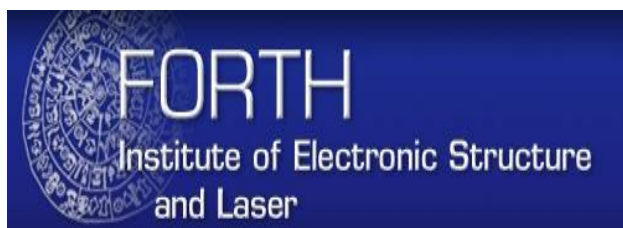


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ: Η ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ Ο ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ  
ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΑΠΟ ΕΚΜΑΓΕΙΟ ΓΙΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΠΕΤΡΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ: ΔΡ. ΣΤΡΑΤΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ  
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΖΕΡ-ΙΤΕ

ΚΑΘ. ΜΗΤΡΑΚΗ ΑΝΝΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΔΡ. ΡΑΝΕΛΛΑ ΑΝΘΗ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ  
ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΖΕΡ-ΙΤΕ

6 ΙΟΥΛΙΟΥ 2021, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	3
Μηχανική ιστοών.....	3
Εξωκυττάρια μήτρα.....	6
Ακτίνη κυτταροσκελετού.....	6
Προσκόλληση κυττάρων.....	7
Η επίδραση της επιφανειακής χημείας και της τοπογραφίας της εξωκυττάριας μήτρας στα κύτταρα.....	8
2. Τεχνικές κατασκευής ικριωμάτων.....	9
Ερευνητική δραστηριότητα.....	13
Κατασκευή υποστρωμάτων πυριτίου με επεξεργασία λέιζερ υπερταχέων παλμών και η χρήση τους ως ικρίωμα για την καλλιέργεια κυττάρων.....	22
Σκοπός μεταπτυχιακής εργασίας.....	25
3. Υλικά - Εργαστηριακά όργανα - Μέθοδοι.....	25
Πολυμερές PLGA.....	25
MSCs.....	27
SEM.....	27
Confocal.....	27
Κατασκευή ρεπλικών PLGA.....	27
Χαρακτηρισμός ρεπλικών PLGA.....	29
Ανάπτυξη των κυττάρων MSCs σε ρέπλικες PLGA.....	29
4. Αποτελέσματα και παρατηρήσεις-Συζητήσεις.....	31
Παρατήρηση μορφολογίας ρεπλικών PLGA.....	31
Χαρακτηρισμός ρεπλικών PLGA.....	32
Μελέτη της ανάπτυξης των MSCs σε ρέπλικες PLGA.....	37
5. Μελλοντικά σχέδια.....	47
6. Βιβλιογραφία.....	48

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ο σχεδιασμός βιοεπιφανειών είναι ζωτικής σημασίας, καθώς οι διεπαφές εμπλέκονται άμεσα στην σύνδεση του υλικού και ενός συγκεκριμένου βιομορίου ή κυττάρου. Παράμετροι υλικού όπως η τοπογραφία, η επιφανειακή μορφολογία, η φυσική δομή και η χημική σύνθεση παίζουν βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το βιολογικό περιβάλλον. Παρά την περιορισμένη πολυπλοκότητα που μπορεί να επιτευχθεί στα υλικά σε σύγκριση με τα περίπλοκα χαρακτηριστικά που βρίσκονται στην φύση και που δύσκολα μπορούν να μιμηθούν από συνθετική άποψη, αρκετές καινοτομίες έχουν αναπτυχθεί στον σχεδιασμό υλικών, όπως την προετοιμασία μοτίβων νανο/μικρο-κλίμακας με ελεγχόμενο τρόπο. Οι εξελίξεις στην μικρο- και νανο-κατασκευή προσφέρουν μοναδικές ευκαιρίες για την κατασκευή δομών. Σήμερα, διατίθεται μια ποικιλία προσεγγίσεων νανο- και μικρο-κατασκευής που έχουν συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην εκπλήρωση των απαιτήσεων για ένα πλήθος εφαρμογών στον τομέα της νανο-βιοτεχνολογίας, όπως στην μηχανική ιστών για την κατασκευή εμφυτεύσιμων ιατρικών συσκευών. Η λιθογραφία είναι ίσως η πιο εκτεταμένη προσέγγιση για την δημιουργία μικροδομών και νανοδομών σε επιφάνειες. Οι λιθογραφικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν διάφορες εναλλακτικές λύσεις όπως επιφανειακή υφή μέσω της χρήσης εξαιρετικά γρήγορων λέιζερ όπως femtosecond, μαλακή λιθογραφία όπως χύτευση αντιγράφων κτλ. Υπάρχει αυξημένη έρευνα για την κατασκευή τέτοιων δομών και στην συνέχεια η χρήση τους ως ικρίωματα για τα κύτταρα για να μελετηθεί η σχέση της επιφάνειας του ικρίωματος και της κυτταρικής απόκρισης που προκαλεί.

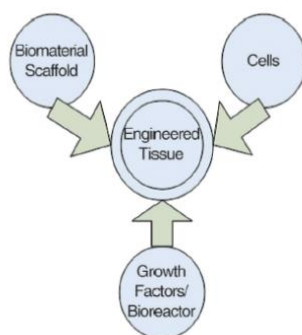
Η μεταπτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην κατασκευή πολυμερικών μαλακών ικρίωμάτων PLGA με την τεχνική μαλακής λιθογραφίας, συγκεκριμένα την χύτευση αντιγράφων έχοντας ως κύριο άκαμπτο και μη βιοαποικοδομήσιμο καλούπι επιφάνειες πυριτίου που φέρουν συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας που κατασκευάστηκαν με την χρήση femtosecond λέιζερ υπερταχέων παλμών αλλάζοντας την πυκνότητα ενέργειας της δέσμης λέιζερ κάθε φορά για την επιθυμητή τραχύτητα και στην συνέχεια τον χαρακτηρισμό αυτών, όπως η τεχνική αποικοδόμησης, αφού συνήθως ένα ικρίωμα δεν κατασκευάζεται ως μόνιμο εμφύτευμα. Επίσης, στα πολυμερικά ικρίωματα PLGA καλλιεργούνται MSCs, με σκοπό την παρατήρηση της επίδρασης της τοπογραφίας και του υλικού στην καλλιέργεια των MSCs, όπως προσκόλληση και μορφολογία.

## **ΜΕΡΟΣ 1**

### **ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΙΣΤΩΝ**

Η ανεπάρκεια οργάνων και η απώλεια ιστών λόγω μιας ασθένειας ή ενός τραύματος είναι τα κύρια προβλήματα στην ανθρώπινη υγειονομική περίθαλψη. Η μηχανική ιστών είναι ο νέος τομέας έρευνας που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής και της επιστήμης της ζωής στην ανάπτυξη βιολογικών υποκατάστατων που αποκαθιστούν, διατηρούν ή βελτιώνουν την λειτουργία των ιστών ή των οργάνων». Η μηχανική ιστών απευθύνεται στην δημιουργία

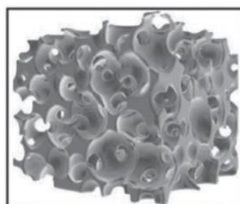
λειτουργικών τρισδιάστατων ιστών και χρησιμοποιεί Α) ικρίσματα, Β) κύτταρα και Γ) βιοδραστικά μόρια (Εικόνα 1). [1]



Εικόνα 1: Σχεδιάγραμμα Μηχανικής ιστών [1]

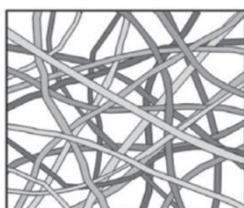
#### Α) Ικρίσματα

Ένας κύριος στόχος στην μηχανική ιστών είναι ο σχεδιασμός τρισδιάστατου ικρίματος, δηλαδή μια τρισδιάστατη τεχνητή κατασκευή *in vitro*, το οποίο θα μπορεί να μιμείται την εξωκυττάρια μήτρα του κυττάρου που καλλιεργείται σε αυτό, ώστε να δημιουργήσει ιστό με σκοπό να μπορεί χρησιμοποιηθεί ως εμφυτεύσιμη ιατρική συσκευή στο εσωτερικό του σώματος. Το ικρίσμα πρέπει να μοιάζει με την ανατομική δομή του ιστού και να μιμείται την λειτουργία και την βιομηχανική του αρχικού ιστού.[1] Η ταξινόμηση του ικρίματος μπορεί να γίνει με βάση την γεωμετρία του ή τον τύπο του υλικού [1]. Με βάση της γεωμετρία: α) Πορώδη ικρίσματα (Εικόνα 2) που περιέχουν αλληλοσυνδεδεμένες δομές πόρων προσανατολισμένες ή τυχαίες. [2]



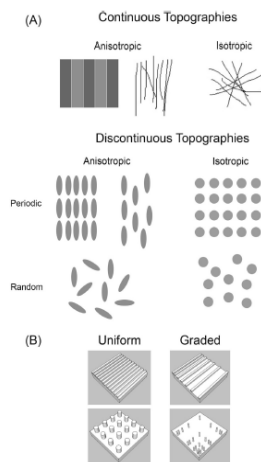
Εικόνα 2: Πορώδη ικρίσματα [2]

β) Ινώδη ικρίσματα με τυχαία ή με προσανατολισμό ίνες (Εικόνα 3) που μιμούνται την δομή της εξωκυττάριας μήτρας [2]



Εικόνα 3: Ινώδη ικρίσματα [2]

γ) Μικρο-νανοδομημένα ικρίσματα (Εικόνα 4), τα οποία έχουν επακριβής ελεγχόμενη περίπλοκη μικροαρχιτεκτονική – τοπογραφία. [3]



Εικόνα 4: Μικρο-νανοδομημένα ικρίωματα [3]

Με βάση του υλικού: Διάφοροι τύποι υλικών έχουν χρησιμοποιηθεί. Αυτά περιλαμβάνουν α) κεραμικά, β) φυσικά ή συνθετικά πολυμερή και γ) μέταλλα.[1] Σε πολλές εφαρμογές μηχανικής ιστών, ικρίωματα χρησιμοποιούνται για να παρέχουν στα κύτταρα ένα κατάλληλο περιβάλλον ανάπτυξης, βέλτιστα επίπεδα οξυγόνου και αποτελεσματική μεταφορά θρεπτικών συστατικών καθώς και μηχανική ακεραιότητα. Τα ικρίωματα στοχεύουν στην παροχή τρισδιάστατων περιβαλλόντων για να φέρουν τα κύτταρα σε κοντινή απόσταση, ώστε να μπορούν να συγκεντρωθούν για να σχηματίσουν ιστούς. Στην ιδανική περίπτωση, καθώς το ικρίωμα αποικοδομείται, τα κύτταρα εναποθέτουν τα δικά τους μόρια εξωκυττάριας μήτρας και τελικά σχηματίζουν τρισδιάστατες δομές που μιμούνται στενά την αρχιτεκτονική των φυσικών ιστών. Ο τελικός στόχος είναι δηλαδή η κατασκευή ικριωμάτων να ταιριάζει με τις φυσικές, χημικές και μηχανικές ιδιότητες του ιστού. [1]

## B) Κύτταρα

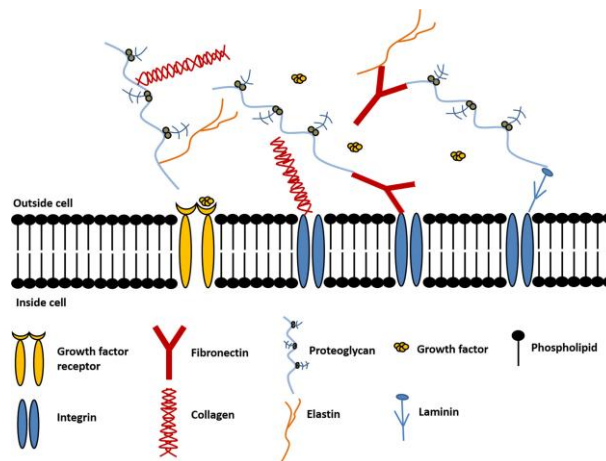
Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: α) Αυτόλογα κύτταρα που ανήκουν στον ίδιο οργανισμό στον οποίο εμφυτεύονται (αυτομόσχευμα). β) Αλλογενή κύτταρα που προέρχονται από τον οργανισμό του δότη που ανήκει στο ίδιο είδος με τον δέκτη (αλλομόσχευμα). γ) Ξενογενή κύτταρα που λαμβάνονται από γενετικά παρόμοιους οργανισμούς, πχ εργαστηριακά μοντέλα ζώων με τον δέκτη. δ) Βλαστικά κύτταρα που είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν διαφορετικές μορφές εξειδικευμένων κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα χωρίζονται σε εμβρυϊκά και σε ενήλικα. [4],[5]

## Γ) Βιοδραστικά μόρια

Τα βιοδραστικά μόρια ή αυξητικοί παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν σήματα που απαιτούνται από τα κύτταρα για να επιταχύνουν την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό. [5]

## ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΗΤΡΑ

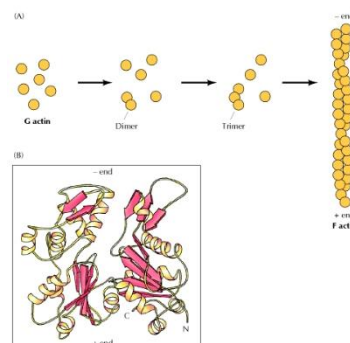
Τα κύτταρα περιβάλλονται από μια τρισδιάστατη εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular matrix, ECM). Η εξωκυττάρια μήτρα είναι το περιβάλλον των κυττάρων και αποτελεί το προϊόν των εκκρίσεων τους, ένα μείγμα από δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες σε μια μοναδική και εξειδικευμένη τρισδιάστατη δομή για κάθε ιστό. Παρέχει την βασική φυσική σκαλωσιά για τα κύτταρα, οργανώνει τα κύτταρα στον χώρο και εκκινεί επίσης ζωτικής σημασίας φυσικά και βιοχημικά συνθήματα απαραίτητα για τις λειτουργίες του κυττάρου όπως προσκόλληση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Γενικά, όμως η ECM (Εικόνα 5) αποτελείται από αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες, όπως ινονεκτίνη, κολλαγόνο, ελαστίνη, λαμινίνη. [6]



Εικόνα 5: ECM [6]

## ΑΚΤΙΝΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ

Ο κυτταροσκελετός είναι ένα δίκτυο από ινίδια που εκτείνονται σε όλο το κυτταρόπλασμα και σχηματίζουν ένα δυναμικό σκελετό που χρησιμεύει στην στήριξη και στην κίνηση του κυττάρου δίνοντας την δυνατότητα στο κύτταρο να αλλάζει σχήμα. Σημαντικά μόρια του κυτταροσκελετού είναι τα μικροϊνίδια ή ινίδια ακτίνης (Εικόνα 6), τα οποία είναι συμπαγείς ράβδοι. Ο ρόλος τους είναι η μυϊκή σύσπαση σε συνεργασία με την μυοσίνη που συνδέεται με την ακτίνη. Τα ινίδια ακτίνης προσδιορίζουν το σχήμα του κυττάρου με τον πολυμερισμό της και εμπλέκονται σε μια ποικιλία δραστηριοτήτων, όπως η κίνηση. [4],[7]

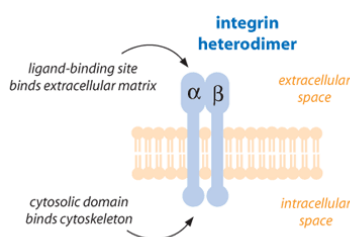


Εικόνα 6: Ινίδια ακτίνης [7]

## ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

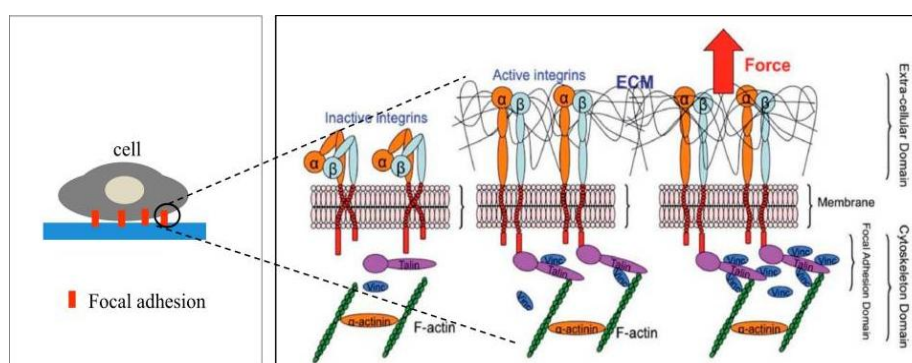
Η προσκόλληση κυττάρου είναι η ικανότητα ενός κυττάρου να συνδεθεί σε μία εξωκυττάρια μήτρα. Η κακή πρόσφυση θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρική απόπτωση. Η προσκόλληση θεωρείται ως η αρχική ένδειξη της αλληλεπίδρασης του κυττάρου με το γύρω περιβάλλον του, πριν από άλλες λειτουργίες, όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση.[8]

Τα σημαντικότερα μόρια προσκόλλησης κυττάρου-υποστρώματος είναι οι ιντεγκρίνες (διαμεμβρανικός αβ ετεροδιμερείς υποδοχέας). Οι ιντεγκρίνες (Εικόνα 7) αποτελούνται από δύο υπομονάδες γλυκοπρωτεΐνης, οι οποίες εκτείνονται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης που συνδέουν το εσωτερικό του κυττάρου με το εξωτερικό του. Αυτές οι υπομονάδες καλούνται άλφα αλυσίδα και βήτα αλυσίδα που δεσμεύονται σε ένα μοτίβο RGD (αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ), μια αλληλουχία που υπάρχει σε πολλές πρωτεΐνες της ECM. [8],[9]



Εικόνα 7: Ιντεγκρίνη [9]

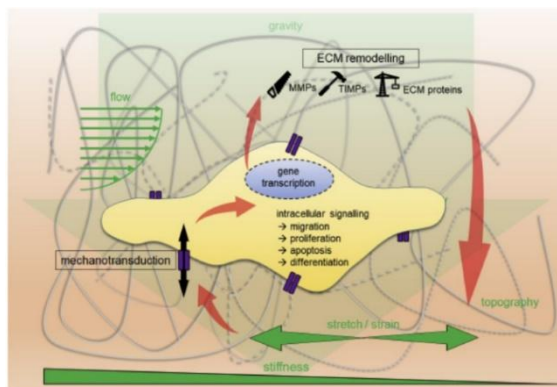
Όταν οι ιντεγκρίνες αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε πρωτεΐνες της ECM, τότε αρχίζει η ομαδοποίηση των ιντεγκρινών, η οποία ενεργοποιεί την πρόσληψη αρκετών ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών προκαλώντας έτσι την πυρήνωση ενός κυτταροπλασματικού συμπλόκου πρωτεϊνών, την πλάκα προσκόλλησης ή εστιακό σύμπλοκο. Η πλάκα πρόσφυσης συναρμολογείται και ωριμάζει με ιεραρχικό τρόπο, αυξάνεται σε μέγεθος και εμπλουτίζεται σε χαρακτηριστικές πρωτεΐνες όπως βινκουλίνη, κινάση εστιακής προσκόλλησης, ταλίνη, και παξιλλίνη (πρωτεΐνες προσκόλλησης) και ονομάζεται ώριμες εστιακές συμφύσεις (θέσεις προσκόλλησης-εστιακή προσκόλληση). Οι εστιακές συμφύσεις ενώνονται με τα μικροϊνίδια ακτίνης και μπορούν να αναδιαμορφώσουν μηχανικά μέσω δυνάμεων ή με ενδοκυτταρική σηματοδότηση το σχήμα των κυττάρων με τον πολυμερισμό της ακτίνης, καθώς και να επηρεάσουν κι άλλες λειτουργίες των κυττάρων (Εικόνα 8). [8]



Εικόνα 8: Αλληλεπίδραση ιντεγκρίνης/ECM [8]

## Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΑΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΜΗΤΡΑΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα αναδιοργανώνονται σύμφωνα με την αλληλεπίδραση με την ECM. Οι πιο σημαντικοί παράμετροι που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση κυττάρου-ECM (Εικόνα 9) είναι α. η επιφανειακή χημεία και β. η τοπογραφία.[10]



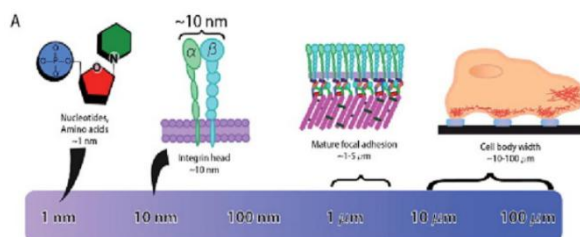
Εικόνα 9: Παράμετροι που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση κυττάρου-ECM [10]

### α. Επιφανειακή χημεία

Η εξωκυττάρια μήτρα περιλαμβάνει διαλυτές και αδιάλυτες πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμεύουν ως υποστρώματα για τα κύτταρα. Οπότε, η χημεία της επιφάνειας έχει μεγάλο αντίκτυπο στην αρχική προσκόλληση των κυττάρων, η οποία θα επηρεάσει ακόμη περισσότερο την βιωσιμότητά τους. [10]

