

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επίδραση Νανοδομημένων Επιφανειών Πολυμεθακρυλικού Μεθυλεστέρα στην Προσκόλληση και τη Βιωσιμότητα Φυσιολογικών και Καρκινικών Κυττάρων

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΑΝΙΟΥΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επίδραση Νανοδομημένων Επιφανειών Πολυμεθακρυλικού Μεθυλεστέρα στην Προσκόλληση και τη Βιωσιμότητα Φυσιολογικών και Καρκινικών Κυττάρων

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΑΝΙΟΥΡΑ

Α.Μ.: 61106

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
Αθανασία Σιαφάκα- Καπάδαη**,** Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανασία Σιαφάκα- Καπάδαη, Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α΄, Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη, Λέκτορας, Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 28/1/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νανοτοπογραφία των επιφανειών είναι δυνατόν να επηρεάζει την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της επιφανειακής νανοτοπογραφίας στην προσκόλληση, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων. Λεπτά υμένια πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA), τα οποία είχαν επιστρωθεί σε δισκία πυριτίου, εγχαράχθηκαν με διαφορετικές συνθήκες πλάσματος O_2 (δυναμικό αυτοπόλωσης: 0-100 Volt, θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15 και 65 ^oC, χρόνος εγχάραξης: 3 δευτερόλεπτα, 1 λεπτό και 3 λεπτά) με σκοπό να δημιουργηθεί διαφορετική τραχύτητα στις επιφάνειες. Οι κατεργασμένες επιφάνειες καθώς και μη κατεργασμένες χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την καλλιέργεια φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ινοσάρκωμα, της σειράς HT1080. Βρέθηκε ότι στη μη κατεργασμένη επιφάνεια οι φυσιολογικοί ινοβλάστες προσκολλώνται και πολλαπλασιάζονται, σε αντίθεση με τους καρκινικούς, οι οποίοι προσκολλώνται ασθενώς. Αντίθετα, στις επιφάνειες οι οποίες είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα O_2 με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά βρέθηκε ότι μετά από μία ημέρα καλλιέργειας προσκολλώνται 3 φορές περισσότερα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας ο πληθυσμός των καρκινικών κυττάρων είχε αυξηθεί 6 φορές σε σύγκριση με τη μία μέρα, ενώ ο πληθυσμός των φυσιολογικών υποδιπλασιάζεται με αποτέλεσμα ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας να είναι 33 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με εκείνον των φυσιολογικών. Διαπιστώθηκε ότι οι νανοδομημένες επιφάνειες προκαλούσαν παραμόρφωση του κυτταροπλάσματος και συρρίκνωση της επιφάνειας των πυρήνων των φυσιολογικών ινοβλαστών, ενώ δεν είχαν επίδραση στη μορφολογία των καρκινικών κυττάρων. Για να διερευνηθεί η αιτία της μείωσης του αριθμού των φυσιολογικών κυττάρων στις τραχείες επιφάνειες μελετήθηκε ο βαθμός απόπτωσής τους μέσω της δοκιμασίας σταυροσπορίνης. Διαπιστώθηκε ότι η μείωση του αριθμού των κυττάρων δεν οφείλεται σε απόπτωση καθώς δεν ανιχνεύθηκαν αποπτωτικά σώματα στους πυρήνες ούτε των φυσιολογικών ούτε των καρκινικών κυττάρων. Μελετήθηκε, επίσης, ο

βαθμός σχηματισμού εστιακών επαφών μέσω μεθόδου ανοσοκυτταρολογίας για την ανίχνευση βινκουλίνης. Διαπιστώθηκε ότι οι φυσιολογικοί ινοβλάστες σχηματίζουν ώριμες εστιακές επαφές μόνο στις μη κατεργασμένες επιφάνειες ενώ στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες ο αριθμός των εστιακών επαφών είναι πολύ μικρός. Επομένως, η μείωση του πληθυσμού των φυσιολογικών κυττάρων μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας στις πολύ τραχιές επιφάνειες είναι δυνατόν να οφείλεται στην ασθενή προσκόλλησή τους στην επιφάνεια η οποία παρεμποδίζει την φυσιολογική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Λόγω των ιδιαίτερα ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων ως προς την επιλεκτική προσκόλληση καρκινικών κυττάρων στις νανοδομημένες επιφάνειες, στο πλαίσιο της εργασίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκαλλιέργειας καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων σε αυτές τις επιφάνειες. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες στο αρχικό εναιώρημα της καλλιέργειας και βρέθηκε ότι ακόμη και στην περίπτωση κατά την οποία ο αρχικός αριθμός καρκινικών κυττάρων ήταν υποδεκαπλάσιος των φυσιολογικών, μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας ο αριθμός τους ήταν διπλάσιος των φυσιολογικών. Επομένως, οι νανοδομημένες μέσω πλάσματος οξυγόνου επιφάνειες μπορεί να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για τον εμπλουτισμό και την απομόνωση καρκινικών κυττάρων που προέρχονται από νεοπλασματικούς ιστούς και θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν τόσο για την έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας όσο και για την επιλογή κατάλληλων θεραπευτικών σχημάτων σε επίπεδο *in vitro* καλλιέργειας με στόχο την εξατομικευμένη θεραπεία.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αλληλεπίδραση κυττάρων με επιφάνειες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: προσκόλληση κυττάρων, νανοδόμηση επιφανειών, πλάσμα O_2, εμπλουτισμός πληθυσμού καρκινικών κυττάρων

ABSTRACT

Surface nanotopography influences cell attachment and proliferation, as well as other basic cell functions. The aim of this work was to study the effect of surface nanotexturing on the adhesion, viability and proliferation of normal fibroblasts and cancer cells. Thin poly(methyl methacrylate) (PMMA) films on Si substrate were treated with O_2 plasma under different etching conditions (bias voltage: 0-100 Volts; electrode temperature: 15 ^oC and 65 ^oC; etching time: 3 s, 1 min and 3 min) in order to achieve varying roughness and surface nanotexturing. The O_2 plasma nanotextured surfaces along with untreated ones were used as substrates to culture normal fibroblasts and cancer cells (fibrosarcoma cell line HT1080). It was found that normal fibroblasts adhered and proliferated on the untreated PMMA surfaces while HT1080 adhered negligibly on these surfaces. On the other hand, employing O_2 plasma nanotextured surfaces prepared using bias voltage of -100 V for 3 min as culture substrates, three times more HT1080 cells adhered after one day culture compared to normal cells. Furthermore, at three days, the number of HT1080 cells was increased 6 times compared to the one day culture, whereas the number of normal cells was reduced by half providing a ratio of cancer to normal cells of approximately 33. The same results were obtained during coculture after one and three days. Although the initial number of HT1080 was 10 times less than the number of normal fibroblasts, the population of the cancer cells was enhanced 1,6 times after one day and 2,1 times after 3 days of coculture. Moreover, it was shown that nanotextured surfaces influenced the shape of the cytoplasm and the area of the nucleus of normal fibroblasts, thus they had no effect on HT1080 cancer cells. Furthermore, normal fibroblasts formed mature focal adhesion complexes on the untreated surfaces, but not on the treated ones. This fact was observed through the expression of vinculin and explains the reduction of their population on the very rough surfaces. HT1080 cancer cells expressed vinculin very vaguely. It was also found that the surfaces did not cause apoptosis to either the normal or the cancer cells, as apoptotic bodies were not present at their nucleuses. In conclusion, O_2 plasma nanotextured PMMA surfaces could be a useful tool for the enrichment and isolation of cancer cells derived from tissues suspected for

neoplasias and thus, could help to improve cancer diagnosis and facilitate personalized therapy approaches.

SUBJECT AREA: cell interactions with surfaces

KEYWORDS: cell attachment, nanostructured surfaces, oxygen plasma, enrichment of cancer cells

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... 23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ…….. 25

1.1 Εισαγωγή..... 25

1.2 Αλληλεπίδραση των κυττάρων με τις νανοδομές της επιφάνειας..... 26

1.3 Επίδραση της νανοδόμησης των επιφανειών στην κυτταρική απόκκριση..... 30

1.3.1 Επίδραση του μεγέθους των δομών..... 30

1.3.2 Επίδραση του σχήματος των δομών..... 32

1.3.2.1 Αυλάκια..... 32

1.3.2.2 Φρεάτια και νησίδες..... 33

1.3.2.3 Φρεάτια και αυλάκια..... 33

1.3.2.4 Προεξοχές..... 34

1.3.3 Επίδραση της απόστασης μεταξύ των νανοδομών..... 35

1.4 Επίδραση του υλικού του υποστρώματος..... 36

1.5 Επίδραση της κυτταρικής σειράς..... 37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΝΑΝΟΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΟΜΗΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ……. 41

2.1 Χρησιμότητα της νανοσχηματοποίησης των επιφανειών για μελέτη βιολογικών συστημάτων..... 41

2.2 Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων (e-beam lithography)..... 43

2.3 Λιθογραφία κολλοειδών σωματιδίων (Colloidal lithography)…..... 43

2.4 Λιθογραφία νανοσφράγισης εν θερμώ (Nanoimprint lithography)..... 44

2.5 Ηλεκτρική περιστροφή (Electrospinning)..... 44

2.6 Αποανάμιξη πολυμερών (Polymer demixing) 44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ…… 47

3.1 Γενικά για το πλάσμα..... 47

3.2 Εγχάραξη με πλάσμα..... 49

3.3 Νανοδόμηση επιφανειών μέσω εγχάραξης με πλάσμα..... 51
3.4 Δημιουργία νανοϋφής με πλάσμα σε επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)..... 52
3.5 Μελέτες προσκόλλησης και επιβίωσης κυττάρων σε νανοδομημένες με πλάσμα επιφάνειες PMMA..... 55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΝΑΝΟΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ……... 59
4.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες ινοβλαστών..... 59
4.2 Ενεργοποίηση ινοβλαστών..... 60
4.3 Ινοβλάστες και καρκινογένεση..... 62
4.4 Ινοβλάστες και ινοσάρκωμα..... 63
4.5 Επίδραση της επιφανειακής νανοτοπογραφίας στη μορφολογία και τις λειτουργίες των ινοβλαστών..... 64

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ…… 71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ…… 73
5.1 Επίστρωση υμενίου PMMA σε δισκίο πυριτίου..... 73
5.2 Εγχάραξη με πλάσμα O_2..... 74
5.3 Χαρακτηρισμός των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (SEM)..... 77
5.4 Χαρακτηρισμός των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)..... 80
5.5 Υπολογισμός της υδροφιλικότητας των νανοδομημένων με πλάσμα επιφανειών..... 83
5.6 Κυτταρικές σειρές..... 85
5.7 Κυτταροκαλλιέργειες..... 86
5.7.1 Απόψυξη κυτταρικής σειράς..... 87
5.7.2 Ανακαλλιέργεια..... 88
5.7.3 Ψύξη κυττάρων..... 89
5.8 Μέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιματοκυτταρόμετρο..... 89
5.9 Καλλιέργεια και έλεγχος προσκόλλησης υγιών και καρκινικών

ινοβλαστών σε επιφάνειες PMMA..... 91
5.9.1 Αποστείρωση σχηματοποιημένων επιφανειών 91
5.9.2 Έλεγχος της προσκόλλησης των κυττάρων σε επιφάνειες PMMA..... 92
5.10 Αξιολόγηση της μορφολογίας των κυττάρων πάνω στις νανοδομημένες επιφάνειες με ανοσοκυτταρολογία..... 93
5.11 Μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων στις νανοδομημένες από το πλάσμα επιφάνειες..... 95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ…….. 97
6.1 Τροποποίηση επιφανειών με πλάσμα οξυγόνου..... 98
6.2 Χαρακτηρισμός των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (SEM)..... 99
6.3 Υπολογισμός του ύψους των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)..... 101
6.4 Έλεγχος της υδροφιλικότητας των νανοδομημένων με πλάσμα O2 επιφανειών..... 102
6.5 Προσκόλληση και ανάπτυξη φυσιολογικών ινοβλαστών καθώς και καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ινοσάρκωμα στις τροποποιημένες από το πλάσμα επιφάνειες..... 104
6.6 Μορφολογία πυρήνα και κυτταροπλάσματος των φυσιολογικών ινοβλαστών καθώς και των καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από τη σειρά HT1080 στις τροποποιημένες από το πλάσμα επιφάνειες..... 115
6.6.1 Φυσιολογικοί ινοβλάστες..... 116
6.6.2 Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT1080)..... 118
6.7 Συγκαλλιέργεια καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων..... 120
6.8 Μελέτη σχηματισμού εστιακών επαφών μέσω ανίχνευσης της συσσωρευμένης βινουλίνης..... 123
6.8.1 Φυσιολογικοί ινοβλάστες..... 124
6.8.2 Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT1080)..... 125

6.9 Έλεγχος απόπτωσης των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων στις επιφάνειες..... 126
6.9.1 Φυσιολογικοί ινοβλάστες..... 127
6.9.2 Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT1080)..... 129

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ……..... 131
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ..... 137
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ..... 139
ΑΝΑΦΟΡΕΣ…… 141

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Απεικόνιση των μηχανισμών μετάδοσης σήματος που επάγονται από την μηχανική διάταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η μηχανική τάση μπορεί να επάγει τη μετάδοση του σήματος από την εξωκυττάρια μήτρα στις ιντεγκρίνες και έπειτα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα επιφέροντας αλλαγές στη μεταγραφή και τη μετάφραση των γονιδίων. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει στη διάνοιξη καναλιών προκαλώντας την εισροή ιόντων (π.χ. Ca^{2+}) και την έναρξη ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών..... 28

Σχήμα 1.2: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης στις οποίες απεικονίζονται φιλοπόδια ανθρώπινων εμβρυϊκών οστεοβλαστών που έχουν καλλιεργηθεί επί 24 ώρες σε επιφάνειες νανοδομημένες με νησίδες ύψους 11 nm (α), 38 nm (β), 85 nm (γ, ζ), αντίστοιχα, και για 3 ώρες σε επιφάνειες με νησίδες ύψους 85 nm (δ,ε)……..... 32

Σχήμα 1.3: Εικόνες από μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων από επιφάνειες πολυστυρενίου (α, β) και πολυβρωμοστυρενίου (γ, δ) στις οποίες καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι εμβρυϊκοί οστεοβλάστες επί 3 (α, γ) και 24 ώρες (β, δ), αντίστοιχα..... 37

Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των ενεργών σωματιδίων που υπάρχουν σε ένα πλάσμα οξυγόνου..... 47

Σχήμα 3.2: Οι βασικοί μηχανισμοί εγχάραξης με πλάσμα..... 49

Σχήμα 3.3: Επιφανειακή και πλευρική τραχύτητα σε επιφάνεια Si μετά από εγχάραξη με πλάσμα οξυγόνου..... 51

Σχήμα 3.4: Χημικός τύπος του πολυμεθακρυλικού μεθυλεστέρα..... 52

Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση της μορφολογίας και των οργανιδίων ενός ινοβλάστη..... 59

Σχήμα 4.2: α) Ανενεργοί ινοβλάστες. Οι ανενεργοί ινοβλάστες έχουν ατρακτοειδές σχήμα, κυτταροσκελετό πλούσιο σε ακτίνη και ενδιάμεσα ινίδια βιμεντίνης. Περιβάλλονται από την εξωκυττάρια μήτρα, η οποία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο Ι και φιμπρονεκτίνη. β) Στην περίπτωση των ενεργών ινοβλαστών η εξωκυττάρια μήτρα αποτελείται από κολλαγόνο Ι, τενασκίνη C, EDA-φιμπρονεκτίνη και όξινη πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη (secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC). Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα

είναι η ύπαρξη α-ακτίνης λείων μυϊκών κυττάρων στον κυτταροσκελετό τους , γι' αυτό και συχνά αναφέρονται ως «μυοϊνοβλάστες»..... 61

Σχήμα 4.3: Σχηματική απεικόνιση των λειτουργιών των ενεργών ινοβλαστών που εντοπίζονται στο καρκινικό στρώμα. Οι ινοβλάστες επικοινωνούν με καρκινικά, επιθηλιακά, και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της έκκρισης αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων. Η αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου I και III και η de novo έκφραση τενασκίνης C, επάγουν τη δημιουργία μιας τροποποιημένης εξωκυττάριας μήτρας, η οποία επιταχύνει την ανάπτυξη και εξάπλωση του όγκου. Οι ινοβλάστες, επίσης ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση με την έκκριση χημειοκινών, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (MCP1) και ιντερλευκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Ακόμα, αλληλεπιδρούν με το μικροαγγειακό σύστημα μέσω της έκκρισης μεταλλοπρωτεϊνασών (MMPs) και του αγγειακού αυξητικού παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF). Τέλος, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων, όπως ο προερχόμενος από τα στρωματικά κύτταρα παράγοντας-1 (Stromal derived factor-1, SDF1) και ο αυξητικός παράγοντας μετατροπής- β (TGFβ)..... 63

Σχήμα 4.4: Απεικόνιση της ακτίνης και της τουμπουλίνης μετά από 72 ώρες καλλιέργειας ινοβλαστών σε (α, β) επίπεδη επιφάνεια, (γ,δ) επιφάνεια με νανονησίδες ύψους 10 nm, και (ε, ζ) επιφάνεια με νανονησίδες ύψους 50 nm. Τόσο η ακτίνη (α,γ) όσο και η τουμπουλίνη (β,δ) ήταν πολύ καλά οργανωμένες στους ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν στην επίπεδη επιφάνεια και στην επιφάνεια με τις νησίδες ύψους 10 nm. Αντίθετα, στις επιφάνειες με τις νησίδες ύψους 50 nm η ακτίνη (ε) και η τουμπουλίνη (ζ) είχαν τυχαία διευθέτηση..... 66

Σχήμα 4.5: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού που καταδεικνύουν προσπάθεια ενδοκύττωσης των νανοκολώνων από κύτταρα που επωάσθηκαν σε επιφάνειες με νανοκολώνες διαμέτρου 100 nm. Παρότι παρατηρήθηκε καλή οργάνωση της τουμπουλίνης στα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες (α), η πυκνότητα της είναι μεγαλύτερη στην επίπεδη επιφάνεια (β). Αντίθετα, η δυναμίνη είναι αυξημένη και πιθανώς συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροπλάσματος

στα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες (γ), σε σχέση με την επίπεδη επιφάνεια όπου είναι ελάχιστη. (δ). Παρομοίως,η κλαθρίνη, εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στην περιφέρεια και στο κυτταρόπλασμα των ινοβλαστών που καλλιεργούνται στις επιφάνειες που φέρουν νανοκολώνες (ε), ενώ είναι διάχυτη στους ινοβλάστες που καλλιεργούνται στην επίπεδη επιφάνεια (στ). Τέλος, η βιμεντίνη δεν είναι καλά οργανωμένη και εμφανίζει συσσωματώματα στα φιλοπόδια των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες (ζ), αντίθετα με τα κύτταρα που αναπτύσσονται στις επίπεδες επιφάνειες (η). Σε όλες τις εικόνες η ακτίνη (κόκκινη χρώση) φαίνεται να είναι καλύτερα οργανωμένη στις επίπεδες επιφάνειες..... 68

Σχήμα 4.6: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης (κόκκινη χρώση) και της βινκουλίνης (πράσινη χρώση) ινοβλαστών που έχουν καλλιεργηθεί σε επιφάνειες με επιφάνειες που φέρουν τετράγωνες δομές χρυσού διαστάσεων 250 nm^2, 500 nm^2, 1 μm^2 και 2 μm^2 . Στα τετράγωνα διαστάσεων 250 nm^2 (δ) και 500 nm^2 (ε) φαίνεται ότι εκτείνουν πολλά φιλοπόδια, έχουν συρρικνωμένο κυτταροσκελετό και όχι καλά οργανωμένη ακτίνη σε αντίθεση με τα τετράγωνα διαστάσεων 1 μm^2 (β) και 2 μm^2 (γ), όπου έχουν την ίδια εξαπλωμένη μορφολογία με την επίπεδη επιφάνεια χρυσού (α)..... 70

Σχήμα 5.1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επίστρωσης διαλυματος πολυμερούς σε δισκίο με περιστροφή και θέρμανση..... 74

Σχήμα 5.2: Ο αντιδραστήρας πλάσματος του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής..... 75

Σχήμα 5.3: Ο κύριος θάλαμος του αντιδραστήρα με την πηγή πλάσματος και τη παροχή ισχύος. Δεξιά φαίνεται η σύζευξη ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου..... 76

Σχήμα 5.4: Σωματίδια που εκπέμπονται από μια επιφάνεια κατά την πρόσπτωση της δέσμης ηλεκτρονίων..... 78

Σχήμα 5.5: Φωτογραφία του μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων JSM-7401-F που βρίσκεται στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής..... 80

Σχήμα 5.6: Η αρχή λειτουργίας ενός Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης..... 81

Σχήμα 5.7: Εικόνα της συσκευής AFM CP-II της εταιρείας Veeco του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής..... 83

Σχήμα 5.8: Απεικόνιση μέτρησης γωνίας επαφής σε μια υδρόφιλη και μια υδρόφοβη επιφάνεια..... 84

Σχήμα 5.9: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης GBX Digidrop Contact Angle Measurement System..... 85

Σχήμα 5.10: α) φωτογραφία αιματοκυτταρόμετρου Neubauer και καλυπτρίδων, β) Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας μέτρησης κυττάρων…. 90

Σχήμα 5.11: Χημική δομή της σταυροσπορίνης..... 96

Σχήμα 6.1: Εικόνες SEM από επιφάνειες PMMA που είχαν κατεργαστεί με πλάσμα O_2 με δυναμικό 50 Volt για 1min στους 15^{o}C (α) και στους 65^{o}C (β), με 75 Volt για 1min στους 15^{o}C (γ) και στους 65^{o}C (δ), με 100 Volt για 1min στους 15^{o}C (ε) και στους 65^{o}C (στ) και τέλος με 100 Volt για 3 min στους 15^{o}C (ζ) και στους 65^{o}C (η). Σε όλες τις εικόνες η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση ήταν 30.000..... 100

Σχήμα 6.2: Εικόνες από AFM επιφανειών PMMA, εγχαραγμένων με δυναμικό αυτοπόλωσης: (α) 0 Volt, (β) 100 Volt για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C και χρόνο εγχάραξης 1 λεπτό. Όλες οι εικόνες είναι 2 μm* 2 μm με ανάλυση 512* 512 σημεία..... 101

Σχήμα 6.3: Απεικόνιση γωνιών επαφής για επιφάνειες που έχουν υποστεί 6 μέρες γήρανση και έχουν κατεργαστεί με πλάσμα σε δυναμικό αυτόπολωσης 0 Volt για χρόνους (α) 3sec (57^{o}) και (β) 1min (52^{o}) και σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C..... 104

Σχήμα 6.4: Εικόνες πυρήνων από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας: (1) 1 μέρα, (2) 3 μέρες, (α- γ) φυσιολογικών και (δ- στ) καρκινικών ινοβλαστών στις συνθήκες που αναγράφονται στις εικόνες, για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C..... 106

Σχήμα 6.5: Εικόνες πυρήνων από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας: (1) 1 μέρα, (2) 3 μέρες, (α- γ) φυσιολογικών και (δ- στ) καρκινικών ινοβλαστών στις συνθήκες που αναγράφονται στις εικόνες, για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C..... 108

Σχήμα 6.6: Μέσος αριθμός προσκολλημένων φυσιολογικών ινοβλαστών ανά μονάδα επιφάνειας που προσδιορίστηκε για τη μη κατεργασμένη (Υμένιο PMMA) καθώς και τις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA, σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου (α) 15^{o}C και (β) 65^{o}C για χρόνο καλλιέργειας μία μέρα..... 109

Σχήμα 6.7: Μέσος αριθμός προσκολλημένων φυσιολογικών ινοβλαστών ανά μονάδα επιφάνειας που προσδιορίστηκε για τη μη κατεργασμένη (flat) καθώς και τις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA, σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου (α) 15^{o}C και (β) 65^{o}C για χρόνο καλλιέργειας τρεις μέρες..... 111

Σχήμα 6.8: Ρυθμός πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών και των καρκινικών ινοβλαστών στις τροποποιημένες από το πλάσμα επιφάνειες για θερμοκρασία ηλεκτροδίου (α) 15^{o}C και (β) 65^{o}C..... 113

Σχήμα 6.9: Λόγος διαχωρισμού των καρκινικών από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες για θερμοκρασίες ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C..... 114

Σχήμα 6.10: Εικόνες φυσιολογικών ινοβλαστών από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες σε: (α) καλυπτρίδα πολυστυρενίου, (β) υμένιο PMMA, (γ, ε) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 0 Volt για 3 sec για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C και (δ, στ) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 100 Volt για 3 min για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και

65^{o}C..... 116

Σχήμα 6.11: Ραβδόγραμμα επιφάνειας πυρήνα φυσιολογικών ινοβλαστών, μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας σε καλυπτρίδα, υμένιο PMMA και επιφάνειες κατεργασμένες με πλάσμα O_2 σε συνθήκες 0 Volt 3 δευτερόλεπτα και 100 Volt 3 λεπτά..... 117

Σχήμα 6.12: Εικόνες καρκινικών ινοβλαστών HT1080 από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες σε: (α) καλυπτρίδα πολυστυρενίου, (β) υμένιο PMMA, (γ, ε) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 0 Volt για 3 sec για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C και (δ, στ) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 100 Volt για 3 min για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C..... 119

Σχήμα 6.13: Ραβδόγραμμα επιφάνειας πυρήνα καρκινικών κυττάρων, μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας σε καλυπτρίδα, υμένιο PMMA και επιφάνειες κατεργασμένες με πλάσμα O_2 σε συνθήκες 0 Volt 3 δευτερόλεπτα και 100 Volt 3 λεπτά..... 120

Σχήμα 6.14: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού συγκαλλιέργειας καρκινικών κυττάρων (HT1080) και φυσιολογικών ινοβλαστών για (α) μία μέρα και (β) 3 μέρες καλλιέργειας σε (I) ακατέργαστο υμένιο PMMA και (II) κατεργασμένη επιφάνεια με 100 Volt για 3 λεπτά και θερμοκρασία του ηλεκτροδίου 15^{o}C. Με κόκκινο βέλος υποδεικνύονται καρκινικά κύτταρα της σειράς HT1080 και με κίτρινο οι φυσιολογικοί ινοβλάστες..... 121

Σχήμα 6.15: Μέσος αριθμός προσκολλημένων φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσδιορίστηκε για τη μη κατεργασμένη (flat) καθώς και την κατεργασμένη με πλάσμα O_2 επιφάνεια PMMA με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά και θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C για χρόνο καλλιέργειας μία και τρεις μέρες..... 122

Σχήμα 6.16: Εικόνες φυσιολογικών ινοβλαστών από συνεστιακό μικροσκόπιο. Απεικόνιση: (α) της βινκουλίνης, (β) της f- ακτίνης (ίδια τομή του κυττάρου) και (γ) συνδυασμού και των δύο (συνολικό κύτταρο) όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε (I) μη κατεργασμένη επιφάνεια και (II)

κατεργασμένη επιφάνεια με πλάσμα O_2 με δυναμικό 100 V για 3 λεπτά..... 125

Σχήμα 6.17: Εικόνες καρκινικών κυττάρων HT1080 από συνεστιακό μικροσκόπιο. Απεικόνιση: (α) της βινκουλίνης, (β) της F-ακτίνης και (γ) συνδυασμού και των δύο όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε (I) μη κατεργασμένη επιφάνεια και (II) κατεργασμένη επιφάνεια με πλάσμα O_2 με δυναμικό 100 V για 3 λεπτά. Η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση είναι 60X..... 126

Σχήμα 6.18: Εικόνες πυρήνων φυσιολογικών ινοβλαστών σε: (α) μη κατεργασμένη επιφάνεια, (β) επιφάνεια κατεργασμένη με 0Volt για 3 δευτερόλεπτα και (γ) επιφάνεια κατεργασμένη με 100 Volt για 3 λεπτά, (I) χωρίς σταυροσπορίνη και (II) μετά από επώαση για 12 ώρες με σταυροσπορίνη. Η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση είναι 100X..... 128

Σχήμα 6.19: Εικόνες πυρήνων καρκινικών κυττάρων της σειράς HT1080 σε: (α) μη κατεργασμένη επιφάνεια, (β) επιφάνεια κατεργασμένη με 0Volt για 3 δευτερόλεπτα και (γ) επιφάνεια κατεργασμένη με 100 Volt για 3 λεπτά, (I) χωρίς σταυροσπορίνη και (II) μετά από επώαση για 12 ώρες με σταυροσπορίνη. Η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση είναι 100X..... 130

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Τεχνικές νανοσχηματοποίησης και νανοδόμησης επιφανειών 41

Πίνακας 3.1: Επίδραση των παραμέτρων της εγχάραξης με πλάσμα O_2 στα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοδομών σε επιφάνειες PMMA..... 54

Πίνακας 6.1: Παράμετροι πλάσματος που εξετάζονται..... 98

Πίνακας 6.2: Τιμές της ρίζας της μέσης τετραγωνικής τιμής (rms) των υψών των δομών της επιφάνειας συναρτήσει του δυναμικού αυτοπόλωσης και του χρόνου κατεργασίας..... 102

Πίνακας 6.3: Μέτρηση γωνιών επαφής αμέσως μετά την κατεργασία με πλάσμα O_2 (0 μέρες γήρανση) και 6 μέρες μετά (6 μέρες γήρανση) για θερμοκρασίες ηλεκτροδίου $15^{O}C$ και $65^{o}C$ 103

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε κατά τα έτη 2011- 2013 στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/ Ανοσοαισθητήρων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α), σε συνεργασία με το Εργαστήριο Πλάσματος του Ινστιτούτου Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων (Ι.Π.Υ.Φ.Δ.Ν.Μ.), του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη του Δρ. Σ. Κακαμπάκου Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας, του Δρ. Ε. Γογγολίδη Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας, της Δρ. Π. Πέτρου Ερευνήτριας Β΄ Βαθμίδας και της Δρ. Α. Μπούρκουλα, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Δρ. Α. Σιαφάκα.

Ευχαριστώ θερμά το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» για την παροχή της εργαστηριακής υποδομής κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα εξίσου θερμά να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., Δρ. Α. Σιαφάκα, για τη συνεισφορά της στην εργασία μου, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις συμβουλές και τις καταλυτικές παρατηρήσεις της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στο Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. Δρ. Σ. Κακαμπάκο, για την ανάθεση του θέματος της ερευνητικής μου εργασίας, τη συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη, τις παρατηρήσεις και τις διορθώσεις του που άνοιγαν νέους δρόμους στην εξέλιξη της έρευνας, καθώς και για την υπομονή και την επιμονή του ως προς την ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ. Ε. Γογγολίδη που με επέλεξε να συμμετάσχω στην ερευνητική ομάδα εκτέλεσης του προγράμματος «Νανο-Εργοστάσιο Πλάσματος (Plasma directed assembly of nanostructures and applications)» μέσω του οποίου χρηματοδοτήθηκε εν μέρει η παρούσα εργασία, για την παροχή της απαραίτητης οργανολογίας καθώς και για την καθοδήγηση και τις εύστοχες

παρατηρήσεις του, οι οποίες συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δ. Κλέτσα, Ερευνητή Α' Βαθμίδας, τόσο για τη διάθεση των κυτταρικών σειρών όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνηση των βιολογικών πειραμάτων, καθώς και τη Δρ. Μαρίνα Σαγνού για τη συμβολή της στην εκπόνηση των πειραμάτων συνεστιακής μικροσκοπίας (Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Δρ. Π. Πέτρου για τα χρήσιμα σχόλια, τις διορθώσεις και τη συνολική στήριξη που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της ερευνητικής μου εργασίας.

Βαθύτατες ευχαριστίες εκφράζω στη Δρ. Α. Μπούρκουλα για την καθοριστική συμβολή της, τη βοήθεια της στο σχεδιασμό και την εκπόνηση των πειραμάτων καθώς και για τη στήριξη, τη συμπαράσταση, την εξαιρετική συνεργασία, το αμείωτο ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε κατά την πρόοδο της έρευνάς μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους Διδάκτορες Μ. Αγγελοπούλου, Γ. Κουκουβίνο, Β. Πάγκαλη και Α. Ψαρούλη, καθώς και τις Π. Κολιτσίδα και Ζ. Τσιάλλα M. Sc. για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και το ευχάριστο κλίμα που διαμόρφωσαν καθ' όλη την διάρκειας της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Δ. Κοντζιάμπαση για τη βοήθεια του στην εκπόνηση των πειραμάτων που σχετίζονται με την επεξεργασία των επιφανειών με πλάσμα, καθώς και τη Δρ. Κ. Τσουγένη και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Πλάσματος για τη βοήθειά τους όπου χρειάστηκεγια την ολοκλήρωση της παρούσας εγασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στην οικογένειά μου, η οποία με στήριξε ψυχολογικά καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της ερευνητικής μου εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

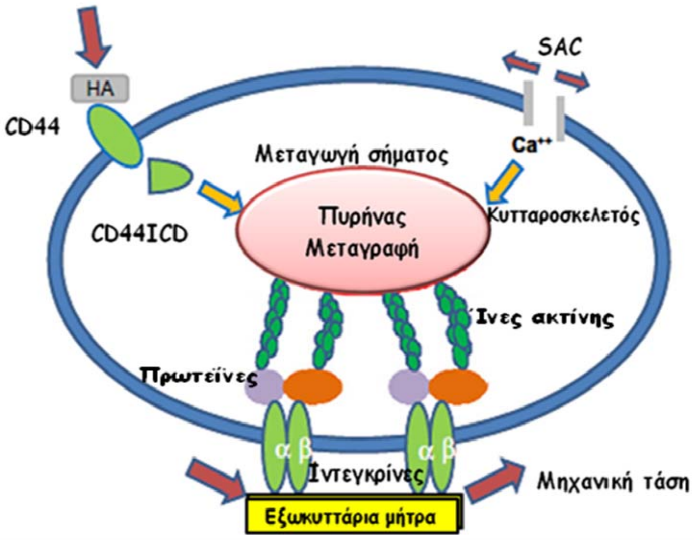
1.1. Εισαγωγή

Οι λειτουργίες των κυττάρων και των ιστών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από διαλυτά και αδιάλυτα μακρομόρια που είτε συνθέτουν την εξωκυττάρια μήτρα είτε μεσολαβούν στην διακυτταρική επικοινωνία [1]. Πιο συγκεκριμένα, η εξωκυττάρια μήτρα στους ζωντανούς οργανισμούς αποτελείται από ένα δίκτυο πρωτεϊνών το οποίο λειτουργεί ως φυσικό πλαίσιο που περιβάλλει τα κύτταρα και ταυτόχρονα τους παρέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξή τους και τη μεταξύ τους προσκόλληση ώστε να δημιουργηθούν οι ιστοί και τα όργανα. Την τελευταία δεκαετία γίνονται προσπάθειες προσομοίωσης του *in vivo* νανοπεριβάλλοντος των κυττάρων *in vitro*, μέσω ενσωμάτωσης συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας σε νανοδομημένες επιφάνειες με σκοπό την αποτελεσματικότερη χρησιμοποίηση τους στον τομέα της βιολογίας και της ιστομηχανικής [2-3]. Όπως έχει διαπιστωθεί, τα κύτταρα είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη νανο-τοπογραφία της επιφάνειας στην οποία αναπτύσσονται, καθώς πολλά λειτουργικά βιομόρια συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης και των σημείων εστιακής προσκόλλησης έχουν μεγέθη στην περιοχή της νανοκλίμακας [2, 4]. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο η νανοτοπογραφία επιδρά στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιείται πληθώρα μελετών σχετικά με την αλληλεπίδραση των κυττάρων με την νανοτοπογραφία της επιφάνειας και την κατανόηση βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη και ο έλεγχος του εξωκυττάριου περιβάλλοντος [5].

1.2 Αλληλεπίδραση των κυττάρων με τις νανοδομές της επιφάνειας

Τα κύτταρα προσκολλώνται στις επιφάνειες πάνω στις οποίες καλλιεργούνται μέσω δημιουργίας εστιακών σημείων πρόσφυσης (focal adhesion points), τα οποία δημιουργούνται μέσω πρόσδεσης των ιντεγκρινών με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, οι οποίες δημιουργούν ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνίστανται από δυο είδη υπομονάδων, την ***α*** και την ***β*** και αποτελούν τους κύριους υποδοχείς μέσω των οποίων τα ζωικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με την εξωκυττάρια μήτρα. Υπάρχουν τουλάχιστον 18 διαφορετικά είδη α και 9 διαφορετικά είδη β υπομονάδων ιντεγκρίνης τα οποία οδηγούν στη δημιουργία μεγάλης ποικιλίας διμερών. Κατά την προσκόλληση των κυττάρων σε μία επιφάνεια οι ιντεγκρίνες αρχικά συνδέονται με τα μόρια εξωκυττάριας ουσίας, ενεργοποιούνται, συσσωρεύονται στα σημεία εστιακής προσκόλλησης και στη συνέχεια δημιουργείται σύμπλεγμα πρωτεϊνών και ώριμες εστιακές επαφές[6]. Στη βιβλιογραφία έχει γίνει κατηγοριοποίηση αυτών των συμπλεγμάτων σε: πρώιμες εστιακές επαφές με διαστάσεις μικρότερες από 1 μm, ώριμες εστιακές επαφές με διαστάσεις από 1 έως 5 μm, και υπερώριμες εστιακές επαφές με μέγεθος μεγαλύτερο των 5 μm. Παρά το γεγονός ότι τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών που συνιστούν τις εστιακές επαφές έχουν μέγεθος μερικών μικρών, τα μεμονωμένα μόρια των ιντεγκρινών έχουν μέγεθος 8 – 12 nm και επομένως η αλληλεπίδρασή τους με την επιφάνεια μπορεί να επηρεαστεί από την ύπαρξη και το βαθμό νανοδόμησής της [7]. Επιπροσθέτως, η νανοδομημένη επιφάνεια είναι πιθανόν να έχει σημαντική επίδραση στην οργάνωση και τον τύπο των εστιακών επαφών που σχηματίζονται, είτε διαταράσσοντας τον σχηματισμό τους είτε επιδρώντας στην σύσταση των διμερών ιντεγκρίνης μέσω της κινητοποίησης συγκεκριμένων υπομονάδων. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να έχουν επίπτωση στην γονιδιακή έκφραση, καθώς οι ιντεγκρίνες συνδέονται με τον πυρήνα τόσο άμεσα μέσω του κυτταροσκελετού και συγκεκριμένα μέσω της ταλίνης και της βινκουλίνης όσο και έμμεσα μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που πυροδοτούνται από την δημιουργία των συμπλεγμάτων ιντεγκρίνης (Σχήμα 1.1) [6].

Κατά την προσκόλληση ενός κυττάρου σε ένα υπόστρωμα, το κύτταρο διερευνά τον περιβάλλοντα χώρο και μετακινείται χρησιμοποιώντας φιλοπόδια (filopodia) και ελασματοπόδια (lamellipodia), τα οποία έχουν εύρος μερικών εκατοντάδων νανομέτρων. Τα ελασματοπόδια αντιπροσωπεύουν το πρόσθιο άκρο ενός κυττάρου το οποίο μετακινείται ή εξαπλώνεται. Τα φιλοπόδια, τα οποία μπορούνξ να θεωρηθούν σα συνέχεια των ελασματοποδίων, διερευνούν το περιβάλλον γύρω από το κύτταρο και οι απολήξεις τους χρησιμεύουν ως προσωρινά σημεία αγκίστρωσης. Καθώς τα φιλοπόδια έχουν εύρος από 250 έως 400 nm είναι πιθανόν να επηρεάζονται από την νανοδομή της επιφάνειας [8]. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί εάν η κίνηση και η εξάπλωση του κυττάρου επηρεάζεται από την ύπαρξη δομών στην επιφάνεια, έχουν διενεργηθεί μελέτες που εστιάζουν στην αλληλεπίδραση της επιφάνειας με τα φιλοπόδια. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι τα κύτταρα αρχικά ανιχνεύουν το περιβάλλον μέσω των φιλοποδίων τους, ενώ στη συνέχεια εάν το σχήμα και το μέγεθος των δομών είναι ευνοϊκά για τα κύτταρα, σχηματίζουν εστιακές επαφές και τελικά εκτείνουν προεξοχές [9]. Επίσης, έχει προταθεί στην βιβλιογραφία ότι η τοπογραφία μπορεί να έχει επίδραση στα κύτταρα μέσω πρόκλησης παραμορφώσεων στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη. Οι παραμορφώσεις αυτές μπορούν να επηρεάσουν διάφορες διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του κυττάρου και οι οποίες ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, η μηχανική παραμόρφωση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη διάνοιξη καναλιών που ενεργοποιούνται από τη διάταση της επιφάνειας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την εισροή ιόντων στο κύτταρο (stretching activated channels, SACs) και την έναρξη σηματοδοτικών μονοπατιών [10].



Σχήμα 1.1: Απεικόνιση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος που επάγονται από την μηχανική διάταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η μηχανική τάση μπορεί να επάγει τη μεταγωγή του σήματος από την εξωκυττάρια μήτρα στις ιντεγκρίνες και έπειτα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα επιφέροντας αλλαγές στη μεταγραφή και τη μετάφραση των γονιδίων. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει στη διάνοιξη καναλιών προκαλώντας την εισροή ιόντων (π.χ. Ca^{2+}) και την έναρξη ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών [6].

Οι αλλαγές στη συμπεριφορά των κυττάρων, που προκαλούνται από την τοπογραφία της επιφάνειας στην οποία αναπτύσσονται, είναι αποτέλεσμα της μεταβίβασης της πληροφορίας στον πυρήνα με άμεσους ή έμμεσους μηχανισμούς.

Στον άμεσο μηχανισμό, κυρίαρχο ρόλο στη μεταβίβαση του σήματος έχει ο κυτταροσκελετός, ο οποίος υφίσταται τροποποιήσεις μέσω των μηχανικών αλληλεπιδράσεων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με την επιφάνεια. Έχουν αναπτυχθεί δύο θεωρίες σχετικά με την άμεση επαγωγή σήματος στον πυρήνα λόγω μηχανικών τάσεων: η θεωρία ανάπτυξης συνέχειας (percolation theory) και η θεωρία της προέντασης (γνωστή και ως ακεραιότητα μέσω τάσης (tensegrity)) [6]. Σύμφωνα και με τις δύο θεωρίες το μηχανικό σήμα διαβιβάζεται στον πυρήνα μέσω των λαμινών οι οποίες είναι δομικές πυρηνικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ρύθμιση της αντιγραφής των γονιδίων. Με βάση τη θεωρία ανάπτυξης συνέχειας, ένα μηχανικό σήμα μεταδίδεται από το ένα άκρο του του κυττάρου στο άλλο μέσω ενός δικτύου

ινών, το οποίο εκτείνεται από την εξωκυττάρια μήτρα στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, η εξωκυττάρια μήτρα συνδέεται μέσω των εστιακών προσφύσεων με τις ίνες ακτίνης του κυτταροπλάσματος, οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται μέσω των ενδιάμεσων ινιδίων με τις λαμίνες του πυρήνα[11]. Σύμφωνα με τη θεωρία της προέντασης η μεταφορά σήματος στον πυρήνα βασίζεται στην συνεχή συμπίεση και έκταση των κυτταροσκελετικών νηματίων. Τα μικρονημάτια της ακτίνης, καθώς και τα ενδιάμεσα νημάτια δρουν ως στοιχεία εφελκυσμού, ενώ οι μικροσωληνίσκοι δουν ως συμπιεστικά στοιχεία [12]. Ο Dalby και η ομάδα του συγκέντρωσαν όλες τις προτεινόμενες υποθέσεις για την προένταση και διαμόρφωσαν μια θεωρία που προτείνει την αυτοπροκαλούμενη μηχανική επαγωγή για την αλληλεπίδραση των κυττάρων με νανοδομημένες επιφάνειες. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η τοπογραφία της επιφάνειας στην οποία είναι προσκολλημένα τα κύτταρα μεταβάλλει τη μορφολογία του πυρήνα, καθώς και τη θέση διεπαφής των χρωμοσωμάτων, επηρεάζοντας την αντιγραφή γονιδίων [13-14].

