε να προκύψει η επί τοις εκατό απορρόφηση.

Τα παρακάτω φάσματα των εικόνων 15, 16 αποτελούν σύγκριση της παραπάνω μεθοδολογίας με την απευθείας μέτρηση της απόλυτης απορρόφησης. Η μαύρη καμπύλη δείχνει την επί τοις εκατό απορρόφηση [%A] και η κόκκινη καμπύλη την απόλυτη απορρόφηση [A(arbitrary units)]. Δεν φαίνονται διαφορές στις περιοχές των απορροφήσεων, παρά μόνο την τιμή της απορρόφησης, η οποία είναι αυξημένη στις καμπύλες της απόλυτης απορρόφησης. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με την πυκνότητα των επιφανειών καθώς η απορρόφηση αυξάνεται αναλογικά με τη σύσταση του εκάστοτε υλικού.



Εικόνα 15: Σύγκριση απορροφήσεων για τα μη ακτινοβολημένα δείγματα



Εικόνα 16: Σύγκριση απορροφήσεων για τα ακτινοβολημένα δείγματα

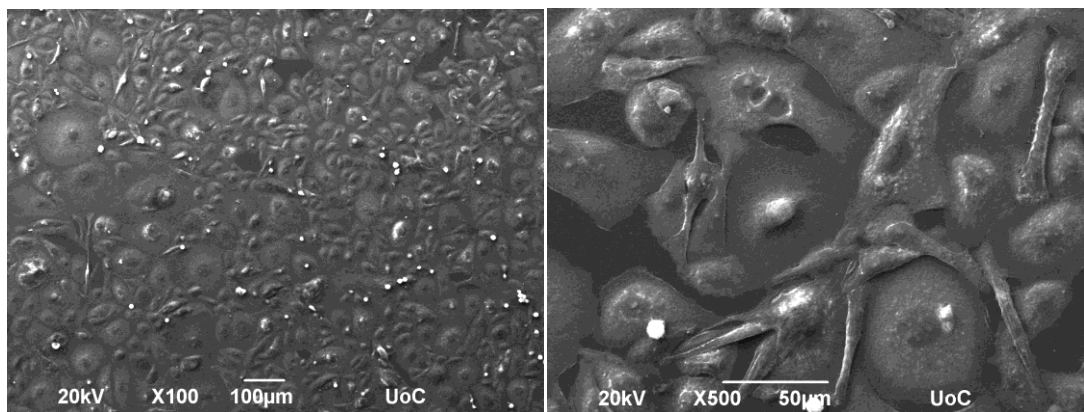
3.4 Παρατήρηση κυτταρικής απόκρισης στο SEM

Η προσκόλληση και η μορφολογία των CAL51 κυττάρων στις επιφάνειες χιτοζάνης παρατηρήθηκε στο SEM κατόπιν μονιμοποίησης και επίστρωσης των δειγμάτων με ιόντα Au/Pd. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα καλλιέργειας κυττάρων στα υποστρώματα διάρκειας 1,3 και 7 ημερών.

ο 1 ημέρα καλλιέργειας

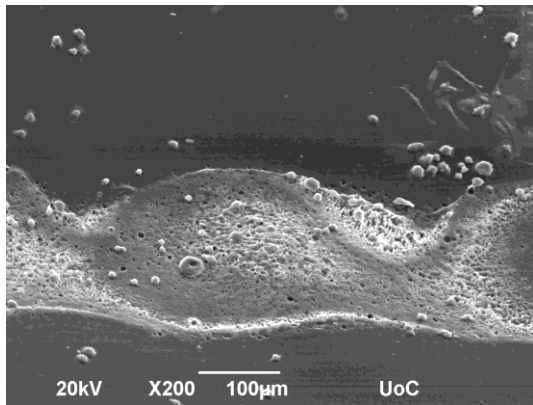
i.

ii.

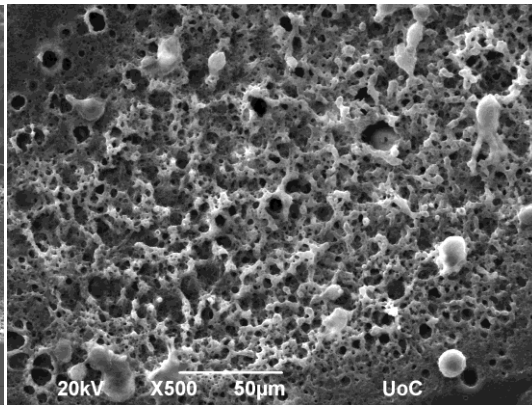


Εικόνα 17: Control δείγμα, 1 ημέρα καλλιέργειας, διαφορετικές μεγεθύνσεις

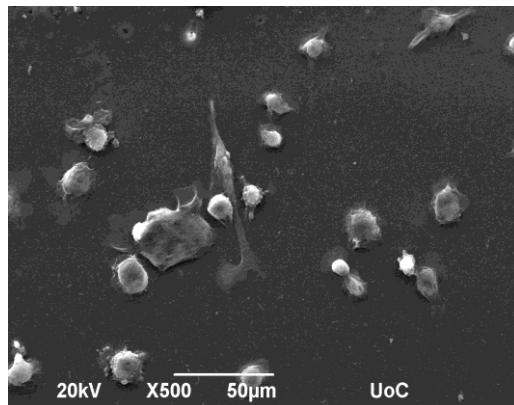
i.



ii.