### β. Τοπογραφία

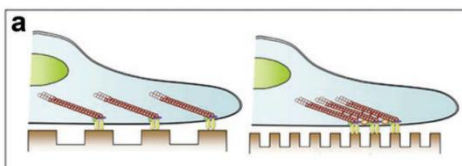
Η τοπογραφία αναφέρεται στα δομικά χαρακτηριστικά της ECM και περιλαμβάνει την αρχιτεκτονική, την γεωμετρία, το μέγεθος και την οργάνωση του δικτύου μήτρας. Η χωρική διάταξη των σημάτων ECM και του μηχανισμού με τον οποίο αυτά τα σήματα ρυθμίζουν την συμπεριφορά των κυττάρων διακρίνονται σε τέσσερις κλίμακες μήκους (Εικόνα 10): i) μεμονωμένες πρωτεΐνες ECM (πχ λαμνίνη 1 nm), ii) κεφαλή υποδοχέα ιντεγκρίνης (10 nm), iii) ώριμες εστιακές συμφύσεις (1-5 μm) και iv) μεμονωμένα κύτταρα (10-100 μm). [10],[11]



Εικόνα 10: Κλίμακες μήκους [11]



Η πιο σημαντική επίδραση της τοπογραφίας μήτρας ECM στα κύτταρα είναι η επίδραση στην μορφολογία των κυττάρων, όπου αλλάζει το σχήμα των κυττάρων με μια διαδικασία γνωστή ως καθοδήγηση επαφής, όπου τα κύτταρα συμμορφώνονται σύμφωνα με την τοπογραφία καθώς οι εστιακές συμφύσεις συμμορφώνονται σύμφωνα με αυτήν (Εικόνα 11). Με τη σειρά του, το σχήμα των κυττάρων μπορεί να συνδέεται άμεσα με την λειτουργία και την συμπεριφορά των κυττάρων. Δηλαδή, τα τοπογραφικά σήματα ECM μπορούν να μεταδοθούν μέσω εστιακών συμφύσεων και του κυτταροσκελετού με την αναδιοργάνωση του συχνά μέσω ενός καταρράκτη σηματοδότησης ή μηχανικά μέσω δυνάμεων που ξεκινά με την ενεργοποίηση υποδοχέα ιντεγκρίνης. [10],[12]



Εικόνα 11: Επίδραση της τοπογραφίας μήτρας ECM στα κύτταρα [12]

## **ΜΕΡΟΣ 2**

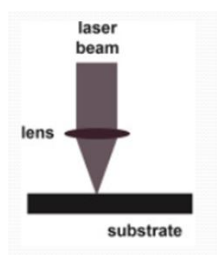
### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ**

Η μικροκατασκευή είναι απαραίτητη στον τομέα της επιστήμης και της τεχνολογίας. Υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή επιφανειακών δομών με διαστάσεις μικρού ή νανομέτρου. Τα τελευταία χρόνια, η μικροκατασκευή χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε βιοϊατρικές και βιολογικές εφαρμογές για την δημιουργία επιφανειακών δομών στην περιοχή μικρομέτρων που είναι η κλίμακα μεγέθους των κυττάρων και στην περιοχή νανομέτρων που είναι η κλίμακα μεγέθους υπό των κυττάρων. Η λιθογραφία είναι ίσως η πιο εκτεταμένη προσέγγιση για την δημιουργία μικροδομών και νανοδομών. Η λιθογραφία είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για την μεταφορά και αναπαραγωγή ή την δημιουργία ενός χημικού ή τοπογραφικού μοτίβου/σχεδίου σε ένα υπόστρωμα μέσω μιας διαδικασίας εκτύπωσης ή χάραξης. Στην λιθογραφία ανήκουν οι τεχνικές, όπως η επιφανειακή υφή μέσω της χρήσης εξαιρετικά γρήγορων λέιζερ και η μαλακή λιθογραφία. [13].[14]

#### **A. Επιφανειακή υφή μέσω της χρήσης εξαιρετικά γρήγορων λέιζερ**

Μία από τις πιο πρόσφατα αναπτυσσόμενες τεχνικές που ανήκουν στις αφαιρετικές κατασκευαστικές προσεγγίσεις είναι η επιφανειακή υφή μέσω της χρήσης εξαιρετικά γρήγορων λέιζερ (Εικόνα 12), όπως femtosecond. Αυτή η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην αρχή της αφαίρεσης λέιζερ και διεγείρει τοπικά ορισμένες περιοχές ενός υλικού με ελάχιστη ζημιά στις γύρω περιοχές. Αυτό οφείλεται στην μικρή διάρκεια του παλμού, η οποία επιτρέπει την επίτευξη υψηλότερης έντασης κατωφλίου διέγερσης χωρίς αύξηση της έντασης της δέσμης λέιζερ. Έτσι, μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της ζημιάς στις γύρω περιοχές και η ζημιά στο υλικό είναι μικροσκοπική, πιο συγκεκριμένα πολύ κοντά στο επίκεντρο του όγκου εστίασης. Δηλαδή, η εναπόθεση ενέργειας στο υλικό γίνεται εξαιρετικά γρήγορα και έτσι ελαχιστοποιούνται τα θερμικά φαινόμενα. Συνεπώς, περιορίζεται κατά πολύ η περιοχή που επηρεάζεται από την μεταφορά της θερμότητας και

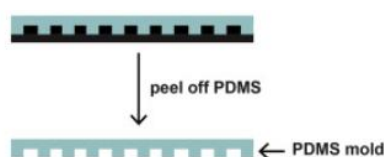
η θερμότητα δεν διαχέεται σε όλο το υλικό. Κατά συνέπεια, μπορεί να επιτευχθεί ακριβής δομή στην επιφάνεια του υλικού τόσο στις κλίμακες του νανομέτρου όσο και του μικρομέτρου.[15],[16]



Εικόνα 12: Επιφανειακή υφή μέσω της χρήσης εξαιρετικά γρήγορων λέιζερ [15]

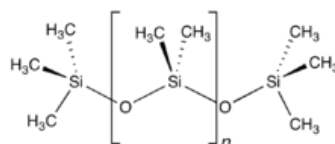
### B. Μαλακή λιθογραφία

Η μαλακή λιθογραφία αναφέρεται σε μια ομάδα τεχνικών που βασίζονται στην χρήση πολυμερών ως σφραγίδα για την αναπαραγωγή και την μεταφορά σχεδίων σε επιφάνειες. Η σφραγίδα είναι ένα εύκαμπτο παραμορφώσιμο ελαστομερές υλικό που κατασκευάζεται από άκαμπτο σκληρό κύριο καλούπι, το οποίο μπορεί να κατασκευαστεί πχ με χρήση εξαιρετικά γρήγορων λέιζερ. Δηλαδή, το προ-πολυμερές που θα χρησιμοποιηθεί ως σφραγίδα (Εικόνα 13) χύνεται πάνω στο κύριο καλούπι και στην συνέχεια σκληραίνεται με θέρμανση ή UV ακτινοβολία. Μετά, αποκολλιέται το πολυμερές από το κύριο καλούπι και έτσι η σφραγίδα φέρει το συμπληρωματικό μοτίβο του κύριου καλουπιού. [13],[14],[17]



Εικόνα 13: Κατασκευή σφραγίδας [15]

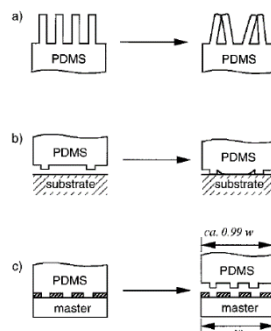
Η σφραγίδα μπορεί να είναι υλικά, όπως σταυρωτά συνδεδεμένη πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS), πολυουρεθάνες, πολυϊμίδια και ρητίνες Novolac κτλ. Συνήθως, ως σφραγίδα χρησιμοποιείτε το PDMS. Το PDMS (Εικόνα 14) είναι ένα οργανικό πολυμερές με βάση το πυρίτιο.



Εικόνα 14: PDMS [4]

Το PDMS προσφέρει μια σειρά από μοναδικά και ελκυστικά χαρακτηριστικά. (α) Έχει ιξωδοελαστική συμπεριφορά: Από την μία πλευρά, το υλικό πρέπει να είναι αρκετά μαλακό για να κάνει μια συμβατή επαφή με το υπόστρωμα, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να είναι αρκετά σκληρό για να επιτρέπει την διαμόρφωση υψηλής ανάλυσης και την ακρίβεια μεγάλης εμβέλειας. (β) Το PDMS παρέχει μια επιφάνεια με χαμηλή ελεύθερη

διεπιφανειακή ενέργεια και καλή χημική σταθερότητα: Τα περισσότερα μόρια ή πολυμερή που διαμορφώνονται δεν προσκολλώνται ανεπανόρθωτα ή δεν αντιδρούν με την επιφάνεια του PDMS που επιτρέπει την σωστή επαφή με το υπόστρωμα χωρίς εφαρμοζόμενη πίεση και μη καταστρεπτική απελευθέρωση από δομές με σχέδια. (γ) Το ελαστομερές PDMS έχει καλή θερμική σταθερότητα και τα προ-πολυμερή που μορφοποιούνται μπορούν να σκληρυνθούν θερμικά. (δ) Το ελαστομερές PDMS είναι οπτικά διαφανές έως 300 nm και τα προ-πολυμερή που μορφοποιούνται μπορούν επίσης να σκληρυνθούν με διασύνδεση με υπεριώδη ακτινοβολία. (ε) Το ελαστομερές PDMS είναι ανθεκτικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές. (ζ) Είναι εγγενώς υδρόφοβο, αλλά η επιφάνεια του μπορεί να τροποποιηθεί με σύντομη έκθεση σε UV/όζον, επεξεργασία πλάσματος  $O_2$  ή λειτουργική επιφάνεια μέσω σιλανίου για να γίνει υδρόφιλο. Ωστόσο, το PDMS έχει και τεχνικά προβλήματα (Εικόνα 15). Πρώτον, το PDMS συρρικνώνεται κατά 1% κατά την σκλήρυνση και το σκληρυμένο PDMS μπορεί εύκολα να διογκωθεί από έναν αριθμό μη πολικών οργανικών διαλυτών όπως τολουόλιο και εξάνιο. Δεύτερον, οι μικροδομές στην επιφάνεια του PDMS μπορούν να υποστούν παραμορφώσεις, οι οποίες εξαρτώνται από τον λόγο διαστάσεων (ύψος h/πλάτος l). Εάν ο λόγος διαστάσεων είναι πολύ μεγάλος, τότε οι μικροδομές στην επιφάνεια του PDMS υφίσταται σύζευξη ή πλευρική κατάρρευση, όπου τα γειτονικά μοτίβα κολλάνε μεταξύ τους. Εάν ο λόγος διαστάσεων είναι πολύ μικρός, τότε οι μικροδομές στην επιφάνεια του PDMS υφίσταται χαλάρωση ή κατάρρευση της στέγης, όπου το κάτω μέρος της σφραγίδας λυγίζει τόσο πολύ, ώστε να έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα. [4],[13],[14],[17],[18]

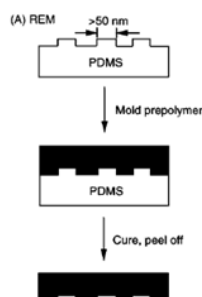


Εικόνα 15: Τεχνικά προβλήματα PDMS [18]

Υπάρχουν 5 τεχνικές μαλακής λιθογραφίας που χρησιμοποιούν ως σφραγίδα το PDMS και είναι οι εξής: [13],[14],[17],[18]

#### Χύτευση αντιγράφων (Εικόνα 16)

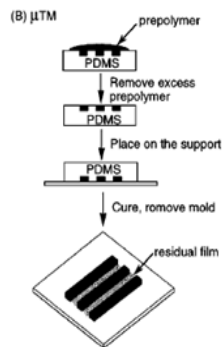
Στην επιφάνεια του καλούπιού PDMS χύνεται ένα υγρό προ-πολυμερές (UV ή θερμικά σκληρυνόμενα προ-πολυμερή), το οποίο στην συνέχεια σκληραίνεται με θέρμανση ή UV ακτινοβολία (οι διαλύτες απομακρύνονται). Μετά, αποκολλιέται το καλούπι PDMS και έτσι έχουμε το πολυμερές με το επιθυμητό μοτίβο.



Εικόνα 16: Χύτευση αντιγράφων [18]

Χύτευση με μικρομεταφορά (Εικόνα 17)

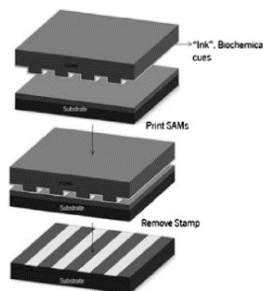
Υγρό προ-πολυμερούς εφαρμόζεται στην διαμορφωμένη επιφάνεια του PDMS και η περίσσεια υγρού απομακρύνεται με ένα επίπεδο PDMS ή με ρεύμα αζώτου. Το γεμισμένο καλούπι έρχεται σε επαφή με ένα υπόστρωμα και ακτινοβολείται με UV ή θερμαίνεται για να σκληρυνθεί το προ-πολυμερές. Στην συνέχεια, το καλούπι αποκολλείται για να αφήσει μοτίβα στην επιφάνεια του υποστρώματος.



Εικόνα 17: Χύτευση με μικρομεταφορά [18]

Εκτύπωση μικροεπαφής (Εικόνα 18)

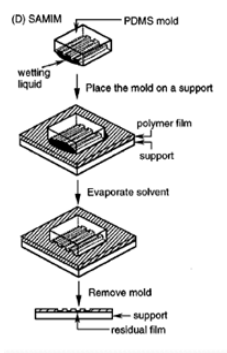
Ένα καλούπι PDMS βυθίζεται σε ένα διάλυμα υλικού προς μεταφορά (χημική συγγένεια μεταξύ καλουπιού PDMS και υλικού προς μεταφορά). Μόλις ο διαλύτης εξατμιστεί, τα μόρια υλικού συμμορφώνονται πάνω στην δομή του PDMS σχηματίζοντας συναρμολογημένες μονοστιβάδες. Στην συνέχεια, έρχεται σε επαφή με ένα υπόστρωμα, το PDMS πιέζεται και μετά αποκολλάται και έτσι το υλικό έχει μεταφερθεί πάνω στο υπόστρωμα.



Εικόνα 18: Εκτύπωση μικροεπαφής [19]

### Μικροχύτευση υποβοηθούμενη από διαλύτη (Εικόνα 19)

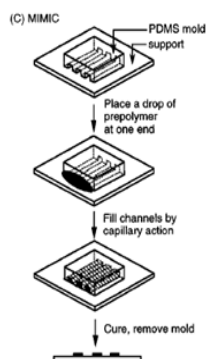
Το καλούπι PDMS διαβρέχεται με ένα διαλύτη που δεν επηρεάζει ή διογκώνει σε μικρό βαθμό (π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη) την δομή του PDMS και έρχεται σε επαφή με μια επιφάνεια ενός πολυμερούς. Ο διαλύτης διαλύει ή διογκώνει μια λεπτή στιβάδα του πολυμερούς και το προκύπτον υγρό ή ρευστό που περιλαμβάνει πολυμερές και διαλύτη συμμορφώνεται με την επιφανειακή τοπολογία του καλουπιού PDMS. Το πολυμερές στερεοποιείται καθώς ο διαλύτης διαλύεται και εξατμίζεται για να σχηματίσει ανάγλυφες δομές με σχέδιο συμπληρωματικό προς αυτό στην επιφάνεια του καλουπιού.



Εικόνα 19: Μικροχύτευση υποβοηθούμενη από διαλύτη [18]

### Μικροχύτευση σε τριχοειδή (Εικόνα 20)

Το καλούπι PDMS τοποθετείται στην επιφάνεια ενός υποστρώματος και η ανάγλυφη δομή στο καλούπι σχηματίζει ένα δίκτυο κενών καναλιών. Όταν ένα υγρό προ-πολυμερές χαμηλού ιξώδους τοποθετείται στα ανοικτά άκρα του δικτύου καναλιών, το υγρό γεμίζει αυθόρμητα τα κανάλια λόγω της τριχοειδούς δράσης. Μετά την πλήρωση των καναλιών και την σκλήρυνση του προ-πολυμερούς με θέρμανση ή UV ακτινοβολία ή εξάτμιση του διαλύτη σε ένα στερεό, το καλούπι PDMS αφαιρείται και ένα δίκτυο πολυμερούς παραμένει στην επιφάνεια του υποστρώματος.

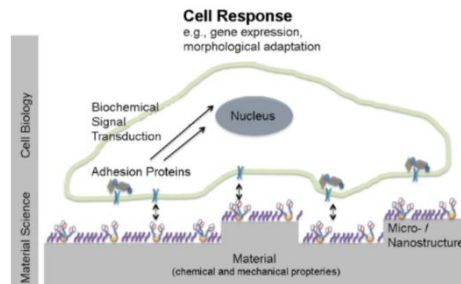


Εικόνα 20: Μικροχύτευση σε τριχοειδή [18]

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

Υπάρχει αυξανόμενη έρευνα για την χρήση τρισδιάστατων τεχνητών ικριωμάτων που μιμούνται το φυσικό εξωκυτταρικό περιβάλλον των κυττάρων, με τέτοιο τρόπο ώστε τα κύτταρα να μπορούν να λειτουργήσουν σαν in vivo και να μπορεί να μελετηθεί η επίδραση τους στις κυτταρικές λειτουργίες, όπως την μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση.

Ο στόχος της έρευνας αλληλεπιδράσεις υποστρώματος είναι η μεταξύ της επιφάνειας τοπογραφία) του κυτταρικής απόκρισης (21). Λαμβάνοντας αλληλεπίδρασης είτε στο μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών προσκόλλησης και των προσδεμάτων τους είτε στο μέγεθος των κυττάρων απαιτείται η αποτελεσματική δομή επιφανειών με ακρίβεια νανομέτρου έως μικρομέτρου. Οι παραδοσιακές καλλιέργειες κυττάρων γίνονται σε καλυπτρίδες ή σε συγκολλητικούς δίσκους, όπου λείπουν τα τοπογραφικά συνθήματα.



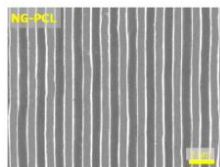
Δηλαδή, ο απώτερος για τις κυττάρου-μελέτη της σχέσης (χημεία και υποστρώματος και της που προκαλεί (Εικόνα υπόψη τις κλίμακες

Εικόνα 21: Αλληλεπίδραση υλικού-κυττάρου [20]

## ΜΕΡΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΥΛΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΧΥΤΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ

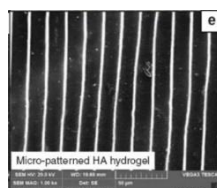
Από PDMS με αυλακώσεις κατασκευάστηκαν:

- Πολυκαπρολακτόνη (PCL) με αυλακώσεις (Εικόνα 22) [21]



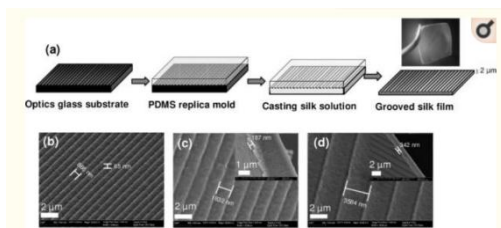
Εικόνα 22: SEM, PCL με αυλακώσεις [21]

- Υδρογέλη υαλουρονικού οξέος (HA) με αυλακώσεις (Εικόνα 23) [22]



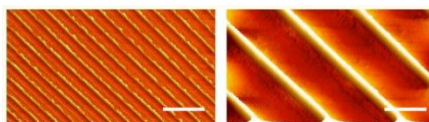
Εικόνα 23: SEM, υδρογέλη HA με αυλακώσεις [22]

- Φιλμ μεταξιού με αυλακώσεις (Εικόνα 24) [23]



Εικόνα 24: (α) Διαδικασία κατασκευής και (b)-(c)-(d) SEM φιλμ μεταξιού με αυλακώσεις σειρά αυξανόμενης τοπογραφία [23]

- Χιτίνη με αυλακώσεις (Εικόνα 25) [24]

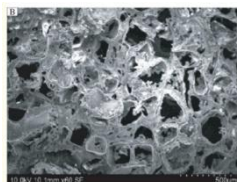


Εικόνα 25: AFM, χιτίνη με αυλακώσεις αριστερά μικρή τοπογραφία και δεξιά μεγάλη τοπογραφία [24]

#### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ: ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ

##### 1 παράδειγμα [25]

Πορώδη ικρίωματα PLGA (Εικόνα 26) με ανάμιξη πολυγαλακτικό οξύ PLA και πολυγλυκολικό οξύ PGA στις αναλογίες 80:20 (A), 75:25 (B) και 70:30 (C) που κατασκευάστηκαν με χύτευση διαλύτη/έκπλυση αλατιού βυθίστηκαν σε προσομοιωμένο σωματικό υγρό (SBF) *in vitro* για 14 και 21 ημέρες στους 37 ° C.