Όσον αφορά τον έμμεσο μηχανισμό απόκρισης στην τοπογραφία, τα κύτταρα μετατρέπουν τα μηχανικά ερεθίσματα σε χημικά μηνύματα, τα οποία φτάνουν στον πυρήνα μέσω ενός καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών. Το εξωκυττάριο τμήμα των διαμεμβρανικών ιντεγκρινών, δεσμεύει πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, όπως το κολλαγόνο και η φιμπρονεκτίνη, ενώ οι ενδοκυττάριες περιοχές τους αλληλεπιδρούν με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως η βινκουλίνη, η παξιλίνη, η ταλίνη και η ακτίνη, καθώς και με άλλα σηματοδοτικά μόρια, όπως οι κινάσες FAK και c-Src, στα σημεία των εστιακών προσφύσεων [15]. Αυτές με τη σειρά τους επάγουν την ενεργοποίηση σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων (όπως ο NF-κβ και ο AP-1), οι οποίοι μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα και να τροποποιήσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων [16]. Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, πέραν των ιντεγκρινών, όπως οι CD44, μπορούν να δράσουν ως μετατροπείς μηχανικού σήματος σε χημικό σήμα, μέσω μετατόπισης των ενδοκυτταρικών περιοχών τους στον πυρήνα, επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων [6].

1.3 Επίδραση της νανοδόμησης των επιφανειών στην κυτταρική απόκριση

Η επίδραση των διαστάσεων και του είδους των δομών των νανοδομημένων επιφανειών στα κύτταρα έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες της τοπογραφίας που μπορούν να επηρεάσουν την συμπεριφορά των κυττάρων όπως το ύψος, το μέγεθος, το πλάτος, το σχήμα και η οργάνωση των χαρακτηριστικών δομών. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα των μελετών έχει αποδειχθεί ότι η κυτταρική απόκριση επηρεάζεται όχι μόνο από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας αλλά και από άλλους δύο καθοριστικούς παράγοντες. Ο ένας, είναι το είδος του υλικού του υποστρώματος (γυαλί, πυρίτιο, πολυμερές) και ο άλλος, είναι ο τύπος των κυττάρων που χρησιμοποιούνται σε κάθε μελέτη. Για το λόγο αυτό, τα αποτελέσματα που παρατίθενται στη βιβλιογραφία ως προς την επίδραση της νανοτοπογραφίας στη συμπεριφορά των κυττάρων είναι συχνά αντικρουόμενα.

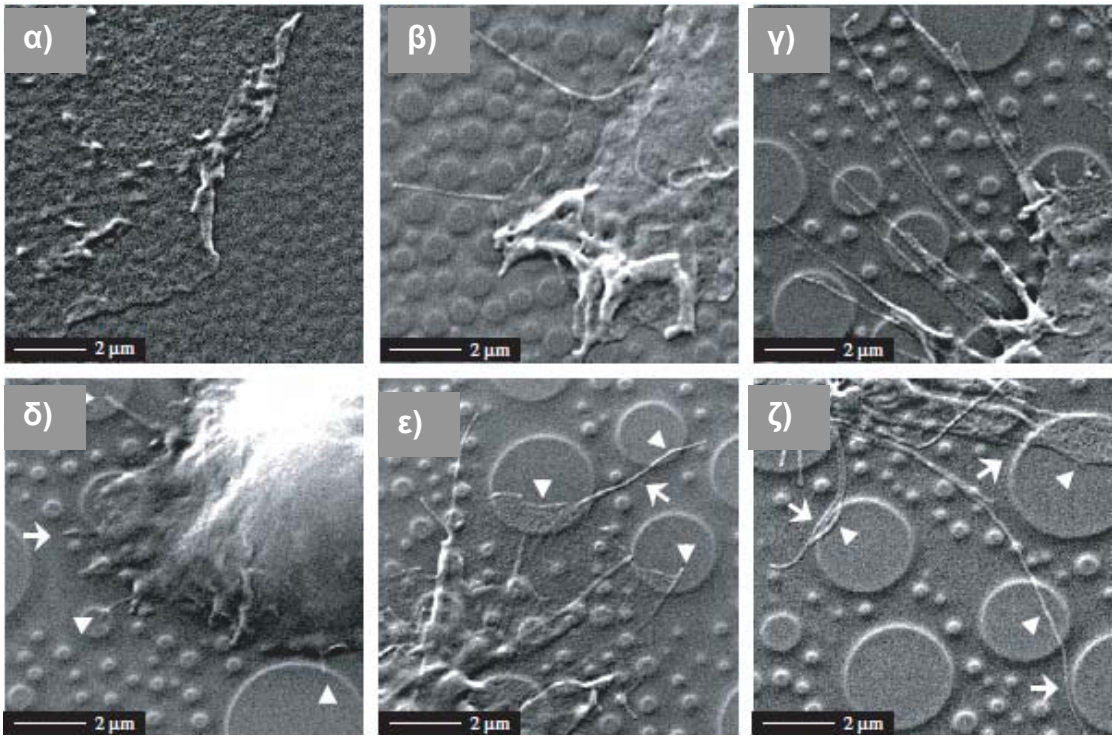
1.3.1 Επίδραση του μεγέθους των δομών

Από τις μέχρι τώρα μελέτες έχει βρεθεί ότι το μικρότερο μέγεθος δομών που μπορεί να αντιληφθεί ένα κύτταρο και ως εκ τούτου να επηρεάσει την προσκόλλησή του στην επιφάνεια είναι τα 10 nm. Εικάζεται ότι το κύτταρο αντιλαμβάνεται αυτές τις δομές ως μια ασυνέχεια της επιφάνειας που έχει ως αποτέλεσμα την ασυνέχεια ως προς τον σχηματισμό εστιακών προσφύσεων λόγω της μειωμένης ικανότητας των ιντεγκρινών να συσσωματωθούν πάνω στις νανοδομές αυτού του μεγέθους [6]. Σε μία από τις πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο της Γλασκώβης τη δεκαετία του ’90, κύτταρα (οστεοβλάστες, ινοβλάστες και κύτταρα του αίματος) καλλιεργήθηκαν σε νανοδομημένες επιφάνειες οι οποίες παρασκευάστηκαν με την τεχνική της αποανάμιξης πολυμερών και συγκεκριμένα με αποανάμιξη πολυστυρενίου και πολυ(4-βρωμοστυρενίου). Οι νησίδες που σχηματίστηκαν είχαν ύψος 13 nm και αποδείχτηκε ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε αυτές τις επιφάνειες απέκτησαν περισσότερο πεπλατυσμένο σχήμα, πολλαπλασιάζονταν με ταχύτερο ρυθμό και ο κυτταροσκελετός τους αποτελούνταν από περισσότερη

ακτίνη και τουμπουλίνη σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε επίπεδες επιφάνειες [17].

Σε μία άλλη μελέτη ανθρώπινοι εμβρυϊκοί οστεοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε νανοδομημένες επιφάνειες που δημιουργήθηκαν με αποανάμιξη πολυστυρενίου και πολυ(L-γαλακτικού οξέος) (PLLA). Στις επιφάνειες αυτές δημιουργήθηκαν σκωληκοειδείς δομές ύψους 14 nm και παρατηρήθηκε αύξηση της προσκόλλησης και της έκτασης των οστεοβλαστών σε σύγκριση με επίπεδες επιφάνειες PLLA. Εφαρμόζοντας την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting/Immunoblot), βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα συγκεκριμένης υπομονάδας των ιντεγκρινών (α_v), παξιλίνης και κινάσης των εστιακών προσφύσεων (Focal Adhesion Kinase, FAK) στα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στις δομές σε σχέση με τα κύτταρα στις επίπεδες επιφάνειες, καταδεικνύοντας ότι η τοπογραφία διήγειρε την έκφραση συγκεκριμένων ιντεγκρινών η οποία οδήγησε στην επαγωγή της παξιλίνης και στην ενεργοποίηση της FAK [18].

Αντίθετα, μελέτες σε επιφάνειες με δομές μεγαλύτερες των 30 nm έδειξαν ότι η προσκόλληση των ινοβλαστών αυξανόταν σε επιφάνειες με νησίδες ύψους μικρότερου των 25 nm ενώ μειωνόταν αισθητά σε νησίδες ύψους μεγαλύτερου των 40 nm [17]. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε μία ακόμα μελέτη στην οποία έγινε καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρυϊκών οστεοβλαστών σε επιφάνειες πολυστυρενίου/ πολυ(βρωμοστυρενίου) στις οποίες είχαν δημιουργηθεί νησίδες ύψους 11 nm, 38 nm και 85 nm, αντίστοιχα (Σχήμα 1.2). Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη των κυττάρων ευνοείτο στις επιφάνειες με δομές ύψους 11 nm, καθώς σε αυτές τις επιφάνειες η ακτίνη και η βινκουλίνη του κυτταροσκελετού ήταν πολύ καλά οργανωμένες, τα λαμελιπόδια πολύ καλά αναπτυγμένα και ευνοούνταν η εξάπλωση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε σχέση με τις επιφάνειες που έφεραν δομές με μεγαλύτερες διαστάσεις [19].



Σχήμα 1.2: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης στις οποίες απεικονίζονται φιλοπόδια ανθρώπινων εμβρυϊκών οστεοβλαστών που έχουν καλλιεργηθεί επί 24 ώρες σε επιφάνειες νανοδομημένες με νησίδες ύψους 11 nm (α), 38 nm (β), 85 nm (γ, ζ), αντίστοιχα, και για 3 ώρες σε επιφάνειες με νησίδες ύψους 85 nm (δ, ε) [19].

1.3.2 Επίδραση του σχήματος των δομών

1.3.2.1 Αυλάκια

Οι πρώτες μελέτες σε επιφάνειες που έφεραν καθορισμένες δομές με την μορφή αυλακίων δημοσιεύτηκαν το 2003 και αφορούσαν την προσκόλληση επιθηλιακών κυττάρων σε δομές κατασκευασμένες σε οξείδιο του πυριτίου. Το πλάτος των αυλακίων και η μεταξύ τους απόσταση ήταν 400 nm και το βάθος τους 150 ή 600 nm. Τα κύτταρα ευθυγραμμίσθηκαν κατά μήκος των αυλακίων ως αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης των εστιακών επαφών και των μικρονηματίων ακτίνης κατά μήκος της τοπογραφίας του υποστρώματος, ενώ ανάλογη με το βάθος των δομών ήταν και η επιμήκυνση των κυττάρων [20]. Σε μία άλλη έρευνα, ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε επιφάνεια πολυστυρενίου που έφερε νανοαυλάκια βάθους από 5 έως 350 nm και πλάτους από 20 εώς 1000 nm. Η μελέτη αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το βάθος των αυλακιών ήταν ο παράγοντας που επηρέαζε περισσότερο την ευθυγράμμιση

των κυττάρων με το υπόστρωμα και επιπλέον, δείχθηκε ότι το ελάχιστο βάθος που μπορούσαν να αντιληφθούν τα κύτταρα ήταν 35 nm, καθώς σε επιφάνειες με δομές μικρότερου βάθους συμπεριφέρονταν όπως και στις επίπεδες επιφάνειες [21].

1.3.2.2 Φρεάτια και νησίδες

Η σύγκριση της προσκόλλησης εμβρυικών οστεοβλαστών πάνω σε νανοφρεάτια και νανονησίδες που δημιουργήθηκαν σε επιφάνεια συμπολυμερούς PS/PLLA (28,5 ± 4,3 nm σε βάθος και 21,0 ± 4,7 nm σε ύψος, αντίστοιχα) έδειξε ότι τόσο η προσκόλληση όσο και η εξάπλωση των κυττάρων ευνοήθηκε στις επιφάνειες που έφεραν νησίδες σε σύγκριση με αυτές που έφεραν φρεάτια. Σε μεταγενέστερη μελέτη, όπου έγινε επανάληψη του ίδιου πειράματος με καλλιέργεια φυσιολογικών οστεοβλαστών από ενήλικες, δείχθηκε μέσω γονιδιακής ανάλυσης και χρώσης με ανοσοφθορισμό ότι σχηματίζονται πολύ λιγότερες εστιακές επαφές στις επιφάνειες που έφεραν νανονησίδες σε σχέση με αυτές που δημιουργούνται σε μια επίπεδη επιφάνεια, οι οποίες όμως, ήταν πολύ περισσότερες σε σχέση με αυτές που δημιουργούνται στις επιφάνειες που έφεραν νανοφρεάτια [22].

1.3.2.3 Φρεάτια και αυλάκια

Παρόμοιες μελέτες πραγματοποιήθηκαν και σε επιφάνειες στις οποίες είχαν δημιουργηθεί νανοφρεάτια βάθους 100 nm και διαμέτρου 120 nm καθώς και σε επιφάνειες με αυλάκια πλάτους 10 και 100 μm και βάθους 300 nm. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα σχηματίζουν περισσότερες και πιο ώριμες εστιακές επαφές στις επιφάνειες με αυλάκια πλάτους 100 μm σε σχέση με τις επίπεδες επιφάνειες. Αντίθετα, η προσκόλληση και η ανάπτυξη τους αναστέλλεται στις επιφάνειες με νανοφρεάτια και με αυλάκια πλάτους 10 μm. Επιπλέον, στα πλαίσια αυτής της μελέτης διερευνήθηκε ο τρόπος με τον οποίο η νανοδόμηση της επιφάνειας επηρεάζει την ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών στα προσκολλημένα κύτταρα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι ERK/MAPK επηρεάστηκε λιγότερο στην περίπτωση κυττάρων που αναπτύσσονται σε επιφάνειες με αυλάκια πλάτους 10 μm σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε επιφάνειες με νανοφρεάτια, ενώ τα αποτελέσματα αντιστράφηκαν στην περίπτωση

επιφανειών με αυλάκια πλάτους 100 μm. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες με αυλάκια πλάτους 10 μm παρατηρήθηκε τόσο ενεργοποίηση όσο και απενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, ενώ σε αυτά που καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες με αυλάκια πλάτους 100 μm παρατηρήθηκε μόνο ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών [23].

1.3.2.4 Προεξοχές

Σε πλακίδιο πυριτίου κατασκευάστηκαν, με συνδυασμό λιθογραφίας συμβολής και εγχάραξης με ενεργά ιόντα, ευθυγραμμισμένες παράλληλες νανοδομές διαφορετικού σχήματος (βελονοειδείς ή σε σχήμα ξυραφιού) με ύψος που κυμαινόταν από 50 έως 600 nm. Η καλλιέργεια ανθρώπινων ινοβλαστών πάνω στις επιφάνειες αυτές έδειξε ότι τα κύτταρα αποκτούσαν μικρότερο μέγεθος και παρουσίαζαν χαμηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού όταν καλλιεργούνταν πάνω σε επιφάνειες με νανοκολώνες με βελονοειδή απόληξη, ενώ όταν καλλιεργούνταν πάνω σε επιφάνειες που έφεραν σχαροειδείς σχηματισμούς νανοκολώνων με σχήμα ξυραφιού, τα κύτταρα παρουσίαζαν μεγαλύτερη επιμήκυνση, ευθυγράμμιση με τις δομές της επιφάνειας, έκταση μεγαλύτερου αριθμού φιλοποδίων και σχηματισμό περισσότερων εστιακών επαφών. Με άλλα λόγια, η προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων ευνοείτο στις επιφάνειες με τους σχαροειδείς σχηματισμούς. Επιπλέον, βρέθηκε ότι για τους ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες με τις νανοκολώνες, τα σύμπλοκα πρόσφυσης είχαν μη συνεχή κατανομή που αντιστοιχούσε στις κορυφές με σχήμα βελόνας, ενώ στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στις επιφάνειες με τις σχαροειδές δομές τα σύμπλοκα πρόσφυσης ευθυγραμμίζονταν με τις δομές σχηματίζοντας επιμήκη συσσωματώματα κατά αντιστοιχία με το μέγεθος των δομών [24].

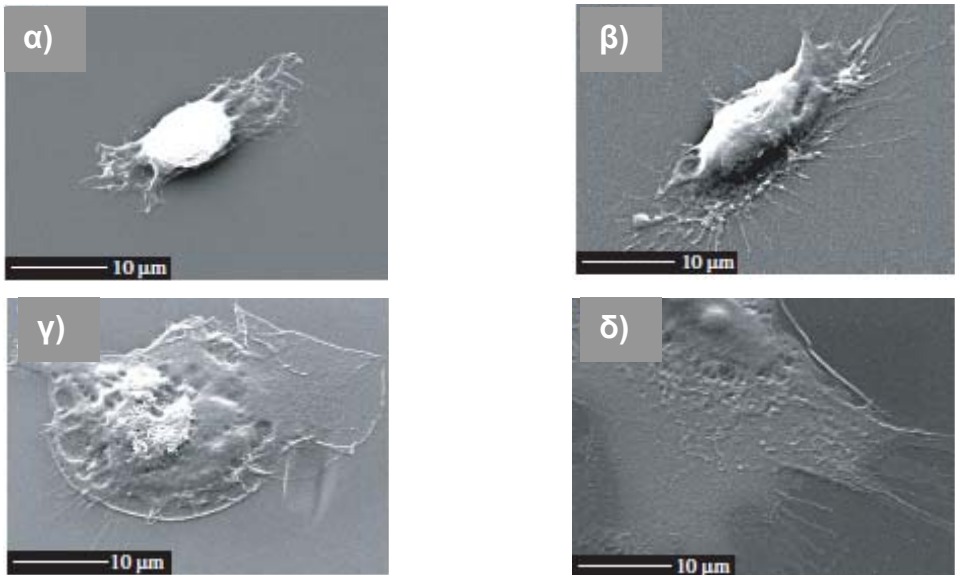
1.3.3 Επίδραση της απόστασης μεταξύ των νανοδομών

Μια ακόμα παράμετρος της τοπογραφίας που επιδρά στην κυτταρική συμπεριφορά είναι η απόσταση μεταξύ των δομών, λόγω του ότι επηρεάζει ή/ και καθορίζει την απόσταση μεταξύ των εστιακών επαφών. Η απόσταση αυτή για επίπεδες επιφάνειες έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται περίπου στα 50 nm [25]. Σε μία προσπάθεια να υπολογιστεί ποια είναι η απόσταση που ευνοεί την ανάπτυξη των κυττάρων κατασκευάστηκαν ημισφαιρικές προεξοχές ύψους 110 nm σε επιφάνειες TiO_2 οι οποίες καταλάμβαναν ποσοστά 3%, 19%, 30% και 43% της συνολικής επιφανείας. Στις επιφάνειες αυτές καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι οστεοβλάστες και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο σχηματισμό και στον προσανατολισμό των στοιχείων του κυτταροσκελετού των κυττάρων [26]. Σε μία άλλη μελέτη, σε επιφάνεια συμπολυμερούς τοποθετήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού σε εξαγωνική διάταξη με διάκενα που κυμαίνονταν από 28 εώς 110 nm, τα οποία στην συνέχεια τροποποιήθηκαν με αλκανοθειόλη και πρόσδεση του τριπεπτιδίου RGD (αργινίνη- γλυκίνη- ασπαρτικό οξύ) ενώ τα διάκενα μεταξύ των σωματιδίων τροποποιήθηκαν με πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG). Λόγω της τροποποίησης της επιφάνειας αναμενόταν ότι η πρόσφυση των κυττάρων θα πραγματοποιείτο αποκλειστικά με τα νανοσωματίδια λόγω της παρουσίας του τριπεπτιδίου RGD το οποίο προάγει την πρόσφυση των κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με τις ιντεγκρίνες ενώ επιπλέον το μέγεθος των δομών (<8 nm) επέτρεπε τη δημιουργία μιας μόνο εστιακής πρόσφυσης. Στις επιφάνειες αυτές καλλιεργήθηκαν οστεοβλάστες και δείχθηκε ότι το διάκενο που επιτρέπει τη συσπείρωση των ιντεγκρινών και την ενεργοποίηση των συμπλόκων που σχηματίζουν τις εστακές προσφύσεις κυμαίνεται από 58 έως 73 nm. Για διάκενο μεγαλύτερο των 73 nm, τα κύτταρα παρουσίασαν μικρότερη προσκόλληση και εξάπλωση πάνω στις υπό μελέτη επιφάνειες με ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των εστιακών προσφύσεων και των ινών ακτίνης [27].

1.4 Επίδραση του υλικού του υποστρώματος

Εκτός από τη νανοδόμηση του υποστρώματος ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική συμπεριφορά είναι αυτό καθαυτό το υλικό του υποστρώματος. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της σύστασης του υποστρώματος στην προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων έχουν γίνει μελέτες στις οποίες δημιουργήθηκαν οι ίδιες νανοδομές σε διαφορετικά υλικά. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν σχαροειδείς δομές πλάτους και βάθους 350 nm με ενδιάμεση απόσταση 700 nm με λιθογραφία νανοαποτύπωσης σε λεπτό υμένιο πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) επιστρωμένου σε πυρίτιο, καθώς και σε επιφάνειες πολυ(διμεθυλοσιλοξανίου) (PDMS). Στις επιφάνειες αυτές καλλιεργήθηκαν λεία μυϊκά κύτταρα και παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν παρόμοιο ρυθμό πολλαπλασιασμού και παρόμοια επιμήκυνση κυτταροπλάσματος και πυρήνα και στα δύο υλικά και επιπλέον ήταν πολύ καλά ευθυγραμμισμένα με τις δομές του υποστρώματος [28].

Αντιθέτως, όταν ανθρώπινοι εμβρυϊκοί οστεοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες πολυστυρενίου και πολυβρωμοστυρενίου, τα προσκολλημένα κύτταρα απέκτησαν αστεροειδές σχήμα και εξασθενημένα φιλοπόδια στις επιφάνειες πολυστυρενίου ενώ στις αντίστοιχες επιφάνειες πολυβρωμοστυρενίου ήταν πολύ καλά εξαπλωμένα και με πολύ καλά οργανωμένο κυτταροσκελετό. Με άλλα λόγια, η προσκόλληση και η ανάπτυξη των κυττάρων ευνοείτο στις επιφάνειες πολυβρωμοστυρενίου σε σχέση με τις επιφάνειες πολυστυρενίου (Σχήμα 1.3) [19].



Σχήμα 1.3: Εικόνες από μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων από επιφάνειες πολυστυρενίου (α, β) και πολυβρωμοστυρενίου (γ, δ) στις οποίες καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι εμβρυϊκοί οστεοβλάστες επί 3 (α, γ) και 24 ώρες (β, δ), αντίστοιχα [19].

1.5 Επίδραση της κυτταρικής σειράς

Όπως είναι αναμενόμενο, εκτός από την σύσταση και την νανοδόμηση της επιφάνειας, η συμπεριφορά των κυττάρων πάνω στις επιφάνειες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από το είδος των κυττάρων που μελετώνται.

Σε αρκετές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι η συμπεριφορά των κυττάρων σε συγκεκριμένες επιφάνειες δεν επηρεάζεται από το είδος των κυττάρων. Παραδείγματος χάριν, σε μία μελέτη έγινε σύγκριση της συμπεριφοράς τριών διαφορετικών ενδοθηλιακών κυτταρικών σειρών σε επιφάνειες νανοδομημένες με λοφίσκους ύψους 13, 35 και 95 nm. Στην μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών καθώς και οι τρεις παρουσίασαν την μεγαλύτερη πρόσφυση στις επιφάνειες με δομές ύψους 13 nm [29]. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, συγκρίθηκε η συμπεριφορά ενδοθηλιακών κυττάρων από αορτή βοός (BAEC) και οστεοβλαστών ποντικού (MC3T3-E1) που καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες επιστρωμένες με νανοσωματίδια διαφορετικού μεγέθους σε κανονικούς σχηματισμούς. Και για τους δυο τύπους κυττάρων ο μέγιστος ρυθμός πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στις επιφάνειες που είχαν επικαλυφθεί με

νανοσωματίδια 50 nm ενώ διαπιστώθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού σε επιφάνειες που είχαν επικαλυφθεί με νανοσωματίδια μεγέθους 300 nm [30].

Σε κάποιες άλλες όμως μελέτες διαπιστώθηκε ότι η συμπεριφορά των κυττάρων πάνω στο ίδιο υλικό διέφερε ανάλογα με το είδος των κυττάρων. Έτσι, σε μια μελέτη προσκόλλησης και βιωσιμότητας ινοβλαστών, ανθρώπινων αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων από τριχοειδή αγγεία βοός πάνω σε επιφάνειες που έφεραν νανοράβδους οξειδίου του ψευδαργύρου παρατηρήθηκε ότι οι ινοβλάστες ήταν λιγότερο ευαίσθητοι στην νανοδόμηση της επιφάνειας σε σχέση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Πιο αναλυτικά, οι ινοβλάστες που προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια ανεξαρτήτως της προέλευσης τους διατηρήθηκαν χωρίς σημαντική μείωση του αριθμού τους μετά από καλλιέργεια επί 24 ώρες, ενώ για τα υπόλοιπα κύτταρα το ποσοστό βιωσιμότητας δεν ξεπερνούσε το 20%. Αντιθέτως, όταν τα ίδια κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες με δομές φρεατίων, η ανάπτυξη των ινοβλαστών επηρεάστηκε περισσότερο σε σύγκριση με τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Συγκεκριμένα, το μικρότερο βάθος φρεατίου που επέφερε μεταβολή στον προσανατολισμό και την μορφολογία των προσκολλημένων ινοβλαστών ήταν τα 50 nm ενώ για τα υπόλοιπα κύτταρα ήταν τα 100 nm [31-32]. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθηκαν από επιφάνειες τιτανίου οι οποίες κατεργάστηκαν με θειϊκό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου (διάλυμα Piranha), ώστε να δημιουργηθούν νανοφρεάτια διαμέτρου 23 και 33 nm. Στις επιφάνειες αυτές καλλιεργήθηκαν ινοβλάστες, οστεοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα. Βρέθηκε ότι, οι νανοδομημένες επιφάνειες προήγαγαν την προσκόληση και ανάπτυξη των οστεογενετικών κυττάρων ενώ δεν επηρέασαν την προσκόλληση και ανάπτυξη ινοβλαστών και λείων μυϊκών κυττάρων [33].

Επίσης, σε μελέτη κατά την οποία συγκρίθηκε η συμπεριφορά κερατινοκυττάρων και επιθηλιακών κυττάρων σε νανοδομημένες επιφάνειες με φρεάτια, διαπιστώθηκε ότι τα δύο είδη κυττάρων αντιδρούσαν με διαφορετικό τρόπο στη νανοτοπογραφία, λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων αυτών των δύο ειδών κυττάρων in vivo. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα κερατινοκύτταρα ευθυγραμμίζονταν σε ποσοστό 70% σε αυλάκια πλάτους 70 nm με βήμα >800 nm, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα ευθυγραμμίζονταν σε ποσοστό 35%. Όταν, η απόσταση μεταξύ των αυλακίων ήταν 400 nm, το

ποσοστό των ευθυγραμμισμένων κερατινοκυττάρων μειώθηκε στο 45%, ενώ το ποσοστό των ευθυγραμμισμένων επιθηλιακών κυττάρων έμεινε αμετάβλητο. Αυτή η διαφορά στην συμπεριφορά μπορεί να οφείλεται στο ότι in vivo τα κερατινοκύτταρα αλληλεπιδρούν μόνο με τις πολύ καλά οργανωμένες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), ενώ τα επιθηλιακά προσκολλώνται στις πρωτεΐνες αυτές με τυχαία τοπογραφία. Οπότε, η αυξημένη ευθυγράμμιση των κερατινοκυττάρων σε σχέση με τα επιθηλιακά μπορεί να αντανακλά την ικανότητα τους να αντιδρούν με το πολύ καλά οργανωμένο δίκτυο της εξωκυττάριας μήτρας [34].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΝΑΝΟΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΟΜΗΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ

2.1 Χρησιμότητα της νανοσχηματοποίησης των επιφανειών για μελέτη βιολογικών συστημάτων

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία ανάπτυξη τεχνικών νανοσχηματοποίησης των επιφανειών, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε μελέτες βιολογικών συστημάτων. Οι μέθοδοι αυτές λειτουργούν ως εργαλεία για την κατανόηση της συμπεριφοράς των κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι νανοδομημένες επιφάνειες δημιουργούν in vitro περιβάλλον που προσομοιάζει το in vivo περιβάλλον των κυττάρων. Οι τεχνικές νανοσχηματοποίησης επιφανειών χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: σε τεχνικές τροποποίησης της τοπογραφίας ή σε τεχνικές τροποποίησης της χημείας μιας επιφάνειας [6]. Στον πίνακα 2.1 παρατίθενται οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές νανοσχηματοποίησης και νανοδόμησης επιφανειών.

Πίνακας 2.1: Τεχνικές νανοσχηματοποίησης και νανοδόμησης επιφανειών [6].

Τεχνική σχηματοποίησης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Μικρότερο μέγεθος δομής
Τεχνικές τροποποίησης της τοπογραφίας μιας επιφάνειας			
Λιθογραφία ακραίου υπεριώδους	Δυνατότητα κατασκευής πολλών σχημάτων με χρήση κατάλληλης μάσκας	Για πολύ μικρές διαστάσεις απαιτείται η χρήση συγχρότρου	**40 nm**
Μεταφορά σχήματος από αυτοοργανωμένα υμένια πολυμερών	Εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων	Κατασκευή μόνο εξάγωνων δομών	**50 nm**
Αποανάμιξη πολυμερών	Εύκολος τρόπος κατασκευής νανομετρικών δομών	Κατασκευάζονται περιορισμένα ήδη δομών (νησίδες και σκωληκοειδείς δομές)	**<1μm**

Λιθογραφία κολλοειδών σωματιδίων	Ίσες αποστάσεις μεταξύ των νανοδομών	Κατασκευή μόνο εξάγωνων δομών	**100 nm**
Λιθογραφία νανοσφράγισης εν θερμώ (nanoimprint lithography)	Δεν επιφέρει χημική τροποποίηση της επιφάνειας	Μικρή διακριτική ικανότητα	**50 nm**
Ανοδική οξείδωση μεταλλικών επιφανειών	Εύκολα ρυθμιζόμενα μεγέθη	Κατασκευή περιορισμένων σχημάτων δομών	**10 nm**
Ηλεκτρική περιστροφή (electrospining)	Χρήση μεγάλης ποικιλίας πολυμερών	Κατασκευή μόνο δικτύου ινών	**Ανάλογα το μέγεθος της ίνας**
Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων	Υψηλή διακριτική ικανότητα	Χρονοβόρα και ακριβή τεχνική	**15 nm**
Εγχάραξη με πλάσμα	Ομοιόμορφη επιφάνεια με ελεγχόμενη χημεία	Οι δομές που δημιουργούνται δεν έχουν πλήρως καθορισμένο σχήμα	**< 1 μm**
Τεχνικές τροποποίησης της χημείας μιας επιφάνειας			
Αποτύπωση με μικροεπαφή (micro-contact printing)	Εύκολη τεχνική	Περιορισμένος αριθμός χρήσης της ίδιας σφραγίδας	**Πλάτος γραμμής 40 nm**
Υμένια Langmuir-Blodgett (LB)	Εύκολη ρύθμιση του μεγέθους των δομών	Κατασκευή περιορισμένων σχημάτων δομών	**50 nm**
Νανολιθογραφία με χρήση ακίδας (dip pen nanolithography)	Ελεγχόμενο μέγεθος και σχήμα δομών	Αργή τεχνική	**15 nm**

Στην ενότητα αυτή θα αναλυθούν διεξοδικότερα οι τεχνικές τροποποίησης της τοπογραφίας μιας επιφάνειας, που έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες προσκόλλησης κυττάρων. Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στη δημιουργία νανοϋφής με πλάσμα που είναι η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η οποία θα παρουσιαστεί στο επόμενο Κεφάλαιο.

2.2 Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων (e-beam lithography)

Η λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων είναι μια τεχνική κατάλληλη για την κατασκευή δομών πολύ μικρών διαστάσεων (έως και 10 nm). Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων. Μία εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια, η οποία έχει επικαλυφθεί με υμένιο ευαίσθητο στα ηλεκτρόνια ακολουθώντας προσχεδιασμένη πορεία έτσι ώστε να αποτυπωθούν στην επιφάνεια οι επιθυμητές δομές. Η μεταφερόμενη από τα ηλεκτρόνια ενέργεια προκαλεί δομικές αλλαγές στο υμένιο (διάσπαση δεσμών ή δημιουργία νέων δεσμών), με αποτέλεσμα οι εκτιθέμενες περιοχές να καθίστανται διαλυτές ή αδιάλυτες σε συγκεκριμένους διαλύτες. Έτσι, μετά την εμφάνιση με κατάλληλο διαλύτη, μέρος του υμενίου διαλύεται και απομακρύνεται, αποκαλύπτοντας τις δομές στο υπόστρωμα, όπως και στις κλασικές λιθογραφικές μεθόδους (π.χ. φωτολιθογραφία) [35-36].

2.3 Λιθογραφία κολλοειδών σωματιδίων (Colloidal lithography)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην δημιουργία ενός αυτοοργανωμένου μονοστρώματος από νανοσφαίρες πολυστυρενίου στο προς σχηματοποίηση υπόστρωμα, το οποίο λειτουργεί ως μάσκα για τη διαδικασία εγχάραξης ή εναπόθεσης που ακολουθεί [37]. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η αδυναμία ελέγχου του σχήματος των δομών που δημιουργούνται, καθώς η μορφή τους καθορίζεται από τα διάκενα που δημιουργούνται κατά την εναπόθεση του στρώματος των νανοσωματιδίων. Εκτός από τις νανοσφαίρες πολυμερών, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν κι άλλα νανοσωματίδια ως μάσκες εγχάραξης [38]. Συγκεκριμένα, συνδυάζοντας νανοσωματίδια μετάλλου ή πυριτίου με ανισοτροπική εγχάραξη με πλάσμα έχουν κατασκευαστεί νανοκολώνες πυριτίου ύψους 7-12 nm και διαμέτρου 55-85 nm [39].

Η χρήση των νανοσωματιδίων για την δημιουργία της μάσκας έχει το πλεονέκτημα της εύκολης και γρήγορης επίστρωσης σε μεγάλη επιφάνεια, δεν έχει όμως την ίδια ποιότητα αυτοοργάνωσης με τα υμένια των νανοσφαιρών. Επίσης, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι οι

θερμοκρασίες για την εναπόθεση και ανόπτηση των νανοσωματιδίων είναι σχετικά υψηλές. Οι μάσκες νανοσωματιδίων χρησιμοποιούνται κυρίως σε εφαρμογές στις οποίες αρκεί η τυχαία ή σχεδόν συμμετρική διάταξη των δομών σε μεγάλες επιφάνειες, όπως σε αντιανακλαστικές επιφάνειες για οπτικούς ανιχνευτές κ.α. [40].

2.4 Λιθογραφία νανοαποτύπωσης εν θερμώ (Nanoimprint lithography)

Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής προϋποθέτει την κατασκευή μιας αρχικής μήτρας/ σφραγίδας με κάποια από τις προαναφερόμενες λιθογραφικές διεργασίες σε επιφάνεια πυριτίου ή άλλου θερμοανθεκτικού υλικού (συνήθως με λιθογραφία δεσμής ηλεκτρονίων) Έπειτα, η σφραγίδα αποτυπώνεται σε θερμοπλαστικά πολυμερή με χρήση θερμαινόμενης πρέσας, μια διεργασία που είναι γνωστή ως αποτύπωση σχήματος με θέρμανση ή σφράγιση «εν θερμώ» (hot embossing) [41].

2.5 Ηλεκτρική περιστροφή (Electrospinning)

Μία άλλη τεχνική η οποία χρησιμοποιείται συχνά για την κατασκευή νανοδομημένων υποστρωμάτων για εφαρμογές στη μηχανική των ιστών είναι η ηλεκτρική περιστροφή. Πιο αναλυτικά στην τεχνική αυτή ένα διάλυμα πολυμερούς εναποτίθεται μέσω ενός ακροφυσίου σε μία επιφάνεια ενώ ταυτόχρονα εφαρμόζεται κατάλληλη τάση. Με τον τρόπο αυτόν κατασκευάζεται μία επιφάνεια που αποτελείται από ίνες του πολυμερούς, η οποία είναι ομοιόμορφη ως προς τις δομές, την τραχύτητα και τη χημεία της [42]. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι οι επιφάνειες που κατασκευάζονται προσομοιάζουν τη δομή της εξωκυττάριας μήτρας [43].

2.6 Αποανάμιξη πολυμερών (Polymer demixing)

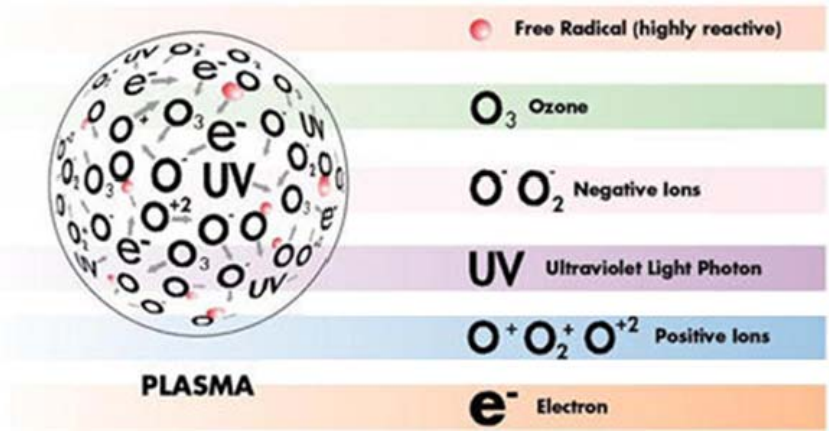
Η μέθοδος της αποανάμιξης πολυμερών βασίζεται στον διαχωρισμό φάσεων μερικώς συμβατών μιγμάτων πολυμερών όταν υπόκεινται σε χύτευση με περιστροφή (Spin casting). Ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την τοπογραφία της επιφάνειας που δημιουργείται είναι η ασυμβατότητα των

πολυμερών που αναμειγνύονται, γι’ αυτό και δεν υπάρχει πλήρης έλεγχος των δομών που κατασκευάζονται με αυτή τη μέθοδο [44]. Η χρήση μιγμάτων των επιλεγμένων πολυμερών σε διαφορετικές αναλογίες οδηγεί στην δημιουργία διαφορετικών δομών στην επιφάνεια, όπως στήλες, νησίδες ή γραμμές, ενώ η απόλυτη συγκέντρωση των δυο πολυμερών καθορίζει το μέγεθος των παραγόμενων δομών [45]. Μία άλλη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος των δομών είναι το Μοριακό Βάρος των πολυμερών [46]. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η πιθανή ανομοιομορφία όσον αφορά την χημική σύσταση της επιφάνειας λόγω της χρήσης των διαφορετικών πολυμερών. Προκειμένου να υπερκεραστεί αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιούνται πολυμερή, από τα οποία το ένα μπορεί να μετατραπεί εύκολα στο άλλο και στη συνέχεια γίνεται ανόπτηση, δηλαδή κατεργασία σε υψηλή θερμοκρασία,προκειμένου στην επιφάνεια να εκτίθεται μόνο το ένα από τα δύο πολυμερή [47]. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα οι δομές που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή να μεταφερθούν με διάφορες μεθόδους αποτύπωσης σε χημικώς ομοιόμορφα υποστρώματα, δηλαδή η αρχική επιφάνεια να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα ή σφραγίδα [48].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ

3.1 Γενικά για το πλάσμα

Το πλάσμα είναι η τέταρτη κατάσταση της ύλης. Δημιουργείται σε θάλαμο υπό κενό, όταν κατά την εισαγωγή ενός αερίου εφαρμόζεται υψηλή τάση με ταυτόχρονη ηλεκτρική εκκένωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μέσα στο θάλαμο ένα ηλεκτρικά ουδέτερο μίγμα το οποίο αποτελείται από ηλεκτρόνια, ιόντα, φωτόνια, προϊόντα επανασύνδεσης σωματιδίων και ουδέτερα σωματίδια (ελεύθερες ρίζες, άτομα) (Σχήμα 3.1). Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια που δημιουργούνται αποκτούν κινητική ενέργεια και συγκρούονται συνεχώς με άλλα άτομα ή μόρια αποκτώντας έτσι μέση ενέργεια πολλών eV (electron Volts), η οποία αντιστοιχεί σε θερμοκρασία δεκάδων χιλιάδων βαθμών Κελσίου και η οποία είναι κατά πολύ υψηλότερη από τη θερμοκρασία του αερίου που δεν διαφέρει σημαντικά από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η συνύπαρξη του ψυχρού αερίου (από εκεί προκύπτει και ο όρος «ψυχρό πλάσμα» που συχνά χρησιμοποιείται) και των θερμών ηλεκτρονίων είναι αυτό που διαφοροποιεί τον αντιδραστήρα του πλάσματος από μια συμβατική θερμική διεργασία [49].



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των ενεργών σωματιδίων που υπάρχουν σε πλάσμα οξυγόνου (http://www.biozone-europe.eu/v2/en/technologies/cold-plasma**)**

Οι συγκρούσεις των σωματιδίων που λαμβάνουν χώρα στο πλάσμα μπορεί να είναι ελαστικές ή ανελαστικές. Στις ελαστικές συγκρούσεις, που συνήθως αποτελούν και τη πλειοψηφία των συγκρούσεων μεταξύ ηλεκτρονίων και ατόμων ή μορίων, τα σωματίδια ανταλλάσσουν ορμή και κινητική ενέργεια χωρίς να επηρεάζονται οι εσωτερικές τους ενεργειακές καταστάσεις. Αντίθετα, στις ανελαστικές συγκρούσεις οι εσωτερικές ενεργειακές καταστάσεις μεταβάλλονται και τα σωματίδια που συμμετέχουν μεταβαίνουν συνήθως σε διεγερμένες καταστάσεις. Αν η μέση ενέργεια των ηλεκτρονίων δεν είναι επαρκής για να προκαλέσει διέγερση, οι πιο πολλές συγκρούσεις ηλεκτρονίων-μορίων θα είναι ελαστικές και αυτό συμβαίνει συνήθως στο πλάσμα ευγενών αερίων (π.χ. Ar), ενώ στο πλάσμα μοριακών αερίων (π.χ. O_2) το μεγαλύτερο μέρος των συγκρούσεων είναι ανελαστικές [50].

Λόγω της μεγάλης κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων, όλες οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον του πλάσματος (τοιχώματα αντιδραστήρα, δείγματα) φορτίζονται αρνητικά με αποτέλεσμα τα θετικά ιόντα να επιταχύνονται και να προσκρούουν κάθετα σε αυτές. Επιπλέον, οι ρίζες που σχηματίζονται μέσα στο πλάσμα αντιδρούν χημικά με την επιφάνεια του υποστρώματος, ενώ τα ιόντα επιδρούν με μηχανικό τρόπο (ιονοβολή) [51]. Η εκπομπή φωτός που παρατηρείται κατά τη δημιουργία του πλάσματος είναι αποτέλεσμα της αποδιέγερσης των διεγερμένων ατόμων και μορίων που σχηματίζονται. Για τις περισσότερες καταστάσεις πλάσματος ο αριθμός των αρνητικών σωματιδίων είναι ίσος με αυτόν των θετικών. Δηλαδή, το πλάσμα είναι ηλεκτρικά ουδέτερο [49].

Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την έκθεση μιας επιφάνειας σε πλάσμα διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες [52]:

Εγχάραξη: αφαίρεση υλικού μέσω αλληλεπιδράσεων με ενεργά συστατικά του πλάσματος, που οδηγούν στην δημιουργία πτητικών προϊόντων.

Εναπόθεση: δημιουργία λεπτών υμενίων πολυμερών που εναποτίθενται στις επιφάνειες. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια του πλάσματος και οι ιδιότητες του πολυμερούς που αποτίθεται με αυτό τον τρόπο είναι διαφορετικές από αυτές ενός πολυμερούς που παρασκευάζεται με τις κλασικές χημικές ή ηλεκτροχημικές διεργασίες. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η δυνατότητα ελέγχου των ιδιοτήτων των επιφανειακών

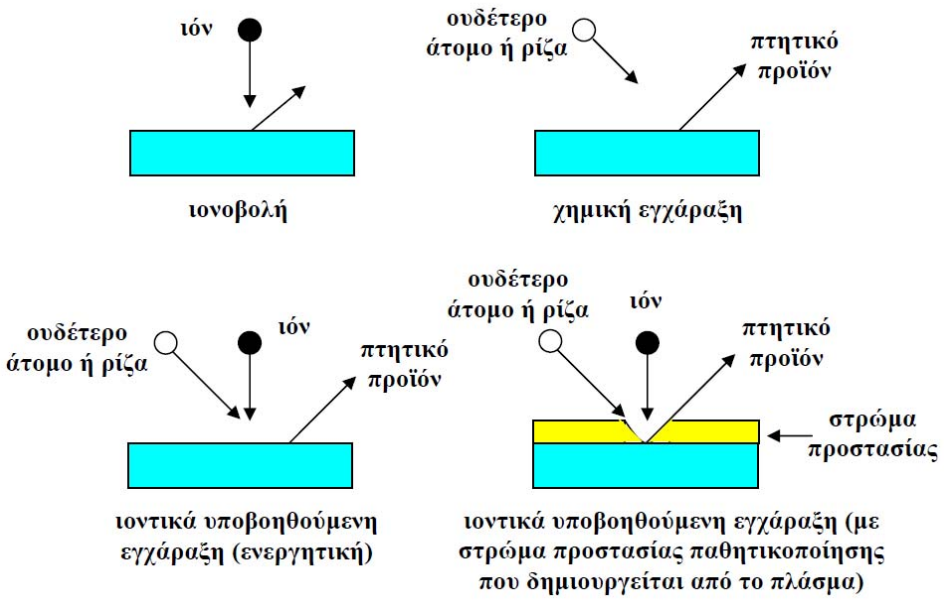
πολυμερών και κατά συνέπεια των επιφανειών, με πιο κλασικό παράδειγμα τη δημιουργία φθορανθρακικών πολυμερών με ελεγχόμενη επιφανειακή τάση (ρύθμιση του λόγου F/C στο υλικό).

Χημική τροποποίηση: προσθήκη δραστικών χημικών ομάδων στην επιφάνεια των υλικών που εκτίθενται στο πλάσμα. Η διεργασία αυτή διαφοροποιείται από την εγχάραξη και την εναπόθεση στο ότι στόχος δεν είναι η μείωση ή η αύξηση της μάζας του υποστρώματος, αλλά μόνο η επιφανειακή φυσική ή χημική τροποποίηση. Για παράδειγμα, κατεργασία πολυμερών με πλάσμα οξυγόνου αυξάνει την υδροφιλικότητα της επιφάνειας και την περιεκτικότητά της σε O, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης των αλυσίδων (δημιουργία καρβονυλίων κτλ).

Στη συνέχεια αναλύεται περαιτέρω η εγχάραξη μέσω πλάσματος, καθώς είναι ο μηχανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων στην παρούσα ερευνητική εργασία.

3.2 Εγχάραξη με Πλάσμα

Οι βασικοί μηχανισμοί που προκαλούν την εγχάραξη είναι η μηχανική αφαίρεση του υλικού από τα ιόντα του πλάσματος που ονομάζεται ιονοβολή (sputtering), η χημική εγχάραξη (θερμική εγχάραξη) και η υποβοηθούμενη από ιόντα χημική εγχάραξη (ion enhanced chemical etching) (Σχήμα 3.2).

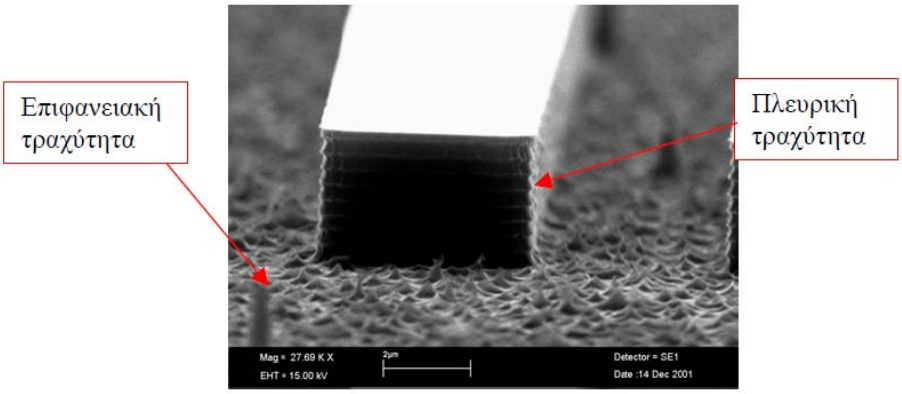


Σχήμα 3.2: Οι βασικοί μηχανισμοί εγχάραξης με πλάσμα [53].

Η βασική διαφορά της ιονοβολής από τη χημική εγχάραξη και την υποβοηθούμενη από ιόντα χημική εγχάραξη είναι ότι στην περίπτωση της ιονοβολής (ή αλλιώς sputtering) έχουμε μηχανική αφαίρεση του υλικού, ενώ στη δεύτερη το υλικό μετατρέπεται πρώτα σε μια πτητική χημική ένωση, η οποία απομακρύνεται από την επιφάνεια. Το μέγεθος που χαρακτηρίζει κάθε διαδικασία εγχάραξης είναι η ποσότητα του υλικού που αφαιρείται συναρτήσει του χρόνου και ορίζεται ως *ρυθμός εγχάραξης* (Ρ.Ε.). Όταν δύο υλικά εγχαράσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς τότε ο λόγος των δύο ρυθμών ορίζει ένα νέο μέγεθος, την εκλεκτικότητα. Η χημική εγχάραξη μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη εκλεκτικότητα, καθώς καθορίζεται από τους δεσμούς και τη χημική συνοχή των διαφορετικών υλικών. Αντίθετα, η ιονοβολή χαρακτηρίζεται από μικρή εκλεκτικότητα γιατί η εγχάραξη στην περίπτωση αυτή δεν εξαρτάται από τη χημική σύσταση του υλικού που υπόκειται σε κατεργασία με πλάσμα. Η εγχάραξη περιορίζεται στο ανώτατο στρώμα της επιφάνειας του υλικού και σπάνια διεισδύει σε μεγαλύτερο βάθος. Επομένως, η τροποποίηση είναι επιφανειακή και το υλικό διατηρεί τις φυσικές και χημικές του ιδιότητες στον κύριο όγκο του[54-55] .

3.3 Νανοδόμηση επιφανειών μέσω εγχάραξης με πλάσμα

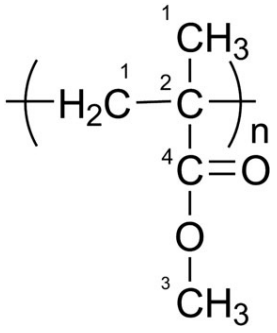
Πολλά αέρια έχουν χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση των επιφανειών με πλάσμα, όπως Ar, He, N_2, O_2, SF_6, C_4F_8 κ.α. Η επιλογή του αερίου γίνεται ανάλογα με το είδος της επιφάνειας (πολυμερές, πυρίτιο και γυαλί) και τη μεταβολή που επιθυμούμε να προκληθεί σε αυτή (Εδάφιο 3.1). Αέρια όπως το SF_6 και το O_2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νανοϋφής σε μία επιφάνεια [56]. Αυτή η νανοϋφή ορίζεται ως τραχύτητα και εκφράζει την τοπογραφική επιφανειακή αλλοίωση, η οποία έχει προκληθεί μετά από κατεργασία με πλάσμα σε σύγκριση με την μη κατεργασμένη επιφάνεια. Διαχωρίζεται στην επιφανειακή τραχύτητα, που χαρακτηρίζει την ποιότητα της επίπεδης επιφάνειας και στην πλευρική τραχύτητα, που χαρακτηρίζει την ομοιομορφία των κάθετων τοιχωμάτων των δομών που δημιουργούνται κατά την εγχάραξη (Σχήμα 3.3) [57]. Η επιφάνεια που εκτίθεται στο πλάσμα αρχίζει πολύ σύντομα να αλλοιώνεται και να παρουσιάζει κοιλάδες και κορυφές. Η απόσταση μεταξύ μιας κοιλάδας και μιας κορυφής καθώς και το ύψος των κορυφών, αυξάνεται με αύξηση του χρόνου κατεργασίας. Το μέσο ύψος μιας δομής εκφράζεται από τη ρίζα της μέσης τετραγωνικής τιμής των υψών (root mean square, rms). Το rms υπολογίζεται μετά από σάρωση της επιφάνειας με Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM) με τον τρόπο που περιγράφεται στο Εδάφιο 5.4 [58].



Σχήμα 3.3: Επιφανειακή και πλευρική τραχύτητα σε επιφάνεια Si μετά από εγχάραξη με πλάσμα οξυγόνου [57].

3.4 Δημιουργία νανοϋφής με πλάσμα σε επιφάνειες πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)

Διάφορα πολυμερικά υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δημιουργίας νανοϋφής από το πλάσμα, όπως ο πολυ(τερεφθαλικός αιθυλενεστέρας) (PET), η πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη) (PDMS), ο πολυ(ανθρακικός εστέρας) (PC) και το πολυστυρένιο (PS) [59-61]. Στη συνέχεια παρατίθενται μελέτες σχετικά με την τροποποίηση επιφανειών πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) με πλάσμα O_2, που είναι και το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) είναι ένα διαφανές, ελαφρύ και ανθεκτικό θερμοπλαστικό πολυμερές που συχνά αντικαθιστά το γυαλί σε διάφορες χρήσεις [62]. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του PMMA είναι ο μεγάλος βαθμός συμβατότητας του με τους ανθρώπινους ιστούς, γι' αυτό και συχνά βρίσκει εφαρμογές στην ιατρική, όπως στην κατασκευή φακών επαφής, στην παρασκευή ορθοπεδικού γύψου αλλά και ως υλικό για εμφυτεύματα αισθητικής χειρουργικής [63]. Στο σχήμα 3.4 παρουσιάζεται ο χημικός τύπος του πολυμερούς.



Σχήμα 3.4: Χημικός τύπος του πολύ(μεθακρυλικού) μεθυλεστέρα.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το βαθμό εγχάραξης του PMMA με πλάσμα αερίων είναι: η θερμοκρασία του ηλεκτροδίου, ο χρόνος εγχάραξης, το δυναμικό αυτοπόλωσης, η πίεση και η ροή του αερίου καθώς και η ισχύς της γεννήτριας του αντιδραστήρα πλάσματος [64-65]. Σε μία μελέτη έχει γίνει εκτενής περιγραφή της επίδρασης των ανωτέρω παραμέτρων εγχάραξης με πλάσμα

O_2 στη δημιουργία νανοδομών σε επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα), προκειμένου να επιτευχθεί η δημιουργία νανοϋφής με ελεγχόμενο ύψος, πλάτος, διάκενο, οργάνωση και σχήμα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι, αύξηση της θερμοκρασίας δημιουργεί δομές μεγαλύτερου ύψους και πλάτους και ότι η καλύτερη οργάνωση παρουσιάζεται για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 60 ^{o}C. Παράλληλα, αποδείχτηκε ότι δεν υπάρχει μεταβολή της ταχύτητας για χρόνους εγχάραξης από 1 εώς 5 λεπτά, ενώ για χρόνους εγχάραξης από 6 έως 25 λεπτά εμφανίζονται ακανόνιστες δομές των οποίων το ύψος και το πάχος αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος εγχάραξης. Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους όσον αφορά τον έλεγχο της ταχύτητας της επιφάνειας είναι το δυναμικό αυτοπόλωσης, όπου με αύξηση του δυναμικού παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των δομών με παράλληλη μείωση της ομοιόμορφης κατανομής των δομών . Επιπλέον, βρέθηκε ότι όταν εφαρμόζεται χαμηλή ροή αερίου (< 75 sccm), λόγω του γεγονότος ότι τα ενεργά σωματίδια του πλάσματος μπορούν να αλληλεπιδρούν για μεγαλύτερο χρόνο με την επιφάνεια, οι δομές που δημιουργούνται είναι υψηλότερες και ακανόνιστες σε σχέση με τις δομές που δημιουργούνται όταν χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ροές αερίου. Τέλος, βρέθηκε ότι η πίεση και η ισχύς της γεννήτριας δεν επηρεάζουν σημαντικά το εύρος των δομών, αλλά επηρεάζουν το ύψος και την οργάνωσή τους [56]. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών παρατίθενται συνοπτικά στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Επίδραση των παραμέτρων της εγχάραξης με πλάσμα O_2 στα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοδομών σε επιφάνειες PMMA[56, 64-65].

	Ύψος	Πάχος	Τάξη	Οξύτητα	Ασυμμετρία	Περίοδος	Γενικά σχόλια
Θερμοκρασία	+++	+++	+++	+++	+	+++	Η τάξη εμφανίζεται σε ένα μικρό παράθυρο τιμών.
Χρόνος εγχάραξης	++	++	+++	+	+++	+++	Εμφάνιση κάποιων μεγάλων σε όγκο και ύψος κορυφών που επηρεάζουν όλα τα στατιστικά μεγέθη από τα 4 λεπτά και έπειτα.
Δυναμικό ηλεκτροδίου	+++	+++	+++	+	++	+++	Όσο αυξάνει το δυναμικό οι δομές που παράγονται είναι πιο οξείες, πιο τραχιές, ενώ τάξη εμφανίζεται μόνο όταν η γεννήτρια είναι κλειστή.
Πίεση αερίου	+	X	+	X	X	+	Η πίεση επηρεάζει ελάχιστα.
Ροή αερίου	++	++	++	+	++	+++	Η ροή αερίου επηρεάζει αρκετά όλα τα στατιστικά μεγέθη ειδικά στις χαμηλές τιμές ροής.
Ισχύς πηγής	++	X	++	++	+	+	Οι νανοδομές επηρεάζονται περισσότερο λόγω του μικρού ρυθμού εγχάραξης στις χαμηλές τιμές ισχύος.

Σε μία άλλη μελέτη, αναλύθηκε εκτός από τη μεταβολή της νανοδόμησης της επιφάνειας συναρτήσει του χρόνου κατεργασίας με πλάσμα (χρόνοι κατεργασίας από 5 έως 60 δευτερόλεπτα) και η μεταβολή της υδροφιλικότητας και της χημείας της επιφάνειας. Βρέθηκε ότι με αύξηση του χρόνου κατεργασίας με πλάσμα, και διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές, αυξανόταν η τραχύτητα και η υδροφιλικότητα της επιφάνειας καθώς και ο αριθμός των ελεύθερων καρβοξυλομάδων και καρβονυλομάδων που δημιουργούνταν σε αυτή. Ένα ενδιαφέρον εύρημα που

προέκυψε ως προς την μεταβολή της υδροφιλικότητας επιφανειών πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) μετά από έκθεση σε πλάσμα οξυγόνου, είναι ότι η γωνία επαφής μειώνεται με την κατεργασία από τις 85^{o} στις 43^{o}, αλλά η μεταβολή αυτή δεν είναι τόσο μεγάλη όσο αυτή που έχει προσδιοριστεί για άλλα πολυμερή, όπως το PET και το PS που η γωνία επαφής λαμβάνει τιμές <10^{o}, για τις ίδιες συνθήκες κατεργασίας [66]. Σε παρόμοια αποτελέσματα οδηγήθηκε και ο Ozgen και η ομάδα του, οι οποίοι εφάρμοσαν διαφορετικό δυναμικό αυτοπόλωσης (10 W, 50 W και 100 W) για χρόνους 5, 15 και 30 λεπτά, και κατέληξαν ότι η μεγαλύτερη μεταβολή στην επιφάνεια ως προς την τραχύτητα, την υδροφιλικότητα και τη χημεία της επιτυγχάνεται με κατεργασία για 30 λεπτά με δυναμικό αυτοπόλωσης 100 W [67]. Από τα προαναφερθέντα είναι προφανές ότι με κατεργασία επιφανειών PMMA σε πλάσμα O_2 υπό συγκεκριμένες συνθήκες είναι δυνατόν να ληφθούν επιφάνειες με συγκεκριμένες ιδιότητες όσον αφορά την τραχύτητα, υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα και χημική σύσταση.

3.5 Μελέτες προσκόλλησης και επιβίωσης κυττάρων σε κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες PMMA

Καθώς ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) θεωρείται βιοσυμβατό υλικό, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες προσκόλλησης, ανάπτυξης και συμπεριφοράς κυττάρων σε νανοσχηματοποιημένες και νανοδομημένες επιφάνειες PMMA. Στο σημείο αυτό θα αναφερθούν εκτενέστερα τα αποτελέσματα των μελετών στις οποίες το πολυμερές έχει υποστεί κατεργασία με πλάσμα αερίων. Σε μία από τις πρώτες μελέτες, επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) κατεργάστηκαν με πλάσμα Ar και πλάσμα N_2 για χρόνους 5 και 10 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η βιοσυμβατότητά τους και να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή εμφυτευμάτων κερατοειδούς. Για την αξιολόγηση των επιφανειών, χρησιμοποιήθηκε η σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων CPA-47 και διαπιστώθηκε ότι η προσκόλληση των κυττάρων ήταν αυξημένη στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες σε σχέση με τις μη κατεργασμένες. Επίσης, μέσω της κυτταροτοξικής δοκιμασίας MTT και της χρήσης συνεστιακού μικροσκοπίου δείχτηκε ότι δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα, η μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων και η οργάνωση του

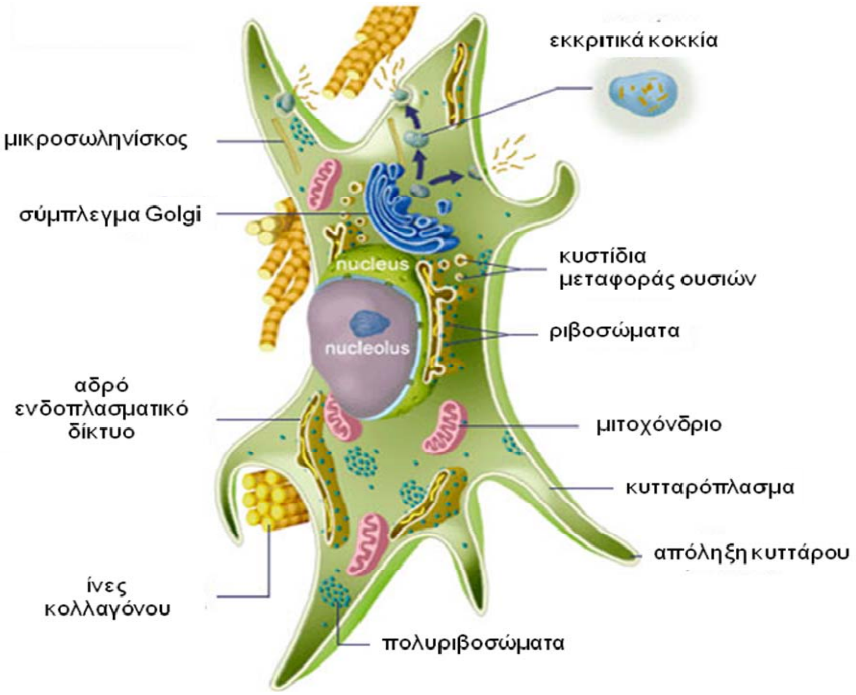
κυτταροσκελετού τους όταν αυτά αναπτύσσονται στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες, σε σύγκριση με τις μη κατεργασμένες[68]. Σε μία άλλη μελέτη, έγινε σύγκριση της προσκόλλησης ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων καρκίνου του τραχήλου (HeLa) σε νανοδομημένες επιφάνειες PMMA, κατεργασμένες και μη με πλάσμα O_2. Με την τεχνική της νανοσχηματοποίησης με έγχυση (nanomolding), δημιουργήθηκαν στις επιφάνειες νανοστήλες που είχαν τις εξής διαστάσεις: ύψος 0, 50, 100, 150 και 200 nm, διάμετρο 60 nm και η απόσταση μεταξύ τους ήταν 50 nm. Παρατηρήθηκε ότι, στις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες, οι οποίες ήταν υδρόφιλες (γωνία επαφής $<20^o$) η προσκόλληση των κυττάρων ήταν αυξημένη κατά 20% σε σχέση με τις μη κατεργασμένες, οι οποίες ήταν υδρόφοβες (γωνία επαφής περίπου 80^o) [69]. Θετική επίδραση της κατεργασίας με πλάσμα τετραφθορομεθανίου (CF4) στην προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF7 (καρκίνος του μαστού) δείχτηκε και από άλλη μία ερευνητική ομάδα, η οποία συσχέτισε την αυξημένη προσκόλληση των κυττάρων με τη μεγαλύτερη προσρόφηση πρωτεϊνών του θρεπτικού υλικού που παρατηρήθηκε στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες[70]. Τέλος, στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/ Ανοσοαισθητήρων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Πλάσματος, του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» έγινε μελέτη της προσκόλλησης και της ανάπτυξης αθανατοποιημένων ινοβλαστών ποντικού 3T3 σε υμένια PMMA, επιστρωμένα σε δισκία πυριτίου, που είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα O_2 για διαφορετικές τιμές δυναμικού αυτοπόλωσης και χρόνους κατεργασίας, καθώς και στις αντίστοιχες μη κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες. Διαπιστώθηκε ότι, μετά από μία μέρα καλλιέργειας προσκολλήθηκε μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων στις πολύ τραχείες επιφάνειες (κατεργασία σε δυναμικό 100 Volt για χρόνο 3 λεπτά) σε σχέση με τις επίπεδες. Αντιθέτως, μετά από καλλιέργεια επί 3 ημέρες, ο αριθμός των κυττάρων στις μη κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες ήταν μεγαλύτερος από αυτόν στις κατεργασμένες επιφάνειες. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι, η αυξημένη τραχύτητα παρότι ευνοούσε την προσκόλληση των ινοβλαστών 3T3, επηρέαζε αρνητικά την ανάπτυξη τους με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που παρέμεναν στην επιφάνεια [71].

Η δυνατότητα διαχωρισμού καρκινικών κυττάρων από φυσιολογικά, τα οποία απαντώνται στον ίδιο ιστό είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διάγνωση, τη θεραπεία αλλά και την παρακολούθηση της εξέλιξης της ασθένειας. Λόγω των ιδιαίτερα ενδιαφερόντων αποτελεσμάτων με τους ινοβλάστες της σειράς 3T3, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αποφασίστηκε να μελετηθεί η συμπεριφορά φυσιολογικών ινοβλαστών και κυττάρων ινοσαρκώματος της κυτταρικής σειράς HT1080 σε επιφάνειες PMMA, οι οποίες είχαν υποστεί κατεργασία με διαφορετικές συνθήκες πλάσματος O_2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΝΑΝΟΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

4.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες ινοβλαστών

Οι ινοβλάστες είναι τα κύτταρα που συνθέτουν κατά κύριο λόγο τον συνδετικό ιστό. Έχουν ατρακτοειδές σχήμα και αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης σε πλαστικά υλικά, με αποτέλεσμα να καθίσταται εύκολη η καλλιέργεια τους *in vitro* σε τρυβλία (Σχήμα 4.1) [72].



Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση της μορφολογίας και των οργανιδίων ενός ινοβλάστη (https://www.google.gr/search?q=fibroblast&tbm)

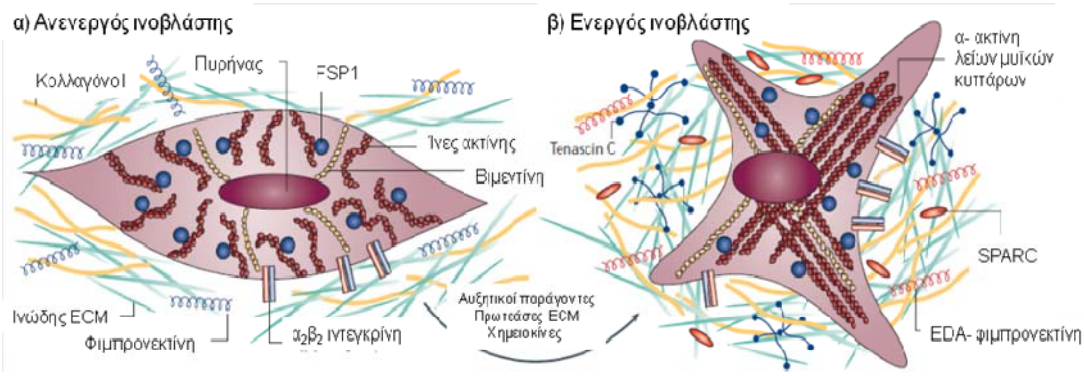
Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των ινοβλαστών είναι η μεγάλη ετερογένεια ως προς τις εκφραζόμενες πρωτεΐνες, τη σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας και την έκκριση αυξητικών παραγόντων και παραγόντων διαφοροποίησης ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται. Για παράδειγμα, οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες του δέρματος εκφράζουν υψηλά επίπεδα κολλαγόνου Ι

και V, σε αντίθεση με τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες του πνεύμονα οι οποίοι εκφράζουν τους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες FOXF1 και FOXP1 [73].
Μια από τις κύριες λειτουργίες των ινοβλαστών είναι η σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας, καθώς παράγουν πολλά από τα βασικά συστατικά της, όπως η φιμπρονεκτίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο I, III, IV και V [74]. Ακόμα, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της εξωκυττάριας μήτρας μέσω της έκκρισης πρωτεασών (όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμησή της [75]. Παράλληλα, ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση του επιθηλίου μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων και της αλληλεπίδρασης επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων [76]. Τέλος, εμπλέκονται στην επούλωση των πληγών, καθώς έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ουσίες εξωκυττάριας μήτρας, η οποία λειτουργεί ως ικρίωμα για τα υπόλοιπα κύτταρα [74].

4.2 Ενεργοποίηση ινοβλαστών

Οι ινοβλάστες σε ζωντανούς οργανισμούς που δεν αντιμετωπίζουν κάποιο πρόβλημα βρίσκονται σε ανενεργό κατάσταση. Μεταβαίνουν στην ενεργό κατάσταση όταν υπάρξει ανάγκη επούλωσης μιας βλάβης/πληγής. Η μετάπτωση από την ανενεργό στην ενεργό κατάσταση συνοδεύεται από μορφολογική αλλαγή των κυττάρων και των επί μέρους οργανιδίων τους, π.χ. ο πυρήνας που στους ανενεργούς ινοβλάστες είναι πεπλατυσμένος και πλούσιος σε ευχρωματίνη αποκτά μια περισσότερο σφαιρική μορφολογία, ενώ το σύμπλεγμα Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο διογκώνονται στους ενεργούς ινοβλάστες σε σχέση με τους ανενεργούς [72]. Η ενεργοποίηση των ινοβλαστών επάγεται από παράγοντες που εκκρίνονται μετά την πρόκληση τραύματος και προέρχονται είτε από τα τραυματισμένα επιθηλιακά κύτταρα είτε από τα μονοπύρηνα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκύτταρα και μακροφάγα). Τέτοιοι παράγοντες είναι ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (transforming growth factor-β, TGFβ), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet derived growth factor, PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 2 (FGF2) (Σχήμα 4.2) [77].

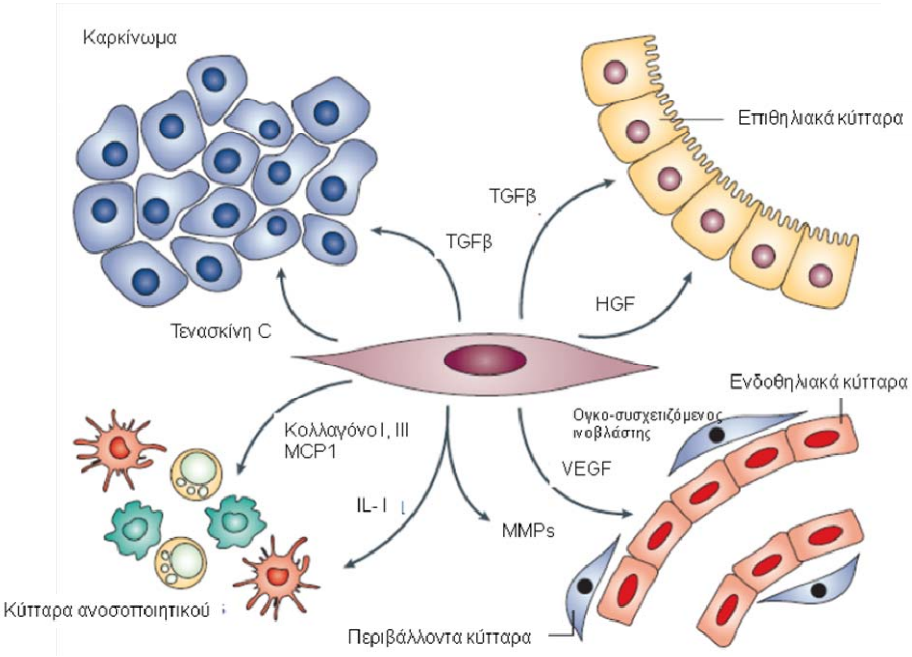
Οι ενεργοί ινοβλάστες εκφράζουν την α-ακτίνη των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και αυξημένα επίπεδα πρωτεασών που προκαλούν αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP2, MMP3 και MMP9, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας στην περιοχή του τραύματος[78]. Παράλληλα, οι ενεργοί ινοβλάστες εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης μετά από τραυματισμό, μέσω έκκρισης κυτταροκινών και χημειοκινών όπως η ιντερλευκίνη-1 και η χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 (Monocyte chemotactic protein-1, MCP1), αντίστοιχα [79].



Σχήμα 4.2: α) Ανενεργοί ινοβλάστες. Οι ανενεργοί ινοβλάστες έχουν ατρακτοειδές σχήμα, κυτταροσκελετό πλούσιο σε ακτίνη και ενδιάμεσα ινίδια βιμεντίνης. Περιβάλλονται από την εξωκυττάρια μήτρα, η οποία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο I και φιμπρονεκτίνη. β) Στην περίπτωση των ενεργών ινοβλαστών η εξωκυττάρια μήτρα αποτελείται από κολλαγόνο I, τενασκίνη C, EDA-φιμπρονεκτίνη και όξινη πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη (secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC). Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η ύπαρξη α-ακτίνης λείων μυϊκών κυττάρων στον κυτταροσκελετό τους, γι' αυτό και συχνά αναφέρονται ως «μυοϊνοβλάστες» [80].

4.3 Ινοβλάστες και καρκινογένεση

Κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης ενός όγκου τα καρκινικά κύτταρα σχηματίζουν ένα νεοπλασματικό μόρφωμα το οποίο είναι ενσωματωμένο στον προσβεβλημένο ιστό (συνήθως επιθηλιακό) αλλά διαχωρίζεται από τον περιβάλλοντα ιστό με μία υποστηρικτική μεμβράνη (*in situ* καρκίνωμα) [81]. Η συγκεκριμένη μεμβράνη μαζί με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τους ινοβλάστες, τα τριχοειδή αγγεία και την εξωκυττάρια μήτρα που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα συνιστούν το καρκινικό στρώμα. Το στρώμα αυτό προσομοιάζει με το στρώμα που σχηματίζεται κατά τη διαδικασία της επούλωσης τραυμάτων και συχνά αναφέρεται ως δραστικό στρώμα (reactive stroma) [82-83]. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλου αριθμού ινοβλαστών, αυξημένη πυκνότητα τριχοειδών αγγείων και έκκριση κολλαγόνου Ι και φιμπρίνης (fibrin) σε αντίθεση με τον φυσιολογικό ιστό [83]. Οι ενεργοί ινοβλάστες που εντοπίζονται γύρω από έναν όγκο ονομάζονται ογκο-συσχετιζόμενοι ινοβλάστες (tumor associated) και η μορφολογία τους είναι παρόμοια με αυτή που αποκτούν οι ενεργοί ινοβλάστες σε έναν τραυματισμένο ιστό, δηλαδή το κυτταροπλασμά τους αποτελείται κατά κύριο λόγο από α-ακτίνη των λείων μυϊκών κυττάρων [84]. Επίσης, συνθέτουν συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας όπως: κολλαγόνο Ι, φιμπρονεκτίνη, πρωτεογλυκάνες και τενασκίνη C, συστατικά που υποβοηθούν τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [83]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ινοβλαστών που σχετίζονται με την καρκινογένεση είναι ότι παραμένουν συνεχώς στην ενεργό κατάσταση σε αντίθεση με την περίπτωση επούλωσης πληγών όπου απενεργοποιούνται σχεδόν αμέσως μετά την αποκατάσταση του τραυματισμένου ιστού [85]. Στο Σχήμα 4.3, παρουσιάζονται αναλυτικά οι λειτουργίες των ινοβλαστών στον καρκινικό ιστό.



Σχήμα 4.3: Σχηματική απεικόνιση των λειτουργιών των ενεργών ινοβλαστών που εντοπίζονται στο καρκινικό στρώμα. Οι ινοβλάστες επικοινωνούν με καρκινικά, επιθηλιακά, και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της έκκρισης αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων. Η αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου I και III και η de novo έκφραση τενασκίνης C, επάγουν τη δημιουργία μιας τροποποιημένης εξωκυττάριας μήτρας, η οποία επιταχύνει την ανάπτυξη και εξάπλωση του όγκου. Οι ινοβλάστες, επίσης ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση με την έκκριση χημειοκινών, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (MCP1) και ιντερλευκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Ακόμα, αλληλεπιδρούν με το μικροαγγειακό σύστημα μέσω της έκκρισης μεταλλοπρωτεϊνασών (MMPs) και του αγγειακού αυξητικού παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF). Τέλος, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων, όπως ο προερχόμενος από τα στρωματικά κύτταρα παράγοντας-1 (Stromal derived factor-1, SDF1) και ο αυξητικός παράγοντας μετατροπής- β (TGFβ) [80].

4.4 Ινοβλάστες και ινοσάρκωμα

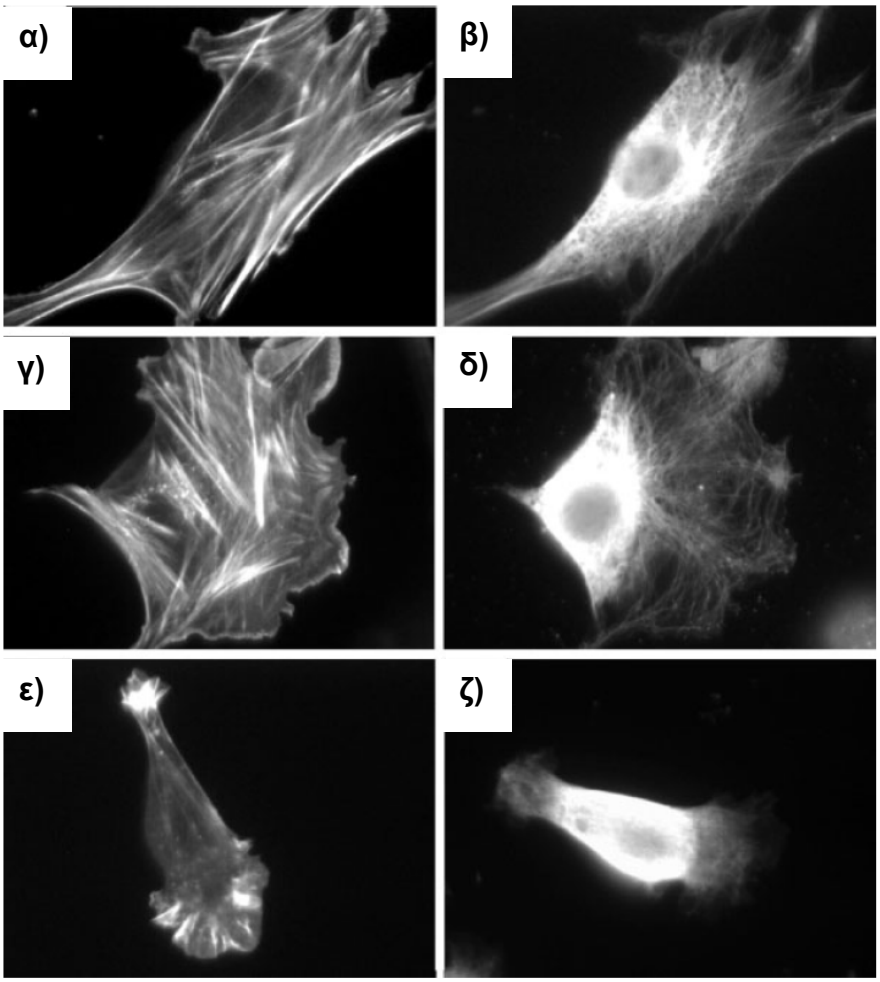
Το ινοσάρκωμα είναι μία κακοήθης νεοπλασία των μεσεγχυματικών κυττάρων του ινώδους συνδετικού ιστού που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινοβλαστών, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται με εξαιρετικά γρήγορο ρυθμό. Μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικούς βαθμούς κακοήθειας: χαμηλή, ενδιάμεση και υψηλή. Ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας τα κύτταρα

προσομοιάζουν περισσότερο ή λιγότερο με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες ως προς την διατήρηση του ατρακτοειδούς σχήματος και την έκκριση κολλαγόνου. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύονται κατά ομάδες και να οργανώνονται σε σχήμα ψαροκόκαλου. Συγκεκριμένα, όταν ο βαθμός κακοήθειας είναι χαμηλός τότε τα κύτταρα διατηρούν την διαφοροποίησή τους και προσομοιάζουν στα φυσιολογικά ενώ όταν ο βαθμός κακοήθειας είναι ενδιάμεσος ή υψηλός τα κύτταρα γίνονται αναπλαστικά. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από απώλεια της διαφοροποίησης, αύξηση του μεγέθους τους παρουσία πολλαπλών πυρήνων ανά κύτταρο, αύξηση του αριθμού των μιτώσεων και μειωμένη παραγωγή κολλαγόνου[86-87] .

4.5 Επίδραση της επιφανειακής νανοτοπογραφίας στη μορφολογία και τις λειτουργίες των ινοβλαστών

Λόγω του σημαντικού ρόλου που παίζουν οι ινοβλάστες στην επούλωση των τραυμάτων, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της τοπογραφίας μιας επιφάνειας στη μορφολογία και τις λειτουργίες των ινοβλαστών με απώτερο στόχο την κατασκευή ικριωμάτων για κατευθυνόμενη κυτταρική ανάπτυξη αλλά και τεχνητών μοσχευμάτων.
Σε μια από αυτές τις έρευνες, έγινε παρατήρηση των ινοβλαστών σε μικροσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθεί η εξάπλωση και η μεταβολή του κυτταροσκελετού τους μετά από καλλιέργεια τους πάνω νανοδομημένες επιφάνειες. Οι προς μελέτη επιφάνειες είχαν κατασκευαστεί με την τεχνική της αποανάμιξης πολυμερών και συγκεκριμένα, με αποανάμιξη πολυστυρενίου/ πολυ-n-βουτυλ-μεθακρυλικού εστέρα (Ps/ PnBMA) ώστε να δημιουργηθούν νησίδες ύψους 10 nm και 50 nm, ενώ παράλληλα ως επιφάνεια ελέγχου χρησιμοποιήθηκε επίπεδη επιφάνεια γυαλιού επιστρωμένη με PnBMA. Στις επιφάνειες αυτές καλλιεργήθηκαν αθανατοποιημένοι ανθρώπινοι ινοβλάστες, hTERT- BJ1, τόσο για μικρούς (15, 90 και 180 λεπτά) όσο και για μεγαλύτερους χρόνους επώασης (72 ώρες). Σε όλους τους χρόνους επώασης, παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά ως προς την προσκόλληση, την έκταση και την οργάνωση του κυτταροσκελετού με την επιφάνεια ελέγχου και τις επιφάνειες με νησίδες ύψους 10nm, ενώ στις επιφάνειες με νησίδες ύψους 50 nm τα κύτταρα είχαν

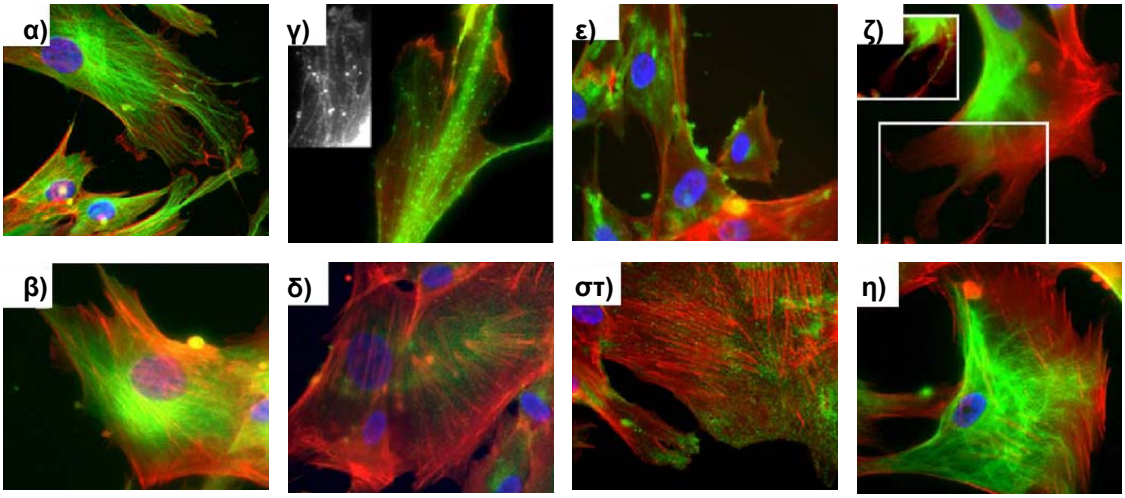
τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα στην επίπεδη επιφάνεια και στις χαμηλές δομές είχαν αρχίσει να εκτείνουν λαμελιπόδια και να έχουν διευθετημένες ίνες ακτίνης, ενώ στις δομές μεγαλύτερου ύψους τα κύτταρα ήταν εμφανώς παραμορφωμένα. Επιπλέον, στους μεγαλύτερους χρόνους επώασης (π.χ., 72 ώρες), τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί στην επίπεδη και στην επιφάνεια με τις νησίδες ύψους 10 nm, είχαν τυπική μορφολογία ινοβλαστών, δηλαδή ήταν καλά εκτεταμένα και σχημάτιζαν φιλοπόδια, η ακτίνη τους ήταν οργανωμένη σε ίνες τάσης και η τουμπουλίνη σχημάτιζε μικροσωληνίσκους οι οποίοι εκτείνονταν από τον πυρήνα προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, στις επιφάνειες με νησίδες ύψους 50 nm, τα κύτταρα είχαν πεπλατυσμένο σχήμα, δεν προέκτειναν φιλοπόδια ενώ η ακτίνη και η τουμπουλίνη δεν παρουσίαζαν κάποια οργάνωση (Σχήμα 4.4). Επίσης σε αυτές τις επιφάνειες, το ποσοστό κάλυψης από ινοβλάστες ήταν πολύ μικρότερο σε σχέση με την επίπεδη επιφάνεια και την επιφάνεια με τη χαμηλή τοπογραφία [88].