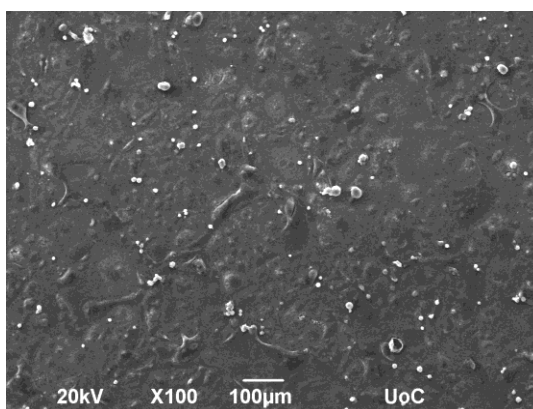
iii.



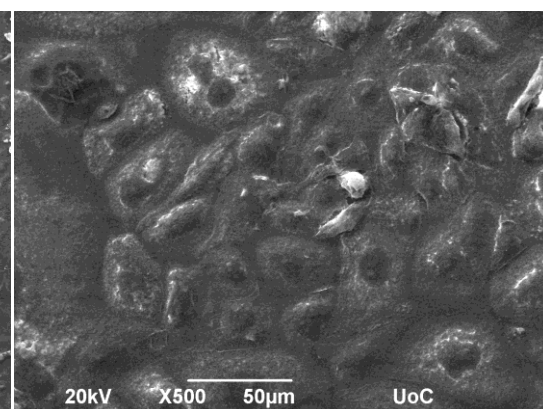
Εικόνα 18: Δείγματα χιτοζάνης, 1 ημέρα καλλιέργειας, πλάγια λήψη ακτινοβολημένης επιφάνειας (i), εστίαση σε ακτινοβολημένο σημείο (ii), εστίαση σε μη ακτινοβολημένο σημείο (iii)

○ 3 ημέρες καλλιέργειας

i.

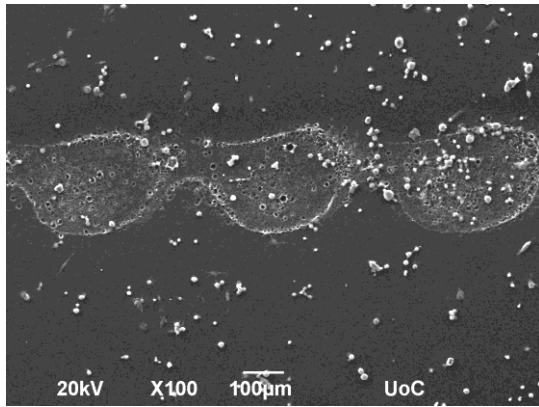


ii.

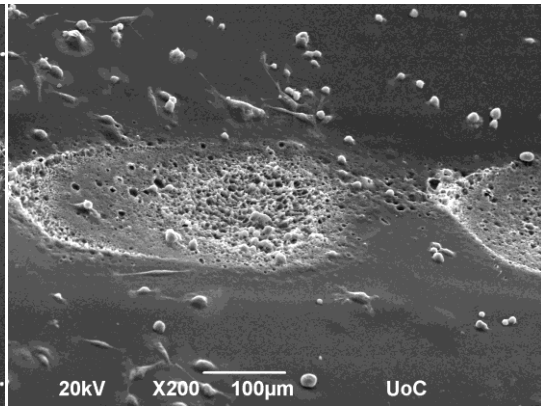


Εικόνα 19: Control δείγμα, 3 ημέρες καλλιέργειας, διαφορετικές μεγεθύνσεις

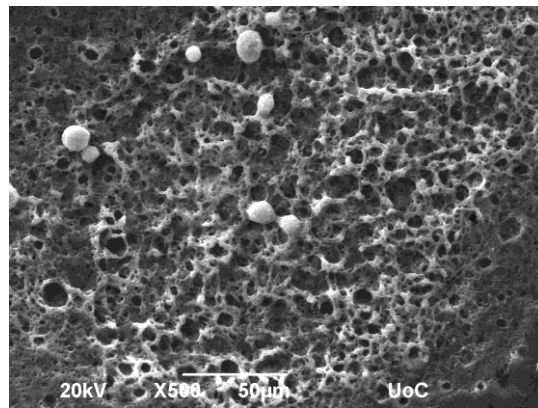
i.



ii.



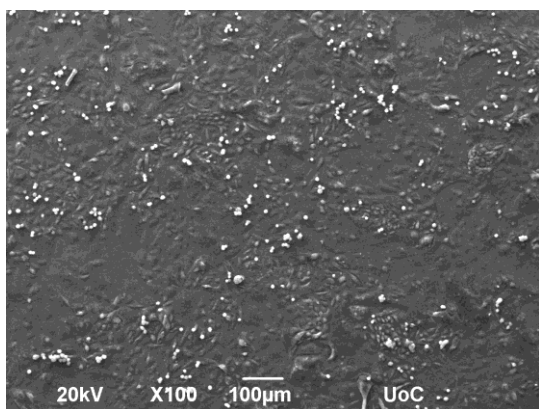
iii.



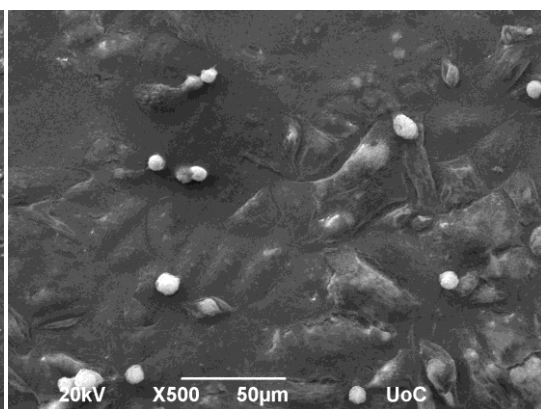
Εικόνα 20: Δείγματα χιτοζάνης, 3 ημέρες καλλιέργειας, γενική εικόνα (i), πλάγια λήψη (ii), εστίαση σε ακτινοβολημένη περιοχή(iii)

ο 7 ημέρες καλλιέργειας

i.