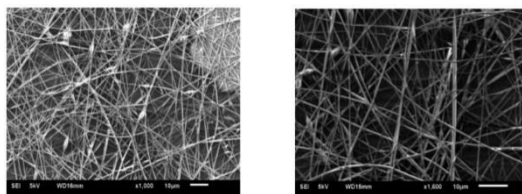


Εικόνα 26: SEM, πορώδες ικρίωμα PLGA

Το δείγμα C είχε επιταχυνόμενη απώλεια βάρους σε σύγκριση με τα άλλα δύο δείγματα και το ποσοστό αποικοδόμησης ήταν υψηλό όμως ο ρυθμός αποικοδόμησης δεν ήταν (περίπου 11% έως 22%). Το δείγμα B είχε σταθερό και βέλτιστο ρυθμό αποικοδόμησης (περίπου 9% έως 12%), ενώ το δείγμα A εμφάνισε χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης (περίπου 4% έως 8%) σε σύγκριση με τα άλλα δύο δείγματα.

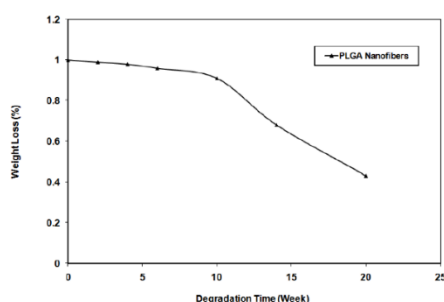
## 2 παράδειγμα [26]

Ικρίώματα PLGA (λακτίδιο:γλυκολίδιο 75:25,  $M_w=70.000$ ) με τυχαίες ίνες (Εικόνα 27) που παρασκευάστηκαν με ηλεκτρονική περιστροφή βυθίστηκαν σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά PBS στους  $37^\circ\text{C}$  για 4, 6, 10, 14 και 16 εβδομάδες.



Εικόνα 27: SEM, ικρίώματα PLGA με τυχαίες ίνες

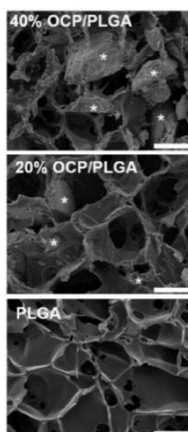
Η απώλεια βάρους του ικριώματος αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου αποικοδόμησης. Αρχικά, υπάρχει μια σταδιακή και ελαφρά μείωση του βάρους του δείγματος που συνεχίζεται για αρκετές εβδομάδες. Μετά από 10 εβδομάδες, παρατηρείται δραματική μείωση του βάρους (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Διάγραμμα απώλεια βάρους-Χρόνος (εβδομάδες)

## 3 παράδειγμα [27]

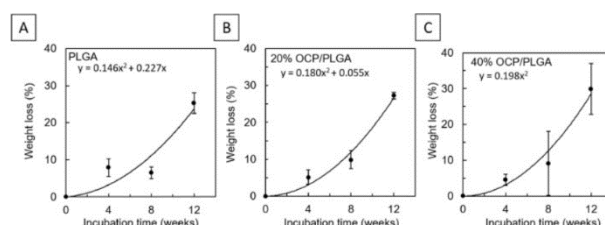
Πορώδη ικρίώματα PLGA (λακτίδιο:γλυκολίδιο = 75:25,  $M_w:25000$ ) και πορώδη ικρίώματα PLGA με φωσφορικό οκτασβέστιο (OCP) ποσοτήτων 20% και 40% OCP που κατασκευάστηκαν με χύτευση διαλύτη/έκπλυση αλατιού βυθίστηκαν σε PBS για 4, 8 και 12 εβδομάδες με ανάδευση περιστροφής στους  $37^\circ\text{C}$  (Εικόνα 29).





Εικόνα 29: SEM, πορώδη ικρίσματα PLGA και πορώδη ικρίσματα PLGA με OCP

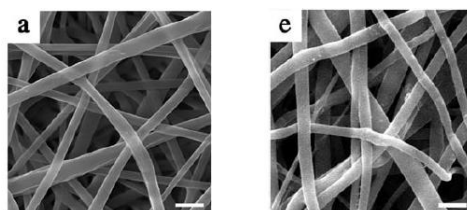
Ο ρυθμός απώλειας βάρους αυξήθηκε με αύξηση του χρόνου επώασης για όλα τα δείγματα, καθώς όταν αυξήθηκε η ποσότητα OCP, η απώλεια βάρους του PLGA αυξήθηκε (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Ρυθμός απώλειας βάρους-χρόνος (εβδομάδες)

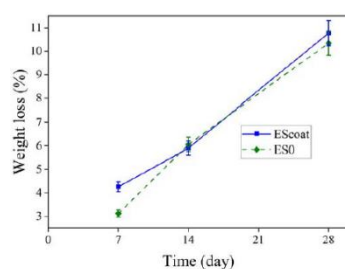
#### 4 παράδειγμα [28]

Ικρίσματα PLGA (75:25) με τυχαίες ίνες και ικρίσματα PLGA επικαλυμμένο με κολλαγόνο τύπου I με τυχαίες ίνες (Εικόνα 31) που παρασκευάστηκαν με ηλεκτρονική περιστροφή βυθίστηκαν σε PBS στους 37 ° C για 7, 14 και 28 ημέρες.



Εικόνα 31: SEM, (a) ικρίσματα PLGA με τυχαίες ίνες και (e) ικρίσματα PLGA επικαλυμμένο με κολλαγόνο με τυχαίες ίνες

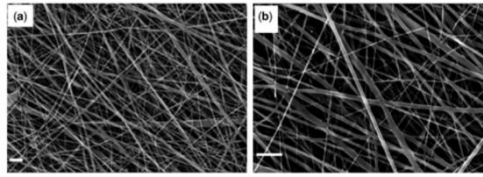
Την πρώτη εβδομάδα η απώλεια βάρους στο ικρίωμα PLGA επικαλυμμένο με κολλαγόνο με τυχαίες ίνες (EScoat) ήταν ελαφρώς υψηλότερη από το ικρίωμα PLGA με τυχαίες ίνες (ES0). Μετά από τέσσερις εβδομάδες ο ρυθμός αποδόμησης και για τα δύο ικρίσματα ήταν περίπου ίσος. Η απώλεια βάρους και για τα δύο δείγματα ήταν αργή και ο ρυθμός αποδόμησης είχε σχεδόν ομοιόμορφη κλίση σε καθορισμένο χρόνο (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Διάγραμμα απώλεια μάζας-Χρόνος (μέρες)

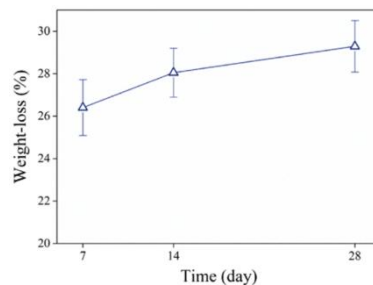
#### 5 παράδειγμα [29]

Ικρίωματα PLGA(75:25, Mw=90.000-126.000 Da) /κολλαγόνο τύπου Ι με τυχαίες ίνες που παρασκευάστηκαν με ηλεκτρονική περιστροφή βυθίστηκαν σε PBS στους 37 ° C για 7, 14 και 28 ημέρες (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: SEM, ικρίωμα PLGA/κολλαγόνο με τυχαίες ίνες

Μετά από 4 εβδομάδες η απώλεια βάρους ικρίωματος έφτασε το 29%. Η απώλεια βάρους ήταν σχετικά υψηλή την πρώτη εβδομάδα και στη συνέχεια μειώθηκε δραματικά κατά τη δεύτερη έως τέταρτη εβδομάδα και μετά έγινε σχεδόν σταθερή (Εικόνα 34) .



Εικόνα 34: Διάγραμμα απώλεια μάζας-Χρόνος (ημέρες)

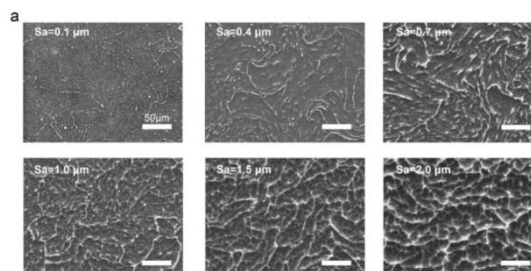
Παρατήρηση: Από τις παραπάνω έρευνες για την αποικοδόμηση παρατηρείτε, ότι η αποικοδόμηση του PLGA εξαρτάται από το μοριακό βάρος, από την αναλογία λακτιδίου:γλυκολιδίου, από το περιβάλλον που γίνεται η αποικοδόμηση, από την μορφολογία και τα πρόσθετα του ικρίωματος.

#### Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ: ΑΚΤΙΝΗ ΚΑΙ ΒΙΝΚΟΥΛΙΝΗ

##### 1 παράδειγμα [30]

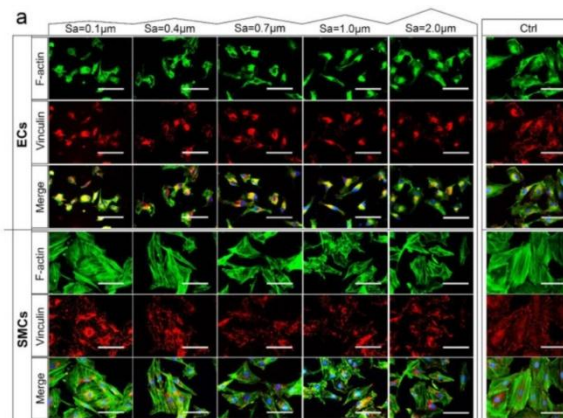
Ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) και κύτταρα λείων μυών (SMCs) καλλιεργήθηκαν για 1 ημέρα καλλιέργειας σε επίπεδο μαγνήσιο (Mg) και σε δομές Mg τύπου κορυφογραμμής/κοιλιάδας με αυξανόμενη πυκνότητα χαρακτηριστικών και διαφορά ύψους (τραχύτητα) που κατασκευάστηκαν με την μέθοδος εμβάπτισης σε κιτρικό οξύ και αντιδιαβρωτική επεξεργασία  $MgF_2$ / επικάλυψη PDA

(Εικόνα 35)



Εικόνα 35: SEM, δομές Mg τύπου κορυφογραμμής/κουλάδας με αυξανόμενη τραχύτητα

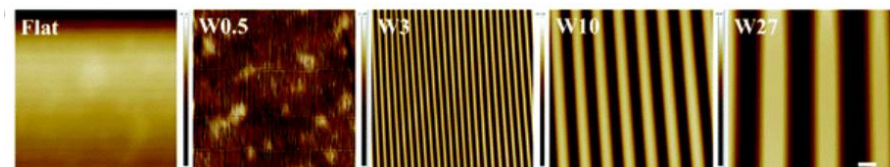
Για τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν παρόμοια ισχυρή έκφραση ακτίνης κατά μήκος των βαθμίδων τραχύτητας και του control (επίπεδο Mg), ενώ η έκφραση της βινκουλίνης είναι κατά μήκος των βαθμίδων τραχύτητας λιγότερη και ασθενέστερη σε σχέση με το control με πολλές ώριμες επαφές FA (εστιακές επαφές). Για τα κύτταρα λείων μυών υπάρχουν σε χαμηλότερες τραχύτητες μακρά, παχιά και καλά οργανωμένα νήματα ακτίνης όπως και στο control, ενώ σε υψηλότερες τραχύτητες μειωμένη πυκνότητα βινκουλίνης και FA σε σχέση με το control (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Confocal (ακτίνη πράσινο, βινκουλίνη κόκκινο και DAPI μπλε), ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) και κύτταρα λείων μυών (SMCs) για 1 ημέρα καλλιέργειας σε επίπεδο μαγνήσιο (Mg) και σε δομές Mg τύπου κορυφογραμμής/κουλάδας με αυξανόμενη τραχύτητα

## 2 παράδειγμα [31]

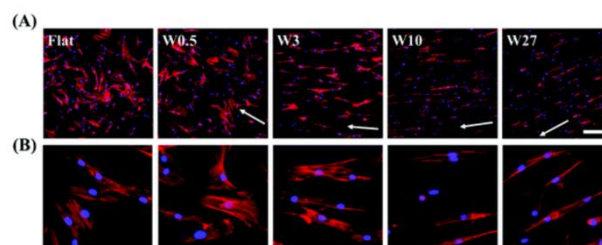
Μεσεγχεματικά βλαστικά κύτταρα από το μυελό των οστών καλλιεργήθηκαν για 1 ημέρα καλλιέργειας σε επίπεδο PDMS και σε υποστρώματα PDMS με ευθυγραμμισμένες κυματοειδείς τοπογραφίες διαφορετικών διαστάσεων που κατασκευάστηκαν με χύτευση ρέπλικας και ειδική συσκευή τεντώματος (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: AFM, επίπεδο PDMS και υποστρώματα PDMS με ευθυγραμμισμένες κυματοειδείς τοπογραφίες σειρά αυξανόμενης τοπογραφίας

Παρατηρήθηκαν κύτταρα τυχαία προσανατολισμένα στο επίπεδο PDMS, ενώ στα υποστρώματα PDMS με ευθυγραμμισμένες κυματοειδείς τοπογραφίες κύτταρα

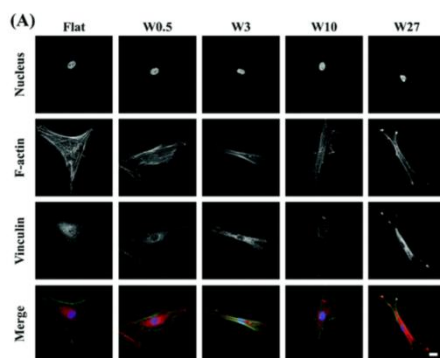
ευθυγραμμισμένα προσανατολισμό



έχοντας σε μεγαλύτερες τοπογραφίες καλύτερη ευθυγράμμιση (Εικόνα 38).

Εικόνα 38: Confocal (ακτίνη κόκκινο και DAPI μπλε), μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από το μυελό των οστών για 1 ημέρα καλλιέργειας σε επίπεδο PDMS και σε υποστρώματα PDMS με ευθυγραμμισμένες κυματοειδείς τοπογραφίες σειρά αυξανόμενης τοπογραφίας

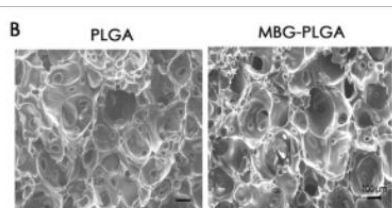
Παρατηρήθηκε καλύτερη έκφραση βινκουλίνης και μεγαλύτερο ποσοστό περιοχή επαφής FA σε μικρότερες τοπογραφίες PDMS σε σχέση με το επίπεδο PDMS και τις μεγαλύτερες τοπογραφίες PDMS (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Confocal (ακτίνη πράσινο, βινκουλίνη κόκκινο και DAPI μπλε), μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από το μυελό των οστών για 1 ημέρα καλλιέργειας σε επίπεδο PDMS και σε υποστρώματα PDMS με ευθυγραμμισμένες κυματοειδείς τοπογραφίες σειρά αυξανόμενης τοπογραφίας

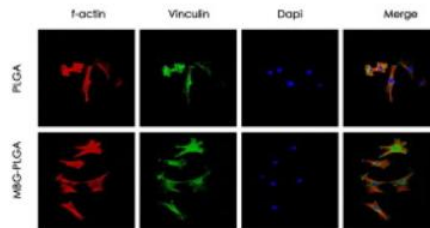
3 παράδειγμα [32]

Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από μυελό οστών αρουραίων καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε πορώδη ικρίσματα PLGA (LA: GA = 85:15, Mw = 50 kDa) και σε πορώδη ικρίσματα PLGA με μεσοπορώδη βιοδραστικά γυαλιά SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Si/Ca/P = 80:15:5 (MBGs) που κατασκευάστηκαν με την υπερκρίσιμη τεχνική αφρισμού CO<sub>2</sub> (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: SEM, πορώδη ικρίσματα και πορώδη ικρίσματα PLGA με MBGs

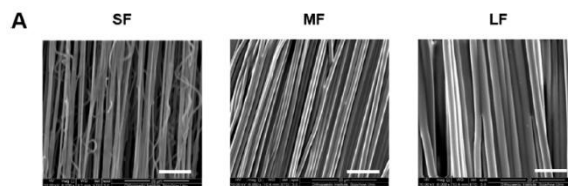
Η βινκουλίνη σε ικρίσματα PLGA εντοπίστηκε σε μεγάλο βαθμό στο κέντρο των κυττάρων με τα νήματα ακτίνης λιγότερο διαδεδομένα, ενώ σε πορώδη ικρίσματα PLGA με MBGs η βινκουλίνη ήταν ευρέως διαδεδομένη με έναν πιο οργανωμένο κυτταροσκελετό (Εικόνα 41).



Εικόνα 41: Confocal (ακτίνη κόκκινο, βινκουλίνη πράσινο και DAPI μπλε), μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από μυελό οστών αρουραίων για 24 ώρες σε πορώδη ικρίσματα PLGA και σε πορώδη ικρίσματα PLGA με MBGs

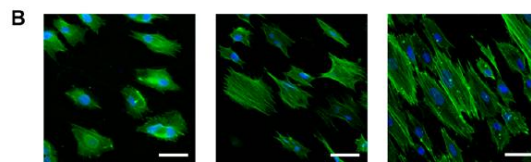
#### 4 παράδειγμα [33]

Βλαστικά κύτταρα από τον ινώδες δακτύλιο καλλιεργήθηκαν για 3 ημέρες καλλιέργειας σε ικρίσματα πολυ(ανθρακικός αιθέρας ουρεθάνη) ουρία με διάφορα μεγέθη ευθυγραμμισμένων ινών που κατασκευάστηκαν με την μέθοδο ηλεκτρονική περιστροφή (Εικόνα 42).



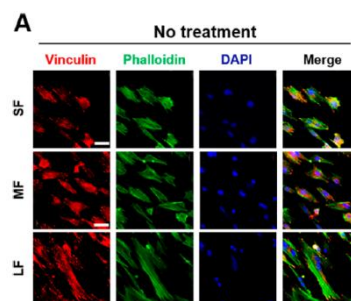
Εικόνα 42: SEM, ικρίσματα πολυ(ανθρακικός αιθέρας ουρεθάνη) ουρία με μικρές ίνες (SF), με μεσαίες ίνες (MF) και με μεγάλες ίνες (LF)

Παρατηρήθηκε σε ικρίσματα με μικρό μέγεθος ινών κύτταρα σχετικά στρογγυλά με ασαφή κυτταροσκελετό, ενώ επιμήκη με πολύ οργανωμένες ίνες ακτίνης σε ικρίσματα με μεγάλο μέγεθος ινών (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Confocal (ακτίνη πράσινο και DAPI μπλε), βλαστικά κύτταρα από τον ινώδες δακτύλιο για 3 ημέρες καλλιέργειας σε ικρίσματα πολυ(ανθρακικός αιθέρας ουρεθάνη) ουρία με ευθυγραμμισμένες ίνες σειρά αυξανόμενου μεγέθους ινών

Παρατηρήθηκε ότι σε ικρίσματα με μικρές ίνες ανώριμα και ασαφή FA με διάχυτη κατανομή, ενώ σε ικρίσματα με μεγάλες ίνες ευθυγραμμισμένες ίνες και



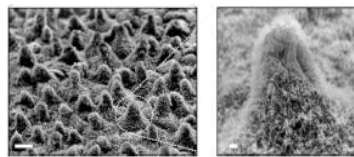
υψηλότερο μέσο αριθμό FA (Εικόνα 44).

Εικόνα 44: Confocal (ακτίνη πράσινο, βινκουλίνη κόκκινο και DAPI μπλε), βλαστικά κύτταρα από τον ινώδες δακτύλιο για 3 ημέρες καλλιέργειας σε ικρίωματα πολυ(ανθρακικός αιθέρας ουρεθάνη) ουρία με ευθυγραμμισμένες ίνες με διαφορετικά μεγέθη ινών

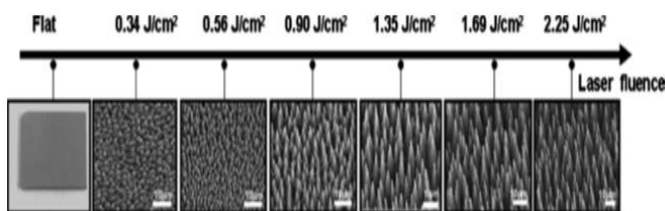
Παρατήρηση: Από τις παραπάνω έρευνες για την καλλιέργεια κυττάρων σε ικρίωματα, παρατηρείται, ότι η τοπογραφία και η χημεία ενός υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει την μορφολογία και την προσκόλληση των κυττάρων.