Σχήμα 4.4: Απεικόνιση της ακτίνης και της τουμπουλίνης μετά από 72 ώρες καλλιέργειας ινοβλαστών σε (α, β) επίπεδη επιφάνεια, (γ, δ) επιφάνεια με νανονησίδες ύψους 10 nm, και (ε, ζ) επιφάνεια με νανονησίδες ύψους 50 nm. Τόσο η ακτίνη (α, γ) όσο και η τουμπουλίνη (β, δ) ήταν πολύ καλά οργανωμένες στους ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν στην επίπεδη επιφάνεια και στην επιφάνεια με τις νησίδες ύψους 10 nm. Αντίθετα, στις επιφάνειες με τις νησίδες ύψους 50 nm η ακτίνη (ε) και η τουμπουλίνη (ζ) είχαν τυχαία διευθέτηση [88].

Άλλες μελέτες εστιάστηκαν στην ικανότητα των ινοβλαστών να ενδοκυτώνουν τις νανοδομές που υπάρχουν στις επιφάνειες. Σε μία από αυτές, μελετήθηκε η μεταβολή στην κατανομή διαφόρων συμπλεγμάτων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού αθανατοποιημένων ανθρώπινων ινοβλαστών hTERT-BJ1 μέσα στο κύτταρο όταν αυτοί καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες εμπορικά διαθέσιμων επιφανειών PMMA, στις οποίες είχαν δημιουργηθεί με κολλοειδή λιθογραφία νανοκολώνες ύψους 160 nm, διαμέτρου 100 nm και η μεταξύ τους απόσταση ήταν 230 nm. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και μη κατεργασμένο

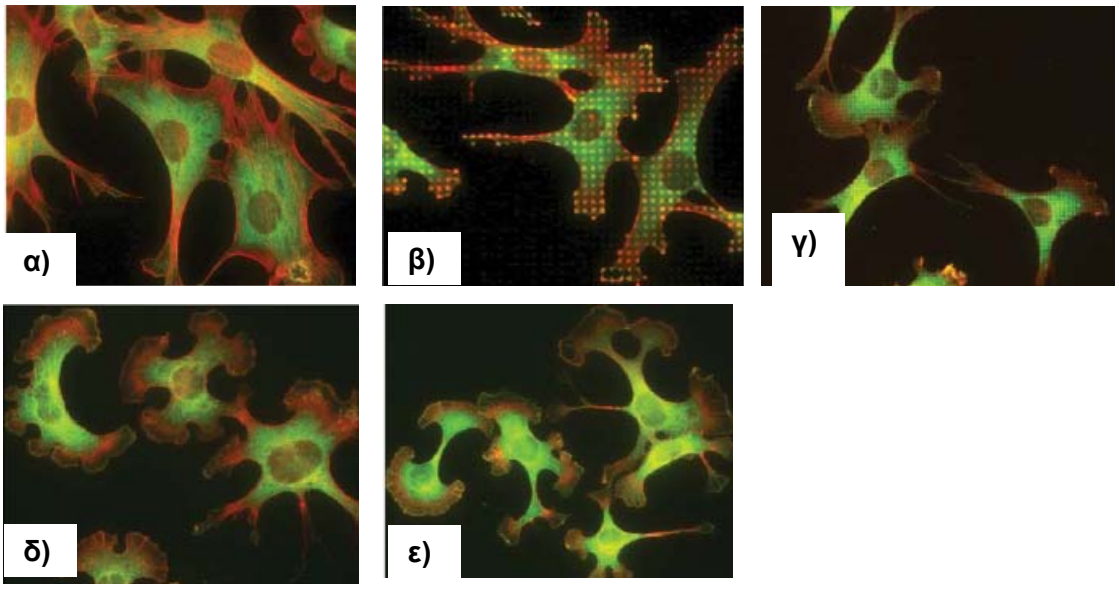
PMMA ως επιφάνεια ελέγχου. Η καλλιέργεια διήρκησε 4 ημέρες και ακολούθησε απεικόνιση με μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) αλλά και με μικροσκόπιο διέλευσης ηλεκτρονίων (TEM). Βρέθηκε ότι τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί στις επιφάνειες που έφεραν νανοκολώνες προέκτειναν πολλά φιλοπόδια, και λαμελιπόδια που κάλυπταν τις νανοκολώνες ενώ επιπλέον είχαν σχηματιστεί κυστίδια σε άμεση γειτνίαση με αυτές καταδεικνύοντας προσπάθεια των ινοβλαστών να τις ενσωματώσουν στο κυτταροπλασμά τους. Περαιτέρω ανάλυση με ανοσοκυτταρολογία χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι συμπλεγμάτων πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος κατέδειξε αρχικά ότι η ακτίνη στα κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί στις επίπεδες επιφάνειες ήταν καλά οργανωμένη σε ίνες τάσης σε όλο το κυτταρόπλασμα, ενώ σε αυτά που είχαν καλλιεργηθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες η ακτίνη ήταν εντοπισμένη κυρίως στην περιφέρεια (Σχήμα 4.5). Επίσης, η τουμπουλίνη στα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες ήταν μειωμένη σε σχέση με αυτά που είχαν καλλιεργηθεί στις επίπεδες επιφάνειες, παρά το γεγονός ότι παρέμενε οργανωμένη με τους μικροσωληνίσκους, οι οποίοι εκτείνονταν από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα (Σχήμα 4.5 α, β). Παράλληλα, τα σημεία προσκόλλησης (focal points) ήταν πιο διακριτά στην επίπεδη επιφάνεια, καθώς η βιμεντίνη ήταν πολύ καλά οργανωμένη στα φιλοπόδια των ινοβλαστών που αναπτύχθηκαν σε αυτή σε σχέση με εκείνα που αναπτύχθηκαν σε επιφάνειες με νανοκολώνες, όπου η βιμεντίνη εντοπιζόταν κυρίως κοντά στον πυρήνα (Σχήμα 4.5 ζ,η). Τέλος, η κλαθρίνη και η δυναμίνη, δύο πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα με την ενδοκύττωση διαφόρων εξωκυττάριων ουσιών, ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στις μη κατεργασμένες επιφάνειες, σε αντίθεση με αυτά που καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες που φέρουν νανοκολώνες. Στις τελευταίες, η κλαθρίνη και η δυναμίνη εντοπίζονταν τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στην περιφέρεια των κυττάρων, υποδεικνύοντας ενδοκύττωση των νανοδομών [89].



Σχήμα 4.5: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού που καταδεικνύουν προσπάθεια ενδοκύττωσης των νανοκολώνων από κύτταρα που επωάσθηκαν σε επιφάνειες με νανοκολώνες διαμέτρου 100 nm. Παρότι παρατηρήθηκε καλή οργάνωση της τουμπουλίνης (πράσινη χρώση) στα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες (α), η πυκνότητα της είναι μεγαλύτερη στην επίπεδη επιφάνεια (β). Αντίθετα, η δυναμίνη (πράσινη χρώση) είναι αυξημένη και πιθανώς συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροπλάσματος στα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες (γ), σε σχέση με την επίπεδη επιφάνεια όπου είναι ελάχιστη. (δ). Παρομοίως, η κλαθρίνη (πράσινη χρώση) εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στην περιφέρεια και στο κυτταρόπλασμα των ινοβλαστών που καλλιεργούνται στις επιφάνειες που φέρουν νανοκολώνες (ε), ενώ είναι διάχυτη στους ινοβλάστες που καλλιεργούνται στην επίπεδη επιφάνεια (στ). Τέλος, η βιμεντίνη (πράσινη χρώση) δεν είναι καλά οργανωμένη και εμφανίζει συσσωματώματα στα φιλοπόδια των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες με νανοκολώνες (ζ), αντίθετα με τα κύτταρα που αναπτύσσονται στις επίπεδες επιφάνειες (η). Σε όλες τις εικόνες η ακτίνη (κόκκινη χρώση) φαίνεται να είναι καλύτερα οργανωμένη στις επίπεδες επιφάνειες [89].

Προκειμένου να διαπιστωθεί με περισσότερη ακρίβεια η επίδραση της νανοτοπογραφίας στη δημιουργία ελασματοποδίων, στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, στο σχηματισμό φιμπρονεκτίνης αλλά και στην κίνηση των ινοβλαστών κατασκευάστηκαν επιφάνειες οι οποίες τροποποιήθηκαν με ακινητοποίηση του πεπτιδίου RGD (αργινίνη- γλυκίνη- ασπαρτικό οξύ), που προάγει τη δημιουργία εστιακών επαφών των κυττάρων με επιφάνειες. Συγκεκριμένα, γυάλινες επιφάνειες που είχαν επικαλυφθεί με στρώμα χρυσού εγχαράγχθηκαν μέσω μάσκας τύπου στένσιλ ώστε να

δημιουργηθούν τετράγωνα χρυσού, τα οποία ενεργοποιήθηκαν στην συνέχεια με ακινητοποίηση του πεπτιδίου RGD, ενώ η ενδιάμεση επιφάνεια αδρανοποιήθηκε με PLL-g-PEG. Ως επιφάνειες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν επίπεδες επιφάνειες χρυσού τροποποιημένου με RGD-ή PLL-g- PEG. Τα τετράγωνα είχαν διαστάσεις 250 nm^2, 500 nm^2, 1 μm^2 και 2 μm^2 και σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό κάλυψης με χρυσό ήταν 25%. Στις επιφάνειες αυτές καλλιεργήθηκαν εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού για διάστημα 4 ωρών. Διαπιστώθηκε ότι στις επιφάνειες με διαστάσεις τετραγώνων <1 μm^2, η εξάπλωση των κυττάρων και η ποσότητα της εκκρινόμενης α5-ιντεγκρίνης μειώνονταν σημαντικά, γεγονός που κατεδείκνυε την αδυναμία μετατροπής των εστιακών προσφύσεων σε ώριμες εστιακές επαφές. Επίσης παρατηρήθηκε ότι στις μικρές διαστάσεις, δεν υπήρχε καλή οργάνωση των ινών ακτίνης και φιμπρονεκτίνης, ενώ ο κυτταροσκελετός ήταν συρρικνωμένος και η κίνηση τους ήταν χωρίς προσανατολισμό (Σχήμα 4.6) [90]. Αντίθετα, στις επιφάνειες με διαστάσεις 1 μm^2 και 2 μm^2 τα κύτταρα παρουσίαζαν ανάλογη συμπεριφορά με τις επίπεδες επιφάνειες. Δηλαδή, τα κύτταρα παρουσίαζαν πολλές ινώδεις συμφήσεις, μήκους αρκετών μm, οι οποίες ήταν πλούσιες σε α5-ιντεγκρίνη και είχαν φυσιολογική μορφολογία ινοβλαστών.



Σχήμα 4.6: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης (κόκκινη χρώση) και της βινκουλίνης (πράσινη χρώση) ινοβλαστών που έχουν καλλιεργηθεί σε επιφάνειες με επιφάνειες που φέρουν τετράγωνες δομές χρυσού διαστάσεων 250 nm^2, 500 nm^2, 1 μm^2 και 2 μm^2 . Στα τετράγωνα διαστάσεων 250 nm^2 (δ) και 500 nm^2 (ε) φαίνεται ότι εκτείνουν πολλά φιλοπόδια, έχουν συρρικνωμένο κυτταροσκελετό και όχι καλά οργανωμένη ακτίνη σε αντίθεση με τα τετράγωνα διαστάσεων 1 μm^2 (β) και 2 μm^2 (γ), όπου έχουν την ίδια εξαπλωμένη μορφολογία με την επίπεδη επιφάνεια χρυσού (α) [90].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι λειτουργίες των κυττάρων και των ιστών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από διαλυτά και αδιάλυτα εξωκυττάρια μακρομόρια, τα οποία αφ' ενός μεσολαβούν στην διακυτταρική επικοινωνία και αφ' ετέρου συνθέτουν την εξωκυττάρια μήτρα, η οποία λειτουργεί ως φυσικό πλαίσιο που στηρίζει τα κύτταρα και τους παρέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τη μεταξύ τους προσκόλληση. Την τελευταία δεκαετία γίνονται προσπάθειες ενσωμάτωσης συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας σε μικρο και νανο-συστήματα, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της τοπογραφίας και της χημείας της επιφάνειας στην προσκόλληση και την ανάπτυξη των κυττάρων. Από διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι, τα κύτταρα είναι εξαιρετικά ευαίσθητα όχι μόνο στη μίκρο- αλλά και στη νανο-τοπογραφία της επιφάνειας στην οποία αναπτύσσονται. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η κλίμακα των νανομέτρων συμπίπτει με το μέγεθος πολλών λειτουργικών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης και των σημείων εστιακής προσκόλλησης. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια καταβάλεται έντονη προσπάθεια διεθνώς για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης κυττάρων με νανοδομημένες επιφάνειες τόσο ως προς την προσκόλληση και την μορφολογία τους όσο και ως προς τις μεταβολές των κυτταρικών λειτουργιών. Στο Εργαστήριο Ανοσαναλύσεων του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α σε συνεργασία με το Εργαστήριο Πλάσματος του Ι.Π.Υ.Φ.Δ.Ν.Μ. του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» πραγματοποιήθηκαν πρόσφατα μελέτες προσκόλλησης αθανατοποιημένων ινοβλαστών ποντικού 3Τ3 σε υμένια PMMA που είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα O_2. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα αυτά είχαν σημαντικά διαφορετική συμπεριφορά ως προς την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό τους όταν καλλιεργήθηκαν στις νανοδομημένες επιφάνειες σε σύγκριση με τις επίπεδες. Λόγω αυτών των ενδιαφερόντων αποτελεσμάτων, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της προσκόλλησης, ανάπτυξης, μορφολογίας, πολλαπλασιασμού και απόπτωσης φυσιολογικών ινοβλαστών και κυττάρων ινοσαρκώματος της καρκινικής σειράς HT-1080 τόσο σε επίπεδες όσο και σε κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επίφανειες PMMA με στόχο τη διερεύνηση της

δυνατότητας διαχωρισμού καρκινικών κυττάρων από φυσιολογικά μέσω της χρήσης νανοδομημένων επιφανειών.

Στα επόμενα Κεφάλαια περιγράφονται οι μέθοδοι παρασκευής και χαρακτηρισμού των νανοδομημένων επιφανειών, οι μέθοδοι καλλιέργειας και χρώσης των κυττάρων (Κεφάλαιο 5), καθώς και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο με τις επίπεδες όσο και με τις νανοδομημένες επιφάνειες ως προς την προσκόλληση, ανάπτυξη, μορφολογία, πολλαπλασιασμό και απόπτωση φυσιολογικών ινοβλαστών και κυττάρων ινοσαρκώματος της καρκινικής σειράς HT-1080 (Κεφάλαιο 6). Τέλος, στο Κεφάλαιο 7 γίνεται συζήτηση των αποτελεσμάτων σε συνδυασμό με σχετικά αποτελέσματα της βιβλιογραφίας και παρατίθενται τα συμπεράσματα της μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Επίστρωση υμενίου PMMA σε δισκίο πυριτίου

Υλικά

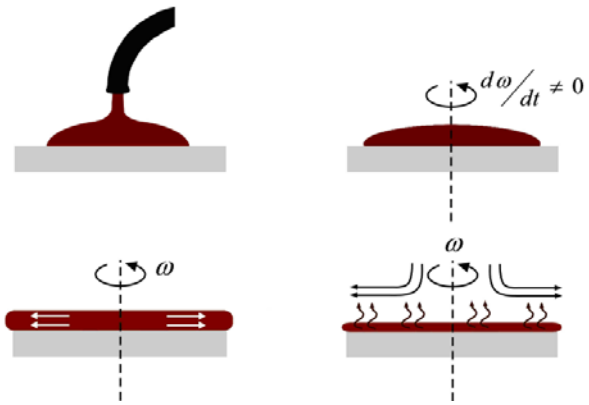
- Πολυ(μεθαρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA), M.B. 120 kDa
- Οξικός εστέρας της μονομεθυλοαιθερο-προλυλενο γλυκόλης (PGMEA)
- Δισκία πυριτίου διαμέτρου 3΄΄

Όργανα

- Περιστροφικός Επιστρωτής, μοντέλο RC8 (Karl Suss)
- Υάλινα μπουκαλάκια
- Θερμαινόμενες πλάκες (hot plates)

Αρχή μεθόδου

Η επίστρωση πολυμερικών υμενίων δια περιστροφής βασίζεται στην εξάπλωση ενός διαλύματος πολυμερούς σε ένα περιστρεφόμενο δισκίο λόγω της κεντρομόλου δύναμης. Το διάλυμα τοποθετείται στη μέση του δισκίου και στη συνέχεια αυτό περιστρέφεται με κατάλληλη ταχύτητα και σταθερή επιτάχυνση ώστε να δημιουργηθεί ένα υμένιο επιθυμητού και ομοιομόρφου πάχους σε όλη την επιφάνεια του δισκίου (Σχήμα 5.1). Έπειτα, ακολουθεί θέρμανση του πολυμερούς σε θερμαινόμενες πλάκες (hot plates) ώστε να επιτευχθεί η σταθεροποίηση του στην επιφάνεια του δισκίου.



Σχήμα 5.1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επίστρωσης διαλυματος πολυμερούς σε δισκίο με περιστροφή και θέρμανση.

Πειραματική πορεία

Για την κατασκευή του πολυμερικού υμενίου χρησιμοποιήθηκε πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA) από την Aldrich, μέσου Μοριακού Βάρους 120 kDa ο οποίος διαλύθηκε σε PGMEA, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 25% κβ. Έπειτα, έγινε επίστρωση δια περιστροφής στις 1000-3000 στροφές το λεπτό για 30 δευτερόλεπτα με επιτάχυνση 300 rpm/s^2 σε δισκίο πυριτίου διαμέτρου 3΄΄. Το πάχος του υμενίου που δημιουργήθηκε ήταν 7,5 μm. Μετά την επίστρωση ακολούθησε ψήσιμο σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε στους 85^o C για 20 min και το δεύτερο στάδιο στους 150^oC για 90 λεπτά.

5.2 Εγχάραξη με πλάσμα O_2

Υλικά

- Δισκίδια πυριτίου επιστρωμένα με υμένιο PMMA
- Αέριο O_2

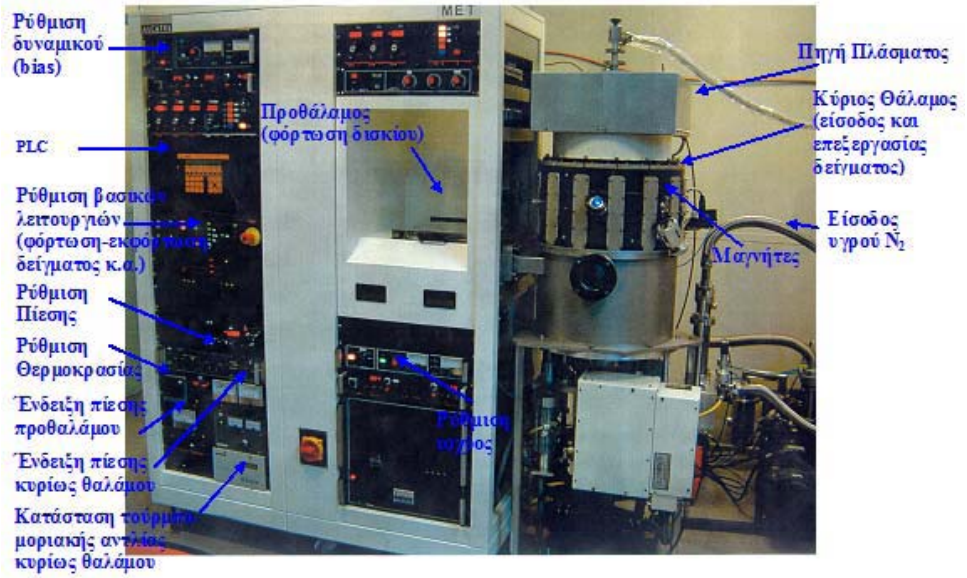
Όργανα

- Αντιδραστήρας πλάσματος MET (Alcatel)

Αρχή Μεθόδου

Ο αντιδραστήρας πλάσματος (Micromachining Etch Tool) που βρίσκεται στο εργαστήριο πλάσματος του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής είναι κατασκευασμένος από την Alcatel, και χρησιμοποιείται τόσο για διεργασίες εγχάραξης όσο και εναπόθεσης διαφόρων υλικών. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.2 το σύστημα αποτελείται από έναν προθάλαμο, από τον κύριο θάλαμο και από διάφορες περιφερικές μονάδες που ρυθμίζουν τη λειτουργία του αντιδραστήρα. Αυτές είναι: η κεντρική μονάδα που ελέγχει τις βασικές λειτουργίες του συστήματος (π.χ. φόρτωση – εκφόρτωση δισκίου), το σύστημα ρύθμισης δυναμικού (bias), το σύστημα ελέγχου πίεσης, η μονάδα ελέγχου ισχύος, το σύστημα ρύθμισης θερμοκρασίας και οι ρυθμιστές ροής των αερίων (Σχήμα 5.3). Η κατάσταση λειτουργίας του αντιδραστήρα ελέγχεται μέσω των ενδείξεων πίεσης του προθαλάμου και του κυρίου θαλάμου και της μονάδας ενημέρωσης της κατάστασης των αντλιών του συστήματος.

Η πηγή πλάσματος είναι τοποθετημένη στο επάνω μέρος του κυλινδρικού κυρίου θαλάμου ώστε το πλάσμα να διαχέεται μέσα σε αυτόν προς την βάση που είναι τοποθετημένα τα δείγματα (Σχήμα 5.3). Η πηγή πλάσματος του αντιδραστήρα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη μπορεί να επιτύχει πυκνότητες του ρεύματος πλάσματος μεγαλύτερες από 2 mA/cm^2.



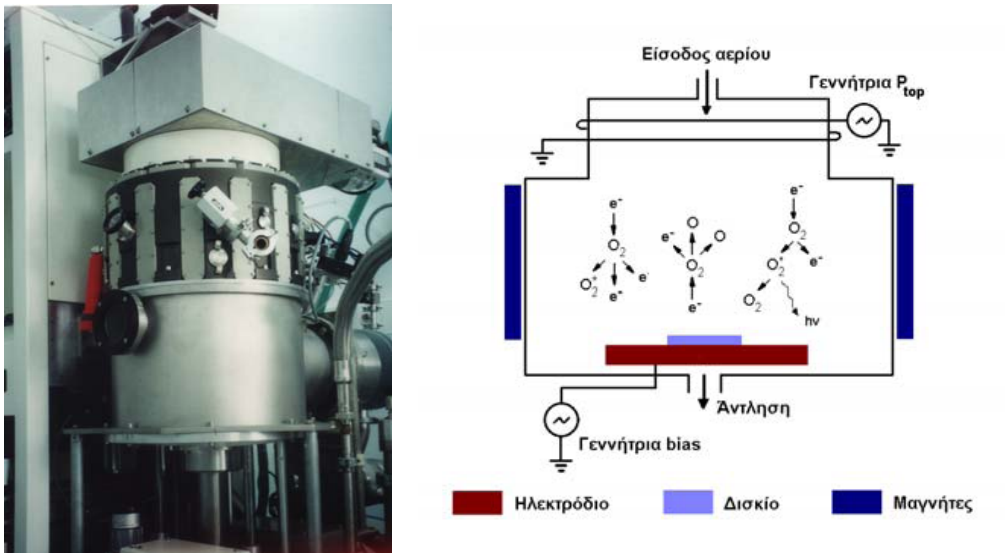
Σχήμα 5.2: Ο αντιδραστήρας πλάσματος του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής.

Ο κύριος θάλαμος είναι ανοδιωμένος και κατά την λειτουργία του αντιδραστήρα βρίσκεται υπό κενό που επιτυγχάνεται με τη βοήθεια δύο αντλιών, μια μηχανικής και μιας τούρμπο-μοριακής αντλίας. Η πίεση στον θάλαμο ρυθμίζεται συνήθως στα 10^{-6} mbar. Τέλος, ο κύριος θάλαμος είναι εξοπλισμένος και με ένα μαγνητικό, πολυπολικό σύστημα περιορισμού (πολλοί ραβδόμορφοι μαγνήτες σε διάταξη NS-SN), που αναγκάζει τα ηλεκτρόνια να επιστρέφουν στον κύριο όγκο του πλάσματος και να μην χάνονται στα τοιχώματα.

Το σύστημα ελέγχου ισχύος μπορεί να ρυθμίσει την ισχύ (ισχύς ραδιοσυχνότητας - RF) σε ένα εύρος από 0 μέχρι 2000 Watts. Η RF παροχή ισχύος είναι συζευγμένη με το πλάσμα μέσω μιας επιχαλκωμένης κεραίας (πηνίο) που ψύχεται με νερό και που περιβάλει την πηγή. Η κεραία αυτή είναι τύπου Helicon, έχει μια μόνο σπείρα και συνδέεται σε αυτόματο δίκτυο προσαρμογής ειδικής αντίστασης. Το εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο που προκύπτει από την κεραία έχει συχνότητα 13,56 MHz, η οποία προσφέρει

μεγαλύτερη απόδοση ισχύος σε σχέση με αντιδραστήρες που λειτουργούν σε χαμηλότερες συχνότητες.

Το σύστημα ρύθμισης δυναμικού μπορεί να ρυθμίζει θεωρητικά το δυναμικό του υποστρώματος (substrate bias) σε μια περιοχή από 0 μέχρι –200 Volts με τη βοήθεια μιας πηγής τάσης RF. Στην πράξη ωστόσο δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί πόλωση 0 Volts αφού το πλάσμα δημιουργεί από μόνο του ένα αρνητικό δυναμικό που ονομάζεται δυναμικό πλάσματος, και το οποίο είναι περίπου -20 Volts. Ως εκ τούτου η εξωτερικά ρυθμιζόμενη παροχή δυναμικού αυξάνει κατά απόλυτη τιμή την αρνητική τιμή της τάσης. Το σύστημα ελέγχου πίεσης ελέγχει τη θέση μιας βάνας που την κλείνει ή την ανοίγει, αυξάνοντας έτσι ή μειώνοντας αντίστοιχα την τιμή της πίεσης σε ένα εύρος από 5 mTorr – 100 mTorr. Το σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας μπορεί να ρυθμίσει τη θερμοκρασία του υποστρώματος στην περιοχή από –100 ως +150 ^{o}C. Η ψύξη πραγματοποιείται με τη βοήθεια υγρού αζώτου ενώ η θέρμανση με τη χρήση θερμαντικής αντίστασης.



Σχήμα 5.3: Ο κύριος θάλαμος του αντιδραστήρα με την πηγή πλάσματος και τη παροχή ισχύος. Δεξιά φαίνεται η σύζευξη ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου.

Πειραματική πορεία

Αρχικά γίνεται φόρτωση των δειγμάτων που πρόκειται να υποστούν κατεργασία στον προθάλαμο του αντιδραστήρα. Τα δείγματα που μπορεί να είναι είτε τμήματα είτε ολόκληρα δισκία διαμέτρου 3΄΄ τοποθετούνται πάνω σε

ειδική βάση από ανοδιωμένο αλουμίνιο ή σε δισκίο πυριτίου 4΄΄ όπου και ακινητοποιούνται με τη χρήση θερμικής κόλλας που εξασφαλίζει την ομαλή μεταφορά θερμότητας από το δισκίο προς το δείγμα. Στη συνέχεια, ο προθάλαμος αντλείται με τη βοήθεια μιας μηχανικής και μιας τουρμπομοριακής αντλίας και η πίεσή του κατεβαίνει μέχρι τα ≤ 10^{-4} mbar. Αφού αποκατασταθεί το κενό, το δισκίο μεταφέρεται από τον προθάλαμο στον κύριο θάλαμο, όπου παράγεται το πλάσμα. Ο βραχίονας που μεταφέρει το δισκίο από τον προθάλαμο στον κύριο θάλαμο, το τοποθετεί στην υποδοχή που υπάρχει στο κάτω μέρος του θαλάμου και κατόπιν αποσύρεται ενώ στη συνέχεια το δισκίο σφραγίζεται μηχανικά μέσα στον υποδοχέα υποστρώματος (substrate holder). Αυτό εξασφαλίζει τη μεταφορά θερμότητας από τον υποδοχέα του υποστρώματος στο δισκίο. Το υπόστρωμα ψύχεται με υγρό άζωτο ή θερμαίνεται με αντιστάσεις ανάλογα με την εφαρμογή.

Από τη στιγμή που το δισκίο έχει φορτωθεί στον κύριο θάλαμο το υπόστρωμα μετακινείται, μαζί με τη βάση του, σε μια υψηλότερη θέση. Η άνοδος του δισκίου γίνεται ώστε αυτό να είναι πιο κοντά στην πηγή. Κατόπιν το αέριο O_2 εισέρχεται στο θάλαμο και πραγματοποιείται η εγχάραξη στις επιθυμητές κάθε φορά συνθήκες.

5.3 Χαρακτηρισμός των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (SEM)

Υλικά

- Δισκίδια πυριτίου επιστρωμένα με υμένιο PMMA και επεξεργασμένα στο πλάσμα

Όργανα

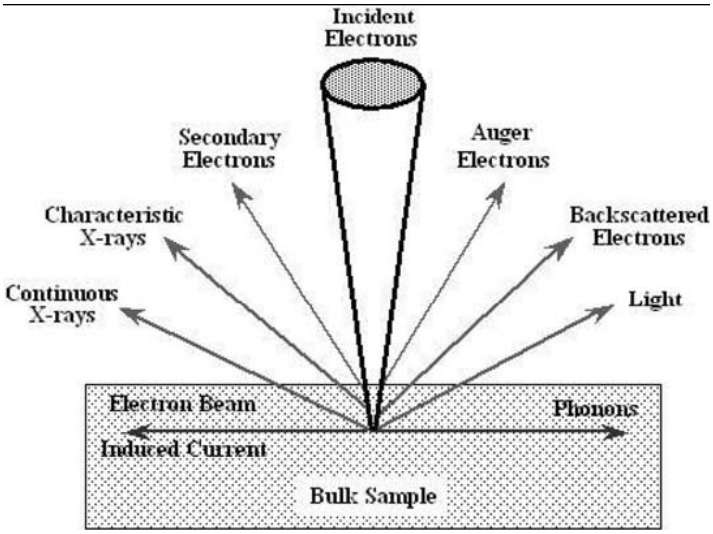
- Μικροσκόπιο Σάρωσης Ηλεκτρονίων JSM – 7401F (JEOL Europe)

Αρχή μεθόδου

Για την παρατήρηση και την λήψη εικόνων από επιφάνειες πολύ μεγάλης τραχύτητας χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM). Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης δεν μπορεί να δώσει πληροφορίες για το ύψος των δομών και επομένως για την ανάλυση της τραχύτητας μιας επιφάνειας όταν οι δομές έχουν ύψος > 100 nm.

Επιπλέον, το SEM είναι ταχύτερο και μπορεί να αποδώσει την τοπογραφία μεγαλύτερης περιοχής μιας επιφάνειας σε σχέση με την Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης. Η λειτουργία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, βασίζεται στην χρήση μιας δέσμης ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας που καθώς προσπίπτει στην περιοχή του δείγματος που πρόκειται να μελετηθεί αλληλεπιδρά με αυτό δημιουργώντας μια ποικιλία σημάτων, συμπεριλαμβανομένων ηλεκτρονίων, φωτονίων και άλλων.

Υπάρχουν τρεις τύποι ηλεκτρονίων που εκπέμπονται από την επιφάνεια ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων της δέσμης με την επιφάνεια του δείγματος: α) τα δευτερογενή ηλεκτρόνια με ενέργεια <50 eV, β) τα ηλεκτρόνια Auger που παράγονται από την αποδιέγερση των διεγειρόμενων ατόμων και γ) τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια ιδίας ενέργειας με αυτή των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων (Σχήμα 5.4).



Σχήμα 5.4: Σωματίδια που εκπέμπονται από μια επιφάνεια κατά την πρόσπτωση της δέσμης ηλεκτρονίων.

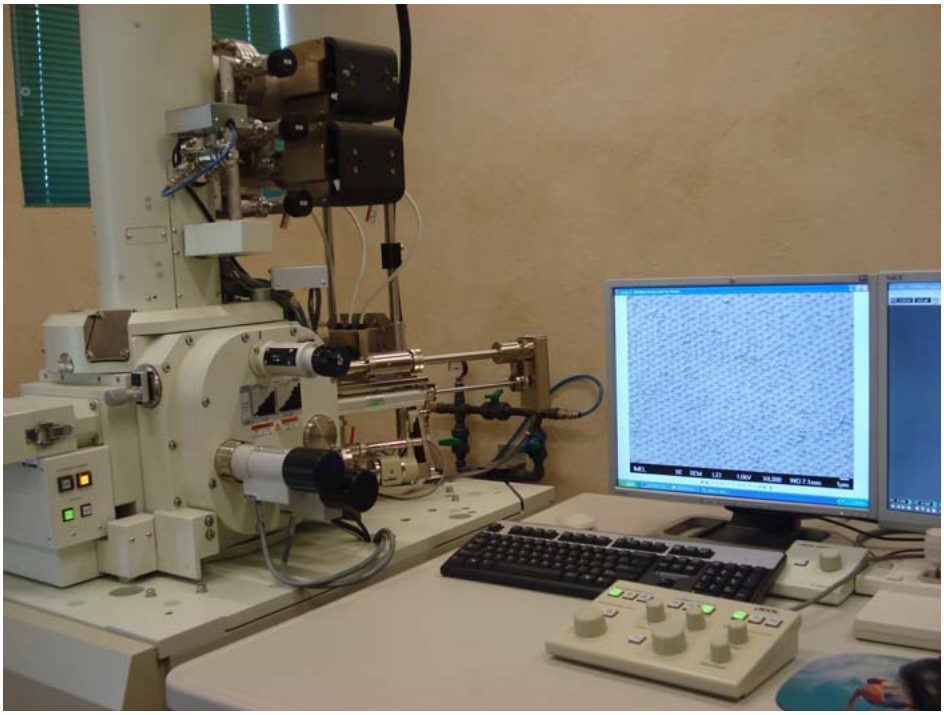
Η δέσμη των ηλεκτρονίων που προέρχεται από το δείγμα συλλέγεται και επεξεργάζεται με τη βοήθεια του προγράμματος που συνοδεύει το SEM οδηγώντας σε μια τρισδιάστατη εικόνα της εξωτερική επιφάνειας της δομής. Πριν τη μέτρηση τα δείγματα επιμεταλλώνονται με εναπόθεση ενός λεπτού

στρώματος πλατίνας ώστε να μη φορτίζεται η επιφάνεια από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν πάνω της.

Πειραματική πορεία

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο που είναι εγκατεστημένο στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής και είναι τύπου JSM – 7401F, του Οίκου JEOL, Europe (Σχήμα 5.5.) και συνοδεύεται από πηγή πεδίου ψυχρής καθόδου (field emission gun, FEG SEM). Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο μπορεί να μεγεθύνει μια επιφάνεια μέχρι και 1.000.000 φορές και σαρώνει με ανάλυση έως και 2,2 nm.

Η σάρωση της επιφάνειας μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χρησιμοποιώντας τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια (secondary electron image, SEI) ή τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (backscattered electron image, BEI). Για την αναπαραγωγή στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός των λειτουργιών SEI και BEI. Η τάση λειτουργίας του οργάνου SEM αυξήθηκε με βήματα των 10 V από τα 0,5 μέχρι τα 2,9 kV και με βήματα των 100 V από τα 2,9 μέχρι τα 30 kV, πού ήταν και η τελική τάση εργασίας, ενώ το ρεύμα της δέσμης αυξήθηκε αντίστοιχα από τα 10^{-13} μέχρι και τα 2×10^{-9} A.



Σχήμα 5.5: Φωτογραφία του μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων JSM-7401-F που βρίσκεται στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής.

5.4 Χαρακτηρισμός των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)

Υλικά

- Δισκίδια πυριτίου επιστρωμένα με υμένιο PMMA και επεξεργασμένα στο πλάσμα

Όργανα

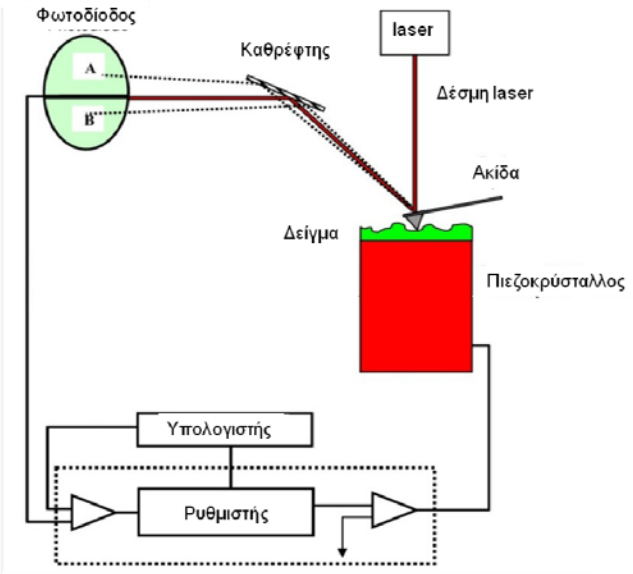
- Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης CP-II (Veeco)

Αρχή μεθόδου

Η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) είναι η ιδανική μέθοδος για την απεικόνιση της επιφανειακής νανο-δομής πολλών υλικών και τον προσδιορισμό της επιφανειακής τραχύτητας. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι είναι μη-καταστροφικη και έχει πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα στις τρεις διαστάσεις.
Στο Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης χρησιμοποιείται μια δοκός με μια ακίδα στην άκρη της, η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος και κάμπτεται

ως αποτέλεσμα των δυνάμεων συνάφειας που αναπτύσσονται μεταξύ της ακίδας και του δείγματος. Σο Σχήμα 5.6 παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης. Καθώς η ράβδος κάμπτεται, μια δέσμη λέιζερ που ανακλάται σε μια φωτοδίοδο στην θέση Α μετακινείται στην θέση Β. Προσδιορίζοντας τη διαφορά (Α – Β), μπορούν να υπολογιστούν οι μεταβολές στην κάμψη της ράβδου και συνεπώς, σύμφωνα με το νόμο του Hooke για μικρές μετατοπίσεις, η δύναμη αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακίδας και του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να υπολογιστούν μικρής εμβέλειας διατομικές δυνάμεις και δυνάμεις τριβής καθώς και μεγάλης εμβέλειας ηλεκτροστατικές ή μαγνητοστατικές δυνάμεις. Το δείγμα μπορεί να είναι είτε αγώγιμο ή μονωτικό. Η κίνηση της ακίδας ελέγχεται από μια συσκευή εξαιρετικής ακρίβειας κατασκευασμένη από πιεζοηλεκτρικά κεραμικά με εφαρμογή τάσεων σε ηλεκτρόδια στις x, y και z διαστάσεις (ο z άξονας είναι κάθετος στο δείγμα). Ο πιεζοηλεκτρικός σαρωτής μπορεί να έχει διακριτική ικανότητα πικομέτρου.

Ανάλογα με τον τρόπο επαφής ακίδας-δείγματος, η μικροσκοπία ατομικής δύναμης διακρίνεται στη μέθοδο με συνεχή επαφή (Contact Mode), η οποία χρησιμοποιείται σε σκληρά και ανθεκτικά δείγματα και στη μέθοδο με περιοδική επαφή ταλάντωσης (Tapping Mode), η οποία χρησιμοποιείται κυρίως σε μαλακά ή/και εύθραυστα δείγματα (πολυμερή, πρωτεΐνες κ.λ.π.).



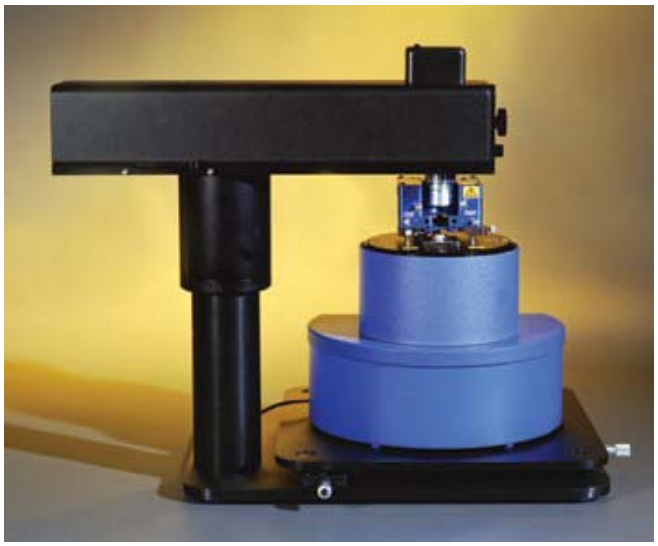
Σχήμα 5.6: Η αρχή λειτουργίας ενός Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης.

Πειραματική πορεία

Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της ταλαντούμενης ακίδας και η διαδικασία λήψης της τοπογραφίας είναι η εξής:

- Η μικροδοκός ταλαντώνεται αρχικά ελεύθερα και καθώς η ακίδα πλησιάζει στο κατώτερο σημείο της ταλάντωσης χτυπάει ελαφρά (Tapping) το δείγμα. Αυτό το πλάτος ταλάντωσης ορίζεται ως αρχικό σημείο (set point) και το όργανο προσπαθεί να το διατηρεί σταθερό καθώς σαρώνει την επιφάνεια . Η συχνότητα ταλάντωσης διατηρείται σταθερή και για τις ακίδες τύπου RTESPA που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των εικόνων στην παρούσα εργασία (Veeco) ήταν ~300 kHz.
- Αλλαγή του πλάτους ταλάντωσης της μικροδοκού, λόγω αλλαγής στην τοπογραφία της επιφάνειας, ανιχνεύεται μέσω της μετακίνησης της δέσμης λέιζερ που ανακλάται από τη μικροδοκό στη φωτοδίοδο.
- Ο πιεζοκρύσταλλος ”αντιλαμβάνεται” τη μεταβολή του πλάτους ταλάντωσης της δέσμης του λέιζερ στη φωτοδίοδο (μέσω του κυκλώματος ανάδρασης) και μετακινείται ανάλογα κατά τον άξονα z ώστε να επαναφέρει το πλάτος ταλάντωσης της δοκού στην τιμή που έχει καθοριστεί ως σημείο ελέγχου.