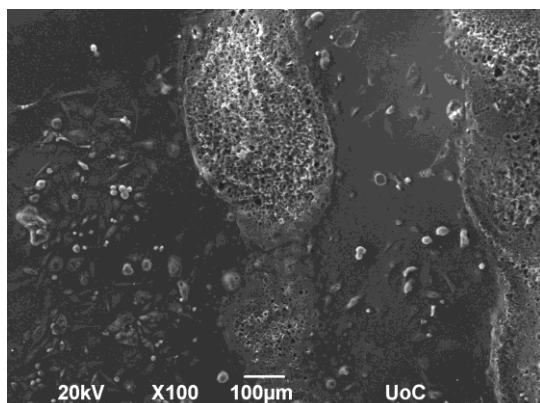


ii.

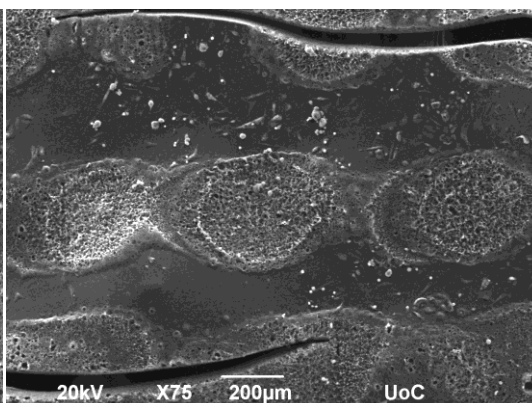


Εικόνα 21: Control δείγμα, 7 ημέρες καλλιέργειας, διαφορετικές μεγεθύνσεις

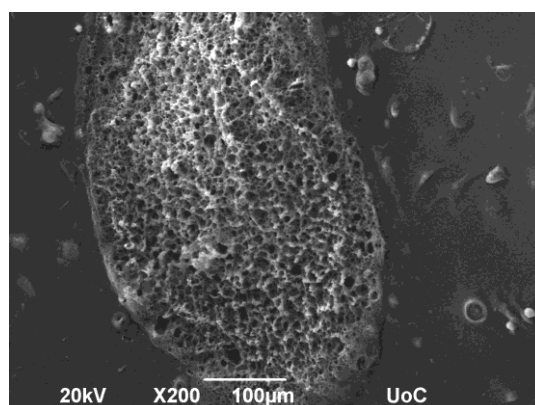
i.



ii.



iii.



Εικόνα 22: Δείγματα χιτοζάνης, 7 ημέρες καλλιέργειας, γενική εικόνα (i, ii), εστίαση σε ακτινοβολημένο σημείο (iii)

Συγκρίνοντας τις εικόνες που λήφθηκαν από τα δείγματα χιτοζάνης (εικόνες 18, 20, 22) με αυτές των control δειγμάτων (εικόνες 17, 19, 21), παρατηρείται πολύ μεγαλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων στα control δείγματα και για τα 3 χρονικά διαστήματα που διήρκεσαν τα πειράματα. Η μορφολογία επίσης των κυττάρων είναι διαφορετική στα δύο υποστρώματα. Στα control δείγματα όλων των ημερών έχουμε ικανοποιητική προσκόλληση και κάλυψη σχεδόν όλης της επιφάνειας από τα κύτταρα. Αντίθετα, στα υποστρώματα χιτοζάνης υπάρχουν πάρα πολλά κενά και τα κύτταρα δεν δείχνουν να προτιμούν την ακτινοβολημένη επιφάνεια, παρά την – θεωρητικά- επιθυμητή τοπολογία της. Το γεγονός, επίσης, ότι τα περισσότερα κύτταρα στα υμένα χιτοζάνης έχουν στρογγυλή μορφή, πιθανόν να υποδηλώνει ότι το υλικό δεν είναι φιλικό προς την ανάπτυξη τους, καθώς τα κύτταρα αυτά προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια χιτοζάνης αλλά δεν εξαπλώθηκαν.

Οι ρωγμές του υλικού που φαίνονται ξεκάθαρα στην εικόνα 22ii προκλήθηκαν στην προσπάθεια στερέωσης των υμενίων σε γυαλί μικροσκοπίου με σκοπό την παρατήρηση στο SEM. Καθώς έπειτα από τη μονιμοποίηση με HDMS είχε

αποκολληθεί το υλικό από την καλυπτρίδα, αυτό είχε πάρει καμπυλώδες σχήμα και αναγκαστικά η στερέωση του στο γυαλί έσπασε το δείγμα.

3.5 Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων – Χρώση πυρήνων με DAPI

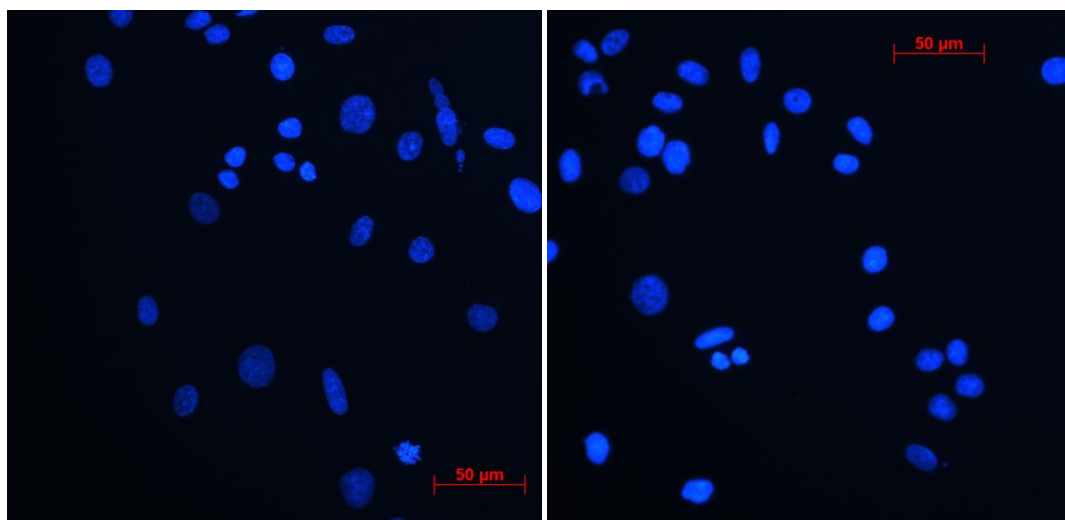
Ακολουθούν ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα χρώσης 1,3 και 7 ημερών οι οποίες λήφθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Οι πυρήνες των κυττάρων πάνω στα υποστρώματα έχουν βαφτεί με έντονο μπλε χρώμα. Παρατηρείται από τις εικόνες ότι και τα δείγματα της χιτοζάνης φθορίζουν στο μπλε χρώμα, με την ακτινοβολημένη περιοχή να φθορίζει σε πιο έντονο βαθμό.