### Κατασκευή υποστρωμάτων πυριτίου με επεξεργασία λέιζερ υπερταχέων παλμών και η χρήση τους ως ικρίωμα για την καλλιέργεια κυττάρων

Η παρακάτω έρευνα αποτελεί η θεμελιώδης βάση για την συνέχεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Από προηγούμενες μελέτες που έγιναν σε επιφάνειες πυριτίου, το οποίο είναι άκαμπτο, σκληρό και μη βιοαποικοδομήσιμο υλικό, που φέρουν συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας (spikes) εμπνευσμένες από τα φυσικά φύλλα του λωτού που αποτελούνται από μικρομετρικού μεγέθους θηλοειδείς προβολές που διακοσμούνται με νανομετρικού μεγέθους διακλαδιζόμενες απολήξεις (Εικόνα 45) που κατασκευάστηκαν με ακτινοβολία femtosecond ( $10^{-15}$  s) λέιζερ αλλάζοντας την πυκνότητα ενέργειας (ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας,  $J/cm^2$ ) της δέσμης λέιζερ βρήκαν, ότι όσο αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας της δέσμης λέιζερ τόσο αυξάνεται και η τραχύτητα (αυξάνεται το ύψος, η διάμετρος και η απόσταση των συστοιχιών μικροκώνων, όμως μειώνεται η πυκνότητα τους) της επιφάνειας του πυριτίου (Εικόνα 46). [16]



Εικόνα 45 : SEM, η δομή των φύλλων του λωτού [16]

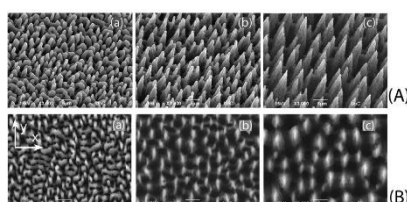


Type of roughness	Height, $a \pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )	Base diameter, $b \pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )	Aspect ratio, $A \pm$ SD	Interspike distance, $c \pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )	Roughness ratio, $r \pm$ SD
Low	$1.26 \pm 0.28$	$1.87 \pm 0.60$	$1.41 \pm 0.27$	$1.73 \pm 0.28$	$1.74 \pm 0.23$
Medium	$3.76 \pm 0.42$	$2.17 \pm 0.25$	$3.51 \pm 0.52$	$2.06 \pm 0.53$	$3.65 \pm 0.49$
High	$8.63 \pm 1.17$	$4.78 \pm 1.03$	$3.73 \pm 0.80$	$4.48 \pm 0.96$	$3.83 \pm 0.76$



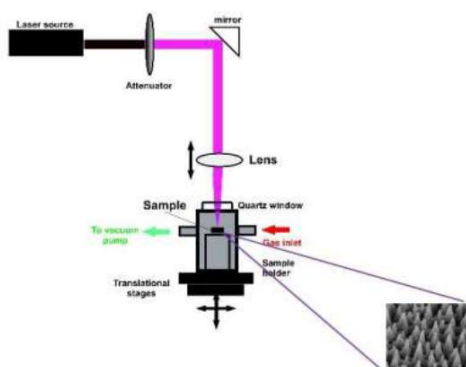
Εικόνες 46: αριστερή εικόνα SEM συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές σε επιφάνειες πυριτίου με διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας και δεξιά εικόνα πίνακας με γεωμετρικά χαρακτηριστικά συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές χαμηλής  $0.68 \text{ J/cm}^2$ , μεσαίας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  και υψηλής τραχύτητας  $1.50 \text{ J/cm}^2$  σε επιφάνειες πυριτίου [16], [34]

Επίσης, τα spikes στην μεσαία και στην υψηλή τραχύτητα έχουν συγκεκριμένο προσανατολισμό, ενώ τα spikes στην χαμηλή τραχύτητα έχουν τυχαίο προσανατολισμό (Εικόνα 47). [35]



Εικόνα 47: SEM, επιφάνειες πυριτίου χαμηλής  $0.68 \text{ J/cm}^2$  (α), μεσαίας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  (β) και υψηλής  $1.50 \text{ J/cm}^2$  τραχύτητας (γ) σε προβολή με κλίση (Α) και σε κάτοψη (Β) [35]

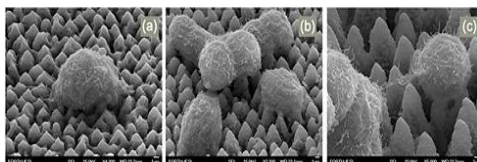
Πειραματικά η δημιουργία τέτοιων δομών γίνεται ως εξής: Γκοφρέτες μονοκρυστάλλου πυριτίου (1 0 0) υπόκεινται σε ακτινοβολία femtosecond λέιζερ σε θάλαμο κενού σε πίεση περίπου  $10^{-2}$  mbar, ο οποίος γεμίζει με αέριο εξαφθοριούχο θείο  $\text{SF}_6$  πίεση 500 Torr, το οποίο οδηγεί σε ελεγχόμενες τραχιές επιφάνειες διπλής κλίμακας που περιλαμβάνουν μικροκονικές δομές διακοσμημένες με νανομέτρου μεγέθους προεξοχές. Η δέσμη λέιζερ εστιάζεται μέσω ενός φακού χαλαζία στην επιφάνεια πυριτίου, σε διεύθυνση κάθετη ως προς το δείγμα. Ο θάλαμος, όπου βρίσκεται το δείγμα, είναι τοποθετημένος σε X-Y κινούμενες πλάκες, οι οποίες επιτρέπουν την μετακίνηση του δείγματος. Η πηγή ακτινοβολίας λέιζερ αποτελείται από αναγεννητικό ενισχυμένο Ti:Sapphire ( $\lambda=800 \text{ nm}$ ) παρέχοντας παλμούς 150 fs με συχνότητα 1 KHz. Επίσης, κάθε φορά αλλάζει η πυκνότητα ενέργειας της δέσμης λέιζερ που κυμαίνεται από  $0.34 \text{ J/cm}^2$  μέχρι  $2.25 \text{ J/cm}^2$ . Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα: [16]



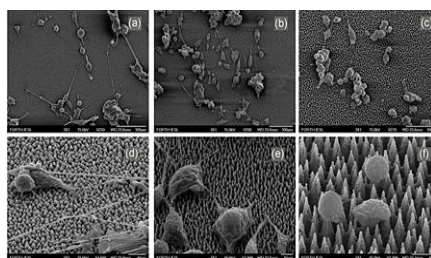
Εικόνα 48: Πειραματική διάταξη [36]

Στην συνέχεια, αυτές οι επιφάνειες πυριτίου χρησιμοποιήθηκαν ως ικρίσματα για την καλλιέργεια των κυττάρων PC12 και αυτό που παρατηρήθηκε είναι το εξής: χωρίς τον αυξητικό παράγοντα νεύρου NGF τα κύτταρα PC12 δεν διαφοροποιούνται σε νευρώνες

έχοντας μικρό στρογγυλό σχήμα και στις τρεις τραχύτητες (Εικόνα 49), ενώ με τον NGF τα κύτταρα PC12 διαφοροποιούνται σε νευρώνες. Πιο συγκεκριμένα, σε χαμηλές τραχύτητες τα κύτταρα διαφοροποιούνται περισσότερο σε νευρώνες (μεγαλύτερο αριθμό διαφοροποιημένων κυττάρων, μεγαλύτερη διαφοροποίηση) έχοντας μεγαλύτερο μήκος νευριτών σε μm σε σχέση με τις μεσαίες τραχύτητες, ενώ σε υψηλές τραχύτητες ελάχιστα κύτταρα διαφοροποιούνται και αυτά που δεν διαφοροποιούνται διατηρούν το μικρό στρογγυλό σχήμα τους (Εικόνα 50). [34]

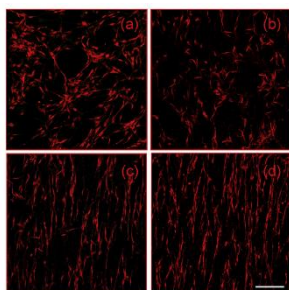


Εικόνα 49: SEM, (a) επιφάνεια Si χαμηλής τραχύτητας  $0.68 \text{ J/cm}^2$  με αδιαφοροποίητα κύτταρα PC12, (b) επιφάνεια Si μεσαίας τραχύτητας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  με αδιαφοροποίητα κύτταρα PC12 και (c) επιφάνεια Si υψηλής τραχύτητας  $1.50 \text{ J/cm}^2$  με αδιαφοροποίητα κύτταρα PC12 [34]



Εικόνα 50: SEM, (a)-(d) επιφάνειες Si χαμηλής τραχύτητας  $0.68 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα PC12, (b)-(e) επιφάνειες Si μεσαίας τραχύτητας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα PC12 και (c)-(f) επιφάνειες Si υψηλής τραχύτητας  $1.50 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα PC12 [34]

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων Schwann και αυτό που παρατηρήθηκε είναι το εξής (Εικόνα 51 ): τα κύτταρα Schwann έχουν τυχαίο προσανατολισμό στο επίπεδο πυριτίου και στην επιφάνεια πυριτίου χαμηλής τραχύτητας, ενώ στην επιφάνεια πυριτίου μεσαίας και υψηλής τραχύτητας τα κύτταρα τείνουν να ακολουθούν έναν προτιμησιακό προσανατολισμό. [35]

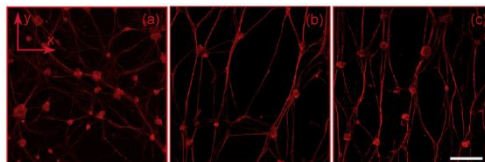


Εικόνα 51: Confocal (κόκκινο χρώμα ακτίνη), (α) επίπεδη επιφάνεια πυριτίου με κύτταρα Schwann, (b) επιφάνεια πυριτίου χαμηλής τραχύτητας  $0.68 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα Schwann, (c) επιφάνεια πυριτίου μεσαίας τραχύτητας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα Schwann, (d) επιφάνεια πυριτίου υψηλής τραχύτητας  $1.50 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα Schwann [35]



επιφάνεια πυριτίου μεσαίας τραχύτητας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα Schwann, και (d) επιφάνεια πυριτίου υψηλής τραχύτητας  $1.50 \text{ J/cm}^2$  με κύτταρα Schwann [35]

Ακόμα, χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια συμπαθητικών νευρώνων και αυτό που παρατηρήθηκε είναι το εξής (Εικόνα 52): οι άξονες των νευρώνων σχηματίζουν ένα τυχαίο δίκτυο σε χαμηλή τραχύτητα, ενώ στην μεσαία και στην υψηλή τραχύτητα οι νευρώνες εμφάνισαν κατευθυντική ανάπτυξη παρέχοντας ένα δίκτυο παράλληλα ευθυγραμμισμένων αξόνων. [35]



Εικόνα 52: Confocal (κόκκινο χρώμα ακτίνης), (α) επιφάνεια πυριτίου χαμηλής τραχύτητας  $0.68 \text{ J/cm}^2$  με συμπαθητικούς νευρώνες, (β) επιφάνεια πυριτίου μεσαίας τραχύτητας  $0.95 \text{ J/cm}^2$  με συμπαθητικούς νευρώνες και (γ) επιφάνεια πυριτίου υψηλής τραχύτητας  $1.50 \text{ J/cm}^2$  με συμπαθητικούς νευρώνες [35]

Όλα αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν, ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει την μορφολογία των κυττάρων.

## ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας είναι η κατασκευή τρισδιάστατων τεχνητών ικριωμάτων σε μορφή ρέπλικας που μιμούνται την εξωκυττάρια μήτρα των κυττάρων και η παρατήρηση της επίδρασης των ικριωμάτων στην κυτταρική συμπεριφορά με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην Μηχανική Ιστών ως εμφυτεύσιμες ιατρικές συσκευές. Οι συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας (spikes) στην επιφάνεια του πυριτίου (άκαμπτο και μη βιοαποικοδομήσιμο υλικό) που κατασκευάστηκαν με την χρήση femtosecond λέιζερ υπερταχέων παλμών αλλάζοντας την πυκνότητα ενέργειας (ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας,  $\text{J/cm}^2$ ) της δέσμης κάθε φορά για την επιθυμητή τραχύτητα μπορούν να μεταφερθούν σε διάφορους τύπους πολυμερικών υλικών (μαλακά και βιοαποικοδομήσιμα υλικά) μέσω της τεχνικής χύτευσης αντιγράφων (τεχνική μαλακής λιθογραφίας). Δηλαδή, οι μικροδομημένες επιφάνειες του πυριτίου γίνονται ως κύριο καλούπι και αντιγράφονται σε ένα διαμορφώσιμο υλικό (ρέπλικα). Στην μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιούνται ρέπλικες πολυ(γαλακτικού-συν-γλυκολικού οξέος) PLGA δηλαδή PLGA-1 (10% συγκέντρωση) με lactide 65 : glycolide 35 (40.000-75.000 gr/mol), PLGA-2 (10% συγκέντρωση) με lactide 75 : glycolide 25 (66.000-107.000 gr/mol) και PLGA-1:PLGA-2 (50:50) ίδιας τοπογραφίας (spikes) με τις επιφάνειες πυριτίου χαμηλής (25 mW,  $0.42 \text{ J/cm}^2$ ), μεσαίας (40 mW,  $0.58 \text{ J/cm}^2$ ) και υψηλής (65 mW,  $0.72 \text{ J/cm}^2$ ), στις οποίες καλλιεργούνται κύτταρα MSCs με σκοπό να παρατηρηθεί η επίδραση της τοπογραφίας και του υλικού των ρεπλικών στην κυτταρική συμπεριφορά, όπως προσκόλληση και μορφολογία. Επίσης, θα εξεταστεί η αποικοδόμηση των ρεπλικών PLGA με δεδομένο ότι τα ικρίωματα PLGA μπορούν να φορτωθούν με κύτταρα σε μια προσέγγιση μηχανικής ιστών για την βελτίωση της αναγέννησης των ιστών και ότι τα

ικριώματα δεν είναι μόνιμα εμφυτεύματα, ο έλεγχος του ρυθμού αποικοδόμησης σε μέσα καλλιέργειας είναι ένα σημαντικό βήμα.

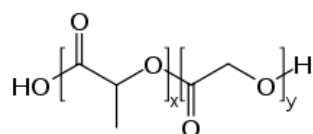
### ΜΕΡΟΣ 3

#### ΥΛΙΚΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΟΡΓΑΝΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

#### ΥΛΙΚΑ

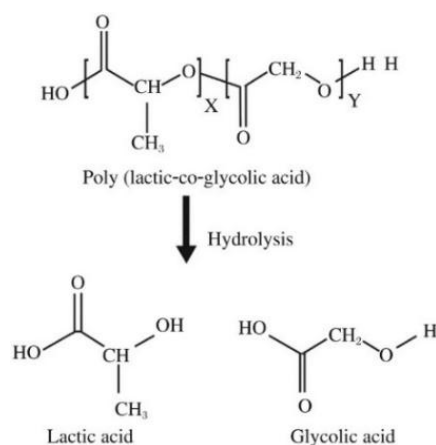
#### ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ PLGA

Το πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) [Poly(Lactic-co-Glycolic Acid), PLGA] (Εικόνα 53) είναι ένα συνθετικό συμπολυμερές (πολυεστέρας) του γαλακτικού οξέος και του γλυκολικού οξέος. [37]



Εικόνα 53: PLGA [4]

Το PLGA είναι βιοσυμβατό και μη κυτταροτοξικό. Επίσης, είναι ελεγχόμενα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές (Εικόνα 54), επειδή υφίσταται τυχαία υδρολυτική διάσπαση εστερικών δεσμών μέσω υδρόλυσης κατά μήκος του σκελετού του πολυμερούς για να παράγει τα μονομερή, γαλακτικό οξύ και γλυκολικό οξύ που διασπώνται στην συνέχεια για να σχηματίσουν ενέργεια, διοξείδιο του άνθρακα και νερό από τις κανονικές μεταβολικές οδούς του σώματος. [25],[38]



Εικόνα 54: Αποικοδόμηση PLGA [25]

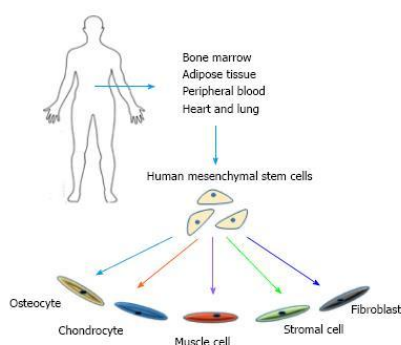
Ένα ξεχωριστό πλεονέκτημα του PLGA είναι ότι μπορεί να σχεδιαστεί έτσι ώστε να αποκτήσει συγκεκριμένες επιθυμητές ιδιότητες πχ έλεγχος στην αποικοδόμηση με χειρισμό: 1. αναλογία λακτιδίου/γλυκολιδίου και 2. μοριακό βάρος. Δηλαδή: 1. Στο PLGA το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι πιο υδρόφοβο από το πολυ(γλυκολικό οξύ) και είναι πιο

ανθεκτικό στην υδρολυτική προσβολή, επειδή κάθε υπόλειμμα γαλακτικού οξέος περιλαμβάνει ένα κρεμαστό μεθύλιο ομάδα, το οποίο καθιστά την επιφάνεια υδρόφοβη και απορροφάει λιγότερο νερό. Αυξάνοντας την αναλογία του γλυκολιδίου σε σχέση με την αναλογία λακτιδίου στο PLGA, αυξάνεται ο ρυθμός αποικοδόμησης. 2.Ο χρόνος αποικοδόμησης αυξάνεται με το μέσο μοριακό βάρος του PLGA. Το μοριακό βάρος σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος της πολυμερούς αλυσίδας. Τα πολυμερή με υψηλό μοριακό βάρος παρουσιάζουν χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης λόγω των μακρών πολυμερών αλυσίδων που απαιτούν περισσότερο χρόνο για διάσπαση και αποικοδόμηση σε σύγκριση με μικρές πολυμερείς αλυσίδες. 3.Η αποικοδόμηση εξαρτάται επίσης από την μορφολογική δομή του κριώματος PLGA (πχ αναλογία επιφάνειας προς όγκο, μέγεθος, σχήμα, πορώδες και παρουσία προσθέτων) και το περιβάλλον που γίνεται η αποικοδόμηση (ο τύπο του ρευστού που έρχεται σε επαφή με αυτό).[37],[38]

Στην μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιούνται PLGA-1 με lactide 65 : glycolide 35 (40.000-75.000 gr/mol), PLGA-2 με lactide 75 : glycolide 25 (66.000-107.000 gr/mol) και PLGA-1:PLGA-2 (50:50).

## MSCS

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal stem cells, MSCs) (Εικόνα 55) ανήκουν στην κατηγορία των βλαστικών κυττάρων ενηλίκων που μπορούν να απομονωθούν από μια ποικιλία ιστών και να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους κυττάρων όπως μυοκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, στρωματικά κύτταρα και ινοβλάστες. Άλλες ενδιαφέρουσες ιδιότητες των MSCs περιλαμβάνουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται που τους επιτρέπει να ρυθμίζουν την διαθεσιμότητα τους και να ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις. [39]



Εικόνα 55: MSCs [39]

Στην μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιούνται τα Murine MSCs (C57BL/6) ως ανθρώπινο μοντέλο, τα οποία έχουν εξαιρετική ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, νευροκύτταρα και μυοκύτταρα.

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΟΡΓΑΝΑ

### SEM

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο (Scanning Electron Microscopy, SEM) που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο αλληλοεπιδρά. Επομένως, το SEM χρησιμοποιείται για την εξέταση μικροδομής στερεών δειγμάτων ή βιολογικών δειγμάτων και για να δίνει εικόνες υψηλού βαθμού διεύθυνσης. [4]

### CONFOCAL

Στην μικροσκοπία φθορισμού βιομόρια του κυττάρου πχ πρωτεΐνες σημαίνονται με ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες είναι ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν και κάθε φθορίζουσα χρωστική παρατηρείται ως συγκεκριμένο χρώμα συγκεκριμένου μήκους κύματος στο μικροσκόπιο φθορισμού (Confocal microscope) για την παρατήρηση συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο κύτταρο. [4]

### ΜΕΘΟΔΟΙ

#### ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΡΕΠΛΙΚΩΝ PLGA

Η διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια: 1) Δημιουργία αντιγράφου του υλικού PDMS έχοντας ως καλούπι την μικροδομημένη επιφάνεια του πυριτίου. 2) Παρασκευή του διαλύματος πολυμερούς PLGA συγκεκριμένης συγκέντρωσης που θέλουμε ως ρέπλικα. 3) Κατασκευή της ρέπλικας PLGA συγκεκριμένης συγκέντρωσης έχοντας ως καλούπι το PDMS.

Πρώτο στάδιο:

Ζυγίζουμε την ποσότητα του PDMS που θέλουμε σε πλαστικό ποτηράκι με σπάτουλα στην ζυγαριά. Βάζουμε 10:1 παράγοντα σκλήρυνσης silicone elastomer με γυάλινη πιπέτα στο πλαστικό ποτηράκι που είναι στην ζυγαριά. Ανακατεύουμε με την σπάτουλα μέχρι το διάλυμα να βγάλει μικρές φυσαλίδες που δείχνει, ότι είναι έτοιμο. Βάζουμε το πλαστικό ποτηράκι στο φούρνο στο κενό για 20 λεπτά για να φύγουν οι φυσαλίδες. Βάζουμε το διάλυμα στο πυρίτιο με την γυάλινη πιπέτα καλύπτοντας την επιφάνεια του πυριτίου. Βάζουμε το υλικό στο κενό στο φούρνο για 30 λεπτά για να φύγουν οι φυσαλίδες, έτσι ώστε το PDMS να διεισδύσει μέσα στην μικροδομή του πυριτίου. Χαμηλώνουμε το κενό στο φούρνο και βάζουμε την θερμοκρασία στους 80 °C για 3 ώρες στο φούρνο.