Οι ακίδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από πυρίτιο με επικάλυψη αλουμινίου. Η δοκός είχε πάχος ~ 4 μm, μήκος ~ 125 μm, πλάτος ~ 30 μm, ενώ οι διαστάσεις της ακίδας ήταν: ύψος ~ 10 μm, ακτίνα ~ 5 nm,. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με σταθερά δύναμης 50 Nm^{-1} και συχνότητα συντονισμού ~ 290 kHz. Με βάση τις λαμβανόμενες εικόνες, το λογισμικό που συνοδεύει το μικροσκόπιο έχει την δυνατότητα να υπολογίσει μεγέθη που σχετίζονται με την τοπογραφία της σαρωμένης επιφάνειας, όπως το rms (η ρίζα της μέσης τετραγωνικής τιμής των υψών της επιφάνειας), το μέσο πάχος των κόκκων κ.α.. Για την μέτρηση της τραχύτητας στην εργασία αυτή, κάθε επιφάνεια σαρώθηκε σε διαστάσεις 2×2 μm ενώ το ύψος των δομών της κάθε επιφάνειας υπολογίστηκε σε ένα πλέγμα από 512×512 σημεία.



Σχήμα 5.7: Εικόνα της συσκευής AFM CP-II της εταιρείας Veeco του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής

5.5 Υπολογισμός της υδροφιλικότητας των νανοδομημένων με πλάσμα επιφανειών

Υλικά

- Δισκίδια πυριτίου επιστρωμένα με υμένιο PMMA και επεξεργασμένα στο πλάσμα

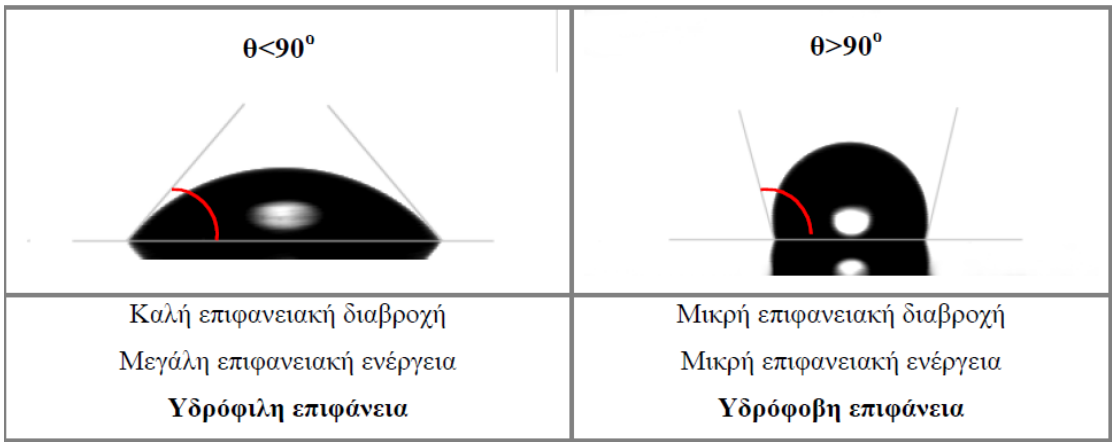
Όργανα

- Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής GBX Digidrop Contact Angle Measurement System

Αρχή μεθόδου

Η γωνία επαφής θ (CA) αποτελεί μία τυπική μέτρηση της υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας μιας στερεής επιφάνειας. Οι μετρήσεις της γωνίας επαφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των επιφανειακών τάσεων στερεών. Ο βαθμός υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας ενός στερεού εκφράζεται από τη γωνία μεταξύ της επιφάνειας του στερεού και της σταγόνας. Επιφάνειες με τιμές γωνίας επαφής $<90^o$ χαρακτηρίζονται ως υδρόφιλες ενώ επιφάνειες με τιμές γωνίας επαφής $>90^o$ χαρακτηρίζονται ως υδρόφοβες. Αύξηση της τιμής της γωνίας επαφής σημαίνει αύξηση της υδροφοβικότητας της επιφάνειας του στερεού. Χαρακτηριστικές εικόνες μέτρησης γωνίας επαφής μιας υδρόφοβης και μιας υδρόφιλης επιφάνειας

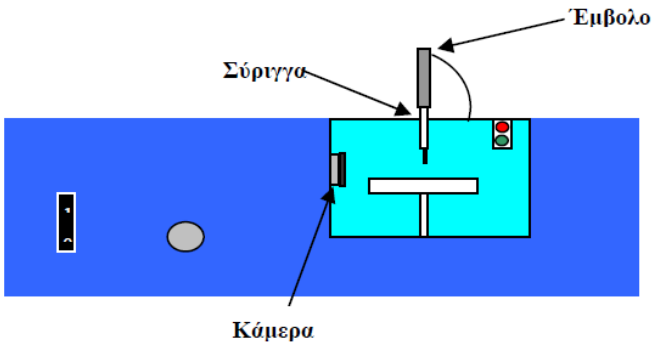
παρουσιάζονται στο σχήμα 5.8. Είναι γνωστό ότι η κατεργασία μιας επιφάνειας με πλάσμα O_2 αυξάνει την υδροφιλικότητά της γι' αυτό και η μέτρηση των γωνιών επαφής είναι ένας γρήγορος τρόπος για να διαπιστωθεί εάν η εγχάραξη έχει γίνει επιτυχώς.



Σχήμα 5.8: Απεικόνιση μέτρησης γωνίας επαφής σε μια υδρόφιλη και μια υδρόφοβη επιφάνεια

Πειραματική πορεία

Το σύστημα αποτελείται από μια βάση πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα και μια μικρομετρική σύριγγα που τοποθετείται κάθετα ως προς το δείγμα και η οποία πληρώνεται με απεσταγμένο νερό ή οποιοδήποτε άλλο υγρό. Η επιφάνεια του δείγματος και η άκρη της σύριγγας είναι τοποθετημένες έτσι ώστε να βρίσκονται στο οπτικό πεδίο μιας κάμερας –προκειμένου να λαμβάνονται φωτογραφίες της σταγόνας και του σημείου επαφής της με την επιφάνεια. Το σύστημα περιέχει εκτός από την CCD κάμερα για την καταγραφή των δεδομένων και ένα λογισμικό για την ανάλυση της εικόνας. Το λογισμικό αυτό καθορίζει το σχήμα και την περίμετρο της σταγόνας και εξάγει τις γωνίες επαφής (δεξιά και αριστερή γωνία).



Σχήμα 5.9: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης GBX Digidrop Contact Angle Measurement System

5.6 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν οι ακόλουθες:

- **Καρκινική κυτταρική σειρά HT- 1080**

Η κυτταρική σειρά HT-1080 προέρχεται από ανθρώπινο ινοσάρκωμα και χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοχημικές μελέτες. Η σειρά προέρχεται από κύτταρα που απομονώθηκαν από ιστό που παραλήφθηκε από άνδρα 35 χρονών, ο οποίος έπασχε από ινοσάρκωμα και δεν είχε υποβληθεί σε κάποια θεραπεία, αποκλείοντας έτσι πιθανές μεταλλάξεις στο δείγμα. Τα κύτταρα της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται προσκολλημένα στον πυθμένα του καλλιεργητικού τρυβλίου.

- **Φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες**

Οι φυσιολογικοί ινοβλάστες προέρχονται από ανθρώπινο ιστό και απομονώθηκαν από την ομάδα του Δρ. Δ. Κλέτσα από το Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε ‘’Δημόκριτος’’ από όπου και παρελήφθησαν.

5.7 Κυτταροκαλλιέργειες

Κυτταρική καλλιέργεια είναι η διαδικασία με την οποία ευκαρυωτικά ή προκαρυωτικά κύτταρα αναπτύσσονται κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιούνται κατάλληλα θρεπτικά υλικά, τα οποία παρέχουν στα κύτταρα όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως γλυκόζη, αμινοξέα, βιταμίνες και νουκλεοτίδια, ενώ ταυτόχρονα περιέχουν και άλατα, τα οποία εξασφαλίζουν τη διατήρηση του pH και της ωσμωτικής πίεσης. Τέλος, στα θρεπτικά υλικά εμπεριέχεται η χρωστική ερυθρό της φαινόλης (phenol red) ως δείκτης pH ώστε να γίνεται αντιληπτή η μεταβολή του pH από ουδέτερο σε όξινο, μέσω μεταβολής του χρώματος από χρυσοκόκκινο σε κίτρινο.

Η διαδικασία διατήρησης και καλλιέργειας των κυτταρικών σειρών περιλαμβάνει απόψυξη των κυττάρων, ανακαλλιέργεια τους και ψύξη τους. Όλες οι εργασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar flow), ο οποίος είναι εξοπλισμένος με λυχνία υπεριώδους φωτός (UV) και φίλτρα αέρος ώστε να εξασφαλίζονται ασηπτικές συνθήκες. Η επώαση των κυττάρων για πολλαπλασιασμό και ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται σε ειδικούς κλιβάνους στους οποίους η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37°C σε συνθήκες κορεσμού υγρασίας και παρουσία 5% CO_2.

Υλικά

- Εμβρυικός ορός βοός, FBS, (Biochrom AG)
- Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 100 Units/ml και 10mg/ml, αντίστοιχα (Biochrom AG)
- Διάλυμα L- γλουταμίνης 200mM (Biochrom AG)
- Θρεπτικό υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη Dulbeco's Mem, DMEM, (Biochrom AG)
- Διμεθυλο-σουλφοξείδιο, DMSO (Sigma Aldrich)
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό: D-MEM στο οποίο έχει προστεθεί 10% FBS (v/v), 1% (v/v) διαλύματος L-γλουταμίνης, 1% (v/v) διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης
- Διάλυμα ψύξης: 10% (v/v) DMSO σε FBS

- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05%/0,02% σε PBS χωρίς Ca^{2+},Mg^{2+}, (Biochrom AG)
- Καρκινικοί ινοβλάστες HT-1080, προερχόμενοι από ανθρώπινο ινοσάρκωμα (Sigma Aldrich)
- Φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες (Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε ''Δημόκριτος'')

Όργανα

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert 25 Zeiss)
- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO_2 (Format Scientific)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής, (ELMED)
- Δοχείο υγρού αζώτου (Forma)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Christ)
- Φιάλες κυτταροκαλιεργειών 75 cm^3 (Greiner Bio- one)
- Τριβλία κυτταροκαλιεργειών 60*15 mm^3 (Greiner Bio- one)
- Σιφώνια ακριβείας (Greiner Bio-one)
- Ειδικά κρυοάντοχα μικροσωληνάρια ψύξης κυττάρων των 2 ml (Greiner Bio- one)
- Πιπέττες και ακροφύσια (COPAN)

5.7.1 Απόψυξη κυτταρικής σειράς

Κατά τη διαδικασία αυτή, κύτταρα τα οποία έχουν φυλαχθεί σε υγρό άζωτο, ακόμα και για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, επαναφέρονται σε συνθήκες καλλιέργειας. Η διαδικασία γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα μετά την απόψυξη των κυττάρων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το χρονικό διάστημα έκθεσης των κυττάρων στο DMSO, το οποίο είναι τοξικό. Αναλυτικά, τα κύτταρα μετά την έξοδο τους από το υγρό άζωτο (-196°C), όπου βρίσκονται μέσα σε ειδικά κρυάντοχα μικροσωληνάρια, μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμαινόμενο στους 37^oC έως ότου ξεπαγώσουν. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάρια φυγοκέντρησης που περιέχουν εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό προθερμασμένο στους 37°C και φυγοκέντρηση για 10 min στα 500 g προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό και το εναιώρημα των κυττάρων

μεταφέρεται σε τριβλία καλλιέργειας τα οποία τοποθετούνται στον ειδικό επωαστικό κλίβανο όπου και καλλιεργούνται για όσο χρόνο απαιτείται για την διεξαγωγή του πειράματος.

5.7.2 Ανακαλλιέργεια

Τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού D-MEM σε κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% CO_2 και κορεσμένη με υγρασία ατμόσφαιρα. Τα κύτταρα ελέγχονται καθημερινά με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και προσδιορίζεται το ποσοστό κάλυψης του πυθμένα του τριβλίου στο οποίο καλλιεργούνται. Δεδομένου ότι αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τροποποιούνται οι μεταβολικές τους διαδικασίες σε συνθήκες έλλειψης χώρου, όταν καλυφθεί το 80-90% του πυθμένα του τριβλίου πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Η ανακαλλιέργεια περιλαμβάνει αποκόλληση των κυττάρων από το τριβλίο με μηχανικό τρόπο ή με χρήση ενζύμων όπως η τρυψίνη, αραίωση και κατανομή τους σε νέα τριβλία, και εκ νέου καλλιέργεια. Αναλυτικά, τα τριβλία μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα θρυψίνης/EDTA. Κατά την διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν ίχνη ορού τα οποία περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης. Ακολούθως, προστίθενται 2 ml διαλύματος θρυψίνης/EDTA ανά τριβλίο και τοποθετούνται πάλι στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 3-5 λεπτά ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του τριβλίου. Η αποκόλληση των κυττάρων επιβεβαιώνεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Εν συνεχεία, με την βοήθεια πιπέττας γίνεται επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση και διοχέτευση με πίεση του εναιωρήματος στο τριβλίο, έτσι ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυττάρων που βρίσκονται με τη μορφή συσσωματωμάτων. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων κατανέμεται σε 2-3 τριβλία και προστίθενται στο καθένα από αυτά 10 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού. Τα τριβλία τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο και ακολουθεί καλλιέργεια των κυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

5.7.3. Ψύξη κυττάρων

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή μέσω της ψύξης τους σε υγρό άζωτο. Για την εξασφάλιση της βιωσιμότητας και της ακεραιότητας των κυττάρων είναι απαραίτητο πριν από την ψύξη τους να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση, για το λόγο αυτό -κατά γενικό κανόνα- η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 80-90% της επιφάνειας του τριβλίου. Επιπλέον, η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται βαθμιαία μέχρι η θερμοκρασία τους να φτάσει ένα κρίσιμο σημείο (-20^{o}C), προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού από τα κύτταρα. Για τον ίδιο λόγο τα κύτταρα καταψύχονται παρουσία DMSO (10% σε εμβρυϊκό ορό βοός). Αναλυτικά, κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης αποκολλώνται από το τριβλίο στο οποίο καλλιεργούνται όπως περιγράφεται στο Εδάφιο 5.7.2 για την ανακαλλιέργεια κυττάρων. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούνται για 10 min στα 1500 g. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος ψύξης και μεταφορά σε ειδικά κρυοάντοχα μικροσωληνάρια. Τα μικροσωληνάρια τοποθετούνται διαδοχικά στους 4°C για μία ώρα, στους -20°C για 4 ώρες, στους -70°C για 12 ώρες και τέλος μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

5.8 Μέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιματοκυτταρόμετρο

Υλικά

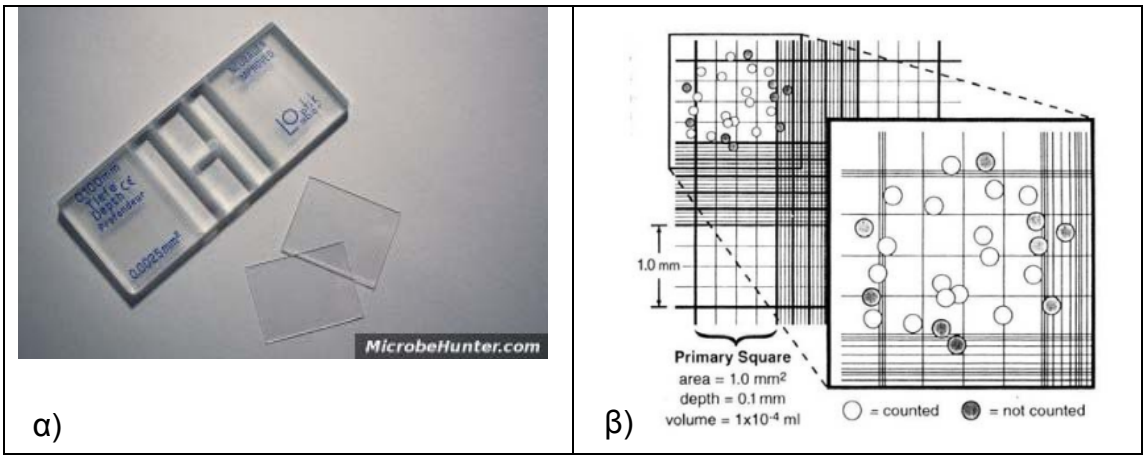
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό
- Εναιώρημα κυττάρων

Όργανα

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert 25 Zeiss)
- Αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer)
- Σιφώνια ακριβείας (Orange Scientific)
- Πιπέττες και ακροφύσια (Gilson)

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο είναι μια άμεση και εύκολη μέθοδος προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων σε εναιώρημα γνωστού όγκου. Το αιμοτοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μία από τις οποίες φέρει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm (Σχήμα 5.10).



α) β)

Σχήμα 5.10: α) φωτογραφία αιματοκυτταρόμετρου Neubauer και καλυπτρίδων, β) Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας μέτρησης κυττάρων.

Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα από τις προεξοχές στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα με αποτέλεσμα όταν στο διάκενο αυτό τοποθετηθεί το κυτταρικό εναιώρημα, λόγω τριχοειδών φαινομένων, να εξαπλώνεται σε όλη την τετραγωνισμένη επιφάνεια.

Μετρώνται τα κύτταρα σε κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα που βρίσκονται στις γωνίες του αιματοκυτταρομέτρου, τα οποία χωρίζονται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα ώστε να διευκολύνεται η καταμέτρηση των κυττάρων. Το κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει επιφάνεια 1 mm^2, έτσι ώστε όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα συγκεκριμένου βάρους ο όγκος του υγρού σε κάθε τετράγωνο να είναι 10^{-4}ml. Γνωρίζοντας τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος και μετρώντας τα κύτταρα ανά τετράγωνο μπορεί να προσδιορισθεί η συγκέντρωσή τους.

Πειραματική πορεία

Τοποθετείται καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο και με πιπέττα Pasteur προστίθενται ~10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα, έτσι ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια του αιματοκυτταρομέτρου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο (Σχήμα 5.10) και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων ανά ml αρχικού εναιωρήματος από τη σχέση:

Μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα x 10^4.

5.9 Καλλιέργεια και έλεγχος προσκόλλησης υγιών και καρκινικών ινοβλαστών σε επιφάνειες PMMA

Η καλλιέργεια των κυττάρων πάνω στις νανοδομημένες επιφάνειες περιλαμβάνει αποστείρωση των επιφανειών, υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων στις αρχικές καλλιέργειες, σπορά και καλλιέργεια των κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες. Η προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες ελέγχεται με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

5.9.1 Αποστείρωση σχηματοποιημένων επιφανειών

Όργανα

- Λάμπα UV
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής, Laminar flow, (ELMED)

Πειραματική πορεία

Η αποστείρωση των σχηματοποιημένων επιφανειών γίνεται με έκθεση τους σε λάμπα υπεριώδους (η οποία βρίσκεται μέσα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής) για 20 λεπτά. Έπειτα, οι επιφάνειες μεταφέρονται σε στείρα τριβλία προκειμένου να ακολουθήσει σπορά των κυττάρων.

5.9.2 Έλεγχος της προσκόλλησης των κυττάρων σε επιφάνειες PMMA

Υλικά

- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05%/0,02 % σε PBS χωρίς Ca^{2+}, Mg^{2+} (Biochrom AG)
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό D-MEM υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη το οποίο περιέχει 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) διαλύματος L-γλουταμίνη, 1% (v/v) διαλύματος πενικιλίνης / στρεπτομυκίνης
- Διάλυμα Παραφορμαλδεύδης 4% β/ο σε PBS, PFA (BioChemica)
- 4,6-Διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη, DAPI (Sigma Aldrich)
- Καρκινικοί ινοβλάστες HT-1080, προερχόμενοι από ανθρώπινο ινοσάρκωμα (Sigma Aldrich)
- Φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες (Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε ‘’Δημόκριτος’’)

Όργανα

- Μικροσκόπιο φθορισμού (AxioScop. 2 Plus, Carl Zeiss)
- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO_2 (Format Scientific)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) (ELMED)
- Δοχείο υγρού αζώτου (Forma)
- Φιάλες κυτταροκαλιεργειών 75 cm^3 (Orange Scientific)
- Σιφώνια ακριβείας (Greiner Bio- one)
- Πιπέττες και ακροφύσια (COPAN)

Πειραματική πορεία

Η μελέτη της προσκόλλησης κυττάρων πάνω στις νανοδομημένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA πραγματοποιήθηκε για καρκινικούς ινοβλάστες της σειράς HT-1080 και για φυσιολογικούς ινοβλάστες. Η καταμέτρηση των προσκολλημένων στις επιφάνειες κυττάρων έγινε με χρώση του πυρήνα με DAPI και παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αρχικά αποκολλήθηκαν από τον πυθμένα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας με χρήση διαλύματος θρυψίνης/ EDTA, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο Εδάφιο 5.7.2 και ακολούθησε σπορά συγκεκριμένης πυκνότητας κυττάρων στις στείρες υπό εξέταση επιφάνειες καθώς και σε δείγματα αναφοράς τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε τριβλία καλλιέργειας. Ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες PMMA

που δεν είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα καθώς και τριβλία καλλιέργειας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο (37 ^{o}C, 5% κ.ό. CO_2) για χρονικό διάστημα από 1 έως 3 ημέρες. Η καλή κατάσταση των κυττάρων επιβεβαιωνόταν καθημερινά με παρατήρηση τους στο οπτικό μικροσκόπιο, ενώ προκειμένου να εξασφαλισθεί η βιωσιμότητα τους ανανεώνονταν το θρεπτικό υλικό κάθε 2 ημέρες. Μετά το πέρας της καλλιέργειας οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 50 mM, pH 7,4, με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Στη συνέχεια έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% (β/ο), για 20 λεπτά και έκπλυση των επιφανειών με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων τρεις φορές επί 5 λεπτά. Ακολούθησε χρώση του πυρήνα με διάλυμα DAPI σε συγκέντρωση 100ng/ml, έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Η καταμέτρηση των πυρήνων έγινε μέσω του προγράμματος επεξεργασίας εικόνας Image Pro Plus 7.0. Για κάθε επιφάνεια ελήφθησαν φωτογραφίες από 25 διαφορετικά οπτικά πεδία.

5.10 Αξιολόγηση της μορφολογίας των κυττάρων πάνω στις νανοδομημένες επιφάνειες με ανοσοκυτταρολογία

Υλικά

- Φαλλοϊδίνη επισημασμένη με φθορίζουσα Atto 488 (Sigma Aldrich)
- Διάλυμα Παραφορμαλδεύδης 4%, PFA (BioChemica)
- 4,6-Διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη, DAPI (Sigma Aldrich)
- p- φαινυλενοδιαμίνη
- Οραλβουμίνη βοός, pH 5, 96-100% πρωτεΐνη (Acros Organics)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της βινκουλίνης(Millipore)
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινων ποντικού επισημασμένο με φθορίζουσα CF-555 (Biotium)

Όργανα

- Μικροσκόπιο φθορισμού (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss)
- Οπτικό μικροσκόπιο (AxioImager.A1m, Carl Zeiss)
- Πιπέτες Pasteur (COPAN)

Αρχή μεθόδου

Η οπτική παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων πάνω στις νανοδομημένες και μη επιφάνειες πραγματοποιήθηκε με χρήση φθοριζόντων ή φθορισμοεπισημασμένων ενώσεων που δεσμεύονται ειδικά σε συγκεκριμένα συστατικά του κυττάρου ή με χρήση ειδικών αντισωμάτων, τα οποία επίσης ανιχνευτήκαν μετά από αντίδραση τους με φθοροεπισημασμένα δεύτερα αντισώματα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε φαλλοϊδίνη επισημασμένη με την φθορίζουσα ουσία Atto 480, η οποία δεσμεύεται στην F-ακτίνη του κυτταροσκελετού, η φθορίζουσα ουσία 4,6-διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη (DAPI), η οποία δεσμεύεται στην διπλή έλικα του DNA και ιδιαίτερα σε περιοχές που είναι πλούσιες σε ζεύγη αδενίνης – θυμίνης, με αποτέλεσμα την χρώση του πυρήνα και μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της βινκουλίνης το οποίο ανιχνεύτηκε με δεύτερο αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού επισημασμένο με φθορίζουσα CF-555.

Πειραματική πορεία

Επιφάνειες οι οποίες είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα O_2 καθώς και επιφάνειες ελέγχου, επωάστηκαν με κύτταρα επί 1- 3 ημέρες. Ακολούθως οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με PBS με σκοπό την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια τα προσκολλημένα στις επιφάνειες κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος παραφορμαλδεϋδης (PFA) 4% β/ο σε PBS για 20 min. Ακολούθησε έκπλυση των επιφανειών με PBS και επώαση τους με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας (5% β/ο οραλβουμίνη βοός σε PBS 50 mM, pH 7,4) το οποίο περιείχε 0.1% ο/ο Triton X-100, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το Triton X-100 καθιστά τις κυτταρικές μεμβράνες διαπερατές σε μεγαλομόρια. Στην συνέχεια τα δείγματα εμβαπτίστηκαν 3 φορές σε PBS ώστε να απομακρυνθούν τα μη μονιμοποιημένα κύτταρα. Στην περίπτωση ελέγχου της μορφολογίας των κυττάρων οι επιφάνειες επωάστηκαν με 500 μl διαλύματος φαλοϊδίνης επισημασμένης με την φθορίζουσα Atto 488 συγκέντρωσης 100 nM σε PBS, επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον έλεγχο της δημιουργίας εστιακών επαφών των κυττάρων με τις επιφάνειες τα κύτταρα επωάστηκαν με διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού κατά της βινκουλίνης συγκέντρωσης 10 μg/ml σε διάλυμα αποκλεισμού των

ελεύθερων θέσεων για 1,5 ώρα, ακολούθησαν εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με μίγμα φαλοιδίνης επισημασμένης με Atto 488 σε συγκέντρωση 100nM και αντισώματος κατά των γ-σφαιρινων ποντικού επισημασμένο με φθορίζουσα CF-555 σε συγκέντρωση 10 μg/ml για 1,5 ώρα. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS και χρώση του πυρήνα των κυττάρων μέσω επώασης με 500 μL διαλύματος DAPI συγκέντρωσης 100 ng/mL σε PBS για 5 λεπτά. Τέλος, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με PBS 3 φορές επί 5 λεπτά κάθε φορά, τοποθετήθηκε μία σταγόνα p- φαινυλενοδιαμίνης για προστασία των φθοριζόντων ουσιών από αποχρωματισμό (bleaching), καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Χρησιμοποιώντας ειδικά ζεύγη φίλτρων διέγερσης/εκπομπής για τις φθορίζουσες ουσίες ελήφθησαν φωτογραφίες για την ίδια περιοχή κάθε επιφάνειας οι οποίες συνδυάστηκαν μέσω του λογισμικού ImageProPlus.

5.11 Μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων στις νανοδομημένες από το πλάσμα επιφάνειες

Υλικά

- Διάλυμα Παραφορμαλδεύδης 4%, PFA (BioChemica)
- 4,6-Διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη, DAPI (Sigma Aldrich)
- p- φαινυλενοδιαμίνη
- σταυροσπορίνη απομονωμένη από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus* (Sigma Aldrich)

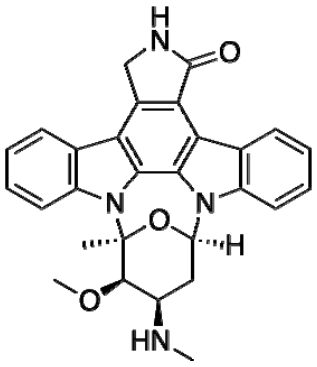
Όργανα

- Μικροσκόπιο φθορισμού (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss)
- Πιπέτες Pasteur (COPAN)

Αρχή μεθόδου

Η σταυροσπορίνη είναι μία οργανική ένωση (Σχήμα 5.11), που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1977 από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus* και λειτουργεί ως αναστολέας των πρωτεϊνικών κινασών, αποτρέποντας τη δέσμευση μορίων ATP σε αυτές [91-92]. Δρα σαν ανταγωνιστής του ATP, καθώς προσδένεται στις πρωτεϊνικές κινάσες στις ίδιες θέσεις με υψηλή συγγένεια,

αλλά χαμηλή εξειδίκευση. Λόγω αυτής της ικανότητας να δρα σαν αναστολέας των κινασών, η σταυροσπορίνη χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα [93]. Η αξιολόγηση της απόπτωσης γίνεται μέσω παρατήρησης των αποπτωτικών σωμάτων του πυρήνα.



Σχήμα 5.11: Χημική δομή της σταυροσπορίνης.

Πειραματική πορεία

Η μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων πάνω στις νανοδομημένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA πραγματοποιήθηκε για καρκινικούς ινοβλάστες της σειράς HT-1080 και για φυσιολογικούς ινοβλάστες. Ο υπολογισμός των αποπτωτικών πυρήνων έγινε με χρώση του πυρήνα με DAPI και παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού. Αναλυτικά, τα κύτταρα αρχικά καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες για 3 ημέρες, όπως περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.9.2 και στη συνέχεια στο ένα από τα δύο ίδια δείγματα προστέθηκε σταυροσπορίνη σε συγκέντρωση 1μM. Δοκιμάστηκαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης και διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος ήταν 12 ώρες. Μετά το πέρας της καλλιέργειας οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 50 mM, pH 7,4, με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Στη συνέχεια έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% (β/ο), για 20 λεπτά και έκπλυση των επιφανειών με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων τρεις φορές επί 5 λεπτά. Ακολούθησε χρώση του πυρήνα με διάλυμα DAPI σε συγκέντρωση 100 ng/ml, έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας κατασκευάστηκαν μη κατεργασμένες επιφάνειες υμενίου PMMA, επιστρωμένες σε δισκία πυριτίου, καθώς και επιφάνειες νανοδομημένες με την επίδραση διαφορετικών συνθηκών πλάσματος O_2, με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της νανοδόμησης στην συμπεριφορά φυσιολογικών ινοβλαστών και ινοβλαστών προερχόμενων από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT-1080). Για το λόγο αυτό η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δύο επιμέρους κατευθύνσεις.

Η πρώτη κατεύθυνση αφορούσε τη μελέτη των επιφανειών ως προς την υδροφιλικότητα και τη μορφολογία των νανοδομών. Οι παράγοντες που εξετάσθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

- Η τοπογραφία των κατεργασμένων με πλάσμα O_2 επιφανειών είτε μέσω οπτικοποίησης αυτών με παρατήρηση στο SEM, είτε μέσω υπολογισμού χαρακτηριστικών μεγεθών με παρατήρηση στο AFM
- Η υδροφιλικότητα με μέτρηση των γωνιών επαφής των μη κατεργασμένων καθώς και των κατεργασμένων με πλάσμα O_2 επιφανειών PMMA

Η δεύτερη κατεύθυνση αφορούσε τη μελέτη της συμπεριφοράς των φυσιολογικών ινοβλαστών και της καρκινικής σειράς HT-1080 σε επιφάνειες ακατέργαστου υμενίου PMMA και στις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες. Αναλυτικά μελετήθηκαν:

- Η προσκόλληση και η ανάπτυξη των καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων στις διαφορετικές επιφάνειες.
- Η επίδραση της νανοτοπογραφίας στη μορφολογία του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα.
- Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις εν λόγω επιφάνειες.
- Η ικανότητα απομόνωσης καρκινικών από μίγμα υγιών και καρκινικών κυττάρων με βάση τον διαφορετικό βαθμό προσκόλλησης τους στις νανοδομημένες επιφάνειες.
- Ο σχηματισμός εστιακών επαφών των κυττάρων με τις επιφάνειες μέσω ανίχνευσης της συσσωρευμένης βινκουλίνης.

- Η επίδραση του βαθμού της νανοδόμησης των υπό εξέταση επιφανειών στην εισαγωγή των κυττάρων στην διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

6.1 Τροποποίηση επιφανειών με πλάσμα οξυγόνου

Δισκία πυριτίου διαμέτρου 3΄΄ επιστρώθηκαν με διάλυμα PMMA 25% κ.β. σε PGMEA με τη μέθοδο που αναλύθηκε στο Εδάφιο 5.1. Έπειτα, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με πλάσμα O_2. Διατηρώντας σταθερά την πίεση στα 0,75 Pa, την ισχύ στα 1800 Watt και τη ροή οξυγόνου στα 100 sccm, έγινε έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας του ηλεκτροδίου, του δυναμικού αυτοπόλωσης και του χρόνου εγχάραξης στη δημιουργία νανοϋφής στις επιφάνειες. Η δημιουργία τραχύτητας στις επιφάνειες οφείλεται στην απόθεση ιόντων αλουμινίου σε αυτές, τα οποία προέρχονται από το θόλο του αντιδραστήρα. Τα ιόντα αυτά λειτουργούν σαν μάσκα κατά την εγχάραξη, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται στις επιφάνειες νανοκολώνες με βελονοειδείς απολήξεις, το ύψος και το πάχος των οποίων μεταβάλλεται με μεταβολή των εξεταζόμενων παραμέτρων. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάστηκαν επιφάνειες οι οποίες διέφεραν ως προς το ύψος, την οργάνωση και την περιοδικότητα των νανοδομών με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση τους στην προσκόλληση, τη βιωσιμότητα και την ανάπτυξη φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ινοσάρκωμα. Στον πίνακα 6.1 παρατίθενται οι παράμετροι που μελετήθηκαν.

Πίνακας 6.1: Παράμετροι πλάσματος που εξετάζονται

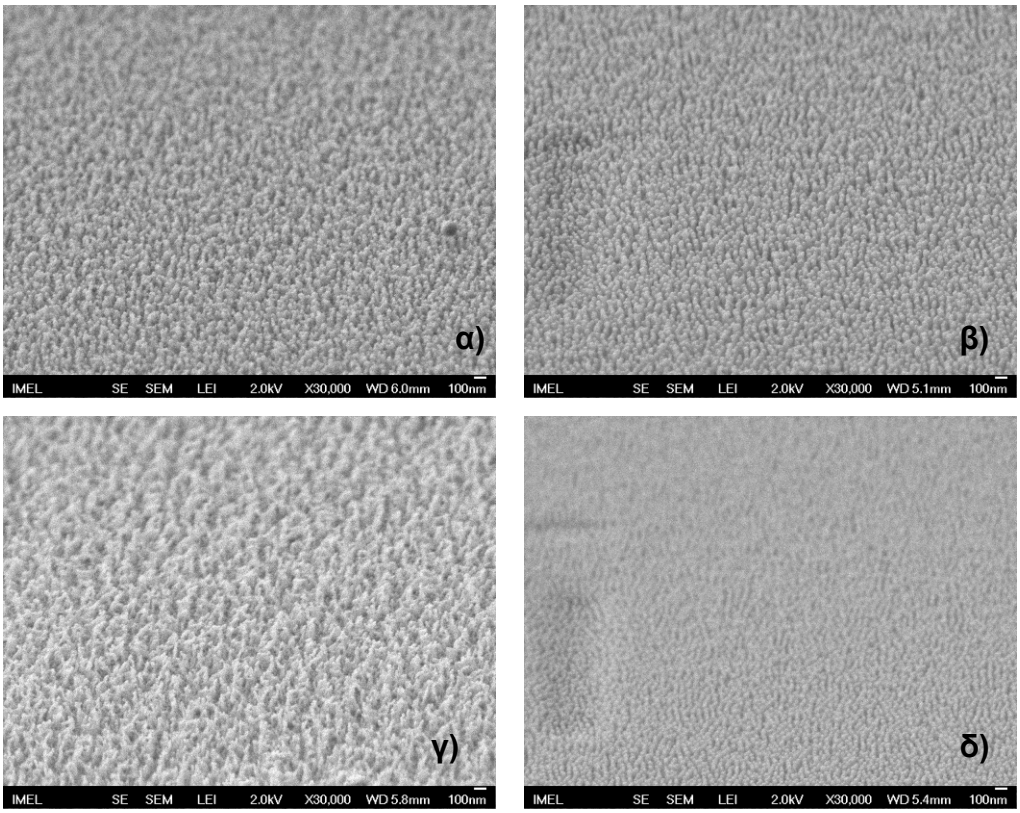
Παράμετροι πλάσματος	
Θερμοκρασία ηλεκτροδίου	15^oC, 65^oC
Δυναμικό αυτοπόλωσης	0 Volt, 25 Volt, 50 Volt, 75 Volt, 100 Volt
Χρόνοι εγχάραξης	3 δευτερόλεπτα, 1 λεπτό, 3 λεπτά

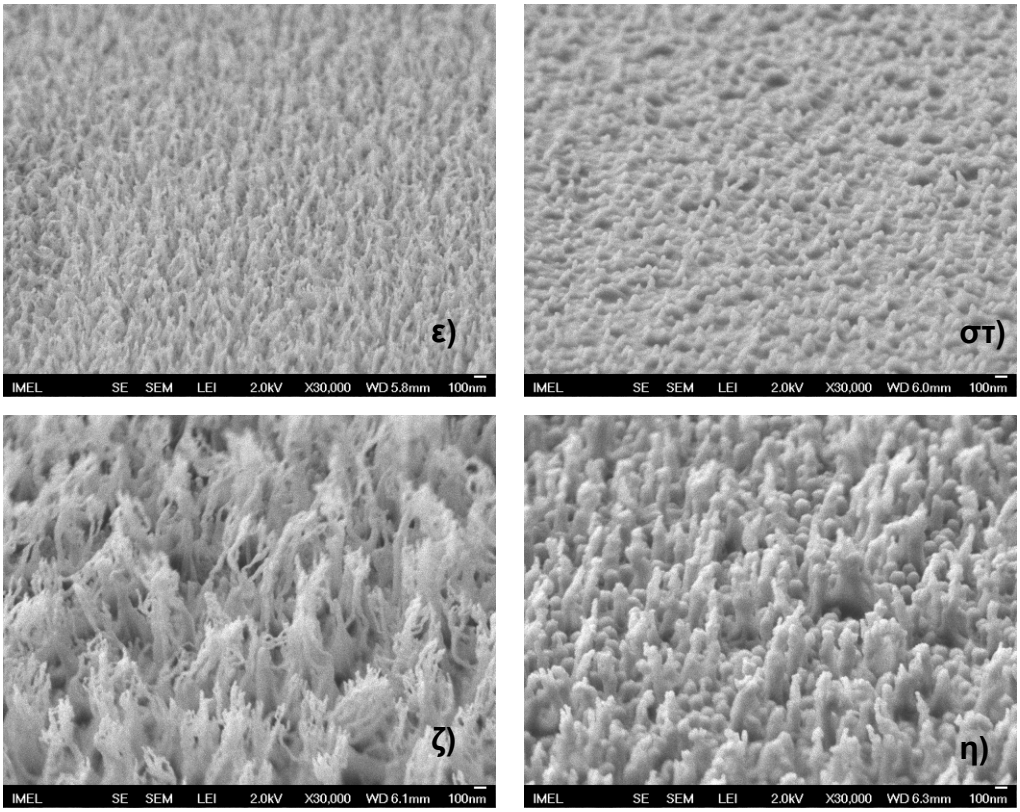
Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν επιφάνειες PMMA έπειτα από κατεργασία με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt για χρόνο 3 δευτερόλεπτα και 1 λεπτό, με δυναμικό αυτοπόλωσης 25, 50, 75 και 100 Volt για 1 λεπτό καθώς και με

δυναμικό αυτοπόλωσης 100 Volt για 3 λεπτά. Όλες οι παραπάνω συνθήκες πραγματοποιήθηκαν και για τις δυο διαφορετικές θερμοκρασίες.

6.2 Χαρακτηρισμός των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (SEM)

Στις επιφάνειες οι οποίες είχαν υποστεί επεξεργασία με δυναμικό >50 Volt έγινε χαρακτηρισμός των δομών με χρήση του Μικροσκοπίου Σάρωσης Ηλεκτρονίων του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής. Λόγω της επικάλυψης των επιφανειών με πλατίνα, όπως περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.3, οι επιφάνειες που είχαν κατεργαστεί σε χαμηλότερα δυναμικά δεν ήταν δυνατόν να παρατηρηθούν με αυτό το μικροσκόπιο, εξ αιτίας της πολύ μικρής τραχύτητας τους. Στο Σχήμα 6.1 απεικονίζονται ενδεικτικές εικόνες της νανοδόμησης των επιφανειών.





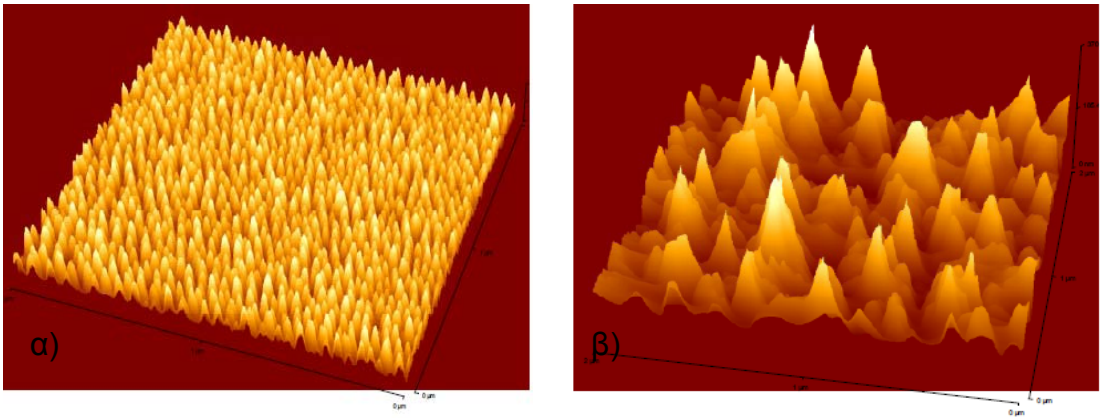
Σχήμα 6.1: Εικόνες SEM από επιφάνειες PMMA που είχαν κατεργαστεί με πλάσμα O_2 με δυναμικό 50 Volt για 1min στους 15^oC (α) και στους 65^oC (β), με 75 Volt για 1min στους 15^oC (γ) και στους 65^oC (δ), με 100 Volt για 1min στους 15^oC (ε) και στους 65^oC (στ) και τέλος με 100 Volt για 3 min στους 15^oC (ζ) και στους 65^oC (η). Σε όλες τις εικόνες η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση ήταν 30.000.

Γενικά παρατηρείται ότι η τραχύτητα των επιφανειών αυξάνεται με αύξηση του δυναμικού αυτοπόλωσης και του χρόνου κατεργασίας, ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας του ηλεκτροδίου. Οι νανο-κολώνες φαίνεται να συναθροίζονται με την αυξανόμενη κατεργασία στο πλάσμα και δημιουργείται ένα πορώδες υλικό για τις κατεργασίες που έχουν διάρκεια 3 λεπτών. Σύγκριση των δομών που δημιουργούνται με κατεργασία με το ίδιο δυναμικό αλλά σε διαφορετική θερμοκρασία δείχνει ότι οι επιφάνειες έχουν πιο οξείες και πιο ψηλές δομές όταν η εγχάραξη γίνεται στους 15^{o}C, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.1 γ, ε, ζ. Αντίθετα, στους 65^{o}C οι κορυφές παρουσιάζουν μικρότερη οξύτητα, ειδικά στις επιφάνειες οι οποίες έχουν υποστεί επεξεργασία με 100 Volt για 3 min. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πιθανή τήξη του πολυμερούς, καθώς η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του PMMA είναι περίπου 105^{o}C και

γνωρίζουμε ότι σε μεγάλους χρόνους κατεργασίας παρατηρείται έλλειψη ελέγχου της θερμοκρασίας του ηλεκτρόδιου (Σχήμα 6.1 δ, στ, η).