Οι εικόνες περιλαμβάνουν τα control δείγματα, την ακτινοβολημένη και τη μη ακτινοβολημένη περιοχή των δειγμάτων χιτοζάνης. Κάποιες από τις εικόνες, ιδιαίτερα αυτές που αντιστοιχούν στην ακτινοβολημένη επιφάνεια υμενίων χιτοζάνης, δείχνουν κάποια σημεία που είναι αρκετά θολά. Όπως διαπιστώθηκε και στις εικόνες του SEM (εικόνες 18, 20, 22), η ακτινοβολημένη επιφάνεια αποκτά μια ανυψωμένη πορώδη δομή. Εφόσον λοιπόν χάνει την επιπεδότητα της, δυσχαιρένεται η εστίαση του μικροσκοπίου. Καθώς μεταβάλλεται η εστίαση του μικροσκοπίου εστιάζουμε σε διαφορετική κλίμακα και η θόλωση παρατηρείται σε άλλο μέρος της επιφάνειας.

- 1 ημέρα καλλιέργειας

i.

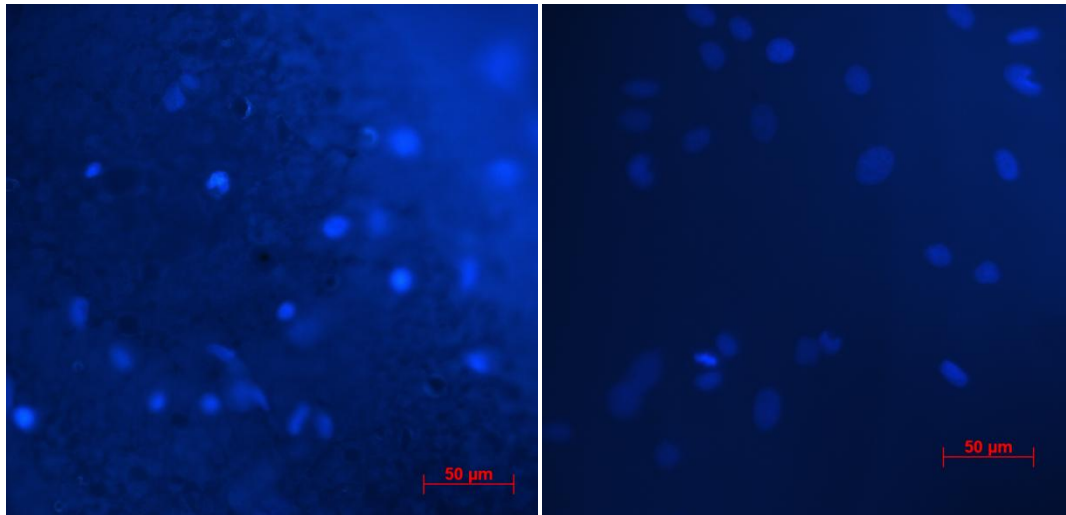
ii.



Εικόνα 23 Control δείγμα, 1 ημέρα καλλιέργειας, διαφορετικά σημεία του δείγματος

i.

ii.

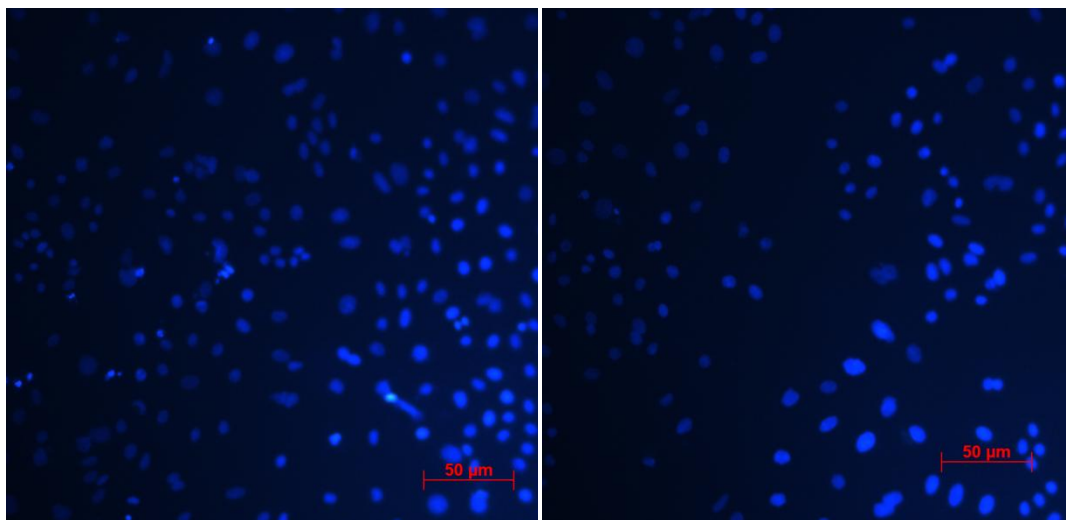


Εικόνα 24: Δείγμα χιτοζάνης, 1 ημέρα καλλιέργειας: Ακτινοβολημένη περιοχή (i) , μη ακτινοβολημένη περιοχή(ii)

○ 3 ημέρες καλλιέργειας

i.