Δεύτερο στάδιο:

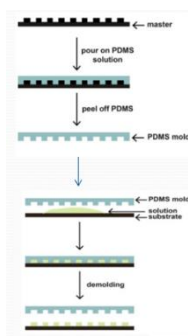
Φτιάχνουμε το διάλυμα πολυμερούς PLGA συγκεκριμένης συγκέντρωσης που θέλουμε ως ρέπλικα. Δηλαδή, ζυγίζουμε στην ζυγαριά την ποσότητα του πολυμερούς PLGA συγκεκριμένης συγκέντρωσης που θέλουμε με την σπάτουλα και την ποσότητα του διαλύτη (διχλωρομεθάνιο) που απαιτείται με την πιπέτα γκίλσον. Βάζουμε στο γυάλινο μπουκαλάκι που είναι μέσα το διάλυμα μας ένα μαγνητάκι. Βάζουμε πάραφιλμ στο στόμιο του γυάλινου μπουκαλιού και τυλίγουμε το γυάλινο μπουκαλάκι με αλουμινόχαρτο. Βάζουμε το γυάλινο μπουκαλάκι στον αναδευτήρα για 3 ώρες.

Τρίτο στάδιο:

Βγάζουμε το PDMS από το πυρίτιο. Βάζουμε με την πιπέτα γκίλσον μια μικρή ποσότητα από το διάλυμα του πολυμερούς PLGA συγκεκριμένης συγκέντρωσης στην επιφάνεια του PDMS καλύπτοντας την επιφάνεια του υλικού. Βάζουμε μικρή στρογγυλή καλυπτρίδα πάνω από το υλικό. Τυλίγουμε το υλικό με αλουμινόχαρτο και το βάζουμε στο ψυγείο για δυο μέρες. Μετά το πέρασμα των δυο ημερών, βγάζουμε την καλυπτρίδα που φέρει την ρέπλικα του πολυμερούς PLGA συγκεκριμένης συγκέντρωσης από το PDMS.

Τα παραπάνω στάδια συνοψίζονται

στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 56: Διαδικασία κατασκευής [15]

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΡΕΠΛΙΚΩΝ PLGA

Τεχνική αποικοδόμησης

Ζυγίζουμε το αρχικό βάρος των ρεπλικών PLGA-1 (10%), των ρεπλικών PLGA-2 (10%) και των ρεπλικών PLGA-1:PLGA-2 (50:50) στην ζυγαριά παίρνοντας 3 μετρήσεις. Τοποθετούμε τις ρέπλικες για 3, 7, 14 και 21 ημέρες σε DMEM (pH=7) ή sterile PBS (pH=7) στους 37 °C στον επωαστικό κλίβανο. Μετά, ανάλογα με τις μέρες αφαιρούμε τις ρέπλικες από το DMEM ή sterile PBS και τις βάζουμε στον απαγωγό για ένα βράδυ για ξήρανση. Στην συνέχεια, ζυγίζουμε το τελικό βάρος των ρεπλικών στην ζυγαριά παίρνοντας 3 μετρήσεις. Η απώλεια βάρους δίνεται από τον εξής τύπο:

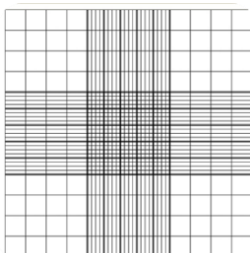
$$\text{Απώλεια βάρους} = \frac{(\text{αρχικό βάρος} - \text{τελικό βάρος}) * 100\%}{\text{αρχικό βάρος}}$$

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ MSCS ΣΕ ΡΕΠΛΙΚΕΣ PLGA

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται, όταν καλύψουν την επιφάνεια καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, αφαιρούμε το παλιό θρεπτικό υλικό DMEM (περιέχει 10% FBS και 1% στρεπτομυκίνη) από την φλάσκα (5 ml) με τα κύτταρα. Προσθέτουμε 1 ml PBS, κουνάμε την φλάσκα και μετά αφαιρούμε το PBS από την φλάσκα. Προσθέτουμε 1 ml θρυψίνη στην φλάσκα και την αφήνουμε για 5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Προσθέτουμε 1 ml νέο θρεπτικό υλικό στην φλάσκα κάνοντας αρκετές πλύσεις με την πιπέτα γκίλσον μέχρι να ξεκολλήσουν όλα τα κύτταρα από τον πάτο της φλάσκας. Μεταφέρουμε το διάλυμα από την φλάσκα σε ένα falcon tube 15 ml και το προσθέτουμε στην φυγόκεντρο για 5 λεπτά στις 300 στροφές. Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό από το falcon tube και προσθέτουμε 3 ml

νέο θρεπτικό υλικό DMEM στο falcon tube. Στο falcon tube πρέπει να γίνουν πολλά up-down με την πιπέτα γκίλσον προκειμένου να διαλυθεί η πελέτα των κυττάρων. Προσθέτουμε 5 ml νέο θρεπτικό υλικό DMEM σε μια νέα φιάσκα και στην συνέχεια βάζουμε διάλυμα από το falcon tube στην φιάσκα με την βοήθεια του νόμου της αραιώσης  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ . Τοποθετούμε την φιάσκα στον επωαστικό κλίβανο.

Το στρώσιμο των κυττάρων σε επιφάνειες και σε καλυπτρίδα γίνεται μετά από κάθε ανακαλλιέργεια. Δηλαδή, τα κύτταρα πρέπει να είναι μονήρη και όχι συσσωματώματα. Η καλυπτρίδα είναι το control ή επιφάνεια-μάρτυρας (δεκτικό και υδρόφιλο περιβάλλον για τα κύτταρα), επειδή λείπουν τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά και είναι η παραδοσιακή μορφή καλλιέργειας. Πριν στρώσουμε τα κύτταρα σε επιφάνειες, πρέπει να αποστειρώσουμε κάθε πλευρά της επιφάνειας για 20 λεπτά στην UV της χουντ. Μετά από την ανακαλλιέργεια πρέπει να γίνει η μέτρηση της αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων με την βοήθεια του αιματοκυτταρομέτρου. Παίρνουμε 10  $\mu$ l από το falcon tube που περιέχει κύτταρα και DMEM και το βάζω στην εγκοπή του αιματοκυτταρομέτρου. Τοποθετούμε το αιματοκυτταρόμετρο στο οπτικό μικροσκόπιο και μετράμε τα κύτταρα. Το αιματοκυτταρόμετρο στο οπτικό μικροσκόπιο φαίνεται ως εξής:



Μετράμε τα στρογγυλά κύτταρα που είναι μέσα στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα γύρω από τον σταυρό. Κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει δεκαέξι μικρά τετράγωνα. Όταν τα κύτταρα πέφτουν στις πλευρές των μεγάλων τετραγώνων μετράμε δύο από τις τέσσερις πλευρές τους. Άρα, μετράμε, ότι τα κύτταρα στα τετράγωνα είναι ο αριθμός κυττάρων σε κάθε μεγάλο τετράγωνο/4 = συνολικός αριθμός κυττάρων. Οπότε, η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων είναι  $c_1 = \text{συνολικό αριθμό κυττάρων} \cdot 10^4$  (διαστάσεις:  $V = 1 \text{ mm} \cdot 1 \text{ mm} \cdot 0,1 \text{ mm}$ ) cells/ml.

Θέλουμε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων σε κάθε well του 24αρη πιάτου να είναι  $c_2 = 3 \cdot 10^4$  cells/ml σε όγκο  $V_2 = 1 \text{ ml}$ . Εφαρμόζουμε τον νόμο της αραιώσης. Οπότε, βάζουμε σε κάθε well με την πιπέτα γκίλσον το διάλυμα (DMEM + κύτταρα) από το falcon tube. Κάνουμε κυκλικές κινήσεις στο πιάτο και το βάζουμε στον επωαστικό κλίβανο.

#### Ανοσοκυτταροχημεία

Η ανοσοκυτταροχημεία βασίζεται στην σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Η τεχνική αυτή είναι ευαίσθητη και έχει μεγάλη ακρίβεια και εξειδίκευση. Η ανοσοκυτταροχημεία διακρίνεται σε δύο μεθόδους: η άμεση και η έμμεση μέθοδος. Στην άμεση μέθοδο η ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου – αντισώματος επιτυγχάνεται μέσω της ουσίας φθορισμού που βρίσκεται συνδεδεμένη άμεσα με το αντίσωμα του παραπάνω συμπλέγματος. Η έμμεση μέθοδος περιλαμβάνει περισσότερα από ένα στάδια: Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος. Στο δεύτερο στάδιο

χρησιμοποιείται ένα δεύτερο αντίσωμα (αντι-αντίσωμα) που είναι συνδεδεμένο με την φθορίζουσα ουσία που στρέφεται εναντίον του πρώτου αντισώματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση του αρχικού συμπλέγματος.[4]

Τα βήματα της ανοσοκυτταροχημείας είναι τα εξής: Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό DMEM από τα wells του 24αρη πιάτου. Κάνουμε πλύση με 300 μL PBS για 5 λεπτά (x 2 φορές). Αφαιρούμε το PBS και προσθέτουμε 400 μL μονιμοποιητή PFA 4% σε κάθε well για 15 λεπτά. Αφαιρούμε τον μονιμοποιητή PFA 4% και κάνουμε πλύση με 300 μL PBS για 5 λεπτά (x 2 φορές). Αφαιρούμε το PBS και προσθέτουμε 300 μL PBS-Triton X 0,1% για 5 λεπτά. Αφαιρούμε το PBS-Triton X 0,1% και κάνουμε πλύση με 300 μL PBS για 5 λεπτά (x 2 φορές). Αφαιρούμε το PBS και προσθέτουμε 400 μL διάλυμα 2% BSA σε PBS σε κάθε well για μισή ώρα. Αφαιρούμε το διάλυμα 2% BSA σε PBS και προσθέτουμε 400 μL από το διάλυμα πρώτων αντισωμάτων (1% BSA σε PBS) σε κάθε well. Τυλίγουμε το 24αρη πιάτο με αλουμινόχαρτο και το τοποθετούμε για ένα βράδυ στο ψυγείο. Αφαιρούμε το διάλυμα πρώτων αντισωμάτων και κάνουμε πλύσεις με 300 μL PBS (x 2 φορές). Αφαιρούμε το PBS και προσθέτουμε 400 μL διάλυμα δεύτερων αντισωμάτων (1% BSA σε PBS) σε κάθε well. Τυλίγουμε το 24αρη πιάτο με αλουμινόχαρτο και το τοποθετούμε για δυο ώρες στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το διάλυμα δεύτερων αντισωμάτων και κάνουμε πλύσεις με 300 μL PBS (x 2 φορές). Αφαιρούμε το PBS και τοποθετούμε τις επιφάνειες με λαβίδα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, προσθέτουμε μια σταγόνα από την χρωστική DAPI (βάφει μπλε τους πυρήνες των κυττάρων) πάνω στις επιφάνειες και στρογγυλές καλυπτρίδες πάνω από τις επιφάνειες. Τέλος, τις παρατηρούμε στο μικροσκόπιο φθορισμού.

*Σημείωση:* Χρησιμοποιήθηκαν:

- cell adhesion and alignment (Cytoskeleton-Phalloidin/actin)-1:1000)
- Vinculin + 2ab (green) (focal contacts- 1:300)

Πρωτόκολλο μονιμοποίησης για βιολογικά δείγματα για την παρατήρηση τους στο SEM

Τα βήματα είναι τα εξής: Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό DMEM από τα wells του 24αρη πιάτου. Κάνουμε πλύσεις με 300 μL SCB για 5 λεπτά (x 2 φορές). Βγάζουμε το SCB και βάζουμε 400 μL μονιμοποιητή 2,5% GDA για 30 λεπτά. Αφαιρούμε τον μονιμοποιητή 2,5% GDA και κάνουμε πλύσεις με 300 μL SCB για 5 λεπτά (x 2 φορές). Βγάζουμε το SCB και αφυδατώνουμε με 300 μL αιθανόλη (από 30%, 50%, 70% , 90% έως 100% για 10 λεπτά το κάθε ένα). Στην συνέχεια, βάζουμε 300 μL HDMS - αιθανόλη 100% (50:50) για 30 λεπτά. Προσθέτουμε 300 μL HDMS - αιθανόλη 100% (50:50) για 20 λεπτά. Επίσης, προσθέτουμε 300 μL HDMS για 20 λεπτά (x 2 φορές). Μετά, αφήνουμε τα δείγματα να στεγνώσουν εντελώς κατά την διάρκεια της νύχτας μέσα στον απαγωγό. Την επόμενη μέρα κάνουμε sputtering συνήθως με χρυσό στα δείγματα για να τα δούμε στο SEM.

## **ΜΕΡΟΣ 4**

### **Αποτελέσματα και Παρατηρήσεις – Συζήτηση**

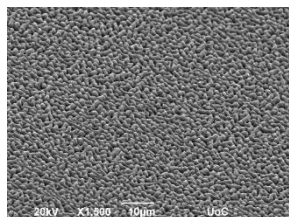
#### **Αποτελέσματα και Παρατηρήσεις**

## Παρατήρηση μορφολογίας ρεπλικών PLGA

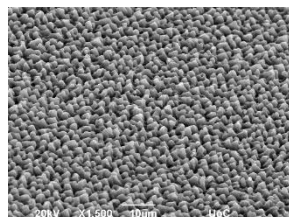
Αυτό το πείραμα περιλαμβάνει την παρατήρηση της μορφολογίας ρεπλικών PLGA-1 (10%) που φέρουν συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές (spikes) χαμηλής (25 mW), μεσαίας (40 mW) και υψηλής τραχύτητας (65 mW) στο SEM.

Από το SEM πάρθηκαν από την κυρία Αλέκα Μανουσάκη οι παρακάτω εικόνες:

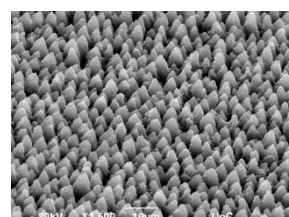
Εικόνες: Ρέπλικες PLGA-1 με συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας



Χαμηλή τραχύτητα  
(25 mW)



Μεσαία τραχύτητα  
(40 mW)



Υψηλή τραχύτητα  
(65 mW)

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρείται, ότι στην υψηλή τραχύτητα οι συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές είναι εντονότερες, πιο ευκρινείς και πιο διαχωρισμένες σε σχέση με την μεσαία τραχύτητα, ενώ στην χαμηλή τραχύτητα οι συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές δημιουργούν ένα κυματιστό τοπίο με δομές όχι εντελώς φυσικά διαχωρισμένες. Οπότε, παρατηρείται, ότι οι δομές της επιφάνειας του πυριτίου αποτυπώθηκαν στο πολυμερές PLGA-1 και έχουν τις ίδιες τοπογραφίες. Αυτό συμβαίνει, επειδή οι ρέπλικες PLGA-1 χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας αποτελούν τα αντίγραφα των επιφανειών πυριτίου χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας.

## Χαρακτηρισμός ρεπλικών PLGA

Τεχνική αποικοδόμησης: Το πείραμα αυτό περιλαμβάνει την απώλεια βάρους (%) (weight loss (%)) και την μορφολογία των ρεπλικών PLGA-1 (P1) (10%), των ρεπλικών PLGA-2 (P2) (10%) και των ρεπλικών PLGA-1:PLGA-2 (MIX) (50:50) χαμηλής (low roughness, LR) και υψηλής (high roughness, HR) τραχύτητας στο SEM για 3, 7, 14 και 21 ημέρες σε DMEM στους 37 C.

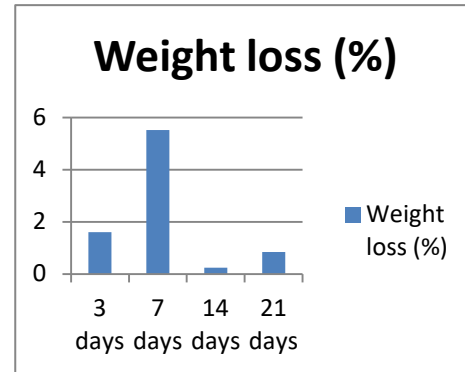
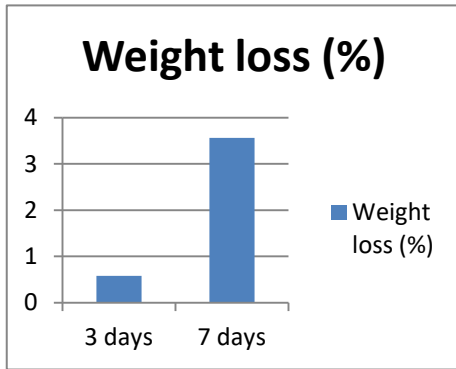
Όσο αφορά την απώλεια βάρους (%) των ρεπλικών:

Σημείωση: Αύξηση απώλεια βάρους (%) → αύξηση ρυθμού αποικοδόμησης

Τα διαγράμματα της απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών είναι:

Διάγραμμα απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών P1 LR (αριστερά) και των ρεπλικών P1 HR (δεξιά):





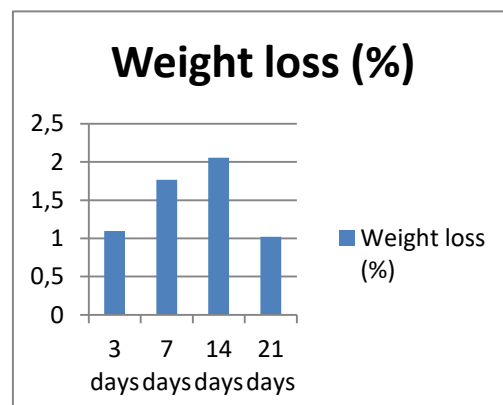
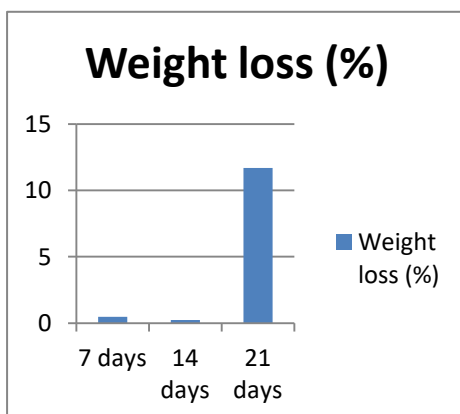
Από τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι οι ρέπλικες P1 HR έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες P1 LR. Αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει περισσότερο υλικό στις ρέπλικες P1 HR λόγω μεγαλύτερων μεγεθών σρίκες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα με τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των ρεπλικών P1 χαμηλής, μεσαίας και υψηλής

Groups PLGA-MS	Density [10(4) / mm(2)]	Height (h) (μm)	Width (b) (μm)	Aspect ratio (A)	Roughness ratio (r)
25mW_Low Roughness	7.18 ± 1.30	3.06 ± 0.40	2.93 ± 0.30	1.044	3.1
40mW_Medium Roughness	5.35 ± 0.25	4.34 ± 0.36	2.16 ± 0.31	2.005	5.0
65mW_High Roughness	4.69 ± 0.19	10.55 ± 1.10	4.68 ± 0.41	2.252	5.5

τραχύτητας [40].

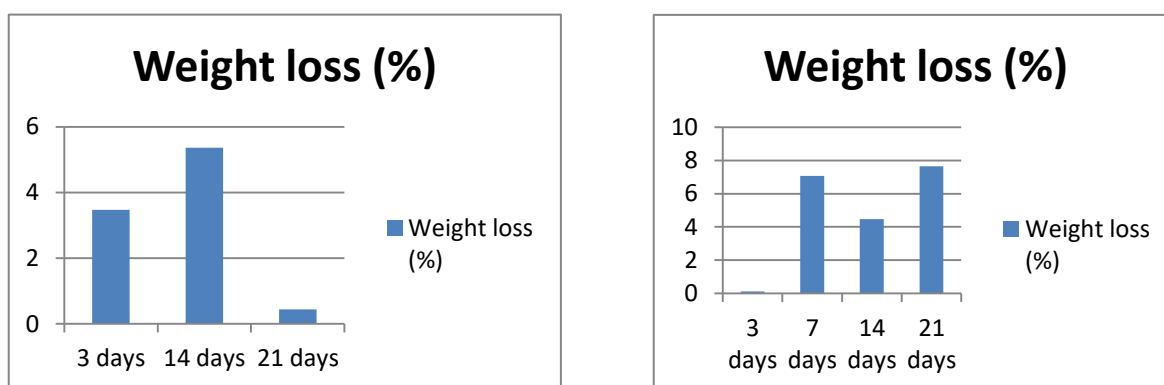
Από τις 3 ημέρες στις 7 ημέρες παρατηρείται μια απότομη αύξηση της απώλειας βάρους (%) στις ρέπλικες P1 LR και HR, καθώς παρατηρείται απότομη μείωση της απώλειας βάρους (%) στις ρέπλικες P1 HR για 14 και 21 ημέρες.