6.3 Υπολογισμός του ύψους των νανοδομών των επιφανειών με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων της εγχάραξης στη δημιουργία νανοδομών στις επιφάνειες PMMA, μέσω παρατήρησης στο Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης. Στο σχήμα 6.2 απεικονίζονται ενδεικτικά φωτογραφίες των επιφανειών που έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt και 100 Volt, για χρόνο 1 λεπτό και για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C. Παρατηρείται ότι η μεταβολή του δυναμικού έχει τεράστια επίδραση στο μέγεθος, τη μορφολογία και την τάξη των δομών. Συγκεκριμένα, όταν οι επιφάνειες κατεργάζονται με δυναμικό 0 Volt οι δομές τους χαρακτηρίζονται από τάξη και περιοδικότητα, ενώ όταν υφίστανται κατεργασία με δυναμικό 100 Volt οι δομές είναι πολύ πυκνές, ακανόνιστες και χωρίς περιοδικότητα.



Σχήμα 6.2: Εικόνες από AFM επιφανειών PMMA, εγχαραγμένων με δυναμικό αυτοπόλωσης: (α) 0 Volt, (β) 100 Volt για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C και χρόνο εγχάραξης 1 λεπτό. Όλες οι εικόνες είναι 2 μm* 2 μm με ανάλυση 512* 512 σημεία.

Προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω οι διαφορές που εμφανίζουν οι νανοδομές ως προς το ύψος, έγινε ανάλυση των εικόνων και εξήχθηκαν οι τιμές της ρίζας της μέσης τετραγωνικής τιμής (rms) των υψών. Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα rms για τις επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία

με δυναμικό αυτοπόλωσης 0, 25, 50, 75 και 100 Volt, για χρόνο 1 λεπτό καθώς και για την επιφάνεια που έχει κατεργαστεί με δυναμικό 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και για τη μη κατεργασμένη επιφάνεια. Η μελέτη έγινε για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C. Από τον Πίνακα 6.2 προκύπτει ότι το rms αυξάνεται με αύξηση του δυναμικού και ειδικά για δυναμικό 75 και 100 Volt, η αύξηση φαίνεται να είναι εκθετική. Δηλαδή, με την εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο δημιουργούνται αιχμηρές, ογκώδεις και ακανόνιστες δομές.

Πίνακας 6.2: Τιμές της ρίζας της μέσης τετραγωνικής τιμής (rms) των υψών των δομών της επιφάνειας συναρτήσει του δυναμικού αυτοπόλωσης και του χρόνου κατεργασίας

Δυναμικό αυτοπόλωσης	Χρόνος κατεργασίας	Rms
Υμένιο PMMA	-	0,1 nm
0 Volt	3 sec	1 nm
0 Volt	1 min	5,2 nm
25 Volt	1 min	5,1 nm
50 Volt	1 min	16,1 nm
75 Volt	1 min	21,1 nm
100 Volt	1 min	41,4 nm

6.4 Έλεγχος της υδροφιλικότητας των νανοδομημένων με πλάσμα O_2 επιφανειών

Προκειμένου να ελεγχθεί η υδροφιλικότητα των επιφανειών που παρασκευάστηκαν με εγχάραξη με πλάσμα O_2 έγινε μέτρηση των γωνιών επαφής με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.5. Η μέτρηση των γωνιών στις επιφάνειες έγινε αμέσως μετά την κατεργασία τους με το πλάσμα και μετά από 6 μέρες γήρανσης, οπότε και οι επιφάνειες επιστρώνονται με κύτταρα. Στον πίνακα 6.2 παρατίθενται οι τιμές των γωνιών επαφής για τις διαφορετικές συνθήκες εγχάραξης.

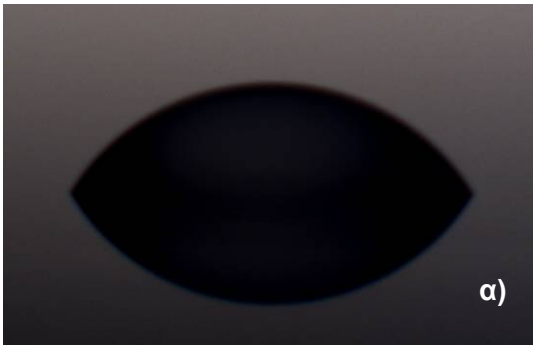
Πίνακας 6.3: Μέτρηση γωνιών επαφής αμέσως μετά την κατεργασία με πλάσμα O_2 (0 μέρες γήρανση) και 6 μέρες μετά (6 μέρες γήρανση) για θερμοκρασίες ηλεκτροδίου 15°C και 65°C

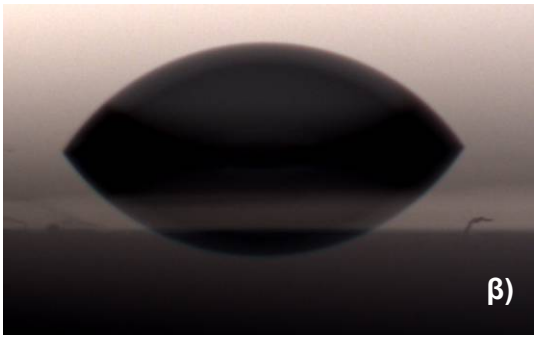
Συνθήκες πλάσματος	Γωνία επαφής 15°C	Γωνία επαφής 65°C	Γωνία επαφής 15°C	Γωνία επαφής 65°C
	0 μέρες γήρανση		6 μέρες γήρανση	
0V 3sec	50°	43°	57°	51°
0V 1min	45°	0°	52°	50°
25V 1min	40°	0°	48°	31°
50V 1min	0°	0°	46°	27°
75V 1min	0°	0°	45°	25°
100V 1min	0°	0°	20°	21°
100V 3min	0°	0°	20°	20°

Για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15°C, στις επιφάνειες οι οποίες είχαν μόλις κατεργαστεί με πλάσμα, παρατηρείται σταδιακή μείωση της τιμής της γωνίας επαφής με αύξηση του δυναμικού εγχάραξης και πτώση της στις 0° για δυναμικό >50 Volt. Για τις αντίστοιχες εγχαράξεις για θερμοκρασία ηλεκτροδίου στους 65°C, η γωνία επαφής ήταν 0° σε όλες τις επιφάνειες εκτός από αυτές που είχαν υποστεί κατεργασία με 0 Volt για 3sec.

Από τις τιμές του πίνακα 6.2 παρατηρείται ότι οι γωνίες επαφής των επιφανειών έξι μέρες μετά την κατεργασία τους με πλάσμα αυξάνονται σε σχέση με τις αντίστοιχες αμέσως μετά το πλάσμα O_2. Εξακολουθούν, όμως, να μειώνονται με αύξηση του δυναμικού κατεργασίας τόσο για τις εγχαράξεις που είχαν πραγματοποιηθεί στους 15°C όσο και για αυτές που είχαν πραγματοποιηθεί στους 65°C, γεγονός που υποδηλώνει φυσιολογική γήρανση των επιφανειών. Η γωνία επαφής του ακατέργαστου PMMA είναι 67°.

Στο σχήμα 6.3 παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες από γωνίες επαφής για επιφάνειες που έχουν υποστεί 6 μέρες γήρανση και έχουν κατεργαστεί με πλάσμα σε δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt για χρόνους 3sec και 1min και σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15°C.





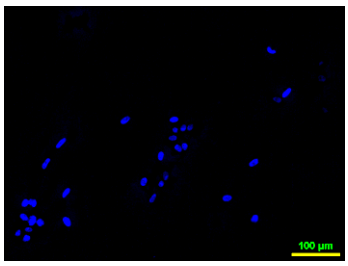
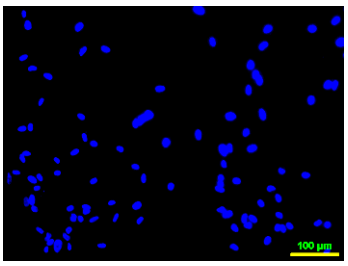
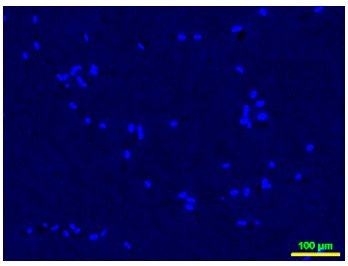
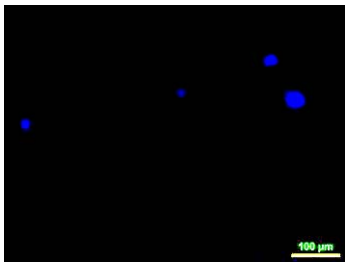
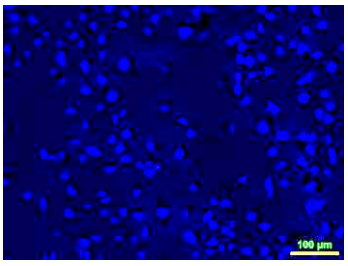
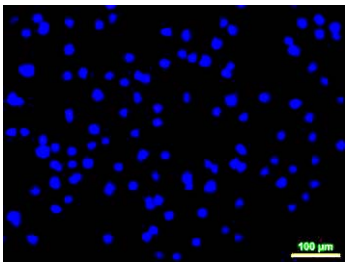
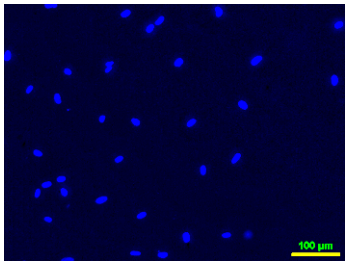
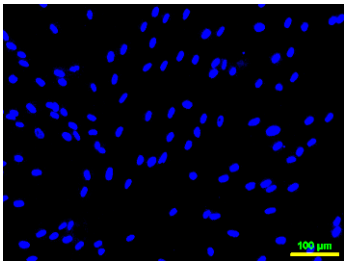
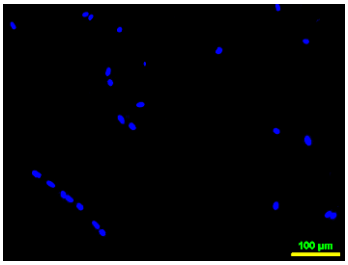
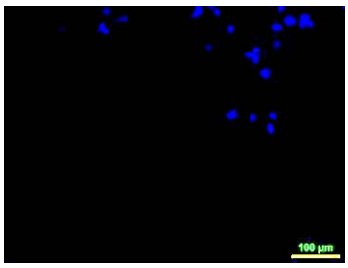
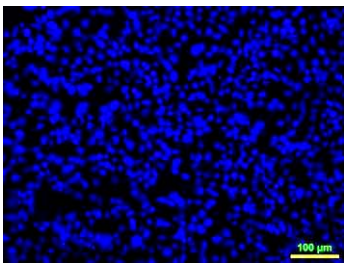
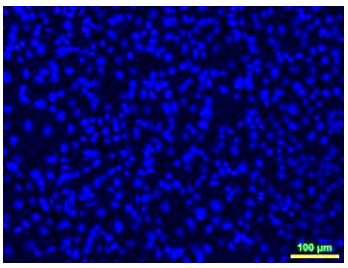
Σχήμα 6.3: Απεικόνιση γωνιών επαφής για επιφάνειες που έχουν υποστεί 6 μέρες γήρανση και έχουν κατεργαστεί με πλάσμα σε δυναμικό αυτόπολωσης 0 Volt για χρόνους (α) 3sec (57^{o}) και (β) 1min (52^{o}) και σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C.

6.5 Προσκόλληση και ανάπτυξη φυσιολογικών ινοβλαστών καθώς και καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ινοσάρκωμα στις τροποποιημένες από το πλάσμα επιφάνειες

Προκειμένου να ερευνηθεί η επίδραση της νανοτοπογραφίας στη συμπεριφορά καρκινικών και υγιών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μελέτη προσκόλλησης και ανάπτυξης φυσιολογικών ινοβλαστών καθώς και καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από την σειρά HT-1080 στις κατεργασμένες από το πλάσμα επιφάνειες στις συνθήκες που αναφέρονται στο Εδάφιο 6.1. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.9.2 για χρόνο καλλιέργειας μία και τρεις ημέρες. Η πυκνότητα των κυττάρων ήταν 80.000 κύτταρα/ ml. Ακολούθησε χρώση των πυρήνων με DAPI, σε συγκέντρωση 100 ng/ ml (Εδάφιο 5.9.2). Έπειτα, έγινε υπολογισμός του πληθυσμού των κυττάρων με καταμέτρηση των πυρήνων με τη βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας Image Pro Plus7.

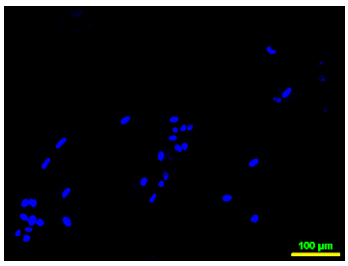
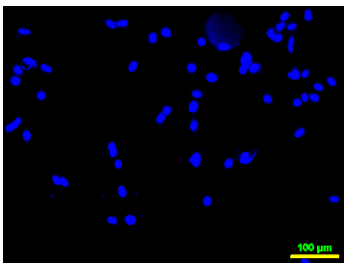
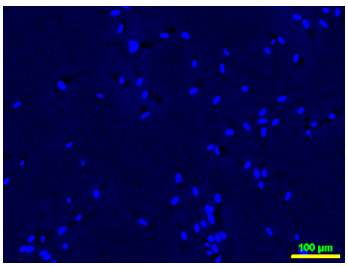
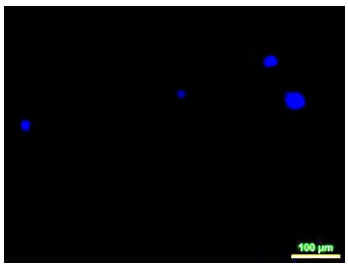
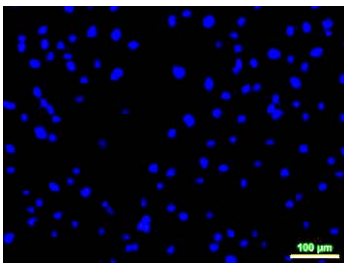
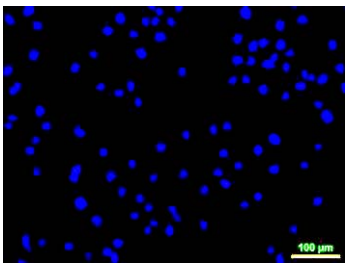
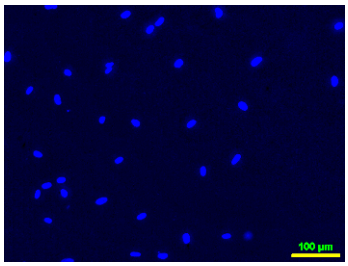
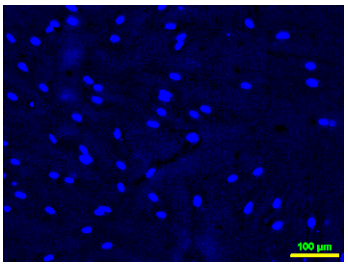
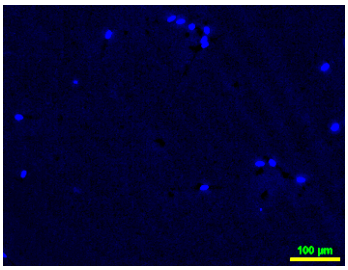
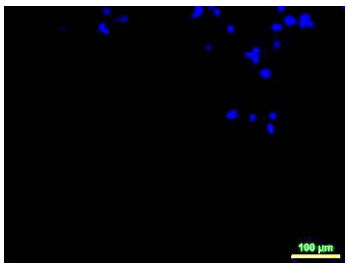
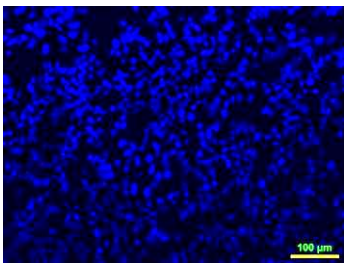
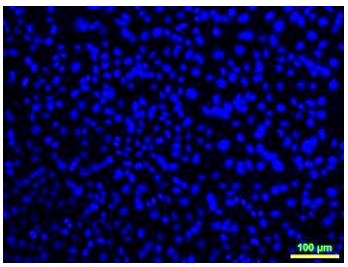
Στο σχήμα 6.4 απεικονίζεται ο πληθυσμός των πυρήνων των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων σε μη κατεργασμένο υμένιο PMMA, καθώς και σε υμένια PMMA τα οποία έχουν υποστεί κατεργασία με πλάσμα O_2 με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και με 100 Volt για 3 λεπτά, για χρόνους καλλιέργειας μία και τρεις ημέρες, σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C. Από την σύγκριση των εικόνων 1α-1γ που αφορούν την προσκόλληση φυσιολογικών ινοβλαστών στις επιφάνειες ακατέργαστου PMMA, στην

ελάχιστα νανοδομημένη επιφάνεια (0V 3sec) και στην περισσότερο νανοδομημένη επιφάνεια (100V 3 λεπτά) παρατηρείται αυξημένος αριθμός προσκολλημένων κυττάρων στην επιφάνεια των 0V 3sec. Επίσης, από τις εικόνες 1δ-1στ των καρκινικών κυττάρων (HT1080) στις υπό εξέταση επιφάνειες φαίνεται η αποτροπή προσκόλλησης τους στην ακατέργαστη/ μη νανοδομημένη επιφάνεια PMMA (1δ) σε αντίθεση με την πολύ τραχιά επιφάνεια (1στ). Η συγκεκριμένη τάση των καρκινικών ινοβλαστών, να προσκολλώνται σε μεγάλο βαθμό στην πολύ τραχιά επιφάνεια, ενώ ο βαθμός προσκόλλησής τους να μειώνεται κατά πολύ στην επιφάνεια ακατέργαστου PMMA, διατηρείται και στις 3 μέρες καλλιέργειας όπως διαπιστώνεται και από τις εικόνες 2δ και 2στ που αφορούν την ακατέργαστη και την πολύ τραχιά επιφάνεια PMMA, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί η πολύ μεγάλη διαφορά προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων μετά από 3 μέρες καλλιέργειας στην πολύ τραχιά επιφάνεια (εικόνα 2στ) σε αντίθεση με την ελάχιστη προσκόλληση των φυσιολογικών ινοβλαστών στην ίδια επιφάνεια (εικόνα 1στ).

1α  Υμένιο PMMA	1β  0 Volt 3 sec	1γ  100 Volt 3 min
1δ  Υμένιο PMMA	1ε  0 Volt 3 sec	1στ  100 Volt 3 min
2α  Υμένιο PMMA	2β  0 Volt 3 sec	2γ  100 Volt 3 min
2δ  Υμένιο PMMA	2ε  0 Volt 3 sec	2στ  100 Volt 3 min

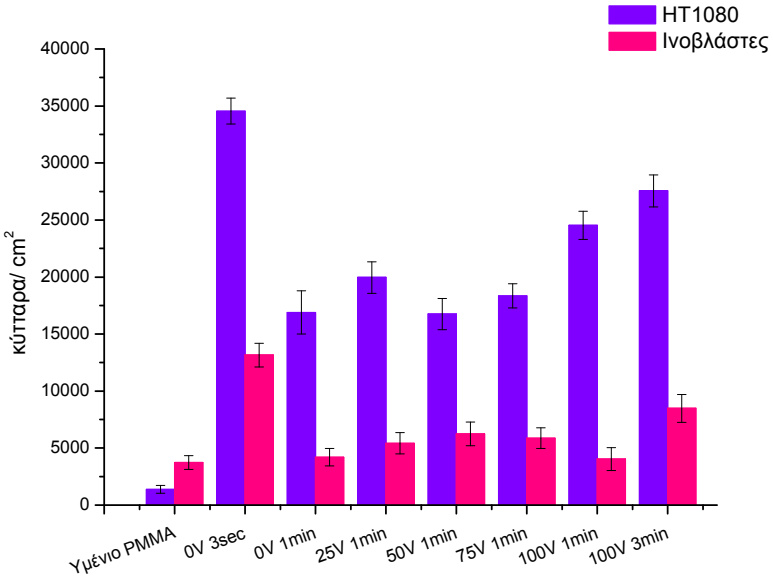
Σχήμα 6.4: Εικόνες πυρήνων από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας: (1) 1 μέρα, (2) 3 μέρες, (α- γ) φυσιολογικών και (δ- στ) καρκινικών ινοβλαστών στις συνθήκες που αναγράφονται στις εικόνες, για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15°C.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την προσκόλληση των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων στο μη κατεργασμένο υμένιο PMMA, στην επιφάνεια που έχει κατεργασθεί με δυναμικό αυτοπόλωσης 0V για χρόνο 3 δευτερόλεπτα και στην επιφάνεια που έχει κατεργασθεί με δυναμικό αυτοπόλωσης 100V για χρόνο 3 λεπτά, για χρόνο καλλιέργειας 1 και 3 μέρες και για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65 ^{o}C φαίνονται στις εικόνες του σχήματος 6.5. Από την σύγκριση των εικόνων προκύπτει ότι, τόσο οι φυσιολογικοί ινοβλάστες όσο και τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά με αυτή που έχουν όταν καλλιεργούνται στις αντίστοιχες επιφάνειες οι οποίες έχουν κατεργαστεί σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C. Ακολούθησε εκτενέστερη μελέτη και καταμέτρηση του αριθμού των προσκολλημένων/cm^{2} επιφανείας κυττάρων για όλες τις υπό εξέταση επιφάνειες και στις δυο θερμοκρασίες ηλεκτροδίου.

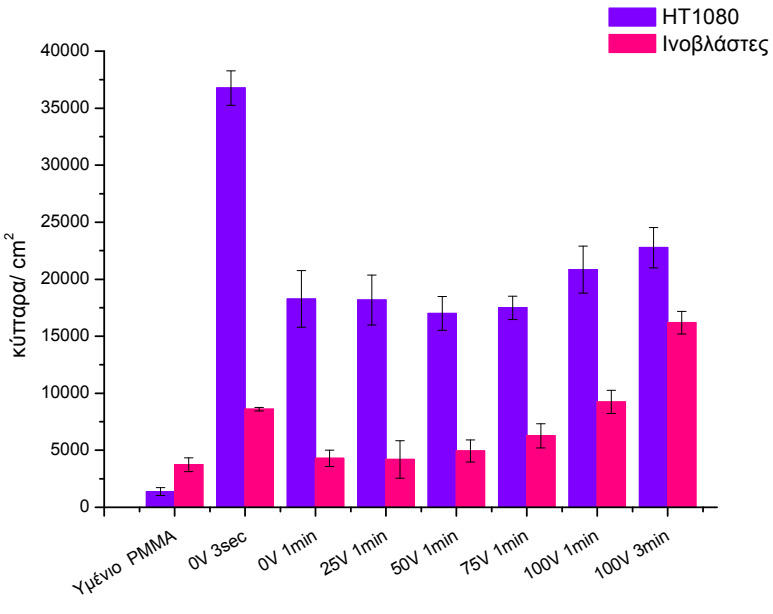
1α  Υμένιο PMMA	1β  0 Volt 3 sec	1γ  100 Volt 3 min
1δ  Υμένιο PMMA	1ε  0 Volt 3 sec	1στ  100 Volt 3 min
2α  Υμένιο PMMA	2β  0 Volt 3 sec	2γ  100 Volt 3 min
2δ  Υμένιο PMMA	2ε  0 Volt 3 sec	2στ  100 Volt 3 min

Σχήμα 6.5: Εικόνες πυρήνων από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας: (1) 1 μέρα, (2) 3 μέρες, (α- γ) φυσιολογικών και (δ- στ) καρκινικών ινοβλαστών στις συνθήκες που αναγράφονται στις εικόνες, για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C.

Συγκεκριμένα στο σχήμα 6.6 παρουσιάζονται τα ραβδογράμματα του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων και των φυσιολογικών ινοβλαστών στις μη κατεργασμένες και στις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες, για συνθήκες κατεργασίας 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα, 0, 25, 50 75, 100 volt για 1 λεπτό και 100 Volt για 3 λεπτά, για τις δύο θερμοκρασίες ηλεκτροδίου και για χρόνο καλλιέργειας μία ημέρα.



α)

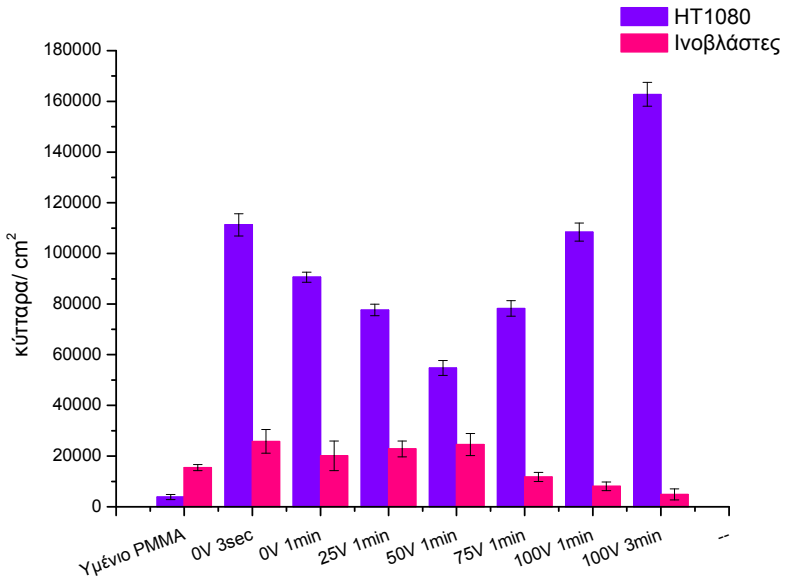


β)

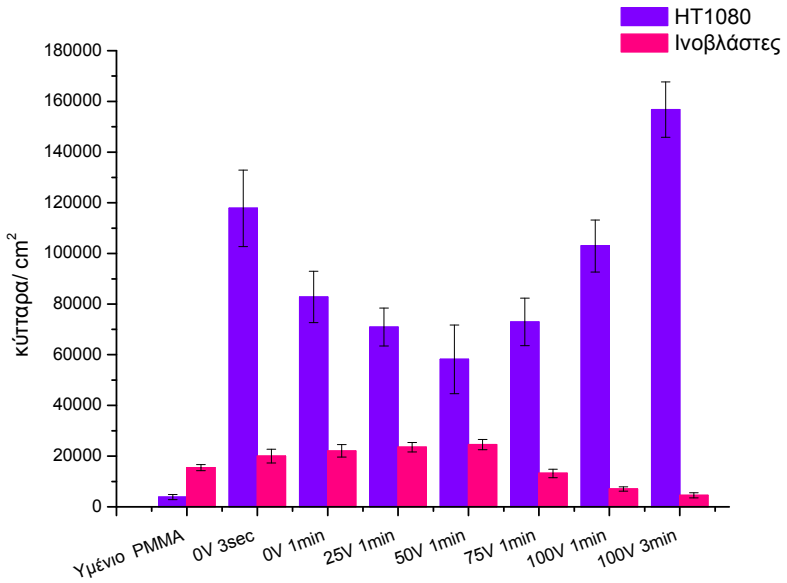
Σχήμα 6.6: Μέσος αριθμός προσκολλημένων φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσδιορίστηκε για τη μη κατεργασμένη (Υμένιο PMMA) καθώς και τις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA, σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου (α) 15°C και (β) 65°C για χρόνο καλλιέργειας μία μέρα.

Από το Σχήμα 6.6 προκύπτει ότι, στο μη κατεργασμένο υμένιο PMMA οι καρκινικοί ινοβλάστες προσκολλώνται ελάχιστα σε σχέση με τα κατεργασμένα υμένια. Επίσης, παρατηρείται ότι στο μη κατεργασμένο υμένιο PMMA προσκολλώνται περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα από ότι καρκινικά, κάτι το οποίο αντιστρέφεται σε όλες τις κατεργασμένες επιφάνειες. Επίσης, διαπιστώνεται ότι η θερμοκρασία του ηλεκτροδίου δεν επηρεάζει σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων. Αναλυτικά, οι καρκινικοί ινοβλάστες και στις δύο θερμοκρασίες ηλεκτροδίου προσκολλώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό στις επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και έχουν πάρα πολύ μικρή τραχύτητα (ύψος κορυφών περίπου 6nm), ενώ στις επιφάνειες που έχουν ενδιάμεση τραχύτητα (0 Volt για 1 λεπτό, 25 Volt για 1 λεπτό, 50 Volt για 1λεπτό, 75 Volt για 1 λεπτό) προσκολλώνται περίπου στον ίδιο βαθμό με μικρές διακυμάνσεις. Μικρή αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων παρατηρείται στις πολύ τραχείες επιφάνειες (100 Volt για 1 και 3 λεπτά), ο οποίος και πάλι είναι μικρότερος σε σχέση με τις επιφάνειες που είναι κατεργασμένες με 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα. Παρόμοια τάση εμφανίζουν και οι φυσιολογικοί ινοβλάστες, οι οποίοι προσκολλώνται στον ίδιο περίπου βαθμό στις επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό αυτοπόλωσης από 0 Volt έως 100 Volt για χρόνο 1 λεπτό. Αύξηση της προσκόλλησης σημειώνεται στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες με δυναμικό 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα, η οποία είναι πιο έντονη όταν η θερμοκρασία του ηλεκτροδίου είναι 15^{o}C, καθώς και στις πολύ τραχιές επιφάνειες (100 Volt για 3 λεπτά) και ιδιαίτερα όταν έχουν υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 65^{o}C.

Τα αντίστοιχα ραβδογράμματα για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες παρουσιάζονται στο σχήμα 6.7.



α)



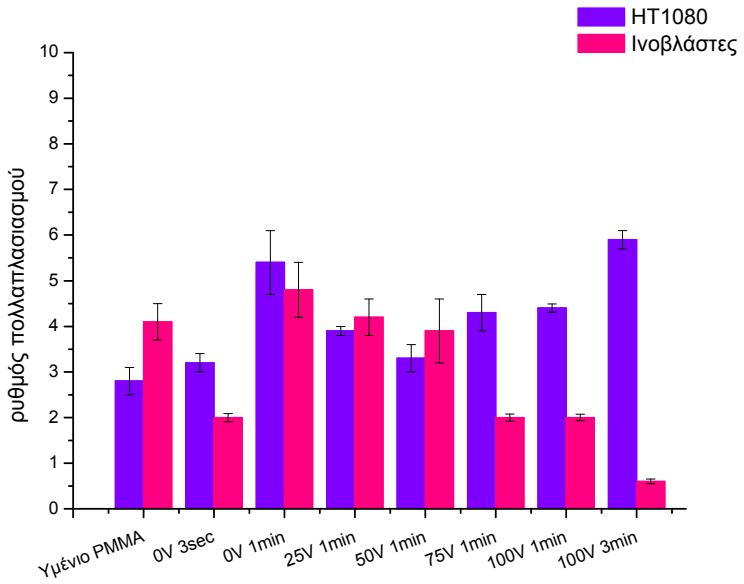
β)

Σχήμα 6.7: Μέσος αριθμός προσκολλημένων φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων HT1080 ανά μονάδα επιφάνειας που προσδιορίστηκε για τη μη κατεργασμένη (flat) καθώς και τις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA, σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου (α) 15°C και (β) 65°C για χρόνο καλλιέργειας τρεις μέρες.

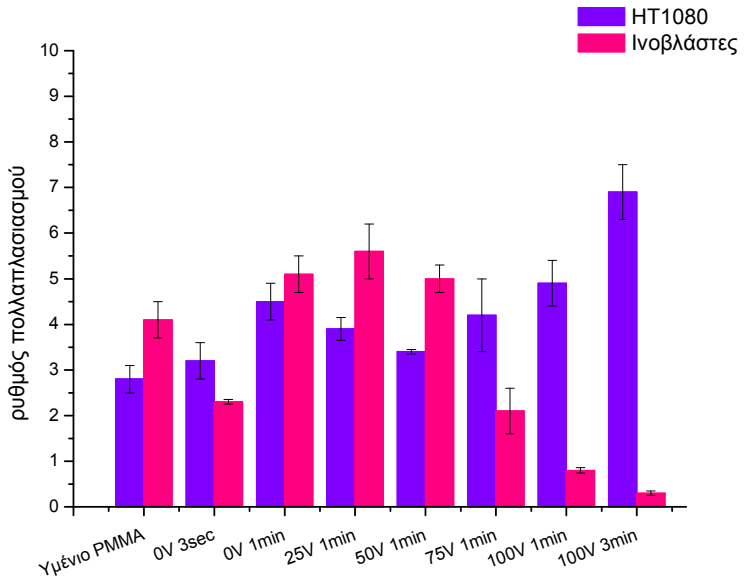
Φαίνεται ότι ο αριθμός των προσκολλημένων καρκινικών ινοβλαστών εξακολουθεί να είναι πολύ μικρός στις μη κατεργασμένες επιφάνειες, σε σχέση με τις κατεργασμένες. Παράλληλα, η μη κατεργασμένη επιφάνεια εξακολουθεί να είναι η μοναδική επιφάνεια στην οποία προσκολλάται

μεγαλύτερος αριθμός φυσιολογικών ινοβλαστών σε σχέση με τους καρκινικούς. Επίσης, η συμπεριφορά των φυσιολογικών ινοβλαστών αναστρέφεται συγκριτικά με την πρώτη μέρα, καθώς παρατηρείται σταδιακή αύξηση του αριθμού τους στις κατεργασμένες επιφάνειες με δυναμικό από 0 Volt έως 50 Volt και σταδιακή πτώση του πληθυσμού τους στις κατεργασμένες επιφάνειες με δυναμικό >75 Volt, με αποτέλεσμα η επιφάνεια των 100 V για 3 λεπτά, η οποία στη μία μέρα είχε τους περισσότερους ινοβλάστες, πλέον να έχει τους λιγότερους. Από την άλλη μεριά, οι καρκινικοί ινοβλάστες έχουν σχεδόν την ίδια συμπεριφορά με τη μία μέρα, με τη διαφορά ότι ο μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων προσκολλάται στις κατεργασμένες επιφάνειες με 100 volt για 3 λεπτά και όχι στις επιφάνειες που είχαν υποστεί κατεργασία με 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα. Και σε αυτή την περίπτωση διαπιστώθηκε ότι η θερμοκρασία του ηλεκτροδίου δεν προκαλεί διαφορές στην προσκόλληση.

Ακολούθησε μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών και των καρκινικών ινοβλαστών και τα αποτελέσματα παρατίθενται στο Σχήμα 6.8.



α)



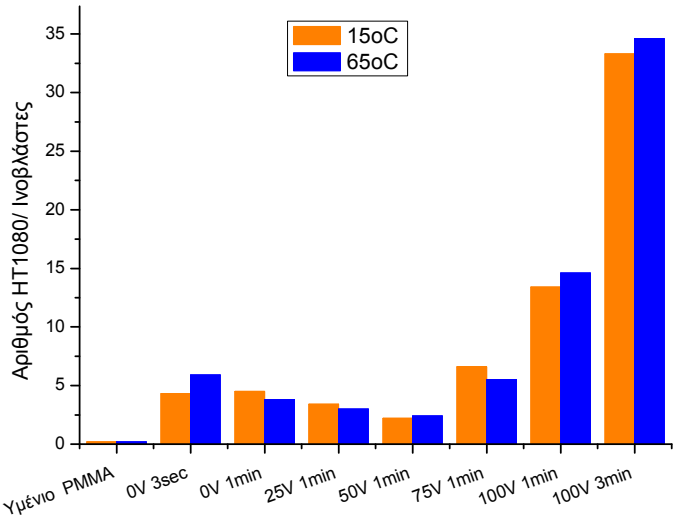
β)

Σχήμα 6.8: Ρυθμός πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών και των καρκινικών ινοβλαστών στις τροποποιημένες από το πλάσμα επιφάνειες για θερμοκρασία ηλεκτροδίου (α) 15°C και (β) 65°C .

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία του ηλεκτροδίου του πλάσματος. Προκύπτει ότι οι φυσιολογικοί ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται με ρυθμό ταχύτερο των καρκινικών στις επιφάνειες οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό από 0 Volt εώς 50 Volt, ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους μειώνεται δραματικά στις πολύ

τραχιές επιφάνειες (δυναμικό κατεργασίας 100 Volt για 3 λεπτά) και οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι δεν ευνοείται η ανάπτυξη των φυσιολογικών ινοβλαστών σε αυτές τις επιφάνειες, καθώς ο ρυθμός είναι μικρότερος της μονάδας. Αντίθετη συμπεριφορά εμφανίζουν οι καρκινικοί ινοβλάστες, οι οποίοι στις επιφάνειες με πολύ μεγάλη τραχύτητα (δυναμικό κατεργασίας 100 Volt για 1 και 3 λεπτά) πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορο ρυθμό.

Η μεγάλη διαφορά που παρατηρείται στις κατεργασμένες επιφάνειες με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά, όσον αφορά στην προσκόλληση των κυττάρων στις 3 μέρες καλλιέργειας καθώς και στο ρυθμό πολλαπλασιασμού μπορεί να οδηγήσει σε διαχωρισμό των καρκινικών από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες, με απομάκρυνση των φυσιολογικών ινοβλαστών και καλλιέργεια των κακρινικών. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από το ραβδόγραμμα των λόγων διαχωρισμού των δύο ειδών κυττάρων, στο οποίο φαίνεται ότι ο λόγος διαχωρισμού τους είναι περίπου 35 και για τις δύο θερμοκρασίες ηλεκτροδίου (Σχήμα 6.9).



Σχήμα 6.9: Λόγος διαχωρισμού των καρκινικών από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες για θερμοκρασίες ηλεκτροδίου 15°C και 65°C.

Ικανοποιητικός διαχωρισμός θα μπορούσε να επιτευχθεί και στις επιφάνειες οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό 100 Volt για 1 λεπτό (λόγος διαχωρισμού ~15). Αντίθετα, διαχωρισμός δε θα μπορούσε να επιτευχθεί στις μη κατεργασμένες επιφάνειες καθώς δεν ευνοείται σε αυτές η προσκόλληση

των καρκινικών ινοβλαστών. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι επιφάνειες οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα, καθώς παρά την πολύ μικρή τραχύτητα ευνοούν σε πολύ μεγάλο βαθμό την προσκόλληση και των δύο ειδών κυττάρων. Γι' αυτό, ενώ δε θα μπορούσε να επιτευχθεί σε αυτές διαχωρισμός των φυσιολογικών από τα καρκινικά κύτταρα είναι πολύ ενδιαφέρουσα η μελέτη της μορφολογίας και της έκτασης των κυττάρων στις επιφάνειες αυτές.

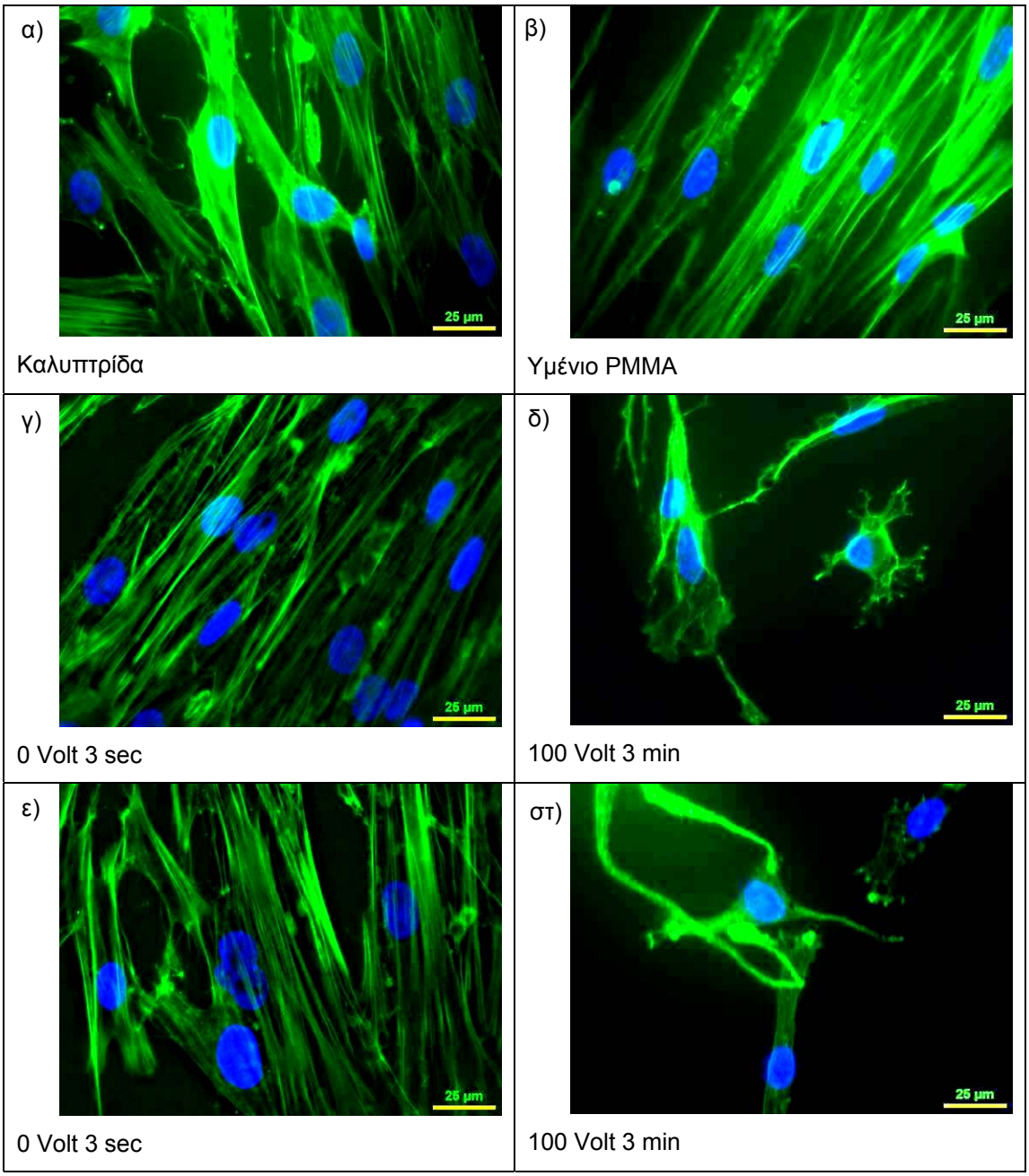
Για τους προαναφερθέντες λόγους επιλέχθηκαν οι μη κατεργασμένες επιφάνειες, οι επιφάνειες οι οποίες είχαν υποστεί κατεργασία με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και με δυναμικό αυτοπόλωσης 100 Volt για 3 λεπτά προκειμένου να μελετηθούν σε αυτές η μορφολογία και η έκταση των κυττάρων, ο σχηματισμός εστιακών επαφών καθώς και η απόπτωσή τους.