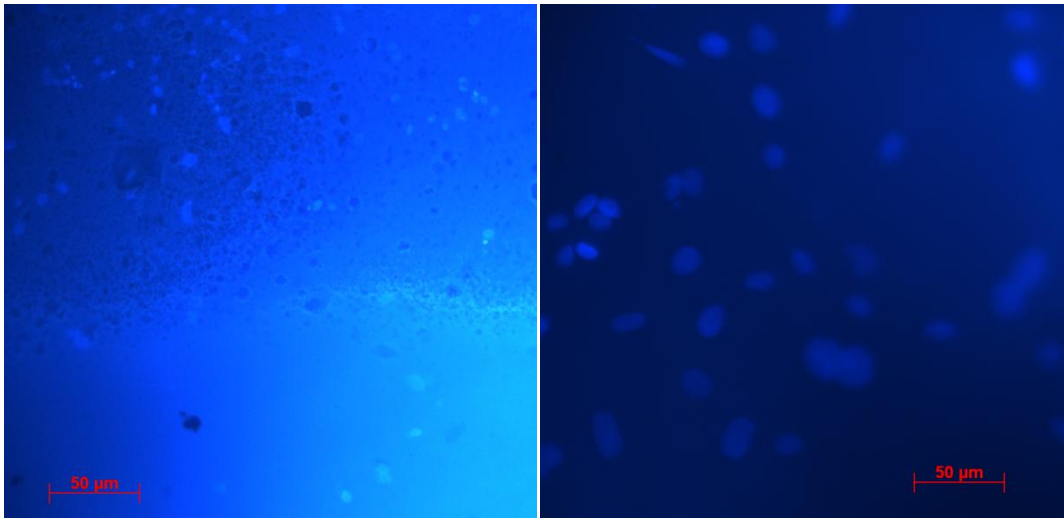
ii.



Εικόνα 25: Control δείγμα, 3 ημέρες καλλιέργειας, διαφορετικά σημεία του δείγματος

i.

ii.

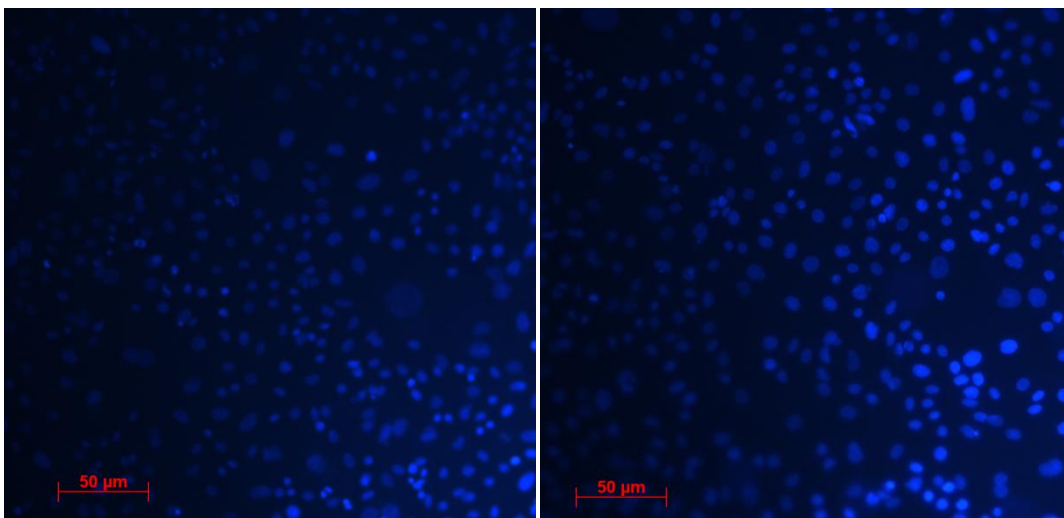


Εικόνα 26: Δείγμα χιτοζάνης, 3 ημέρες καλλιέργειας: Ακτινοβολημένη περιοχή (i) , μη ακτινοβολημένη περιοχή(ii)

○ 7 ημέρες καλλιέργειας

i.

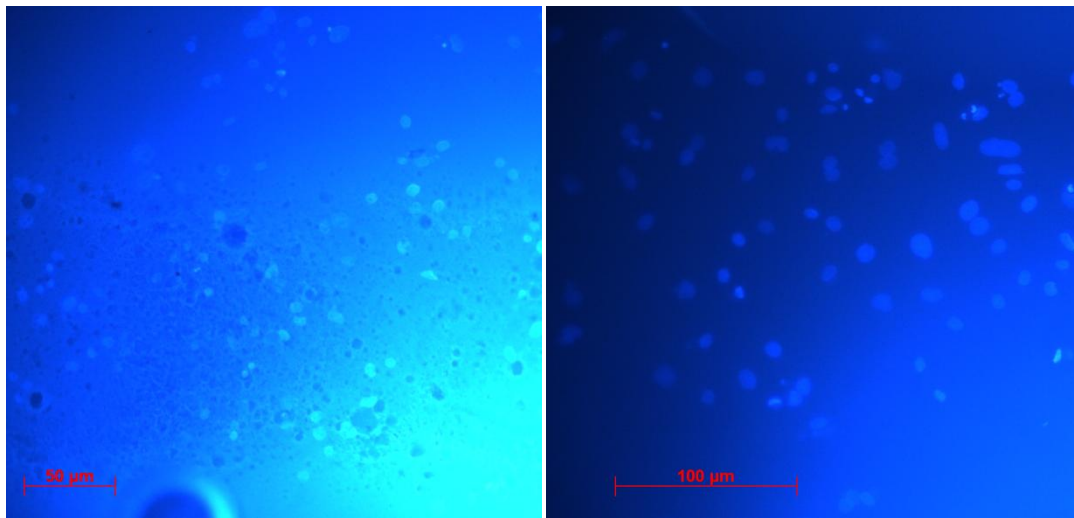
ii.