Διάγραμμα απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών P2 LR (αριστερά) και των ρεπλικών P2 HR (δεξιά):



Από τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι οι ρέπλικες P2 HR έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες P2 LR. Αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει περισσότερο υλικό στις ρέπλικες P2 HR. Στις ρέπλικες P2 LR παρατηρείται μέχρι τις 14 ημέρες μειωμένη απώλεια βάρους (%) και στις 21 ημέρες μια απότομη αύξηση, ενώ στις ρέπλικες P2 HR από τις 3 ημέρες στις 14 ημέρες υπάρχει αύξηση της απώλεια βάρους (%) και στην συνέχεια μια μείωση για τις 21 ημέρες.

Διάγραμμα απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών MIX LR (αριστερά) και των ρεπλικών MIX HR (δεξιά):



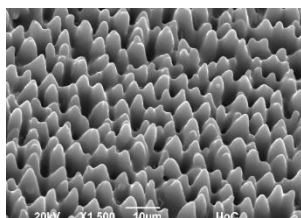
Από τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι οι ρέπλικες MIX HR έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες MIX LR. Αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει περισσότερο υλικό στις ρέπλικες MIX HR. Στις ρέπλικες MIX LR παρατηρείται από τις 3 ημέρες στις 14 ημέρες αύξηση απώλεια βάρους (%) και στις 21 ημέρες μια απότομη μείωση. Στις ρέπλικες MIX HR παρατηρείται από τις 3 ημέρες στις 7 ημέρες μια απότομη αύξηση απώλεια βάρους (%), στην συνέχεια στις 14 ημέρες μια μείωση και πάλι μια αύξηση στις 21 ημέρες.

Από όλα τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι η απώλεια βάρους (%) είναι μεγαλύτερη στις ρέπλικες MIX οπότε μεγαλύτερο ρυθμό αποικοδόμησης και μικρότερη στις ρέπλικες P2, καθώς οι ρέπλικες PLGA high έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) σε σχέση με τις ρέπλικες PLGA low. Οι ρέπλικες P1 έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες P2, επειδή πιθανότατα το P2 έχει μεγαλύτερη κατανομή μοριακού βάρους και ελάχιστα πιο υψηλό ποσοστό λακτιδίου σε σχέση με το γλυκολίδιο σε σχέση με το P1.

Όσο αφορά την μορφολογία των ρεπλικών:

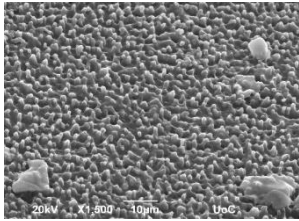
Από το SEM πάρθηκαν από την κυρία Αλέκα Μανουσάκη οι εξής εικόνες:

Εικόνα: 3 ημέρες ρέπλικα P1 HR

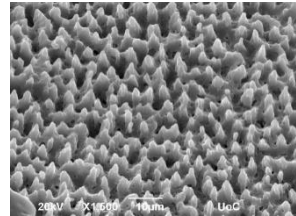


Δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα.

Εικόνα: 3 ημέρες ρέπλικα MIX LR

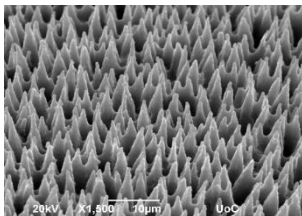


Εικόνα: 3 ημέρες ρέπλικα MIX HR

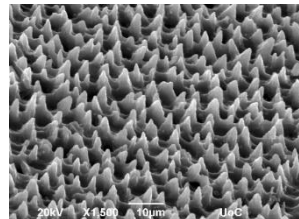


Δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα.

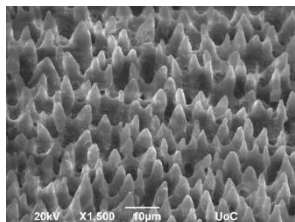
Εικόνα: 3 ημέρες ρέπλικα P2 HR



Εικόνα: 7 ημέρες ρέπλικα P2 HR

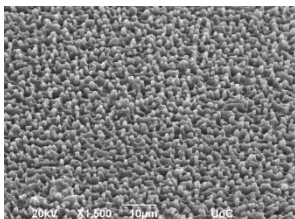


Εικόνα: 21 ημέρες ρέπλικα P2 HR

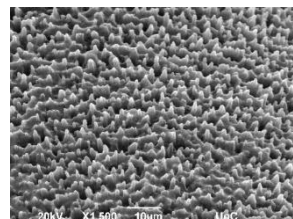


Παρατηρείται, ότι η ρέπλικα P2 HR διατηρεί την μορφολογία των spikes.

Εικόνα: 7 ημέρες ρέπλικα P2 LR



Εικόνα: 14 ημέρες ρέπλικα P2 LR



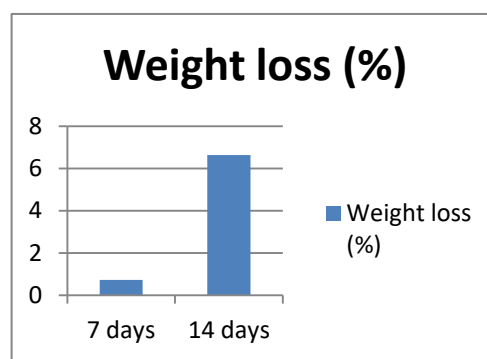
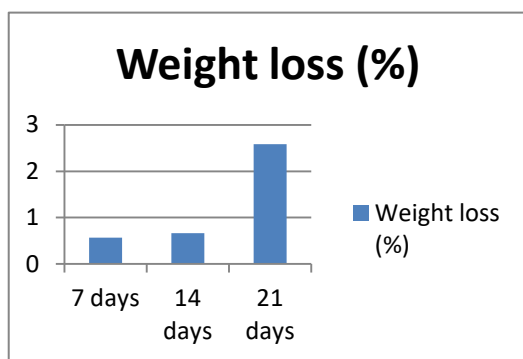
Παρατηρείται, ότι η ρέπλικα P2 LR διατηρεί την μορφολογία των spikes.

Τεχνική αποικοδόμησης: Το πείραμα αυτό περιλαμβάνει την απώλεια βάρους (%) (weight loss (%)) των ρεπλικών PLGA-1 (P1) (10%), των ρεπλικών PLGA-2 (P2) (10%) και των

ρεπλικών PLGA-1:PLGA-2 MIX (50:50) μεσαίας (medium, MR) και υψηλής (high, HR) τραχύτητας στο SEM για 7, 14 και 21 ημέρες σε sterile PBS στους 37 C.

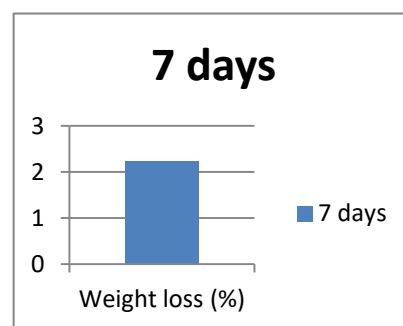
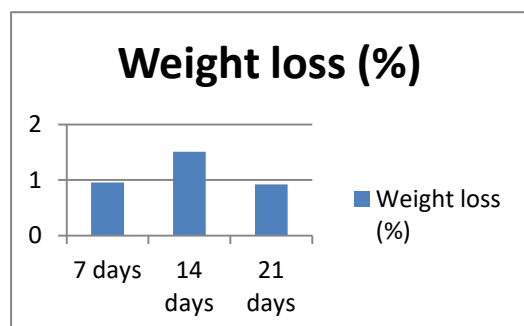
Τα διαγράμματα της απώλειας βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών είναι:

Διάγραμμα απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών P1 MR (αριστερά) και των ρεπλικών P1 HR (δεξιά):



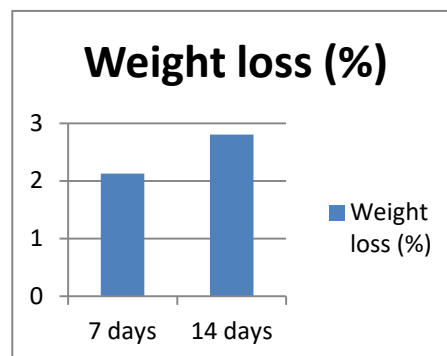
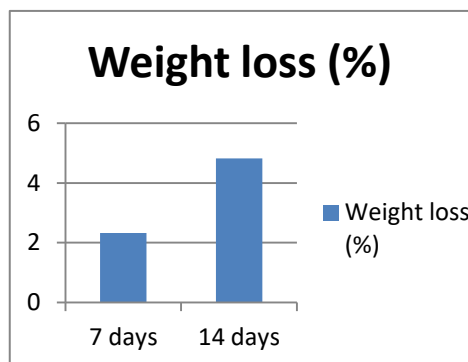
Από τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι οι ρέπλικες P1 HR έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες P1 MR. Αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει περισσότερο υλικό στις ρέπλικες P1 HR. Στις ρέπλικες P1 MR παρατηρείται στις 7 ημέρες και στις 14 ημέρες μια μειωμένη απώλεια βάρους (%) και στις 21 ημέρες μια απότομη αύξηση. Στις ρέπλικες P1 HR παρατηρείται από τις 7 ημέρες στις 14 ημέρες μια απότομη αύξηση απώλεια βάρους (%).

Διάγραμμα απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών P2 MR (αριστερά) και των ρεπλικών P2 HR (δεξιά):



Από τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι οι ρέπλικες P2 HR έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες P2 MR. Αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει περισσότερο υλικό στις ρέπλικες P2 HR. Στις ρέπλικες P2 MR παρατηρείται από τις 7 ημέρες στις 14 ημέρες μια αύξηση απώλεια βάρους (%) και στις 21 ημέρες μια μείωση.

Διάγραμμα απώλεια βάρους (%) σαν συνάρτηση των ημερών αποικοδόμησης των ρεπλικών MIX MR (αριστερά) και των ρεπλικών MIX HR (δεξιά):



Από τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι οι ρέπλικες MIX MR έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) από τις ρέπλικες MIX HR. Στις ρέπλικες MIX MR και HR παρατηρείται από τις 7 ημέρες στις 14 ημέρες μια αύξηση απώλειας βάρους (%).

Από όλα τα διαγράμματα παρατηρείται, ότι η απώλεια βάρους (%) είναι μεγαλύτερη στις ρέπλικες MIX οπότε μεγαλύτερο ρυθμό αποικοδόμησης και μικρότερη στις ρέπλικες P2, καθώς οι ρέπλικες PLGA high έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) σε σχέση με τις ρέπλικες PLGA medium με εξαίρεση στις ρέπλικες MIX.

Σημείωση: Έλλειψη χρονικών σημείων λόγω κακίας αποτύπωσης τοπογραφίας στην ρέπλικα PLGA

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως στις επιφάνειες του πυριτίου χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας έτσι και στις ρέπλικες PLGA στην υψηλή τραχύτητα οι συστοιχίες μικροκώνων (spikes) είναι εντονότερες, πιο ευκρινείς και πιο διαχωρισμένες σε σχέση με τις μεσαίες και χαμηλές τραχύτητες. Αυτό συμβαίνει, επειδή οι ρέπλικες PLGA χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας αποτελούν τα αντίγραφα των επιφανειών πυριτίου χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας. Όσο αφορά για τις τεχνικές αποικοδόμησης τόσο σε DMEM όσο σε sterile PBS παρατηρείται ότι οι ρέπλικες MIX έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) οπότε μεγαλύτερο ρυθμό αποικοδόμησης, ενώ οι ρέπλικες P2 έχουν μικρότερη απώλεια βάρους (%), καθώς οι ρέπλικες PLGA υψηλής τραχύτητας έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) σε σχέση με τις ρέπλικες PLGA χαμηλής ή μεσαίας τραχύτητας. Επίσης, οι τιμές της απώλειας βάρους (%) των ρεπλικών PLGA είναι πιο υψηλές σε DMEM από ότι σε sterile PBS.

Γενικό συμπέρασμα: Η αποικοδόμηση του PLGA εξαρτάται από το μοριακό βάρος, από την αναλογία lactide:glycolide, από το περιβάλλον που γίνεται η αποικοδόμηση και από την μορφολογία του ικρίωματος.

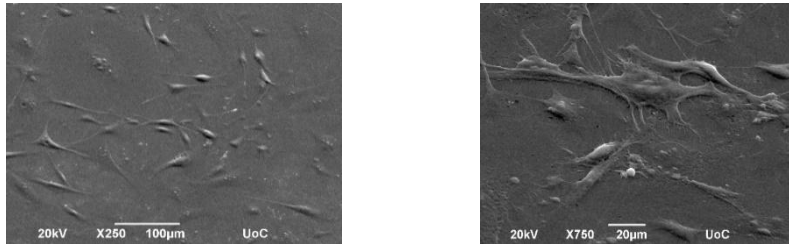
## Αποτελέσματα και Παρατηρήσεις

### Μελέτη της ανάπτυξης των MSCs σε ρέπλικες PLGA

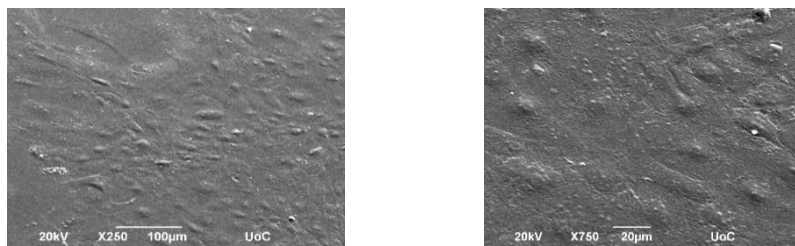
Πείραμα 1: Ο σκοπός αυτού του πειράματος είναι η καλλιέργεια των MSCs (30000 cells/ml) σε ρέπλικες PLGA-1 (P1) (10%), σε ρέπλικες PLGA-2 (P2) (10%), σε ρέπλικες PLGA-1:PLGA-2 (MIX) (50:50) χαμηλής (LR), μεσαίας (MR) και υψηλής (HR) τραχύτητας και καλυπτρίδα για 1, 5 και 7 ημέρες καλλιέργειας για να παρατηρηθεί η επίδραση της τοπογραφίας και του υλικού στην καλλιέργεια των MSCs, όπως μορφολογία.

Από το SEM πάρθηκαν οι παρακάτω εικόνες από την κυρία Αλέκα Μανουσάκη:

Εικόνες: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε καλυπτρίδα

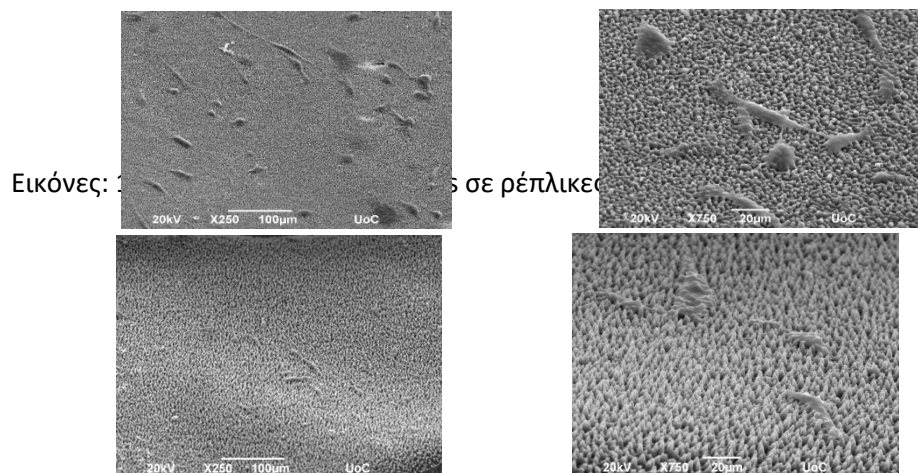


Εικόνες: 7 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε καλυπτρίδα



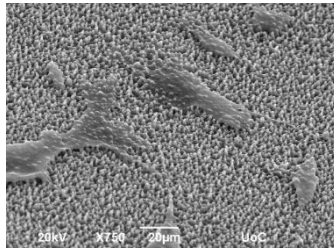
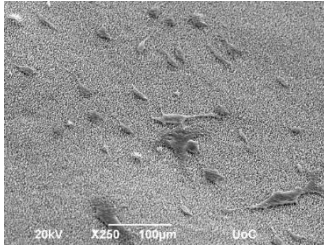
Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα έχουν σχηματίσει χαλί στις 7 ημέρες σε σχέση με την 1 ημέρα καλλιέργειας και έχουν απλωμένο κυτταρικό σώμα.

Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P1 LR

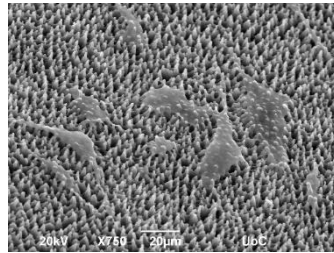
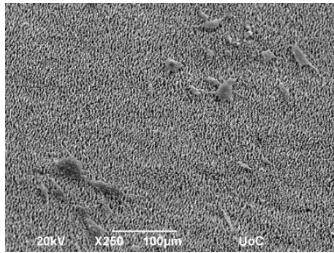


Παρατηρείται, ότι η μορφολογία των κυττάρων στις ρέπλικες P1 LR και HR είναι διαφορετική σε σχέση με την μορφολογία των κυττάρων στις καλυπτρίδες γεγονός που δείχνει ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος επηρεάζει την μορφολογία των κυττάρων.

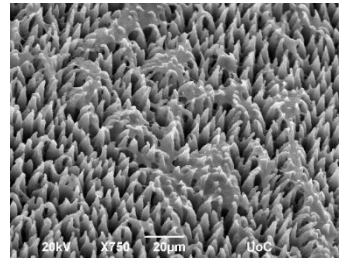
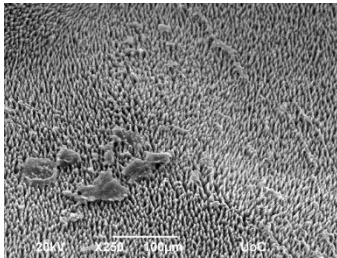
Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P2 LR



Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P2 MR



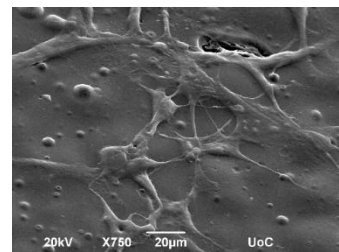
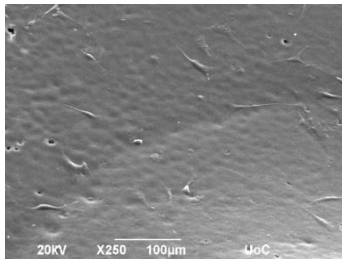
Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P2 HR



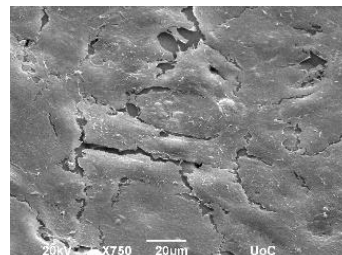
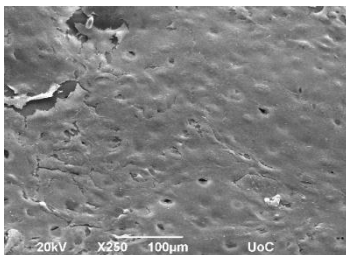
Παρατηρείται, ότι η μορφολογία των κυττάρων στις ρέπλικες P2 LR, MR και HR είναι διαφορετική σε σχέση με την μορφολογία των κυττάρων στις καλυπτρίδες γεγονός που δείχνει ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος επηρεάζει την μορφολογία των κυττάρων.

Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε MIX

flat

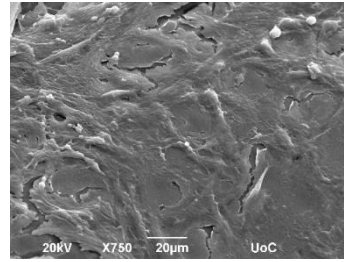
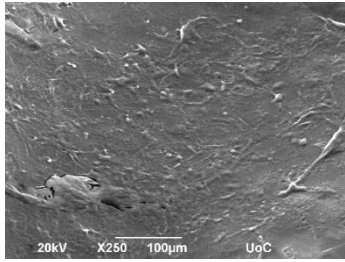


Εικόνες: 5 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε MIX flat



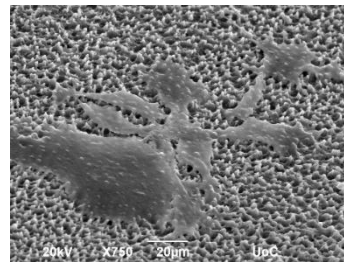
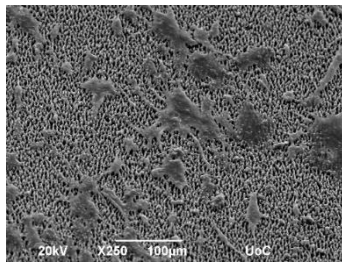
Εικόνες: 7 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε MIX flat



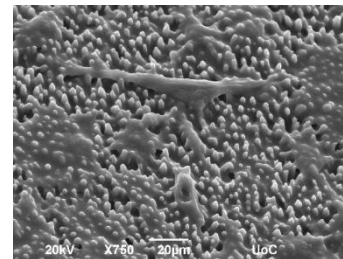
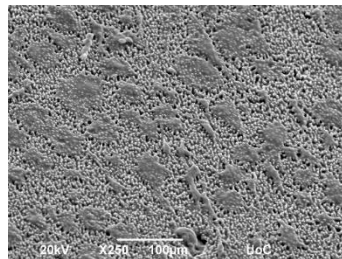


Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα στις 7 και 5 ημέρες σε σχέση με την 1 ημέρα καλλιέργειας έχουν σχηματίσει χαλί όπως και στην καλυπτρίδα και έχουν απλωμένο κυτταρικό σώμα .