6.6 Μορφολογία πυρήνα και κυτταροπλάσματος των φυσιολογικών ινοβλαστών καθώς και των καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από τη σειρά HT1080 στις τροποποιημένες από το πλάσμα επιφάνειες

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η μορφολογία του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος τόσο των φυσιολογικών ινοβλαστών όσο και των καρκινικών κυττάρων στις μη κατεργασμένες καθώς και στις κατεργασμένες με πλάσμα οξυγόνου επιφάνειες, με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt και 100 Volt για χρόνο 3 δευτερόλεπτα και 3 λεπτά αντίστοιχα. Η θερμοκρασία του ηλεκτροδίου ήταν 15^{o}C.Η μορφολογία των κυττάρων συγκρίθηκε με αυτή σε καλυπτρίδες πολυστυρενίου για τον ίδιο χρόνο καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.9.2 για χρόνο καλλιέργειας τρεις ημέρες. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις ήταν 80.000 κύτταρα/ ml. Ακολούθησε ανοσοκυτταρολογία με χρώση του κυτταροπλάσματος με φαλοϊδίνη επισημασμένη με ATTO 488 σε συγκέντρωση 100 nM καθώς και χρώση των πυρήνων με DAPI, σε συγκέντρωση 100 ng/ ml (Εδάφιο 5.9.2). Έπειτα, μετρήθηκαν οι προς εξέταση παράμετροι των κυττάρων με τη βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων Image Pro Plus7.

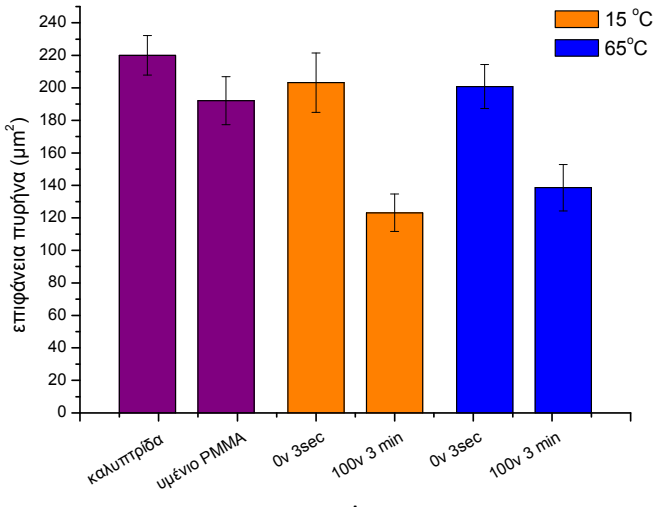
6.6.1 Φυσιολογικοί ινοβλάστες

Όσον αφορά την μορφολογία των φυσιολογικών ινοβλαστών μετά από καλλιέργεια τους τόσο στις υπό μελέτη επιφάνειες όσο και στις επιφάνειες αναφοράς διαπιστώθηκε παραμόρφωση των κυττάρων στις πολύ τραχειές επιφάνειες. Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού προσκολλημένων κυττάρων στις εν λόγω επιφάνειες.



Σχήμα 6.10: Εικόνες φυσιολογικών ινοβλαστών από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες σε: (α) καλυπτρίδα πολυστυρενίου, (β) υμένιο PMMA, (γ, ε) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 0 Volt για 3 sec για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C και (δ, στ) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 100 Volt για 3 min για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C (πράσινο: κυτταροσκελετός, μπλε: πυρήνας).

Αναλυτικά, όπως προκύπτει από την σύγκριση των εικόνων 6.10 α και β οι φυσιολογικοί ινοβλάστες παρουσιάζουν την ίδια μορφολογία κυτταροπλάσματος όταν αναπτύσσονται προσκολλώμενοι στην καλυπτρίδα και στο μη κατεργασμένο υμένιο PMMA, γεγονός που υποδεικνύει ότι το πολυμερές δεν επηρεάζει μορφολογικά τα κύτταρα. Επίσης, η ίδια μορφολογία παρατηρείται και στους ινοβλάστες που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνεια PMMA η οποία έχει επεξεργασθεί με πλάσμα O_2 σε δυναμικό αυτοπόλωσης 0V και χρόνο 3 δευτερόλεπτα. Αντίθετα, στην επιφάνεια των 100 V 3 λεπτά στην οποία όπως προαναφέρθηκε, μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας ο αριθμός των προσκολλημένων ινοβλαστών και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους είναι πολύ μικρός, παρατηρείται πλήρης παραμόρφωση της μορφολογίας του κυτταροπλάσματος σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες επιφάνειες.



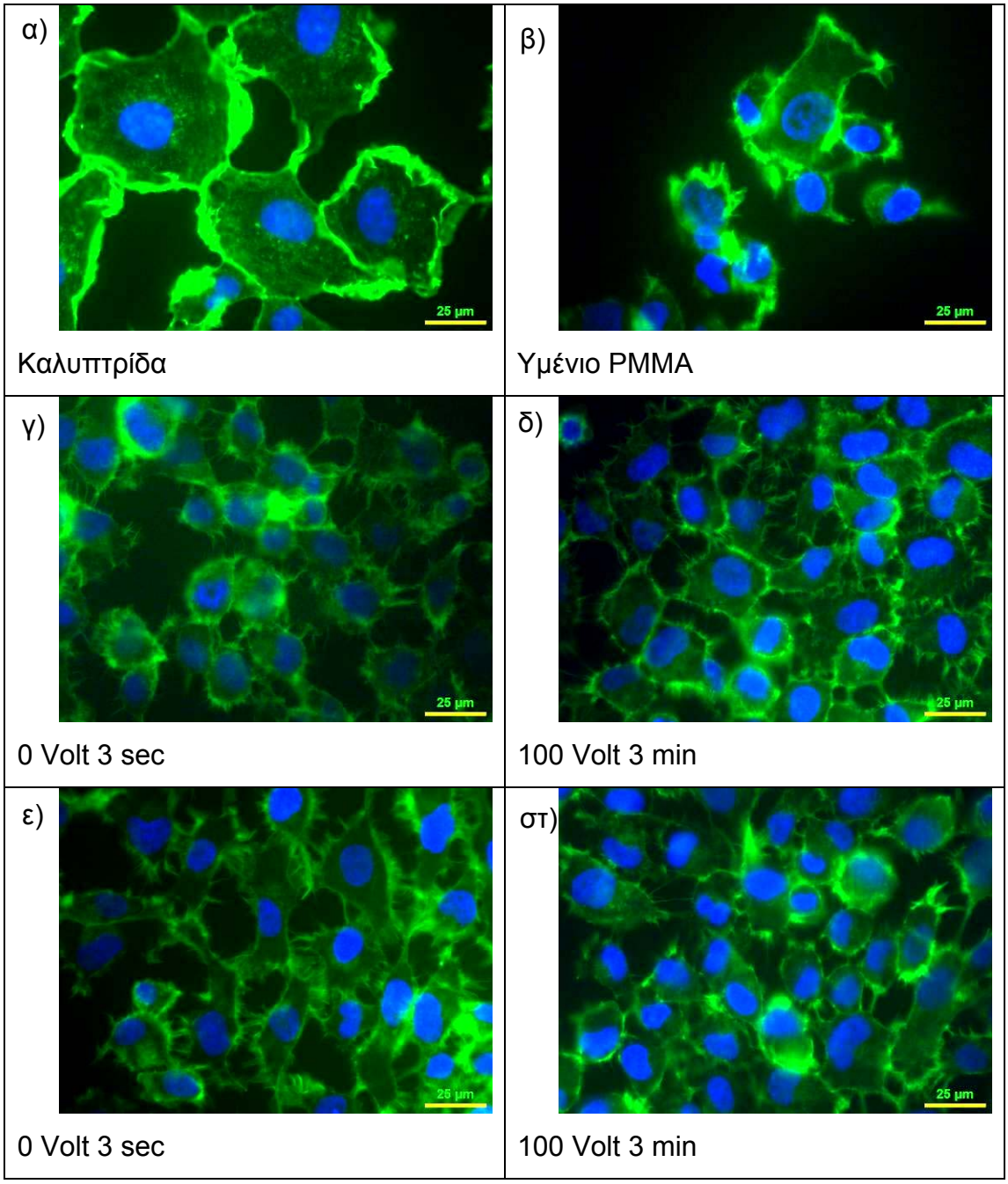
Σχήμα 6.11: Ραβδόγραμμα επιφάνειας πυρήνα φυσιολογικών ινοβλαστών, μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας σε καλυπτρίδα, υμένιο PMMA και επιφάνειες κατεργασμένες με πλάσμα O_2 σε συνθήκες 0 Volt 3 δευτερόλεπτα και 100 Volt 3 λεπτά.

Η συγκεκριμένη παραμόρφωση συνοδεύεται από αντίστοιχη συρρίκνωση της επιφάνειας του πυρήνα και στις δυο θερμοκρασίες ηλεκτροδίου, όπως αποδεικνύεται από το ραβδόγραμμα του σχήματος 6.11 στο οποίο παρουσιάζεται η επιφάνεια του πυρήνα των φυσιολογικών ινοβλαστών όταν αυτά έχουν καλλιεργηθεί για 3 μέρες σε καλυπτρίδα, σε ακατέργαστο PMMA και σε κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες σε συνθήκες 0 Volt 3

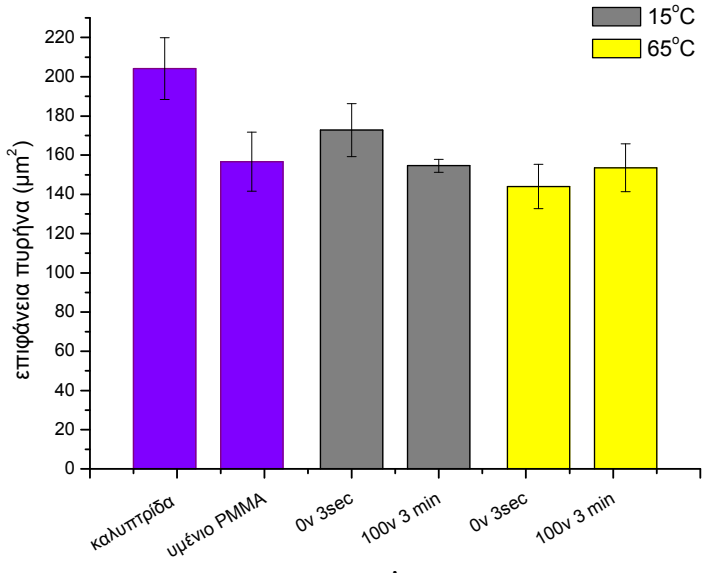
δευτερόλεπτα και 100 Volt 3 λεπτά. Η συρρίκνωση του πυρήνα ενδέχεται να έχει επιπτώσεις σε πολλές βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Αντίθετα, σε όλες τις υπόλοιπες επιφάνειες δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβολή της επιφάνειας του πυρήνα.

6.6.2 Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT-1080)

Όσον αφορά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στις υπό μελέτη επιφάνειες, δεν παρατηρείται καμία παραμόρφωση της μορφολογίας του κυτταροπλάσματος τους μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας στις επιφάνειες που έχουν κατεργασθεί με δυναμικό αυτοπόλωσης 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα (σχήμα 6.12 γ και ε) και 100 Volt 3 λεπτά (σχήμα 6.12 δ και στ) και στις δυο θερμοκρασίες ηλεκτροδίου. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα εκτείνουν και στις δύο επιφάνειες φιλοπόδια και λαμελιπόδια μέσω των οποίων ανιχνεύουν την επιφάνεια και επεκτείνονται προσκολλώμενα σε αυτήν ενώ επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω κυτταρικών προεξοχών. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν και οι πυρήνες των κυττάρων, όπως προκύπτει από τον υπολογισμό της επιφάνειας τους (σχήμα 6.13), όπου δεν παρατηρείται καμία μεταβολή μεταξύ των διαφορετικά επεξεργασμένων με πλάσμα επιφανειών. Στην επιφάνεια του ακατέργαστου υμενίου PMMA (σχήμα 6.12 β) παρόλο που ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων ήταν πολύ μικρός σε σχέση με τις υπόλοιπες επιφάνειες, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη συρρίκνωση τόσο του κυτταροπλάσματος όσο και του πυρήνα (σχήμα 6.13), γεγονός που υποδεικνύει ότι η επιφάνεια αφενός δεν ευνοεί την προσκόλληση τους αλλά αφετέρου αυτά που τελικά προσκολλώνται στην επιφάνεια αναπτύσσονται χωρίς να επηρεάζεται η μορφολογία τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα που βρίσκονται προσκολλημένα στην καλυπτρίδα (σχήμα 6.12 α) έχουν εμφανώς πεπλατυσμένο κυτταρόπλασμα σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες επιφάνειες αλλά και μεγαλύτερο εμβαδό πυρήνα όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα του σχήματος 6.13.



Σχήμα 6.12: Εικόνες καρκινικών ινοβλαστών HT1080 από μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες σε: (α) καλυπτρίδα πολυστυρενίου, (β) υμένιο PMMA, (γ, ε) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 0 Volt για 3 sec για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C και (δ, στ) επιφάνεια PMMA κατεργασμένη με 100 Volt για 3 min για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C και 65^{o}C (πράσινο: κυτταροσκελετός, μπλε: πυρήνας).

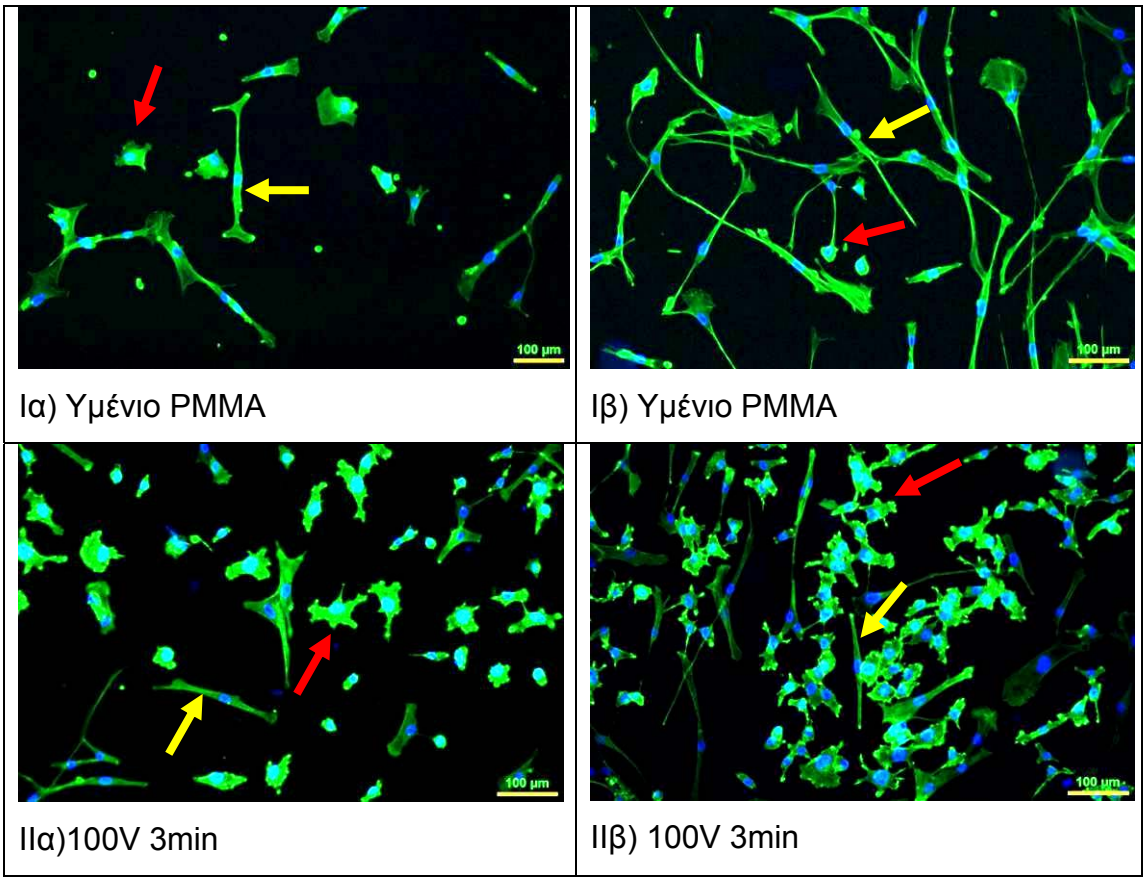


Σχήμα 6.13: Ραβδόγραμμα επιφάνειας πυρήνα καρκινικών κυττάρων, μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας σε καλυπτρίδα, υμένιο PMMA και επιφάνειες κατεργασμένες με πλάσμα O_2 σε συνθήκες 0 Volt 3 δευτερόλεπτα και 100 Volt 3 λεπτά.

6.7 Συγκαλλιέργεια καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της μονοκαλλιέργειας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η επιφάνεια στην οποία επετεύχθη ο μεγαλύτερος βαθμός προσκόλλησης των καρκινικών και ταυτόχρονα ο μικρότερος βαθμός προσκόλλησης των φυσιολογικών κυττάρων είναι εκείνη η οποία είχε υποστεί κατεργασία με πλάσμα O_2 με δυναμικό αυτοπόλωσης 100 Volt για χρόνο 3 λεπτά και θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15°C. Για το λόγο αυτό, στην συγκεκριμένη επιφάνεια, καθώς και στο ακατέργαστο υμένιο PMMA πραγματοποιήθηκε συγκαλλιέργεια των δύο διαφορετικών ειδών κυττάρων για μία και τρεις ημέρες. Ο λόγος του πληθυσμού των φυσιολογικών προς τα καρκινικά κύτταρα στο αρχικό κυτταρικό διάλυμα ήταν 10:1. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.14 Ια, για χρόνο καλλιέργειας μία μέρα στο ακατέργαστο υμένιο PMMA προσκολλάται μεγαλύτερος αριθμός φυσιολογικών ινοβλαστών σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα, ενώ στο κατεργασμένο υμένιο ευνοείται η προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων εις βάρος των φυσιολογικών (σχήμα 6.14 ΙΙα) παρότι τα καρκινικά κύτταρα που αρχικά είχαν επιστρωθεί στην επιφάνεια είναι 10 φορές λιγότερα από τα φυσιολογικά. Τα κύτταρα παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά και για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες καθώς ο αριθμός των προσκολλημένων φυσιολογικών κυττάρων είναι πολύ

μεγαλύτερος από αυτόν των καρκινικών (σχήμα 6.14 Ιβ). Αντίθετα, στην νανοδομημένη επιφάνεια μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας του μίγματος των κυττάρων παρατηρείται πολύ μεγάλη ενίσχυση της αυξημένης προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων που είχε ήδη παρατηρηθεί από την πρώτη κιόλας μέρα καλλιέργειας, έναντι των φυσιολογικών (σχήμα 6.14 IIα,IIβ).



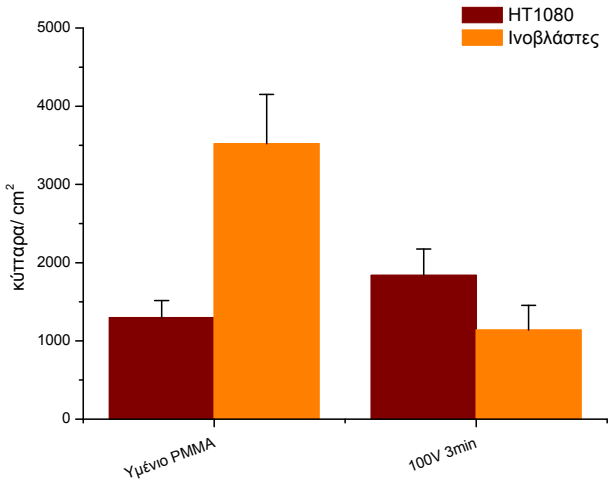
Ια) Υμένιο PMMA | Ιβ) Υμένιο PMMA

IIα)100V 3min | IIβ) 100V 3min

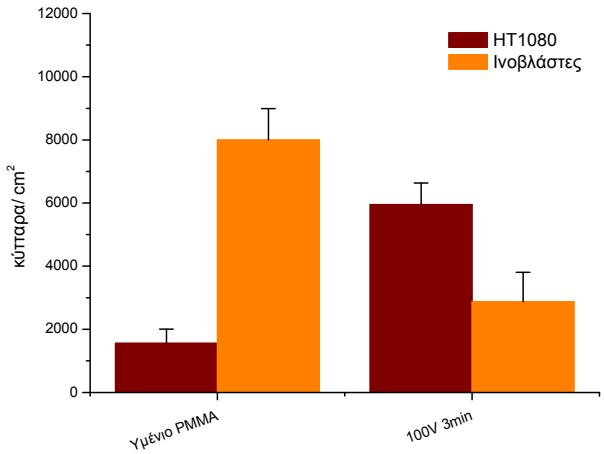
Σχήμα 6.14: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού συγκαλλιέργειας καρκινικών κυττάρων (HT1080) και φυσιολογικών ινοβλαστών για (α) μία μέρα και (β) 3 μέρες καλλιέργειας σε (I) ακατέργαστο υμένιο PMMA και (II) κατεργασμένη επιφάνεια με 100 Volt για 3 λεπτά και θερμοκρασία του ηλεκτροδίου 15°C. Με κόκκινο βέλος υποδεικνύονται καρκινικά κύτταρα της σειράς HT1080 και με κίτρινο οι φυσιολογικοί ινοβλάστες

Από την επεξεργασία των εικόνων προκύπτουν τα ραβδογράμματα του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων και των φυσιολογικών ινοβλαστών στις μη κατεργασμένες και στις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες με δυναμικό αυτοπόλωσης 100 volt για χρόνο 3 λεπτά, για θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15°C και για χρόνο καλλιέργειας μία και τρεις ημέρες. Παρόλο

που οι φυσιολογικοί ινοβλάστες είναι σε μεγάλη περίσσεια στο αρχικό μίγμα κυττάρων μέσω της κατεργασμένης με πλάσμα επιφάνειας μας δίνεται η δυνατότητα σημαντικής ενίσχυσης προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων μια και όπως προκύπτει από την καταμέτρηση (σχήμα 6.15) ο λόγος των καρκινικών προς τα φυσιολογικά κύτταρα αυξάνεται από 1,6 που είναι μετά από μια μέρα καλλιέργειας σε 2,1 μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο προσκολλώνται πολύ περισσότερο στην επιφάνεια αλλά και αναπτύσσονται.



α)



β)

Σχήμα 6.15: Μέσος αριθμός προσκολλημένων φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσδιορίστηκε για τη μη κατεργασμένη (flat) καθώς και την κατεργασμένη με πλάσμα O_2 επιφάνεια PMMA με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά και θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C για χρόνο καλλιέργειας μία και τρεις μέρες.

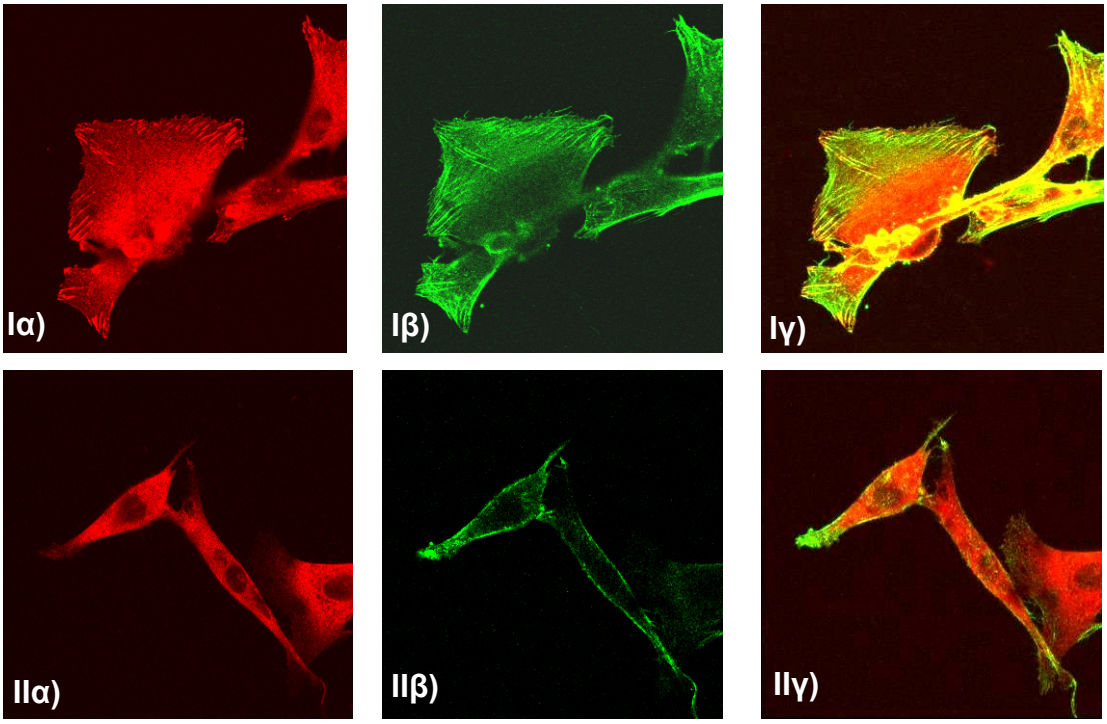
Αντίθετα, η μη κατεργασμένη με πλάσμα επιφάνεια PMMA ευνοεί την προσκόλληση και ανάπτυξη των φυσιολογικών ινοβλαστών έναντι των καρκινικών, ενώ ο λόγος διαχωρισμού των καρκινικών προς τα φυσιολογικά κύτταρα δεν μεταβάλλεται σημαντικά μια και μετά από μια μέρα καλλιέργειας είναι 0,37 και μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας είναι 0,19. Από τα αποτελέσματα είναι φανερή η διαφορετική επίδραση της νανοδόμησης στην προσκόλληση των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων.

6.8 Μελέτη σχηματισμού εστιακών επαφών μέσω ανίχνευσης της συσσωρευμένης βινκουλίνης

Με σκοπό την μελέτη της σταθερότητας της προσκόλλησης τόσο των φυσιολογικών ινοβλαστών όσο και των καρκινικών κυττάρων της σειράς HT-1080 στις μη κατεργασμένες επιφάνειες PMMA καθώς και στις επιφάνειες που είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα οξυγόνου με δυναμικό αυτοπόλωσης 100 V για χρόνο 3 λεπτά, σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15^{o}C, έγινε μελέτη των δημιουργούμενων εστιακών επαφών μεταξύ κυττάρου και επιφάνειας. Η επιλογή των συγκεκριμένων επιφανειών έγινε προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της πιο ακραίας νανοδόμησης, αλλά ταυτόχρονα και αυτής με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων σε μεγαλύτερο βαθμό, σε σχέση με την αντίστοιχη ακατέργαστη επιφάνεια. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.9.1 για χρόνο καλλιέργειας δύο μέρες. Η πυκνότητα των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις ήταν 80.000 κύτταρα/ ml. Ακολούθησε ανοσοκυτταρολογία με επώαση των προσκολλημένων κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της βινκουλίνης σε συγκέντρωση 10 μg/ml για 1,5 ώρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν με μίγμα φαλοϊδίνης επισημασμένης με Atto 488 σε συγκέντρωση 100 nM και αντισώματος κατά των γ-σφαιρινων ποντικού επισημασμένο με φθορίζουσα CF-555 σε συγκέντρωση 10 μg/ml για 1,5 ώρα, προς χρώση της F- ακτίνης και της βινκουλίνης, αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα δείγματα παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών.

6.8.1 Φυσιολογικοί ινοβλάστες

Στο σχήμα 6.16 παρουσιάζονται εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από φυσιολογικούς ινοβλάστες μετά από καλλιέργεια 2 ημερών στις προαναφερθείσες επιφάνειες. Με κόκκινη χρώση απεικονίζεται η βινκουλίνη και με πράσινη η F-ακτίνη. Στη μη κατεργασμένη-επίπεδη επιφάνεια (σχήμα 6.16 Ια) παρατηρείται συσσώρευση και εντοπισμός της βινκουλίνης στα σημεία που το κύτταρο αλληλεπιδρά με την επιφάνεια. Στα ίδια σημεία παρατηρείται συσσώρευση των ινών F-ακτίνης (σχήμα 6.16 Ιβ), κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς η F-ακτίνη προσδένεται μεταξύ άλλων πρωτεϊνών στην βινκουλίνη προς σχηματισμό των ώριμων εστιακών επαφών. Αντίθετα, στην κατεργασμένη επιφάνεια με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά, δεν παρατηρείται συσσώρευση της βινκουλίνης αλλά είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 6.16 IIα) ενώ ταυτόχρονα και η ακτίνη δεν είναι τόσο έντονη όσο στη μη κατεργασμένη επιφάνεια (σχήμα 6.16 IIβ). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι στη μη κατεργασμένη επιφάνεια οι φυσιολογικοί ινοβλάστες προσκολλώνται ισχυρότερα στην επιφάνεια μέσω των δημιουργούμενων εστιακών επαφών σε σχέση με την τραχεία επιφάνεια, γεγονός που συμβαδίζει και με τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τα πειράματα προσκόλλησης των κυττάρων σ' αυτές τις επιφάνειες, για χρόνο καλλιέργειας 3 μέρες. Δηλαδή, οι φυσιολογικοί ινοβλάστες προσκολλώνται ισχυρά στη μη κατεργασμένη επιφάνεια, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται διατηρώντας φυσιολογική μορφολογία ενώ στη νανοδομημένη επιφάνεια προσδένονται ασθενώς με αποτέλεσμα όχι μόνο να μην πολλαπλασιάζονται, αλλά να ξεκολλάνε από την επιφάνεια, γεγονός που δικαιολογεί τον μειωμένο αριθμό προσκολλημένων κυττάρων μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας σε σχέση τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων μετά από μια μέρα καλλιέργειας.

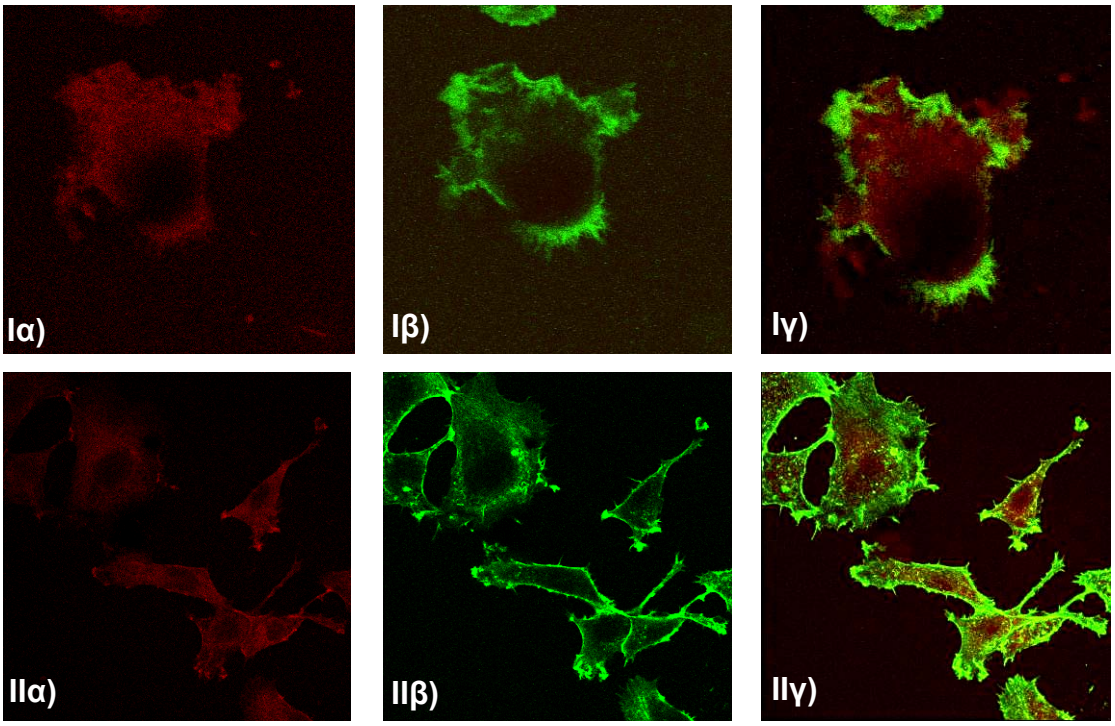


Σχήμα 6.16: Εικόνες φυσιολογικών ινοβλαστών από συνεστιακό μικροσκόπιο. Απεικόνιση: (α) της βινκουλίνης, (β) της f- ακτίνης (ίδια τομή του κυττάρου) και (γ) συνδυασμού και των δύο (συνολικό κύτταρο) όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε (Ι) μη κατεργασμένη επιφάνεια και (ΙΙ) κατεργασμένη επιφάνεια με πλάσμα O_2 με δυναμικό 100 V για 3 λεπτά.

6.8.2 Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT-1080)

Στο σχήμα 6.17 παρουσιάζονται εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα μετά από καλλιέργεια 2 ημερών στις μη κατεργασμένες και στις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά, επιφάνειες. Με κόκκινη χρώση απεικονίζεται η βινκουλίνη και με πράσινη η F-ακτίνη. Τόσο στη μη κατεργασμένη, όσο και στην κατεργασμένη με πλάσμα επιφάνεια η χρώση της βινκουλίνης είναι πολύ ασθενής (σχήμα 6.17 Ια και ΙΙα), η πρωτεΐνη βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και δεν παρατηρείται συσσώρευσή της στα σημεία επαφής του κυττάρου με την επιφάνεια. Συγκρίνοντας όμως τις εικόνες Ιβ και ΙΙβ του σχήματος 6.17 παρατηρείται ότι στην περίπτωση της προσκόλλησης του κυττάρου στην κατεργασμένη με πλάσμα επιφάνεια (σχήμα 6.17 ΙΙβ) υπάρχει

μεγαλύτερη συσσώρευση F-ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου σε σχέση με την επίπεδη επιφάνεια PMMA (σχήμα 6.17 Ιβ), γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στη δημιουργία εστιακών επαφών. Η δημιουργία περισσότερων εστιακών επαφών στην περίπτωση της τραχιάς επιφάνειας σε σχέση με την επίπεδη επιφάνεια PMMA συμβαδίζει με το γεγονός ότι ο αριθμός των προσκολλημένων καρκινικών κυττάρων στην τραχεία επιφάνεια είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με την επίπεδη.



Σχήμα 6.17: Εικόνες καρκινικών κυττάρων HT1080 από συνεστιακό μικροσκόπιο. Απεικόνιση: (α) της βινκουλίνης, (β) της F-ακτίνης και (γ) συνδυασμού και των δύο όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε (Ι) μη κατεργασμένη επιφάνεια και (ΙΙ) κατεργασμένη επιφάνεια με πλάσμα O_2 με δυναμικό 100 V για 3 λεπτά. Η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση είναι 60Χ.

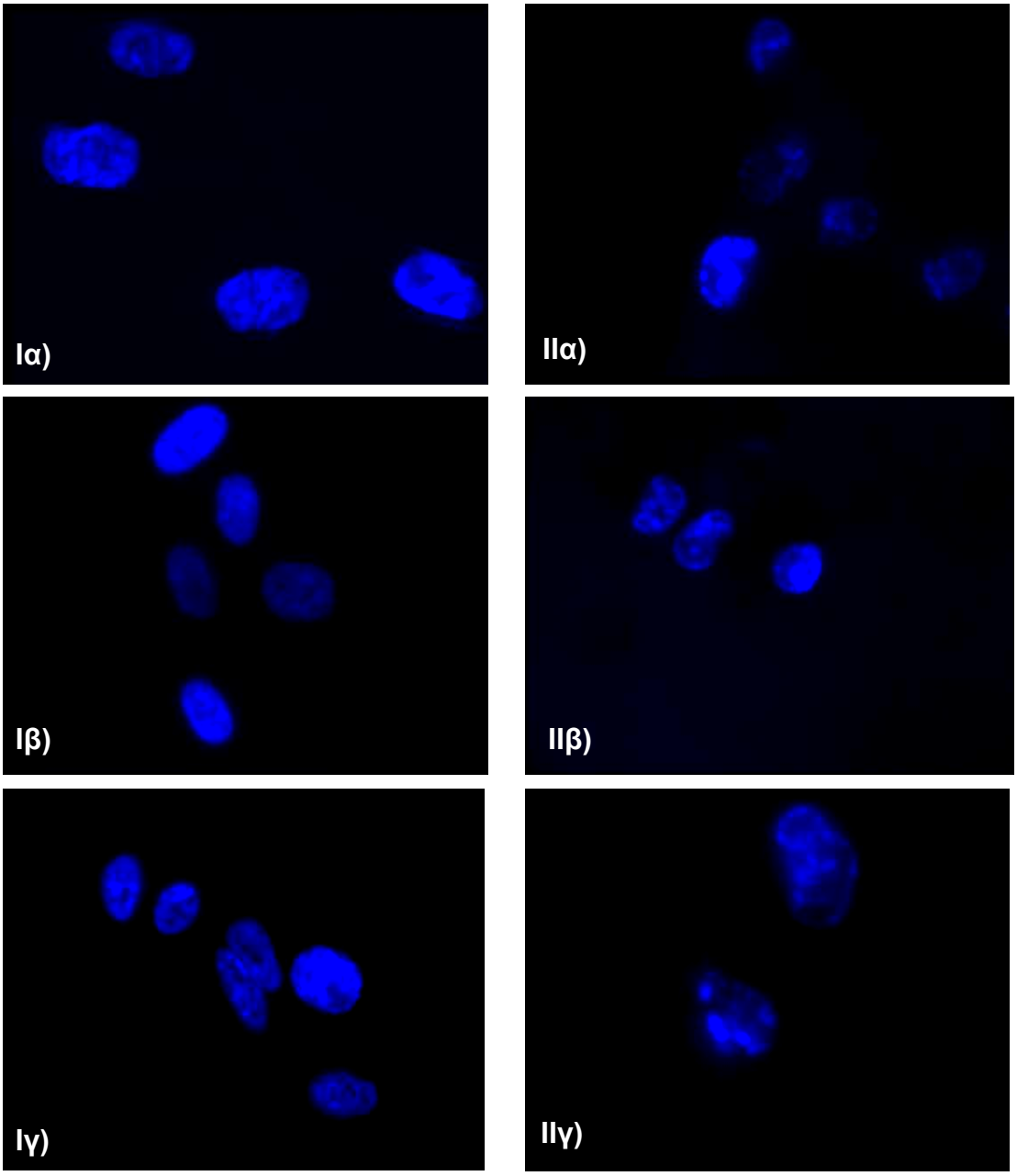
6.9 Έλεγχος απόπτωσης των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων στις επιφάνειες

Με σκοπό να διερευνηθεί αν ο λόγος που παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των προσκολλημένων φυσιολογικών ινοβλαστών μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας στην πολύ τραχεία επιφάνεια (100 Volt 3 λεπτά) ήταν η

απόπτωση, έγινε έλεγχος της ύπαρξης αποπτωτικών σωματίων στους πυρήνες των κυττάρων αυτών. Συγκεκριμένα, έγινε διερεύνηση της ύπαρξης αποπτωτικών πυρήνων τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων στις μη κατεργασμένες επιφάνειες και στις επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά. Αναλυτικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.9.2 για χρόνο καλλιέργειας 3 ημέρες και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των μισών δειγμάτων με σταυροσπορίνη για 12 ώρες (Εδάφιο 5.11). Έπειτα, έγινε χρώση των πυρήνων με DAPI σε συγκέντρωση 100 ng/ ml, όπως περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.9.2 και οι πυρήνες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Όπως προαναφέρθηκε, η σταυροσπορίνη είναι μία ουσία η οποία οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση, ως εκ τούτου τα δείγματα που επωάστηκαν με αυτή, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα κύτταρα αποπίπτουν καλλιεργούμενα στις επιφάνειες

6.9.1 Φυσιολογικοί ινοβλάστες

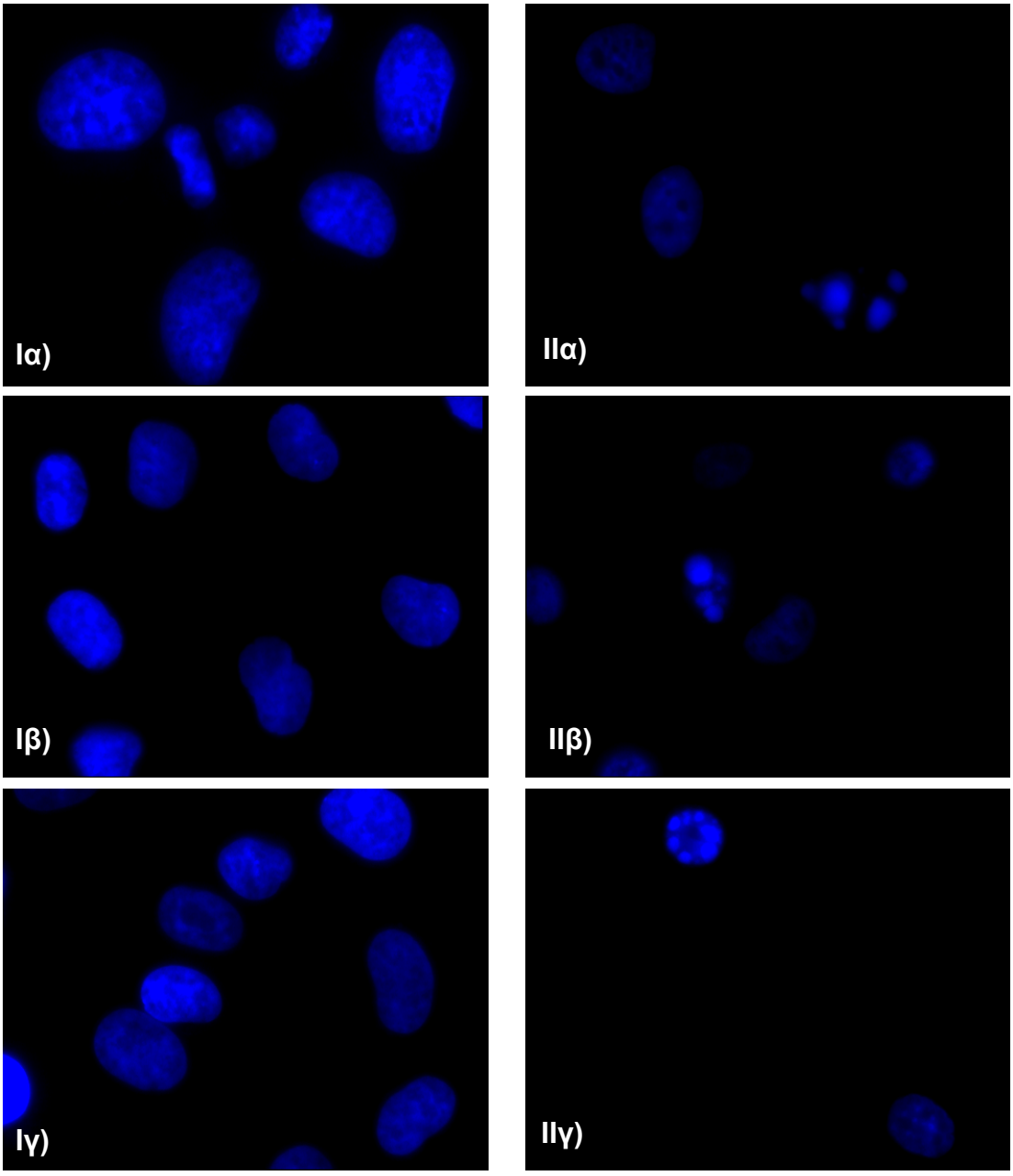
Στο σχήμα 6.18 απεικονίζονται οι πυρήνες των φυσιολογικών ινοβλαστών με και χωρίς επώαση τους με σταυροσπορίνη για 12 ώρες στις υπό εξέταση επιφάνειες. Διαπιστώνεται ότι δεν παρατηρούνται αποπτωτικά σωμάτια στους πυρήνες των κυττάρων σε καμία από τις επιφάνειες στις οποίες δεν είχε γίνει επώαση με σταυροσπορίνη (σχήμα 6.18 Ια-Ιγ),. Υπάρχουν περιοχές οι οποίες είναι πιο φωτεινές, αλλά αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το DAPI προσδένεται ισχυρότερα στην ευχρωματίνη σε σχέση με την ετεροχρωματίνη. Αντίθετα, στις επιφάνειες που έγινε επώαση με σταυροσπορίνη (σχήμα 6.18 IIα-IIγ), είναι ξεκάθαρος ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων. Από τα ανωτέρω αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι η μείωση του αριθμού των προσκολλημένων μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας κυττάρων πάνω στην περισσότερο νανοδομημένη επιφάνεια δεν οφείλεται σε απόπτωση τους .