Εικόνα 27: Control δείγμα, 7 ημέρες καλλιέργειας, διαφορετικά σημεία του δείγματος

i.

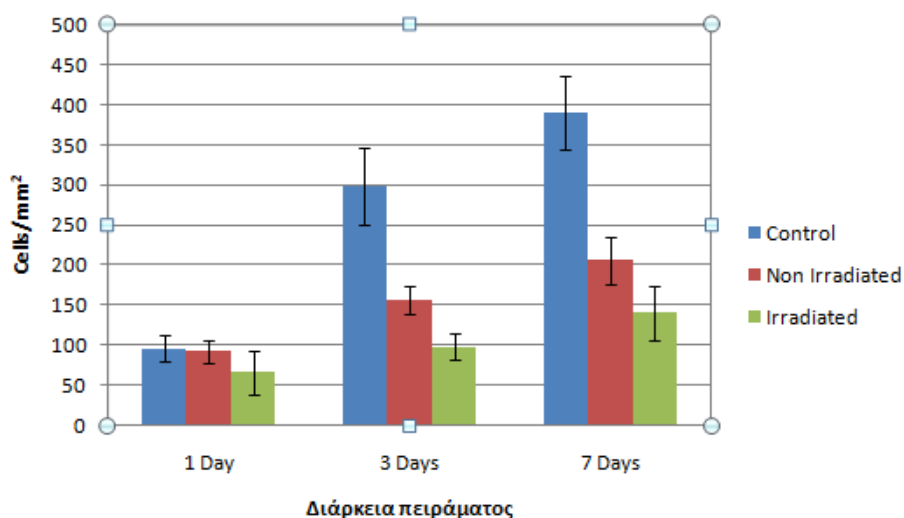
ii.



Εικόνα 28: Δείγμα χιτοζάνης, 7 ημέρες καλλιέργειας: Ακτινοβολημένη περιοχή (i) , μη ακτινοβολημένη περιοχή(ii)

Οι εικόνες λήφθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού AxionVision, μέσω του οποίου προστέθηκε επίσης η κλίμακα που φαίνεται ως κόκκινη μπάρα. Για κάθε πειραματική διάρκεια, παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερος κυτταρικός πληθυσμός στο control δείγμα σε σύγκριση με τις επιφάνειες χιτοζάνης.

Από κάθε δείγμα λήφθηκαν αρκετές εικόνες ώστε όσο γίνεται να καλυφθεί σε μεγάλο βαθμό όλη η επιφάνεια. Με δεδομένη την κλίμακα των εικόνων και τη χρήση του λογισμικού επεξεργασίας εικόνων ImageJ μετρήθηκαν τα κύτταρα ανά μονάδα επιφάνειας mm^2 . Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν τα κύτταρα για τα control δείγματα, για την ακτινοβολημένη και τη μη ακτινοβολημένη περιοχή των δειγμάτων χιτοζάνης, και για τις 3 συνολικές διάρκειες πειραμάτων. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 29: Πυκνότητα κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας

Οι μπάρες του διαγράμματος προέκυψαν έπειτα από την εξαγωγή του μέσου όρου των μετρήσεων. Με βάση όλες τις μετρήσεις υπολογίστηκε το τυπικό σφάλμα και προστέθηκε στα διαγράμματα.

Είναι σαφές και από το διάγραμμα ότι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται καλύτερα στο control δείγμα σε σύγκριση με τη χιτοζάνη. Μόνο στην καμπύλη 1 ημέρας φαίνονται να έχουν παρόμοια απόκριση, όμως αυτό αλλάζει με το πέρασμα των ημερών.

Οι εικόνες 23,24 που αναφέρονται σε 1 ημέρα καλλιέργειας δείχνουν παρόμοιο αριθμό κυττάρων και στα 3 είδη επιφάνειας. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό στα control δείγματα με το πέρασμα των ημερών (εικόνες 25, 27) , και πολύ πιο αργά στη μη ακτινοβολημένη περιοχή της χιτοζάνης (εικόνες 26ii, 28ii). Ελάχιστη αύξηση του πληθυσμού παρατηρείται στην ακτινοβολημένη επιφάνεια (εικόνες 26i, 28i).

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα παρατηρούμενα στο SEM, τα οποία έδειξαν μειωμένη προσκόλληση των κυττάρων στα ικρίωματα χιτοζάνης. . . Η παρατηρούμενη συμπεριφορά των κυττάρων CAL51 στα υποστρώματα χιτοζάνης θα μπορούσε να σχετίζεται με το βαθμό αποακετυλίωσης αυτής καθώς η συμπεριφορά διαφόρων κυτταρικών τύπων κατόπιν έκθεσης σε χιτοζάνη σχετίζεται άμεσα με αυτόν. Έχει βρεθεί ότι ευνοείται ο πολλαπλασιασμός διαφορετικών τύπων κυττάρων ανάλογα με το βαθμό αποακετυλίωσης του πολυμερούς.³⁶

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η επίδραση του παλμικού laser στο βιοπολυμερές της χιτοζάνης αξιοποιώντας μεθοδολογίες ευρέως διαδεδομένες ως προς το χαρακτηρισμό πολυμερών. Έπειτα, διερευνήθηκε η χρήση των υποστρωμάτων σε εφαρμογές σχετικές με τη μελέτη της απόκρισης καρκινικών κυττάρων στα βιομιμικά αυτά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η πιθανότητα να εμφανίζουν τα κύτταρα CAL51 παρόμοια συμπεριφορά με τα NIH – 3T3 κύτταρα, τα οποία προσκολλώνται επιλεκτικά στην ακτινοβολημένη περιοχή υμενίων χιτοζάνης.