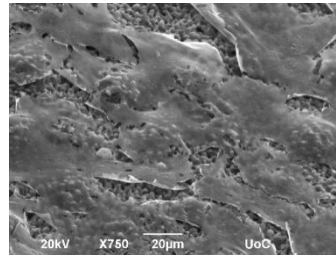
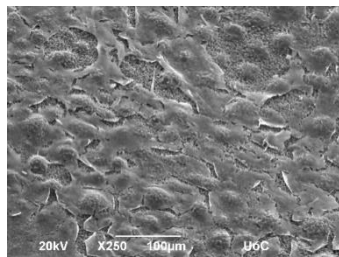
Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX LR



Εικόνες: 5 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX LR

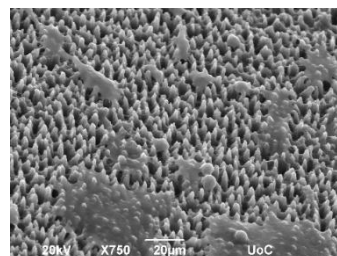
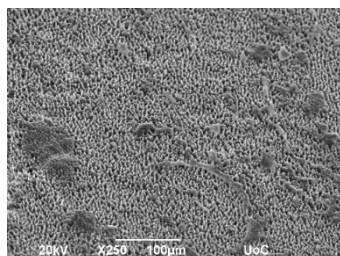


Εικόνες: 7 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX LR



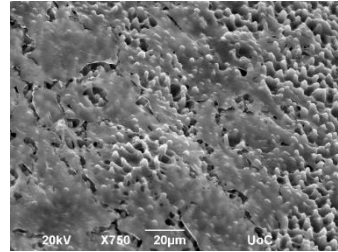
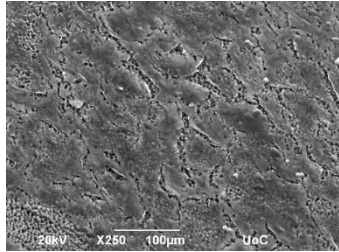
Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα στις 7 και 5 ημέρες σε σχέση με την 1 ημέρα καλλιέργειας έχουν σχηματίσει χαλί. Η μορφολογία των κυττάρων στις ρέπλικες MIX LR είναι διαφορετική σε σχέση με την μορφολογία των κυττάρων στις καλυπτρίδες και στο MIX flat γεγονός που δείχνει ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος επηρεάζει την μορφολογία των κυττάρων.

Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX MR



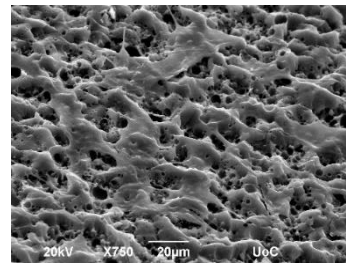
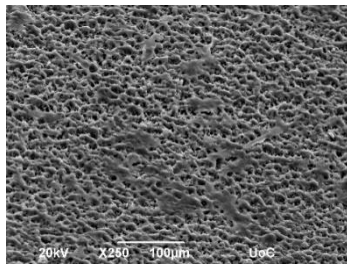


Εικόνες: 7 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX MR



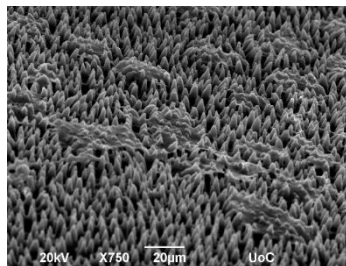
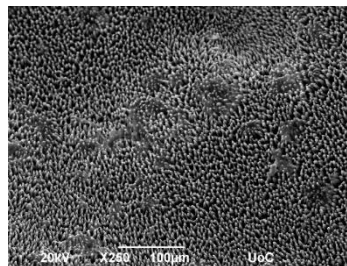
Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα στις 7 ημέρες σε σχέση με την 1 ημέρα καλλιέργειας έχουν σχηματίσει χαλί. Η μορφολογία των κυττάρων στις ρέπλικες MIX MR είναι διαφορετική σε σχέση με την μορφολογία των κυττάρων στις καλυπτρίδες και στο MIX flat γεγονός που δείχνει ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος επηρεάζει την μορφολογία των κυττάρων.

Εικόνες: 1 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX HR



Εικόνες: 7 ημέρες καλλιέργειας MSCs σε  
MIX HR

ρέπλικες



Παρατηρείται, ότι η μορφολογία των κυττάρων στις ρέπλικες MIX HR είναι διαφορετική σε σχέση με την μορφολογία των κυττάρων στις καλυπτρίδες και στο MIX flat γεγονός που δείχνει ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος επηρεάζει την μορφολογία των κυττάρων.

Από όλες τις εικόνες παρατηρείται, ότι η μορφολογία των MSCs στις ρέπλικες PLGA με τις τραχύτητες είναι διαφορετική από την μορφολογία των MSCs στις καλυπτρίδες και στα PLGA flat γεγονός που δείχνει ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος επηρεάζει την μορφολογία των κυττάρων.

Σημείωση: Σε όλα τα υλικά παρατηρείται προσκόλληση κυττάρων.

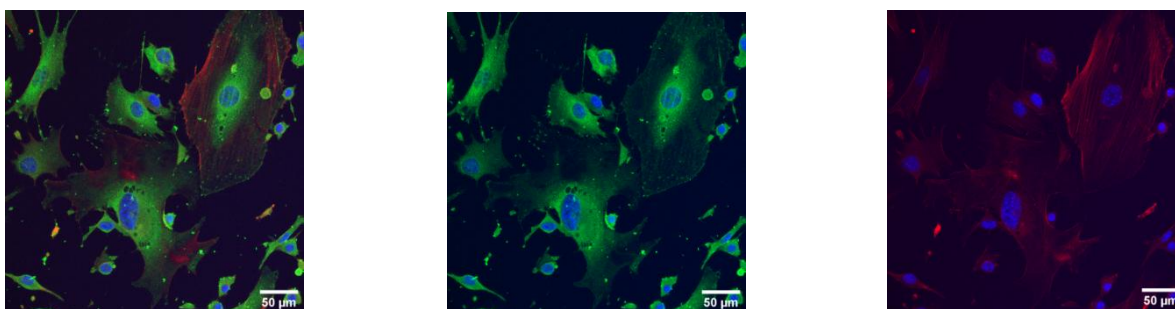
Πείραμα 2: Ο σκοπός του πειράματος είναι να γίνει το πρωτόκολλο της ανοσοκυταροχημείας DAPI/VINCULIN/TRITC σε ρέπλικες PLGA-1 (P1) (10%), ρέπλικες PLGA-2 (P2) (10%), σε ρέπλικες PLGA-1:PLGA-2 (MIX) (50:50) χαμηλής (LR) και υψηλής (HR) τραχύτητας και σε καλυπτρίδα με MSCs (30000 cells/ml) για 1 ημέρα καλλιέργειας με σκοπό την παρατήρηση της έκφρασης DAPI/VINCULIN/TRITC στα MSCs.

Σημειώσεις:

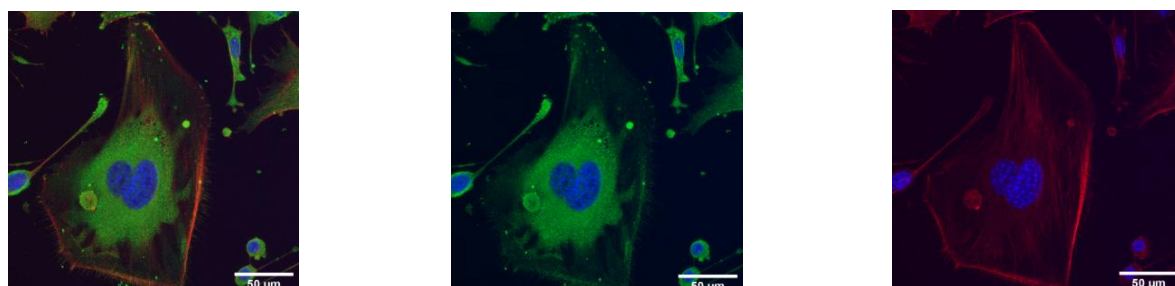
- DAPI → Πυρήνες (μπλε χρώμα)
- VINCULIN (πληροφορίες για την προσκόλληση των κυττάρων και για τις εστιακές συμφύσεις) → Πράσινο χρώμα
- TRITC → Κυτταροσκελετό (κόκκινο χρώμα)

Από το Confocal πάρθηκαν οι παρακάτω εικόνες από την Δρ. Καβατζικίδου Εύη:

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε καλυπτρίδα μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)

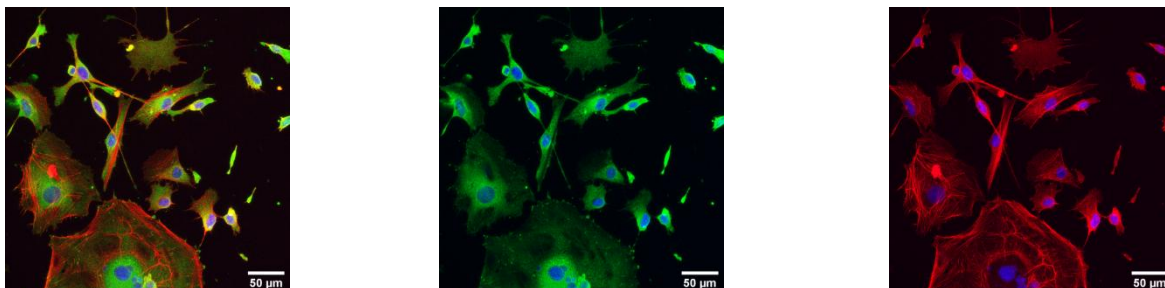


Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε καλυπτρίδα μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)

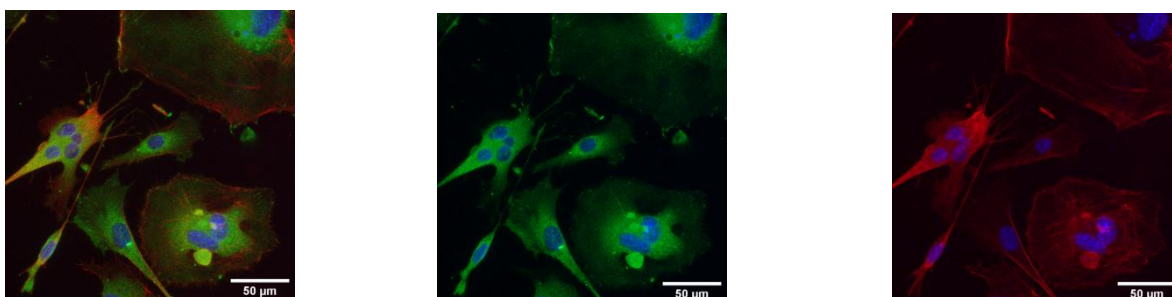


Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα έχουν κυρίως απλωμένο κυτταρικό σώμα προς διάφορες κατευθύνσεις, καθώς υπάρχουν και κάποια κύτταρα με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι μεγάλες και ώριμες που μοιάζουν με ραβδώσεις (έντονα φωτεινά πράσινα σημεία) που εντοπίζονται στις κυτταρικές άκρες των κυττάρων.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε P1 flat μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)

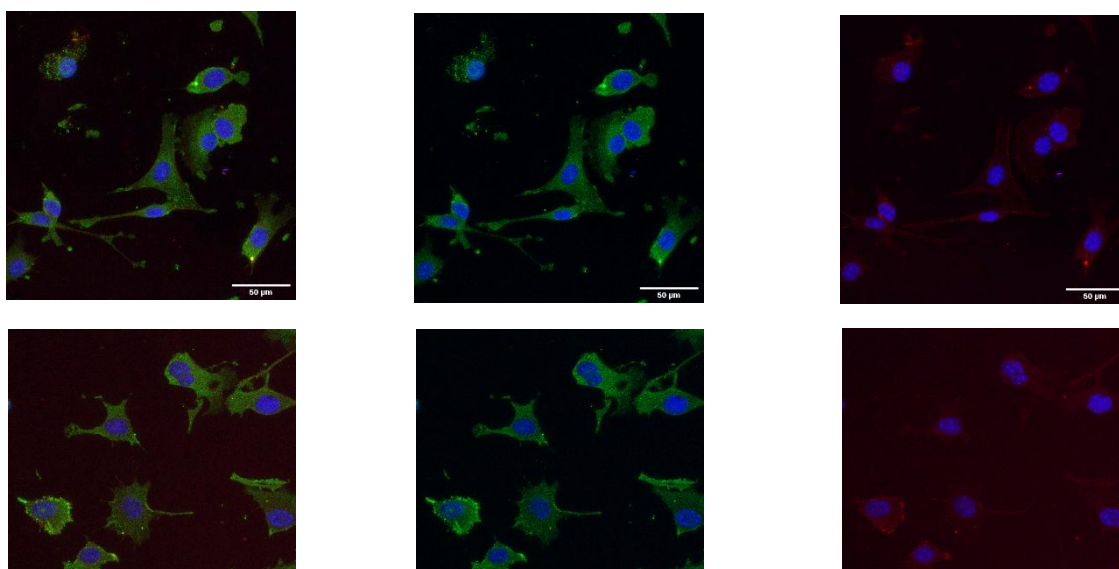


Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε P1 flat μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)



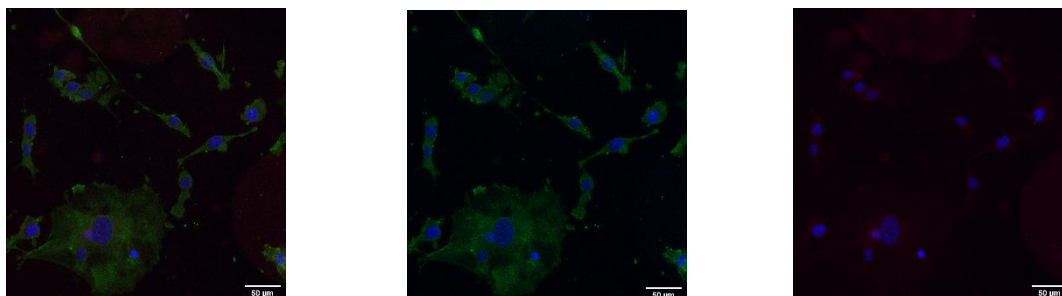
Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα έχουν κυρίως απλωμένο κυτταρικό σώμα προς διάφορες κατευθύνσεις, καθώς υπάρχουν και κάποια κύτταρα με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι μεγάλες και ώριμες που μοιάζουν με ραβδώσεις (έντονα φωτεινά πράσινα σημεία) που εντοπίζονται στις κυτταρικές άκρες των κυττάρων.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε P2 flat μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)

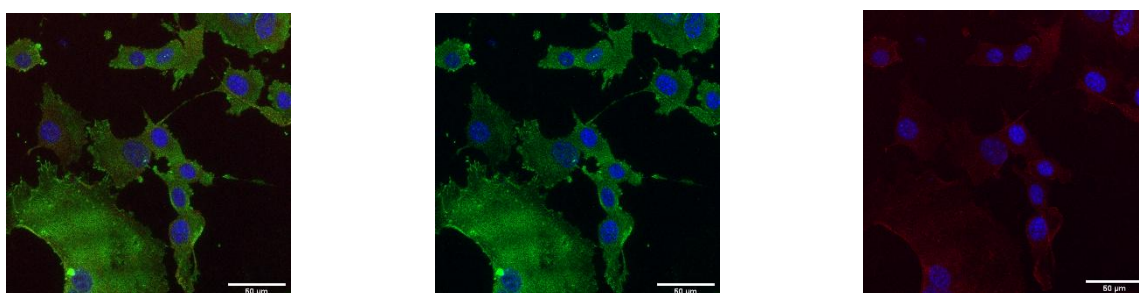


Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα έχουν κυρίως απλωμένο κυτταρικό σώμα προς διάφορες κατευθύνσεις, καθώς υπάρχουν και κάποια κύτταρα με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι μεγάλες και ώριμες που μοιάζουν με ραβδώσεις (έντονα φωτεινά πράσινα σημεία) που εντοπίζονται στις κυτταρικές άκρες των κυττάρων.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε MIX flat μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)



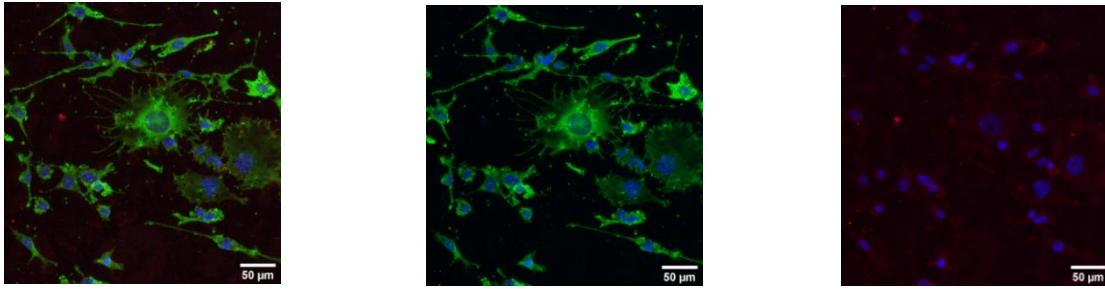
Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε MIX flat μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)



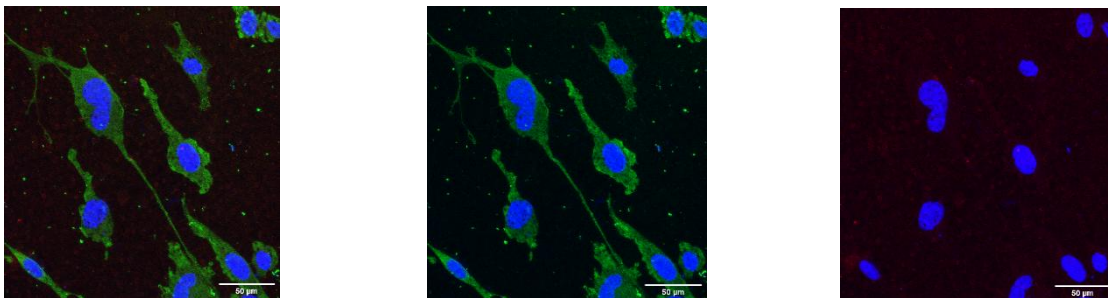
Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα έχουν κυρίως απλωμένο κυτταρικό σώμα προς διάφορες κατευθύνσεις, καθώς υπάρχουν και κάποια κύτταρα με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι μεγάλες και ώριμες που μοιάζουν με ραβδώσεις (έντονα φωτεινά πράσινα σημεία) που εντοπίζονται στις κυτταρικές άκρες των κυττάρων.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P1 LR μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)



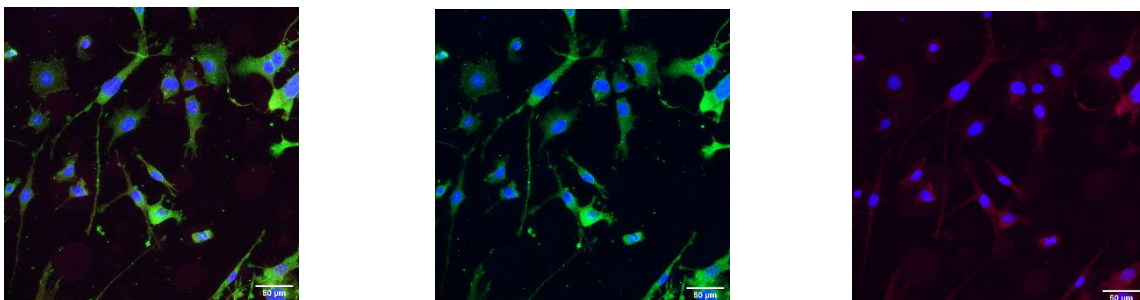


Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P1 LR μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)

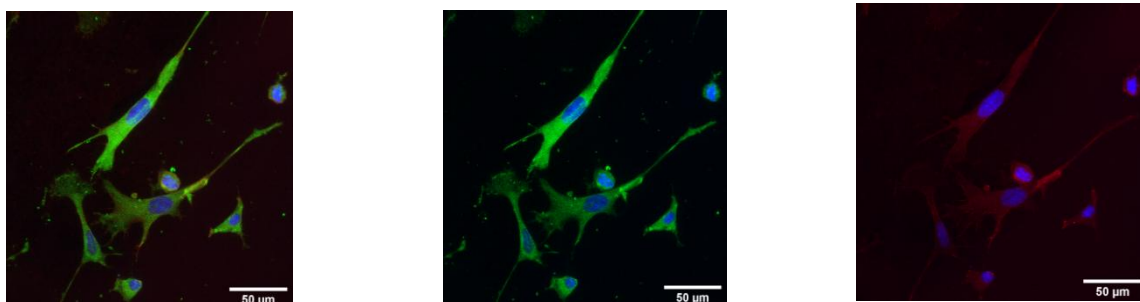


Παρατηρείται, ότι υπάρχουν MSCs με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό, καθώς και MSCs με απλωμένο κυτταρικό σώμα. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι μικρότερες και λιγότερο ώριμες που μοιάζουν με φωτεινά πράσινα σημεία (λιγότερο έντονα) που εντοπίζονται στις κυτταρικές άκρες των κυττάρων σε σχέση με τις καλυπτρίδες και τα PLGA flat.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P1 HR μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)