Σχήμα 6.18: Εικόνες πυρήνων φυσιολογικών ινοβλαστών σε: (α) μη κατεργασμένη επιφάνεια, (β) επιφάνεια κατεργασμένη με 0Volt για 3 δευτερόλεπτα και (γ) επιφάνεια κατεργασμένη με 100 Volt για 3 λεπτά, (Ι) χωρίς σταυροσπορίνη και (ΙΙ) μετά από επώαση για 12 ώρες με σταυροσπορίνη. Η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση είναι 100Χ.

6.9.2 Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από ινοσάρκωμα (καρκινική σειρά HT-1080)

Στο σχήμα 6.19 απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων της καρκινικής σειράς HT1080 με και χωρίς επώαση των κυττάρων με σταυροσπορίνη για 12 ώρες στις υπό εξέταση επιφάνειες. Όπως προκύπτει από την σύγκριση των εικόνων με (σχήμα 6.19 IIα-IIγ) και χωρίς σταυροσπορίνη (σχήμα 6.19 Iα-Iγ) οι επιφάνειες PMMA είτε είναι επίπεδες είτε νανονοδομημένες δεν οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση μια και δεν παρατηρείται σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων όπως στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν επωασθεί με σταυροσπορίνη.



Σχήμα 6.19: Εικόνες πυρήνων καρκινικών κυττάρων της σειράς HT1080 σε: (α) μη κατεργασμένη επιφάνεια, (β) επιφάνεια κατεργασμένη με 0Volt για 3 δευτερόλεπτα και (γ) επιφάνεια κατεργασμένη με 100 Volt για 3 λεπτά, (I) χωρίς σταυροσπορίνη και (II) μετά από επώαση για 12 ώρες με σταυροσπορίνη. Η χρησιμοποιούμενη μεγέθυνση είναι 100X.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι λειτουργίες των κυττάρων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη μικροτοπογραφία των επιφανειών στις οποίες αναπτύσσονται, όταν καλλιεργούνται in vitro. Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι και η νανοτοπογραφία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την οργάνωση και τις λειτουργίες των κυττάρων. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η κλίμακα των νανομέτρων συμπίπτει με το μέγεθος πολλών λειτουργικών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης και των σημείων εστιακής προσκόλλησης. Έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τους παράγοντες της τοπογραφίας που μπορούν να επηρεάσουν την συμπεριφορά των κυττάρων όπως το ύψος, το μέγεθος, το πλάτος, το σχήμα και η οργάνωση των χαρακτηριστικών δομών. Αυτές οι καθορισμένες δομές κατασκευάζονται στα υποστρώματα με λιθογραφικές κυρίως μεθόδους όπως: η λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων, η λιθογραφία κολλοειδών σωματιδίων και η λιθογραφία νανοσφράγισης εν θερμώ. Πρόσφατες μελέτες αναφέρονται στην επίδραση τυχαίας νανοδόμησης, η οποία επιτυγχάνεται με εγχάραξη πολυμερικών επιφανειών με πλάσμα αερίων, στην προσκόλληση και τις λειτουργίες των κυττάρων. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται πιο συχνά στη βιβλιογραφία, αλλά και στην παρούσα εργασία ως υπόστρωμα για την εκτέλεση αυτών των πειραμάτων είναι ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA), λόγω της βιοσυμβατότητάς του. Έχει βρεθεί ότι η κατεργασία των επιφανειών με πλάσμα έχει θετική επίδραση στην προσκόλληση των κυττάρων, είτε αυτά είναι καρκινικά είτε φυσιολογικά, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της προσρόφησης των πρωτεϊνών του θρεπτικού υλικού που παρατηρείται στις κατεργασμένες σε σχέση με τις μη κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/ Ανοσοαισθητήρων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Πλάσματος, του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» και αφορά την προσκόλληση και την ανάπτυξη αθανατοποιημένων ινοβλαστών ποντικού 3T3 σε υμένια PMMA, επιστρωμένα σε δισκία πυριτίου, που είχαν υποστεί

κατεργασία με πλάσμα O_2. Ενώ για μία μέρα καλλιέργειας παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός προσκολλημένων κυττάρων στην πολύ τραχειά (κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα) επιφάνεια και μειωμένος αριθμός στη μη κατεργασμένη επιφάνεια, για τρεις μέρες καλλιέργειας η συμπεριφορά των κυττάρων αναστράφηκε με το μεγαλύτερο αριθμό να προσκολλάται στη μη κατεργασμένη επιφάνεια.

Λόγω των εξαιρετικά ενδιαφερόντων αποτελεσμάτων της προαναφερθείσας μελέτης αλλά και του γενικότερου ενδιαφέροντος για την μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων σε ειδικά διαμορφωμένες επιφάνειες τόσο για in vitro όσο και για in vivo εφαρμογές, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετάται η προσκόλληση και η βιωσιμότητα φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ινοσάρκωμα σε επιφάνειες PMMA, οι οποίες κατεργάζονται σε πλάσμα O_2. Για την παρασκευή των επιφανειών εφαρμόστηκαν διαφορετικές συνθήκες πλάσματος ώστε να δημιουργηθούν νανοδομές, οι οποίες διέφεραν ως προς το ύψος, την οργάνωση και την περιοδικότητα και καλλιεργήθηκαν τα προαναφερθέντα είδη κυττάρων, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της νανοτοπογραφίας στην προσκόλληση αλλά και την ανάπτυξη κυττάρων με διαφορετικές ιδιότητες.

Αρχικά, έγινε επίστρωση δισκίων πυριτίου με διάλυμα PMMA 25%, προκειμένου να αποτεθεί σε αυτά υμένιο πάχους 7,5 μm. Τα υμένια αυτά έπειτα υπέστησαν κατεργασία με πλάσμα O_2 σε θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15 ^oC και 65 ^oC, για διαφορετικές τιμές δυναμικού αυτοπόλωσης (0 Volt εώς 100 Volt) και για διαφορετικούς χρόνους κατεργασίας (3 δευτερόλεπτα, 1 λεπτό και 3 λεπτά). Ακολούθησε χαρακτηρισμός των δημιουργούμενων νανοδομών στην επιφάνεια με χρήση μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων καθώς και μικροσκοπίου ατομικής δύναμης. Προέκυψε ότι η τραχύτητα των επιφανειών αυξάνεται με αύξηση του δυναμικού αυτοπόλωσης και του χρόνου κατεργασίας. Όταν οι επιφάνειες κατεργάζονται με δυναμικό 0 Volt οι δομές τους χαρακτηρίζονται από τάξη και περιοδικότητα, ενώ όταν εφαρμόζεται τάση στο ηλεκτρόδιο οι δομές που δημιουργούνται είναι αιχμηρές, ογκώδεις και ακανόνιστες. Επιπροσθέτως, οι νανοδομές φαίνεται να συναθροίζονται με την αυξανόμενη κατεργασία στο πλάσμα με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα πορώδες υλικό για τις κατεργασίες που έχουν διάρκεια 3 λεπτών. Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας του ηλεκτροδίου στις παραγόμενες

δομές, φαίνεται ότι αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της οξύτητας των κορυφών γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε υπέρβαση της θερμοκρασίας του ηλεκτροδίου και επομένως σε πιθανή τήξη του πολυμερούς στους 65^{o}C, καθώς η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του PMMA είναι 105^{o}C. Παράλληλα, μελετήθηκε η μεταβολή της υδροφιλικότητας καθώς και η γήρανση των διαφορετικά κατεργασμένων με πλάσμα O_2 επιφανειών και διαπιστώθηκε μείωση της γωνίας επαφής και καθυστέρηση της γήρανσης με αύξηση του δυναμικού αυτοπόλωσης και του χρόνου κατεργασίας.

Όπως προαναφέρθηκε, οι επιφάνειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της νανοτοπογραφίας στη συμπεριφορά φυσιολογικών ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων της σειράς HT1080. Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η μεταβολή που προκλήθηκε από τη νανοδόμηση στην προσκόλληση και την επιβίωση των δύο ειδών κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι στο μη κατεργασμένο υμένιο PMMA οι καρκινικοί ινοβλάστες προσκολλώνται ελάχιστα σε σχέση με τα κατεργασμένα υμένια. Επίσης, το μη κατεργασμένο υμένιο PMMA είναι η μοναδική επιφάνεια στην οποία προσκολλώνται περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα από ότι καρκινικά, τόσο για μία όσο και για τρεις μέρες καλλιέργειας. Αναλυτικότερα, οι καρκινικοί ινοβλάστες στις επιφάνειες που έχουν ενδιάμεση τραχύτητα (0 Volt για 1 λεπτό, 25 Volt για 1 λεπτό, 50 Volt για 1λεπτό, 75 Volt για 1 λεπτό) προσκολλώνται περίπου στον ίδιο βαθμό με μικρές διακυμάνσεις, ενώ εμφανίζεται μικρή αύξηση του αριθμού των κυττάρων στις πολύ τραχείες επιφάνειες (100 Volt για 1 και 3 λεπτά), για χρόνο καλλιέργειας μία ημέρα. Ανάλογη συμπεριφορά για το ίδιο διάστημα καλλιέργειας, παρουσιάζουν και οι φυσιολογικοί ινοβλάστες. Μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για τρεις ημέρες στις επιφάνειες, παρατηρείται αναστροφή της συμπεριφοράς των φυσιολογικών ινοβλαστών συγκριτικά με την πρώτη μέρα, καθώς σημειώνεται σταδιακή πτώση του πληθυσμού τους στις κατεργασμένες επιφάνειες με δυναμικό >75 Volt, με αποτέλεσμα η επιφάνεια των 100 V για 3 λεπτά, η οποία στη μία μέρα είχε τους περισσότερους ινοβλάστες, πλέον να έχει τους λιγότερους. Από την άλλη μεριά, τα καρκινικά κύτταρα έχουν σχεδόν την ίδια συμπεριφορά με τη μία μέρα, με τη διαφορά ότι παρουσιάζεται μεγάλη αύξηση του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων στις κατεργασμένες επιφάνειες με 100 volt για 3 λεπτά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η αυξημένη

προσκόλληση τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων στην επιφάνεια η οποία έχει υποστεί κατεργασία με 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και για τους δύο χρόνους καλλιέργειας. Παράλληλα, διαπιστώνεται ότι η θερμοκρασία του ηλεκτροδίου δεν επηρεάζει σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων.

Η μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των δύο ειδών κυττάρων στις προαναφερθείσες επιφάνειες, έδειξε ότι δεν ευνοείται η ανάπτυξη των φυσιολογικών ινοβλαστών στις κατεργασμένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες με δυναμικό 100 Volt για χρόνο 3 λεπτά, καθώς ο ρυθμός τους είναι μικρότερος της μονάδας. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα στις ίδιες επιφάνειες πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορο ρυθμό. Στις υπόλοιπες συνθήκες τα δύο είδη κυττάρων πολλαπλασιάζονται με παρόμοιο ρυθμό. Λόγω της μεγάλης διαφοράς που παρατηρείται στις κατεργασμένες επιφάνειες με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά, σχετικά με την προσκόλληση των κυττάρων στις 3 μέρες καλλιέργειας καθώς και με το ρυθμό πολλαπλασιασμού, προκύπτει ότι σε αυτές τις επιφάνειες μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός των καρκινικών από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται τόσο από το λόγο διαχωρισμού των δύο ειδών κυττάρων, ο οποίος είναι περίπου 35, όσο και από πειράματα συγκαλλιέργειας των δύο ειδών κυττάρων.

Στα πειράματα συγκαλλιέργειας που πραγματοποιήθηκαν ο λόγος των φυσιολογικών ινοβλαστών προς τα καρκινικά κύτταρα ήταν 10:1 και επαληθεύτηκε η ικανότητα της κατεργασμένης επιφάνειας όσον αφορά την ενίσχυση της προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων. Παρόλο που οι φυσιολογικοί ινοβλάστες ήταν σε μεγάλη περίσσεια στο αρχικό μίγμα, ο λόγος των καρκινικών προς τα φυσιολογικά κύτταρα αυξήθηκε από 1,6 μετά από μια μέρα καλλιέργειας σε 2,1 μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας. Αντίθετα, η μη κατεργασμένη με πλάσμα επιφάνεια PMMA ευνοεί την προσκόλληση και ανάπτυξη των φυσιολογικών ινοβλαστών έναντι των καρκινικών, ενώ ο λόγος διαχωρισμού των καρκινικών προς τα φυσιολογικά κύτταρα δεν μεταβάλλεται σημαντικά μια και μετά από μια μέρα καλλιέργειας είναι 0,37 και μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας είναι 0,19.

Μία άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η επίδραση της νανοτοπογραφίας στη μορφολογία των κυττάρων. Οι επιφάνειες που

επιλέχθηκαν ήταν αυτές που είχαν υποστεί κατεργασία με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά, καθώς και αυτές που είχαν κατεργαστεί με 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα. Ως επιφάνειες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν μη κατεργασμένα υμένια PMMA και καλυπτρίδες. Διαπιστώθηκε ότι τόσο το κυτταρόπλασμα όσο και η επιφάνεια του πυρήνα των καρκινικών κυττάρων δεν επηρεάζονται ούτε από τη νανοδόμηση ούτε από το υλικό των επιφανειών, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα έχουν την ίδια μορφολογία με αυτή που παρουσιάζουν όταν καλλιεργούνται σε καλυπτρίδες. Από την άλλη μεριά, η εξάπλωση των φυσιολογικών ινοβλαστών μπορεί να μην επηρεάζεται από το υλικό στο οποίο καλλιεργούνται, επηρεάζεται, όμως, σε μεγάλο βαθμό από τη νανοτογραφία των επιφανειών. Αναλυτικά, στις επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία με 100 Volt για 3 λεπτά, το κυτταρόπλασμα παραμορφώνεται αλλά και ο πυρήνας συρρικνώνεται σημαντικά σε σχέση με τις υπόλοιπες επιφάνειες. Συγκεκριμένα, η επιφάνεια του πυρήνα μειώνεται σε 130 μm^2 από περίπου 200 μm^2, που καταλαμβάνει τόσο στην καλυπτρίδα όσο και στις υπόλοιπες υπό εξέταση επιφάνειες PMMA.

Επιπλέον, μελετήθηκε η σταθερότητα της προσκόλλησης τόσο των φυσιολογικών ινοβλαστών όσο και των καρκινικών κυττάρων της σειράς HT-1080 μέσω προσδιορισμού της βινκουλίνης στα σημεία εστιακών επαφών, μετά από καλλιέργεια δύο ημερών στη μη κατεργασμένη επιφάνεια, καθώς και στην επιφάνεια με την πιο ακραία νανοδόμηση (100 Volt για 3 λεπτά). Όσον αφορά τους φυσιολογικούς ινοβλάστες, στη μη κατεργασμένη επιφάνεια παρατηρείται συσσώρευση και εντοπισμός της βινκουλίνης με ταυτόχρονη συσσώρευση των ινών F-ακτίνης στα σημεία που το κύτταρο αλληλεπιδρά με την επιφάνεια, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς η F-ακτίνη προσδένεται μεταξύ άλλων πρωτεϊνών στην βινκουλίνη προς σχηματισμό των ώριμων εστιακών επαφών. Αντίθετα, στην κατεργασμένη επιφάνεια με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά, η βινκουλίνη είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα ενώ η ακτίνη δεν είναι τόσο έντονη όσο στη μη κατεργασμένη επιφάνεια. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι στη μη κατεργασμένη επιφάνεια οι φυσιολογικοί ινοβλάστες προσκολλώνται ισχυρότερα μέσω των δημιουργούμενων εστιακών επαφών σε σχέση με την τραχιά επιφάνεια, γεγονός που συμβαδίζει με τη μείωση του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων μετά από τρεις μέρες καλλιέργειας σε σχέση με αυτόν μετά από μια

μέρα καλλιέργειας. Αντίθετα, στα καρκινικά κύτταρα η βινκουλίνη βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και δεν παρατηρείται συσσώρευσή της στα σημεία επαφής του κυττάρου με την επιφάνεια, σε καμία από τις επιφάνειες. Ωστόσο, στην κατεργασμένη επιφάνεια υπάρχει μεγαλύτερη συσσώρευση F-ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου σε σχέση με την επίπεδη επιφάνεια PMMA, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στη δημιουργία εστιακών επαφών και εξηγεί τον πολύ μεγάλο αριθμό προσκολλημένων κυττάρων στην τραχιά επιφάνεια. Η πολύ ασθενής χρώση της βινκουλίνης θα μπορούσε επίσης να υποδηλώσει ότι στον συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, η βινκουλίνη δεν είναι η βασική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο σχηματισμό των εστιακών επαφών.

Μία τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η ύπαρξη αποπτωτικών πυρήνων τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα στις μη κατεργασμένες επιφάνειες και στις επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία με δυναμικό 0 Volt για 3 δευτερόλεπτα και με δυναμικό 100 Volt για 3 λεπτά. Σα θετικοί μάρτυρες απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία είχαν επωαστεί με σταυροσπορίνη, μία ουσία η οποία οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Αποπτωτικοί πυρήνες, όμως, δε βρέθηκαν ούτε στους φυσιολογικούς ινοβλάστες που είχαν καλλιεργηθεί στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες με δυναμικό 100 Volt για χρόνο 3 λεπτά. Οπότε, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η απόπτωση δεν είναι ο λόγος που μειώνονται τα φυσιολογικά κύτταρα μετά από καλλιέργεια τριών ημερών στις πολύ τραχιές επιφάνειες.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	**Ελληνικός Όρος**
Actin filaments	Νημάτια ακτίνης
Atomic Force Microscopy	Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης
Backscattered electron image	Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια
Bias	Δυναμικό αυτοπόλωσης
Colloidal lithography	Λιθογραφία κολλοειδών σωματιδίων
Contact angle	Γωνία επαφής
Dip pen nanolithography	Νανολιθογραφία με χρήση ακίδας
e-beam lithography	Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων
Electrospinning	Ηλεκτρική περιστροφή
Epidermal growth factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EUV Lithography	Λιθογραφία ακραίου υπεριώδους
Extracellular matrix	Εξωκυττάρια μήτρα
Fibrin	Φιμπρίνη
Fibroblast growth factor 2	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 2
Fibronectin	Φιμπρονεκτίνη
Filopodia	Φιλοπόδια
Focal adhesion points	Εστιακά σημεία πρόσφυσης
Hot embossing	Σφράγιση «εν θερμώ»
Hot plates	Θερμαινόμενες πλάκες
Integrins	Ιντεγκρίνες
Interleukin 1	Ιντερλευκίνη 1
Ion enhanced chemical etching	Χημική εγχάραξη υποβοηθούμενη από ιόντα
Lamelipodia	Ελασματοπόδια
Micro- contact printing	Αποτύπωση με μικροεπαφή
Monocyte chemotactic protein-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1
Nanoimprint lithography	Λιθογραφία νανοσφράγισης εν θερμώ
Nanomolding	Νανοσχηματοποίηση με έγχυση

Paxilin	Παξιλίνη
Percolation theory	Θεωρία ανάπτυξης συνέχειας
Platelet derived growth factor	Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια
Polycarbonate	Πολύ(ανθρακικός εστέρας)
Polydimethylsiloxane	Πολύ(διμεθυλοσιλοξάνη)
Poly(ethylene terephthalate)	Πολύ(τερεφθαλικός αιθυλενεστέρας)
Poly(methyl methacrylate)	Πολυ(μεθαρυλικός μεθυλεστέρας)
Polymer demixing	Αποανάμιξη πολυμερών
Polystyrene	Πολυστυρένιο
Propylene glycol monomethyl ether acetate	Οξικός εστέρας της μονομεθυλοαιθερο-προλυλενο γλυκόλης
Reactive stroma	Δραστικό στρώμα
Scanning Electron Microscopy	Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων
Secondary electron image	Δευτερεύοντα ηλεκτρόνια
Secreted protein acidic and rich in cysteine	Όξινη πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη
Set point	Σημείο ελέγχου
Spin casting	Χύτευση με περιστροφή
Sputtering	Ιονοβολή
Stromal derived factor-1	Προερχόμενος από τα στρωματικά κύτταρα παράγοντας-1
Talin	Ταλίνη
Tensegrity	Ακεραιότητα μέσω τάσης
Transforming growth factor-β	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β
Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων
Vinculin	Βινκουλίνη
Western Blotting	Ανοσοαποτύπωση κατά Westen

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AFM	Atomic Force Microscopy
AP-1	Activator protein 1
BEI	backscattered electron image
CA	Contact angle
C_4F_8	Octafluorocyclobutane
DAPI	4,6-Διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη
DMSO	Dimethylsulfoxide
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
eV	electron Volts
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FOXF1	Forkhead box protein F1
FOXP1	Forkhead box protein P1
IL-1	Interleukin 1
LB	Υμένια Langmuir- Blodgett
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCP1	Monocyte chemotactic protein-1
MMPs	Matrix metalloproteinases
NF-κβ	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBrS	Polybromostyrene
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Polycarbonate
PDGF	Platelet derived growth factor
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEG	Polyethylene glycol
PET	Poly(ethylene terephthalate)
PFA	Paraformaldehyde

PGMEA	Propylene glycol monomethyl ether acetate
PLL	Poly (L-lysine)_
PLLA	Poly (L-lactic acid)
PMMA	Poly-Methyl MethAcrylate
PS	Polystyrene
RGD	Arginine- Glycine –Aspartic acid
rms	Root mean square
sccm	Standard cubic centimetres per minute
SDF1	Stromal derived factor-1
SEI	secondary electron image
SEM	Scanning Electron Microscopy
Si	Silicon
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
TEM	Transmission Electron Microscopy
TGFβ	Transforming growth factor-β
UV	Ultra violet
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt

Βιβλιογραφία

1. M.M. Stevens, J.H. George, Exploring and engineering the cell surface interface, *Science,* vol. 310, no. 5751, Nov 18, 2005, pp. 1135-1138.
2. A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, J.P. Vacanti, Microscale technologies for tissue engineering and biology, *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 103, no. 8, Feb 21, 2006, pp. 2480-2487.
3. N. Li, A. Tourovskaia, A. Folch, Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells, *Crit Rev Biomed Eng,* vol. 31, no. 5-6, 2003, pp. 423-488.
4. B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K.M. Yamada, Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk, *Nat Rev Mol Cell Biol,* vol. 2, no. 11, Nov, 2001, pp. 793-805.
5. L. Ferreira, J.M. Karp, L. Nobre, R. Langer, New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells, *Cell Stem Cell,* vol. 3, no. 2, Aug 7, 2008, pp. 136-146.
6. K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, L. Ploux, The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, *Acta Biomater,* vol. 6, no. 10, Oct, 2010, pp. 3824-3846.
7. E.A. Cavalcanti-Adam, A. Micoulet, J. Blummel, J. Auernheimer, H. Kessler, J.P. Spatz, Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly, *Eur J Cell Biol,* vol. 85, no. 3-4, Apr, 2006, pp. 219-224.
8. D.R. McClay, The role of thin filopodia in motility and morphogenesis, *Exp Cell Res,* vol. 253, no. 2, Dec 15, 1999, pp. 296-301.
9. S. Fujita, M. Ohshima, H. Iwata, Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns, *J R Soc Interface,* vol. 6 Suppl 3, no. Jun 6, 2009, pp. S269-277.
10. J.H. Wang, B.P. Thampatty, J.S. Lin, H.J. Im, Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts, *Gene,* vol. 391, no. 1-2, Apr 15, 2007, pp. 1-15.
11. G. Forgacs, On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation, *J Cell Sci,* vol. 108 (Pt 6), no. Jun, 1995, pp. 2131-2143.

12. D.E. Ingber, Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction, *Annu Rev Physiol,* vol. 59, no. 1997, pp. 575-599.
13. M.J. Dalby, Topographically induced direct cell mechanotransduction, *Med Eng Phys,* vol. 27, no. 9, Nov, 2005, pp. 730-742.
14. M.J. Dalby, M.J. Biggs, N. Gadegaard, G. Kalna, C.D. Wilkinson, A.S. Curtis, Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning, *J Cell Biochem,* vol. 100, no. 2, Feb 1, 2007, pp. 326-338.
15. M.T. Frey, I.Y. Tsai, T.P. Russell, S.K. Hanks, Y.L. Wang, Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase, *Biophys J,* vol. 90, no. 10, May 15, 2006, pp. 3774-3782.
16. F.J. Alenghat, D.E. Ingber, Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins, *Sci STKE,* vol. 2002, no. 119, Feb 12, 2002, pp. pe6.
17. M.J. Dalby, D. Pasqui, S. Affrossman, Cell response to nano-islands produced by polymer demixing: a brief review, *IEE Proc Nanobiotechnol,* vol. 151, no. 2, Apr, 2004, pp. 53-61.
18. J.Y. Lim, A.D. Dreiss, Z. Zhou, J.C. Hansen, C.A. Siedlecki, R.W. Hengstebeck, J. Cheng, N. Winograd, H.J. Donahue, The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography, *Biomaterials,* vol. 28, no. 10, Apr, 2007, pp. 1787-1797.
19. J.Y. Lim, J.C. Hansen, C.A. Siedlecki, J. Runt, H.J. Donahue, Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces, *J R Soc Interface,* vol. 2, no. 2, Mar 22, 2005, pp. 97-108.
20. A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates, *J Cell Sci,* vol. 116, no. Pt 10, May 15, 2003, pp. 1881-1892.
21. W.A. Loesberg, J. te Riet, F.C. van Delft, P. Schon, C.G. Figdor, S. Speller, J.J. van Loon, X.F. Walboomers, J.A. Jansen, The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion, *Biomaterials,* vol. 28, no. 27, Sep, 2007, pp. 3944-3951.
22. M.J. Biggs, R.G. Richards, N. Gadegaard, R.J. McMurray, S. Affrossman, C.D. Wilkinson, R.O. Oreffo, M.J. Dalby, Interactions with nanoscale

topography: adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage, *J Biomed Mater Res A,* vol. 91, no. 1, Oct, 2009, pp. 195-208.

23. M.J. Biggs, R.G. Richards, N. Gadegaard, C.D. Wilkinson, R.O. Oreffo, M.J. Dalby, The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1+ enriched skeletal stem cells, *Biomaterials,* vol. 30, no. 28, Oct, 2009, pp. 5094-5103.
24. C.H. Choi, S.H. Hagvall, B.M. Wu, J.C. Dunn, R.E. Beygui, C.J.K. CJ, Cell interaction with three-dimensional sharp-tip nanotopography, *Biomaterials,* vol. 28, no. 9, Mar, 2007, pp. 1672-1679.
25. T.P. Kunzler, C. Huwiler, T. Drobek, J. Voros, N.D. Spencer, Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients, *Biomaterials,* vol. 28, no. 33, Nov, 2007, pp. 5000-5006.
26. J.M. Rice, J.A. Hunt, J.A. Gallagher, P. Hanarp, D.S. Sutherland, J. Gold, Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro, *Biomaterials,* vol. 24, no. 26, Nov, 2003, pp. 4799-4818.
27. M. Arnold, E.A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blummel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, J.P. Spatz, Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces, *Chemphyschem,* vol. 5, no. 3, Mar 19, 2004, pp. 383-388.
28. E.K. Yim, R.M. Reano, S.W. Pang, A.F. Yee, C.S. Chen, K.W. Leong, Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells, *Biomaterials,* vol. 26, no. 26, Sep, 2005, pp. 5405-5413.
29. S. Buttiglieri, D. Pasqui, M. Migliori, H. Johnstone, S. Affrossman, L. Sereni, M.L. Wratten, R. Barbucci, C. Tetta, G. Camussi, Endothelization and adherence of leucocytes to nanostructured surfaces, *Biomaterials,* vol. 24, no. 16, Jul, 2003, pp. 2731-2738.
30. A.M. Lipski, C.J. Pino, F.R. Haselton, I.W. Chen, V.P. Shastri, The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function, *Biomaterials,* vol. 29, no. 28, Oct, 2008, pp. 3836-3846.

31. S.A. Biela, Y. Su, J.P. Spatz, R. Kemkemer, Different sensitivity of human endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts to topography in the nano-micro range, *Acta Biomater,* vol. 5, no. 7, Sep, 2009, pp. 2460-2466.
32. J. Lee, B.S. Kang, B. Hicks, T.F. Chancellor, Jr., B.H. Chu, H.T. Wang, B.G. Keselowsky, F. Ren, T.P. Lele, The control of cell adhesion and viability by zinc oxide nanorods, *Biomaterials,* vol. 29, no. 27, Sep, 2008, pp. 3743-3749.
33. L. Richert, F. Vetrone, J.H. Yi, S.F. Zalzal, J.D. Wuest, F. Rosei, A. Nanci, Surface nanopatterning to control cell growth, *Advanced Materials,* vol. 20, no. 8, Apr 21, 2008, pp. 1488-+.
34. A.I. Teixeira, P.F. Nealey, C.J. Murphy, Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates, *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* vol. 71A, no. 3, Dec 1, 2004, pp. 369-376.
35. D.H. Kim, H. Lee, Y.K. Lee, J.M. Nam, A. Levchenko, Biomimetic nanopatterns as enabling tools for analysis and control of live cells, *Adv Mater,* vol. 22, no. 41, Nov 2, 2010, pp. 4551-4566.
36. T. Blattler, C. Huwiler, M. Ochsner, B. Stadler, H. Solak, J. Voros, H.M. Grandin, Nanopatterns with biological functions, *J Nanosci Nanotechnol,* vol. 6, no. 8, Aug, 2006, pp. 2237-2264.
37. H.W. Deckman, J.H. Dunsmuir, Natural Lithography, *Applied Physics Letters,* vol. 41, no. 4, 1982, pp. 377-379.
38. M.A. Wood, Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications, *J R Soc Interface,* vol. 4, no. 12, Feb 22, 2007, pp. 1-17.
39. V. Ovchinnikov, A. Malinin, S. Novikov, C. Tuovinen, Fabrication of silicon nanopillars using self-organized gold-chromium mask, *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology,* vol. 69, no. Jan 19, 2000, pp. 459-463.
40. S.M. Yang, S.G. Jang, D.G. Choi, S. Kim, H.K. Yu, Nanomachining by colloidal lithography, *Small,* vol. 2, no. 4, Apr, 2006, pp. 458-475.
41. Y.N. Xia, G.M. Whitesides, Soft lithography, *Angewandte Chemie-International Edition,* vol. 37, no. 5, Mar 16, 1998, pp. 551-575.
42. W.E. Teo, S. Ramakrishna, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology,* vol. 17, no. 14, Jul 28, 2006, pp. R89-R106.

43. T.G. Kim, T.G. Park, Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh, *Tissue Eng,* vol. 12, no. 2, Feb, 2006, pp. 221-233.
44. S. Affrossman, S.A. O'Neill, M. Stamm, Topography and surface composition of thin films of blends of polystyrene with brominated polystyrenes: Effects of varying the degree of bromination and annealing, *Macromolecules,* vol. 31, no. 18, Sep 8, 1998, pp. 6280-6288.
45. S. Affrossman, G. Henn, S.A. ONeill, R.A. Pethrick, M. Stamm, Surface topography and composition of deuterated polystyrene-poly(bromostyrene) blends, *Macromolecules,* vol. 29, no. 14, Jul 1, 1996, pp. 5010-5016.
46. S. Affrossman, M. Stamm, The effect of molecular weight an the topography of thin films of blends of poly(4-bromostyrene) and polystyrene, *Colloid and Polymer Science,* vol. 278, no. 9, Sep, 2000, pp. 888-893.
47. M.J. Dalby, S.J. Yarwood, M.O. Riehle, H.J. Johnstone, S. Affrossman, A.S. Curtis, Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands, *Exp Cell Res,* vol. 276, no. 1, May 15, 2002, pp. 1-9.
48. M.J. Dalby, D. McCloy, M. Robertson, H. Agheli, D. Sutherland, S. Affrossman, R.O. Oreffo, Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies, *Biomaterials,* vol. 27, no. 15, May, 2006, pp. 2980-2987.
49. C. Lee, D.B. Graves, M.A. Lieberman, D.W. Hess, Global-Model of Plasma Chemistry in a High-Density Oxygen Discharge, *Journal of the Electrochemical Society,* vol. 141, no. 6, Jun, 1994, pp. 1546-1555.
50. A.J. Lichtenberg, V. Vahedi, M.A. Lieberman, T. Rognlien, Modeling Electronegative Plasma Discharges, (Vol 75, Pg 2339, 1994), *Journal of Applied Physics,* vol. 76, no. 1, Jul 1, 1994, pp. 625-625.
51. L.M. Dai, H.J. Griesser, A.W.H. Mau, Surface modification by plasma etching and plasma patterning, *Journal of Physical Chemistry B,* vol. 101, no. 46, Nov 13, 1997, pp. 9548-9554.
52. C. Cardinaud, M.C. Peignon, P.Y. Tessier, Plasma etching: principles, mechanisms, application to micro- and nano-technologies, *Applied Surface Science,* vol. 164, no. Sep 1, 2000, pp. 72-83.

53. M. Cornejo, B. Ziberi, C. Meinecke, D. Hirsch, J.W. Gerlach, T. Hoche, F. Frost, B. Rauschenbach, Self-organized patterning on Si(001) by ion sputtering with simultaneous metal incorporation, *Applied Physics a-Materials Science & Processing,* vol. 102, no. 3, Mar, 2011, pp. 593-599.
54. E. Gogolides, V. Constantoudis, G. Kokkoris, D. Kontziampasis, K. Tsougeni, G. Boulousis, M. Vlachopoulou, A. Tserepi, Controlling roughness: from etching to nanotexturing and plasma-directed organization on organic and inorganic materials, *Journal of Physics D-Applied Physics,* vol. 44, no. 17, May 4, 2011, pp.
55. N. Vourdas, D. Kontziampasis, G. Kokkoris, V. Constantoudis, A. Goodyear, A. Tserepi, M. Cooke, E. Gogolides, Plasma directed assembly and organization: bottom-up nanopatterning using top-down technology, *Nanotechnology,* vol. 21, no. 8, Feb 26, 2010, pp.
56. D. Kontziampasis, V. Constantoudis, E. Gogolides, Plasma Directed Organization of Nanodots on Polymers: Effects of Polymer Type and Etching Time on Morphology and Order, *Plasma Processes and Polymers,* vol. 9, no. 9, Sep, 2012, pp. 866-872.
57. J. Kijlstra, K. Reihs, A. Klamt, Roughness and topology of ultra-hydrophobic surfaces, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,* vol. 206, no. 1-3, Jul 9, 2002, pp. 521-529.
58. K. Seeger, R.E. Palmer, Fabrication of ordered arrays of silicon nanopillars, *Journal of Physics D-Applied Physics,* vol. 32, no. 24, Dec 21, 1999, pp. L129-L132.
59. K. Derwinska, L.A. Gheber, C. Preininger, A comparative analysis of polyurethane hydrogel for immobilization of IgG on chips, *Analytica Chimica Acta,* vol. 592, no. 2, Jun 5, 2007, pp. 132-138.
60. Y.C. Li, Z. Wang, L.M.L. Ou, H.Z. Yu, DNA detection on plastic: Surface activation protocol to convert polycarbonate substrates to biochip platforms, *Analytical Chemistry,* vol. 79, no. 2, Jan 15, 2007, pp. 426-433.
61. V.C. Rucker, K.L. Havenstrite, B.A. Simmons, S.M. Sickafoose, A.E. Herr, R. Shediac, Functional antibody immobilization on 3-dimensional polymeric surfaces generated by reactive ion etching, *Langmuir,* vol. 21, no. 17, Aug 16, 2005, pp. 7621-7625.

62. R.V. Lapshin, A.P. Alekhin, A.G. Kirilenko, S.L. Odintsov, V.A. Krotkov, Vacuum ultraviolet smoothing of nanometer-scale asperities of Poly(methyl methacrylate) surface, *Journal of Surface Investigation-X-Ray Synchrotron and Neutron Techniques,* vol. 4, no. 1, Feb, 2010, pp. 1-11.
63. T.J. Kaufmann, M.E. Jensen, G. Ford, L.L. Gill, W.F. Marx, D.F. Kallmes, Cardiovascular effects of polymethylmethacrylate use in percutaneous vertebroplasty, *American Journal of Neuroradiology,* vol. 23, no. 4, Apr, 2002, pp. 601-604.
64. F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C.B.V. Christensen, One-step immobilization of aminated and thiolated DNA onto poly(methylmethacrylate) (PMMA) substrates, *Lab on a Chip,* vol. 4, no. 3, 2004, pp. 191-195.
65. F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C.B.V. Christensen, Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays, *Nucleic Acids Research,* vol. 32, no. 1, Jan, 2004, pp.
66. A. Vesel, M. Mozetic, Surface modification and ageing of PMMA polymer by oxygen plasma treatment, *Vacuum,* vol. 86, no. 6, Jan 27, 2012, pp. 634-637.
67. O. Ozgen, E.A. Aksoy, V. Hasirci, N. Hasirci, Surface characterization and radical decay studies of oxygen plasma-treated PMMA films, *Surface and Interface Analysis,* vol. 45, no. 4, Apr, 2013, pp. 844-853.
68. C. Ozcan, N. Hasirci, Plasma modification of PMMA films: surface free energy and cell-attachment studies, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition,* vol. 18, no. 6, Jun, 2007, pp. 759-773.
69. J. Ahn, S.J. Son, J. Min, The control of cell adhesion on a PMMA polymer surface consisting of nanopillar arrays, *Journal of Biotechnology,* vol. 164, no. 4, Apr 15, 2013, pp. 543-548.
70. Chih-Hsin Shih, Meng-Jiy Wang, Chien-Hsing Lu, Wei-Li Yuan, Li-Qun Lai, Zong-Xin Wu, C.-J. Chang, Effect of Tetrafluoromethane Plasma Treatment of PMMA on MCF-7 Cell Proliferation, *The Open Surface Science Journal,* vol. 2, no. 2010, pp. 13-18.
71. Dimitrios Kontziampasis, Athanasia Bourkoula, Panagiota Petrou, Angeliki Tserepi, Sotirios Kakabakos, Evangelos Gogolides, Cell Array Fabrication by Plasma Nanotexturing, *Proceedings of SPIE,* vol. 8765, no. 2013, pp. 87650B 87651-87610.

72. D. Tarin, C.B. Croft, Ultrastructural features of wound healing in mouse skin, *J Anat,* vol. 105, no. Pt 1, Jul, 1969, pp. 189-190.
73. H.Y. Chang, J.T. Chi, S. Dudoit, C. Bondre, M. van de Rijn, D. Botstein, P.O. Brown, Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 99, no. 20, Oct 1, 2002, pp. 12877-12882.
74. J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown, Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol,* vol. 3, no. 5, May, 2002, pp. 349-363.
75. M. Simian, Y. Hirai, M. Navre, Z. Werb, A. Lochter, M.J. Bissell, The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells, *Development,* vol. 128, no. 16, Aug, 2001, pp. 3117-3131.
76. B.S. Wiseman, Z. Werb, Stromal effects on mammary gland development and breast cancer, *Science,* vol. 296, no. 5570, May 10, 2002, pp. 1046-1049.
77. M. Zeisberg, F. Strutz, G.A. Muller, Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis, *J Nephrol,* vol. 13 Suppl 3, no. Nov-Dec, 2000, pp. S111-120.
78. H.P. Rodemann, G.A. Muller, Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis, *Am J Kidney Dis,* vol. 17, no. 6, Jun, 1991, pp. 684-686.
79. R.M. Strieter, R. Wiggins, S.H. Phan, B.L. Wharram, H.J. Showell, D.G. Remick, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun,* vol. 162, no. 2, Jul 31, 1989, pp. 694-700.
80. R. Kalluri, M. Zeisberg, Fibroblasts in cancer, *Nat Rev Cancer,* vol. 6, no. 5, May, 2006, pp. 392-401.
81. D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell,* vol. 100, no. 1, Jan 7, 2000, pp. 57-70.
82. H.F. Dvorak, D.M. Form, E.J. Manseau, B.D. Smith, Pathogenesis of desmoplasia. I. Immunofluorescence identification and localization of some structural proteins of line 1 and line 10 guinea pig tumors and of healing wounds, *J Natl Cancer Inst,* vol. 73, no. 5, Nov, 1984, pp. 1195-1205.

83. L. Ronnov-Jessen, O.W. Petersen, M.J. Bissell, Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction, *Physiol Rev,* vol. 76, no. 1, Jan, 1996, pp. 69-125.
84. M.M. Mueller, N.E. Fusenig, Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer, *Nat Rev Cancer,* vol. 4, no. 11, Nov, 2004, pp. 839-849.
85. A. Orimo, P.B. Gupta, D.C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V.J. Carey, A.L. Richardson, R.A. Weinberg, Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, *Cell,* vol. 121, no. 3, May 6, 2005, pp. 335-348.
86. H.D. Dorfman, B. Czerniak, Bone Cancers, *Cancer,* vol. 75, no. 1, Jan 1, 1995, pp. 203-210.
87. T. Wong, J.A. McGrath, H. Navsaria, The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration, *British Journal of Dermatology,* vol. 156, no. 6, Jun, 2007, pp. 1149-1155.
88. M.J. Dalby, M.O. Riehle, H.J. Johnstone, S. Affrossman, A.S. Curtis, Nonadhesive nanotopography: fibroblast response to poly(n-butyl methacrylate)-poly(styrene) demixed surface features, *J Biomed Mater Res A,* vol. 67, no. 3, Dec 1, 2003, pp. 1025-1032.
89. M.J. Dalby, C.C. Berry, M.O. Riehle, D.S. Sutherland, H. Agheli, A.S. Curtis, Attempted endocytosis of nano-environment produced by colloidal lithography by human fibroblasts, *Exp Cell Res,* vol. 295, no. 2, May 1, 2004, pp. 387-394.
90. R. Lutz, K. Pataky, N. Gadhari, M. Marelli, J. Brugger, M. Chiquet, Nano-stenciled RGD-gold patterns that inhibit focal contact maturation induce lamellipodia formation in fibroblasts, *PLoS One,* vol. 6, no. 9, 2011, pp. e25459.
91. M.W. Karaman, S. Herrgard, D.K. Treiber, P. Gallant, C.E. Atteridge, B.T. Campbell, K.W. Chan, P. Ciceri, M.I. Davis, P.T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J.P. Hunt, D.J. Lockhart, Z.V. Milanov, M.J. Morrison, G. Pallares, H.K. Patel, S. Pritchard, L.M. Wodicka, P.P. Zarrinkar, A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity, *Nat Biotechnol,* vol. 26, no. 1, Jan, 2008, pp. 127-132.
92. S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchya, Y. Takahashi, R. Masuma, A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin.

Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization, *J Antibiot (Tokyo),* vol. 30, no. 4, Apr, 1977, pp. 275-282.

93. H.J. Chae, J.S. Kang, J.O. Byun, K.S. Han, D.U. Kim, S.M. Oh, H.M. Kim, S.W. Chae, H.R. Kim, Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts, *Pharmacol Res,* vol. 42, no. 4, Oct, 2000, pp. 373-381.