Η απεικόνιση της επιφάνειας που προέκυψε έπειτα από την ακτινοβολή στο SEM έδειξε μια πορώδη δομή που επιτρέπει την προσκόλληση και την ανάπτυξη κυτταρικών ιστών, καθώς ευνοεί την κυκλοφορία θρεπτικών ουσιών και προϊόντων του μεταβολισμού των κυττάρων. Έτσι, η δομή αυτή παρομοιάζει τον εξωκυττάριο χώρο και θα μπορούσε να αποτελέσει ικανοποιητικό υπόστρωμα για εφαρμογές της μηχανικής ιστών. Οι μετρήσεις διαβρεξιμότητας έδειξαν αύξηση της υδροφιλικότητας της επιφάνειας έπειτα από την ακτινοβολή ενώ η φασματοσκοπία UV-Vis έδειξε ότι γενικά η χιτοζάνη φαίνεται να διατηρεί τη δομή της πριν και μετά την ακτινοβολή όσον αφορά τις χρωμοφόρες ομάδες καθώς δεν μεταβλήθηκαν οι περιοχές απορρόφησης. Η αύξηση της απορρόφησης για την ακτινοβολημένη επιφάνεια, ωστόσο, ίσως να σχετίζεται με αύξηση του βαθμού οξειδωσης του πολυμερούς κατά την ακτινοβολή. Η οξείδωση αυτή θα μπορούσε να περιλαμβάνει το σχηματισμό καρβονυλίου ή καρβοξυλίου στις πολυμερικές αλυσίδες έπειτα από μερική αντίδραση των ομάδων υδροξυλίου που υπάρχουν σε αυτές, καθώς επίσης και τη διάσπαση τμημάτων της πολυμερικής αλυσίδας. Οι διεργασίες αυτές πιθανόν να λαμβάνουν χώρα σε μεγαλύτερο ποσοστό υπό την καταλυτική επίδραση του παλμικού laser, με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης της ακτινοβολημένης επιφάνειας. Η κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού CAL51 δεν φαίνεται με βάση τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης να αναπτύσσεται ικανοποιητικά στα ικρίωματα χιτοζάνης που μελετώνται.

Θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα ως προς την επίδραση της παλμικής ακτινοβολίας laser στα υμένια χιτοζάνης. Ενδεικτικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η φασματοσκοπία FT-IR. Καθώς η φασματοσκοπία FT-IR σχετίζεται με δονήσεις συγκεκριμένων δεσμών, είναι ικανή να δώσει λεπτομερέστερες πληροφορίες για τις φυσικοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται στη χιτοζάνη κατά την ακτινοβολή. Θα ήταν επίσης ενδιαφέρον να διερευνηθούν τα ικρίωματα που έχουν παραχθεί από άλλα βιοπολυμερή με τη βοήθεια της αρχής της φωτοαποδόμησης ως προς τη μελέτη απόκρισης διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων. Είναι πιθανό να προκύψουν αντίστοιχες δομές, οι ιδιότητες και η δραστηριότητα των οποίων αξίζει να μελετηθεί. Αναφορικά με την κυτταρική σειρά CAL51, για τη μελέτη της ως μοντέλο καρκινικού ιστού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο υπόστρωμα, καθώς τα κύτταρα αυτά δεν πολλαπλασιάζονται ικανοποιητικά στα ικρίωματα χιτοζάνης. Επίσης, θα μπορούσε να δοκιμαστεί χιτοζάνη με διαφορετικό βαθμό αποακετυλίωσης για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση αυτού του χαρακτηριστικού. Κρίνεται απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες

για τα κύτταρα CAL51 στην προσπάθεια να διευκρινιστεί η αιτία της μη ικανοποιητικής ανάπτυξης τους στα δείγματα.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αλλά και διαφορετικές μελέτες που συσχετίζουν τη χιτοζάνη με διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου, η χιτοζάνη μπορεί να εμφανίσει επιλεκτικά τοξικότητα ως προς τα καρκινικά κύτταρα, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη τους. Θα μπορούσε, έτσι, να δράσει υποβοηθητικά στη φαρμακευτική αντιμετώπιση καρκινοπαθειών καθώς γενικά δεν θεωρείται τοξική για υγιείς ιστούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*. 2008;213(1):66-72
2. Sonali K. Doke, Shashikant C. Dhawale, Alternatives to animal testing: A review, *Saudi Pharmaceutical Journal*, Volume 23, Issue 3, 2015, Pages 223-229,
3. Castells-Sala C, Alemany-Ribes M, Fernandez-Muiños T, Recha-Sancho L, Lopez-Chicon P et al. (2013) Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. *J Biochip Tissue chip* S2:004.
4. Narendra Reddy, Roopa Reddy, Qiuran Jiang. Crosslinking biopolymers for biomedical applications, *Trends in Biotechnology*, Volume 33, Issue 6, 2015, Pages 362-369
5. Farhad Garavand, Milad Rouhi, Seyed Hadi Razavi, Ilaria Cacciotti, Reza Mohammadi, Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 104, Part A, 2017, Pages 687-707,
6. Yu Xiong, Radostina Georgieva, Axel Steffen, Kathrin Smuda, Hans Bäumlner, Structure and properties of hybrid biopolymer particles fabricated by coprecipitation cross-linking dissolution procedure, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 514, 2018, Pages 156-164,
7. Sadia Atta, Shaista Khaliq, Atif Islam, Irtaza Javeria, Tahir Jamil, Muhammad Makshoof Athar, Muhammad Imtiaz Shafiq, Abdul Ghaffar, Injectable biopolymer based hydrogels for drug delivery applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 80, 2015, Pages 240-245,
8. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. and Thun, M. J. (2008), *Cancer Statistics, 2008*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 58: 71–96
9. Ashim K. Mitra, Vibhuti Agrahari, Abhirup Mandal, Kishore Cholkar, Chandramouli Natarajan, Sujay Shah, Mary Joseph, Hoang M. Trinh, Ravi Vaishya, Xiaoyan Yang, Yi Hao, Varun Khurana, Dhananjay Pal, Novel delivery approaches for cancer therapeutics, *Journal of Controlled Release*, Volume 219, 2015, Pages 248-268,
10. L. Urech, T. Lippert, C.R. Phipps, A. Wokaun, Polymer ablation: From fundamentals of polymer design to laser plasma thruster, *Applied Surface Science*, Volume 25 3, Issue 15, 2007, Pages 6409-6415,
11. Nakayama, Yasuhide & Matsuda, Takehisa. (1995). Surface microarchitectural design in biomedical applications: Preparation of microporous polymer surfaces by an excimer laser ablation technique. *Journal of biomedical materials research*. 29. 1295-301..
12. <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>