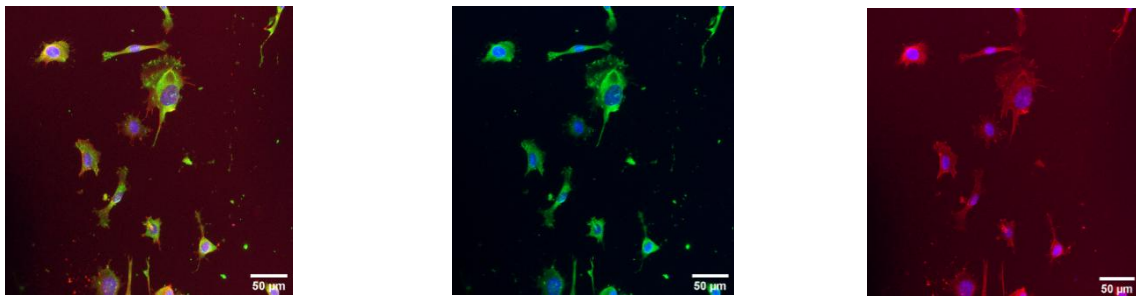


Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες P1 HR μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)

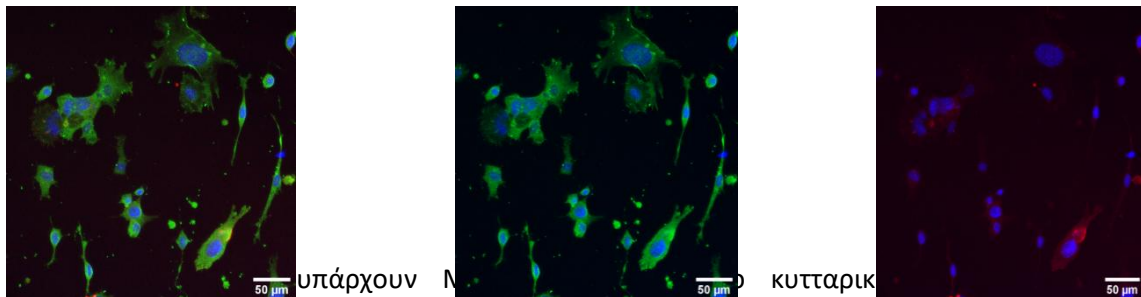


Παρατηρείται, ότι υπάρχουν MSCs με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό, καθώς και MSCs με απλωμένο κυτταρικό σώμα. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι ελάχιστες με ασαφείς σχήματα που μοιάζουν με πολύ μικρά φωτεινά πράσινα σημεία (ακόμα λιγότερο έντονα) σε σχέση με αυτά στις χαμηλές τραχύτητες και στις καλυπτρίδες και στα PLGA flat.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX LR μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)

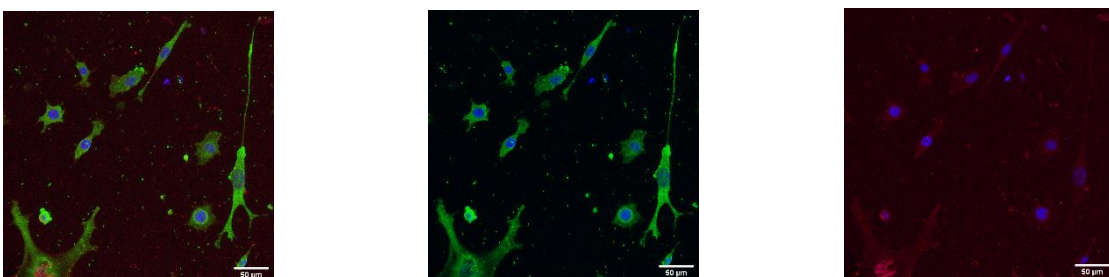


Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX LR μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)

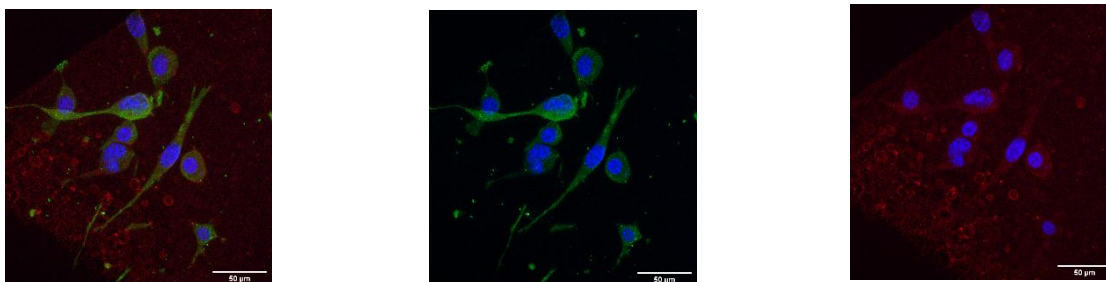


υπάρχουν MSCs με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό, καθώς και MSCs με απλωμένο κυτταρικό σώμα. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι μικρότερες και λιγότερο ώριμες που μοιάζουν με φωτεινά πράσινα σημεία (λιγότερο έντονα) που εντοπίζονται στις κυτταρικές άκρες των κυττάρων σε σχέση με τις καλυπτρίδες και τα PLGA flat.

Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX HR μεγέθυνση x40 (DAPI VINCULIN TRITC)



Εικόνα: 1 ημέρα καλλιέργειας MSCs σε ρέπλικες MIX HR μεγέθυνση x63 (DAPI VINCULIN TRITC)



Παρατηρείται, ότι υπάρχουν MSCs με επιμηκυμένο κυτταρικό σώμα με τυχαίο προσανατολισμό, καθώς και MSCs με απλωμένο κυτταρικό σώμα. Η VINCULIN είναι κατανεμημένη κατά μήκος των απλωμένων κυτταρικών σωμάτων ή των επιμηκυμένων κυτταρικών σωμάτων των κυττάρων. Οι εστιακές συμφύσεις είναι ελάχιστες με ασαφείς σχήματα που μοιάζουν με πολύ μικρά φωτεινά πράσινα σημεία (ακόμα λιγότερο έντονα) σε σχέση με αυτά στις χαμηλές τραχύτητες και στις καλυπτρίδες και στα PLGA flat.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από όλες τις εικόνες παρατηρείται, ότι η τοπογραφία ενός υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει την προσκόλληση (εστιακές συμφύσεις) και την μορφολογία των κυττάρων. Αυτό μάλλον συμβαίνει, επειδή η τοπογραφία επιδρά στην μορφολογία των κυττάρων, όπου αλλάζει το σχήμα των κυττάρων και τα κύτταρα συμμορφώνονται σύμφωνα με την τοπογραφία καθώς οι εστιακές συμφύσεις συμμορφώνονται σύμφωνα με αυτήν. Παρατηρείται καλύτερη προσκόλληση κυττάρων λόγω περισσότερο ώριμων εστιακών συμφύσεων στα PLGA flat και στις ρέπλικες PLGA χαμηλής τραχύτητας σε σχέση με τις ρέπλικες PLGA υψηλής τραχύτητας που οφείλεται στην μορφολογία των spikes.

Γενικό συμπέρασμα: Η τοπογραφία ενός υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει την συμπεριφορά και τις λειτουργίες των κυττάρων, όπως την μορφολογία και την προσκόλληση.

## ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Γενικά παρατηρείται από την βιβλιογραφία και από τα παραπάνω πειράματα, ότι η μικροκατασκευή παίζει σημαντικό ρόλο σε βιοϊατρικές και βιολογικές εφαρμογές για την δημιουργία επιφανειακών δομών στην περιοχή μικρομέτρων που είναι η κλίμακα μεγέθους των κυττάρων και στην περιοχή νανομέτρων που είναι η κλίμακα μεγέθους υπό των κυττάρων. Επίσης, ο χαρακτηρισμός αυτών των δομών είναι απαραίτητος για να έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ως ικρίσματα και στην συνέχεια η χρήση τους στην καλλιέργεια κυττάρων.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν, ότι με την βοήθεια της μαλακής λιθογραφίας συγκεκριμένα την χύτευση αντιγράφων οι συστοιχίες μικροκώνων με νανομετρικού μεγέθους προεξοχές χαμηλής, μεσαίας και υψηλής τραχύτητας στις επιφάνειες του πυριτίου, το οποίο είναι ένα σκληρό, άκαμπτο και μη βιοαποικοδομήσιμο υλικό, που κατασκευάστηκαν με την βοήθεια ακτινοβολίας femtosecond λέιζερ αλλάζοντας την πυκνότητα ενέργειας της δέσμης λέιζερ κάθε φορά για την επιθυμητή τραχύτητα

μπορούν να μεταφερθούν με ακρίβεια στα PLGA-1, PLGA-2 και PLGA-1:PLGA-2, τα οποία είναι μαλακά και βιοαποικοδομήσιμα υλικά. Επίσης, η αποικοδόμηση του PLGA εξαρτάται από το μοριακό βάρος, από την αναλογία lactide:glycolide, από το περιβάλλον που γίνεται η αποικοδόμηση και από την μορφολογία του ικριώματος. Η απώλεια βάρους (%) είναι μεγαλύτερη στις ρέπλικες MIX οπότε μεγαλύτερο ρυθμό αποικοδόμησης και μικρότερη στις ρέπλικες P2, καθώς οι ρέπλικες PLGA high έχουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους (%) σε σχέση με τις ρέπλικες PLGA low ή medium. Τέλος, η τοπογραφία ενός υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει την συμπεριφορά και τις λειτουργίες των κυττάρων, όπως την μορφολογία και την προσκόλληση. Η μορφολογία των MSCs στις ρέπλικες PLGA με τις τραχύτητες είναι διαφορετική από την μορφολογία των MSCs στις καλυπτρίδες και στα PLGA flat. Παρατηρείται καλύτερη προσκόλληση κυττάρων λόγω περισσότερο ώριμων εστιακών συμφύσεων στα PLGA flat και στις ρέπλικες PLGA χαμηλής τραχύτητας σε σχέση με τις ρέπλικες PLGA υψηλής τραχύτητας.

## **ΜΕΡΟΣ 5**

### **ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ**

- Για την κατασκευή ικριωμάτων PLGA μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτός από την χύτευση αντιγράφων και οι άλλες τέσσερις τεχνικές μαλακής λιθογραφίας.
- Για τον χαρακτηρισμό ικριωμάτων PLGA μπορούν να χρησιμοποιηθούν όσο αφορά την αποικοδόμηση τους άλλα περιβάλλοντα που μπορεί να γίνει η αποικοδόμηση όπως προσομοιωμένο σωματικό υγρό (SBF). Επίσης, μπορούν να γίνουν άλλοι χαρακτηρισμοί, όπως χαρακτηρισμός των οπτικών ιδιοτήτων με UV-Vis, γωνία διαβροχής (υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητα) και γεωμετρικές ιδιότητες (μέτρηση γεωμετρικών χαρακτηριστικών των spikes όπως ύψος, πυκνότητα, διάμετρος και απόσταση των spikes).
- Για την καλλιέργεια κυττάρων στα ικριώματα PLGA μπορεί να μελετηθεί η διαφοροποίηση των MSCs (λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, νευροκύτταρα και μυοκύτταρα) στα ικριώματα.

## **ΜΕΡΟΣ 6**

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] Fergal J.O'Brien, [2011], Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materialstoday
- [2] Sandra Pina, Joaquim M. Oliveira and Rui L. Reis, [2015], Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review, Adv. Mater.
- [3] C. Simitzi, A. Ranella, E. Stratakis, [2017], Controlling the morphology and outgrowth of nerve and neuroglial cells: The effect of surface topography, Acta Biomaterialia
- [4] wikipedia.org
- [5] Cristina Castells-Sala, Mireia Alemany-Ribes, Teresa Fernández-Muiños, Lourdes Recha-Sancho, Patricia López-Chicón, Caterina Aloy- Reverté, Javier Caballero-Camino, Alejandro Márquez-Gil and Carlos E Semino, [2013], Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine, Journal of Bioengineering and Bioelectronics



- [6] Shehnaz Ahmed . Veeren M. Chauhan . Amir M. Ghaemmaghami .Jonathan W. Aylott, [2019], New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering, *Biotechnol Lett*
- [7] *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition, Structure and Organization of Actin Filaments
- [8] Amelia Ahmad Khalili and Mohd Ridzuan Ahmad, [2015], A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications, *International Journal of Molecular Sciences*
- [9] Amenehe Slami, [2005], The role of integrins in wound healing, *THE SCIENCE CREATIVE QUARTERLY*
- [10] Max Urbanczyk, Shannon L.Leyl and Katja Schenke-Layland, [2020], The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues, *Matrix Biology*
- [11] Adnan Haider, Sajjad Haider, Madhusudana Rao Kummar, Tahseen Kamal, Abdul-Aziz A Alghyamah, Faiza Jan Iftikhar, Bushra Bano, Naeem Khan. Mohammad Amjid Afridi, Sung Soo Han, Ali Alrahlah, Rawaiz Khan, [2020], Advances in the scaffolds fabrication techniques using biocompatible polymers and their biomedical application: A technical and statistical review, *Journal of Saudi Chemical Society*
- [12] Chor Yong Tay , Scott Alexander Irvine , Freddy Y. C. Boey , Lay Poh Tan and Subbu Venkatraman, [2011], Micro-/Nano-engineered Cellular Responses for Soft Tissue Engineering and Biomedical Applications, *Small*
- [13] Shin-Won Kang, [2010], Application of Soft Lithography for Nano Functional Devices, *Lithography*
- [14] Sujatha Lakshminarayanan, [2017], Micro/Nano Patterning on Polymers Using Soft Lithography Technique, *Micro/Nanolithography*
- [15] L.Papadimitriou, P.Manganas, A.Ranella and E.Stratakis, [2020], Biofabrication for neural tissue engineering applications, *Materials Today Bio*
- [16] E. Stratakis, A. Ranella, and C. Fotakis, [2011], Biomimetic micro/nanostructured functional surfaces for microfluidic and tissue engineering applications, *Biomicrofluidics Fundamentals*
- [17] Dong Qin, Younan Xia & George M Whitesides, [2010], Soft lithography for micro- and nanoscale patterning, *Nature*
- [18] Younan Xia and George M. Whitesides, [1998], review: Soft Lithography, *Annu. Rev. Mater. Sci*
- [19] M.J. Lima, V.M. Correlo, R.L. Reis, [2014], Micro/nano replication and 3D assembling techniques for scaffold fabrication, *Materials Science and Engineering C*

- [20] Alexandra M. Greiner, Adria Sales, Hao Chen, Sarah A. Biela, Dieter Kaufmann and Ralf Kemkemer, [2016], Nano- and microstructured materials for in vitro studies of the physiology of vascular cells, *Journal of Nanotechnology*
- [21] Kyoung-Je Jang, Sujin Kim, Sangbae Park, Woochan Kim, Yonghyun Gwon, Sunho Park, Ki-Taek Lim, Hoon Seonwoo and Jangho Kim, [2020], Lithographically-Fabricated HA-Incorporated PCL Nanopatterned Patch for Tissue Engineering, *Appl. Sci.*
- [22] Hyo Seung Park , Su Yeon Lee , Hyunsik Yoon and Insup Noh, [2014], Biological evaluation of micro-patterned hyaluronic acid hydrogel for bone tissue engineering, *Pure and Applied Chemistry*
- [23] Eun Seok Gil, Sang Huyg Park, Jeff Marchant, Fiorenzo Omenetto, and David L. Kaplan, [2010], Response of Human Corneal Fibroblasts on Silk Film Surface Patterns, *Macromol Biosci.*
- [24] Pegah Hassanzadeh, Mahshid Kharaziha, Mehdi Nikkhah, Su-Ryon Shin, Jungho Jin, Simeiqi He, Wei Sun, Chao Zhong, Mehmet R. Dokmeci, Ali Khademhosseini and Marco Rolandi, [2014], Chitin Nanofiber Micropatterned Flexible Substrates for Tissue Engineering†, *J Mater Chem B Mater Biol Med*
- [25] Naveen Kumar Mekala, Rama Raju Baadhe, Sreenivasa Rao Parcha and Prameela Devi Yalavarthy, [2014], Physical and degradation properties of PLGA scaffolds fabricated by salt fusion technique, *J Biomed Res.*
- [26] H. Fouad, T. Elsarnagawy, Fahad N. Almajhdi, and Khalil Abdelrazek Khalil, [2013], Preparation and In Vitro Thermo-Mechanical Characterization of Electrospun PLGA Nanofibers for Soft and Hard Tissue Replacement, *Int. J. Electrochem. Sci*
- [27] Itsuki Oizumi, Ryo Hamai, Yukari Shiwaku, Yu Mori, Takahisa Anada, Kazuyoshi Baba, Naohisa Miyatake, Soshi Hamada, Kaori Tsuchiy, Shin-nosuke Nishimura, Eiji Itoi, Osamu Suzuki, [2021], Impact of simultaneous hydrolysis of OCP and PLGA on bone induction of a PLGA-OCP composite scaffold in a rat femoral defect, *Acta Biomaterialia*
- [28] A.R. Sadeghi, S. Nokhasteha, A.M. Molavi, M. Khorsand-Ghayeni, H. Naderi-Meshkin and A. Mahdzadeh, [2016], Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes, *Materials Science and Engineering C*
- [29] Alireza Sadeghi-Avalshahr, Samira Nokhasteh, Amir Mahdi Molavi, Mohammad Khorsand-Ghayeni, Meysam Mahdavi-Shahri, [2017], Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold fibers, *Regenerative Biomaterials*
- [30] Ke Zhou, Yutong Li, Lei Zhang, Liang Jin, Feng Yuan, Jinyun Tan, Guangyin Yuan, Jia Pei, [2021], Nano-micrometer surface roughness gradients reveal topographical influences on differentiating responses of vascular cells on biodegradable magnesium, *Bioactive Materials*
- [31] Liangliang Yang, Qi Gao, Lu Ge ab, Qihui Zhou, Eliza M. Warszawik, Reinier Bron, King Wai Chiu Lai and Patrick van Rijn, [2020], Topography induced stiffness alteration of stem cells influences osteogenic differentiation, *Biomaterials Science*

[32] Shuang Li, Chaobo Song, Shengbing Yang, Weijun Yu, Weiqi Zhang, Guohua Zhang, Zhenhao Xi, Eryi Lu, [2019], Supercritical CO<sub>2</sub> foamed composite scaffolds incorporating bioactive lipids promote vascularized bone regeneration via Hif-1 $\alpha$  upregulation and enhanced type H vessel formation, *Acta Biomaterialia*

[33] Genglei Chu, Weidong Zhang, Pinghui Zhou, Zhangqin Yuan, Caihong Zhu, Huan Wang, Jiaying Li, Feng Zhou, Qiang Yang, Huilin Yang and Bin Li, [2020], Substrate Topography Regulates Differentiation of Annulus Fibrosus-Derived Stem Cells via CAV1-YAP-Mediated Mechanotransduction, *acsbiomaterials*

[34] C. Simitzi, E. Stratakis, C. Fotakis, I. Athanassakis, A. Ranella, [2013], Microconical silicon structures influence NGF-induced PC12 cell morphology<sup>†</sup>, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*

[35] C. Simitzi, P. Efstathopoulos, A. Kourgiantaki c, A. Ranella, I. Charalampopoulos, C. Fotakis, I. Athanassakis, E. Stratakis, A. Gravanis, [2015], Laser fabricated discontinuous anisotropic microconical substrates as a new model scaffold to control the directionality of neuronal network outgrowth, *Biomaterials*

[36] Σημειώσεις κ. Χ.Σιμιτζή, Εργαστήριο Λείζερ και Μοντέρνας Οπτικής, «Βιομηχανικές επιφάνειες»

[37] Konstantinos Avgoustakis, [2005], Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA), *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*

[38] Kapoor, Bhatia, Kaur, Sharma, Kaur & Dhawan, [2015], PLGA: a unique polymer for drug delivery, *Ther. Deliv*

[39] Shima Salmasi, Deepak M Kalaskar, Wai-Weng Yoon, Gordon W Blunn, Alexander M Seifalian, [2015], Role of nanotopography in the development of tissue engineered 3D organs and tissues using mesenchymal stem cells, *World Journal of Stem Cells*

[40] Eleftheria Babaliari, Paraskevi Kavatzikidou, Despoina Angelaki, Lefki Chaniotaki, Alexandra Manousaki, Alexandra Siakouli-Galanopoulou, Anthi Ranella and Emmanuel Stratakis, [2018], Engineering Cell Adhesion and Orientation via Ultrafast Laser Fabricated Microstructured Substrates, *Int. J. Mol. Sci.*