13. Vida-Simiti, Ioan & Jumate, N & Chicinas, Ionel & Batin, Gabriel. (2004). Applications of Scanning Electron Microscopy (SEM) in Nanotechnology and Nanoscience
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>
15. <http://nptel.ac.in/courses/102103044/module3/lec15/2.html>
16. . Daniel C. Harris, Ποσοτική χημική ανάλυση, Τόμος Β', Κεφάλαιο 18, σελ.434-436, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
17. <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/spec/uv-vis/uv-vis.htm>
18. Perkampus, Heinz-Helmut. UV-VIS Spectroscopy and its Applications. Springer Science & Business Media, 2013.
19. Aruna U. et al. Role of chitosan nanoparticles in cancer therapy. International Journal of Innovative Pharmaceutical Research. 2013,4(3),318-324.
20. Salehi, Fahimeh Behboudi, Hossein Ardestani, Sussan K Kavooosi, Gholamreza. Chitosan promotes ROS-mediated apoptosis and S phase cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells: evidence for intercalative interaction with genomic DNA. 2017. RSC Advances. 2017,7, 43141-43150
21. Kumbar, Sangamesh, Cato T. Laurencin, and Meng Deng. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* , 2014.
22. Lambertus A.M. van den Broek, Rutger J.I. Knoop, Frans H.J. Kappen, Carmen G. Boeriu. *Chitosan films and blends for packaging material*, Carbohydrate Polymers, Volume 116, 2015, Pages 237-242
23. P.W. Atkins, J. De Paula. *Φυσικοχημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2014
24. Sang-Ho Yoo, Ji-Soo Lee, Seung Young Park, Young-Suk Kim, Pahn-Shick Chang, Hyeon Gyu Lee, Effects of selective oxidation of chitosan on physical and biological properties, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 35, Issues 1–2, 2005, Pages 27-31
25. Liu K, Kim Y, Noh H. ArF Excimer Laser Micromachining of MEMS Materials: Characterization and Applications. ASME. J. Micro Nano-Manuf. 2014;2(2):021006-021006-13.
26. M. Castillejo, E. Rebollar, M. Oujja, M. Sans, A. Selimis, M. Sigletou, S. Psycharakis, A. Ranella, and C. Fotakis. *Fabrication of porous biopolymer substrates for cell growth by UV laser: the role of pulse duration*. Applied Surface Science, Volume 258, 2012, Pages 8919–8927
27. Giovanni J, Le François D, Zanghellini E, et al. Establishment and characterisation of a new tumorigenic cell line with a normal karyotype derived from a human breast adenocarcinoma. British Journal of Cancer. 1990;62(1):8-13.
28. <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>
29. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP. 2012;16(3):400-405.
30. Shively, Shawn. The use of HMDS (hexamethyldisilazane) to Replace Critical Point Drying (CPD) in the Preparation of Tardigrades for SEM (Scanning

- Electron Microscope) Imaging. Transactions of the Kansas Academy of Science. 2009. 112. 198-200.
31. Wen Z-S, Liu L-J, Qu Y-L, OuYang X-K, Yang L-Y, Xu Z-R. Chitosan Nanoparticles Attenuate Hydrogen Peroxide-Induced Stress Injury in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. *Marine Drugs*. 2013;11(10):3582-3600
 32. Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem*. 1991;66(6):297-302
 33. A.P.P. Praxedes, A.J.C. da Silva, R.C. da Silva, R.P.A. Lima, J. Tonholo, A.S. Ribeiro, I.N. de Oliveira, Effects of UV irradiation on the wettability of chitosan films containing dansyl derivatives, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 376, Issue 1, 2012, Pages 255-261,
 34. Kumirska J, Czerwicka M, Kaczyński Z, et al. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs*. 2010;8(5):1567-1636
 35. Hassan A. Abd El-Rehim, Naeem M. El-Sawy, El-Sayed A. Hegazy, El-Sayed A. Soliman, Ahmed M. Elbarbary, Improvement of antioxidant activity of chitosan by chemical treatment and ionizing radiation, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 50, Issue 2, 2012, Pages 403-413
 36. Gao Wenjuan, Lai James C. K., Leung Solomon. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Frontiers in Physiology*, Volume 3, 2012, Pg. 321