



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη Νέου Φωτοπολυμερικού Υλικού και Μεθόδου
Σχηματοποίησής του για την Κατευθυνόμενη Προσκόλληση
Κυττάρων σε Επιφάνειες**

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΟΥΡΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη Νέου Φωτοπολυμερικού Υλικού και Μεθόδου Σχηματοποίησης του για την Κατευθυνόμενη Προσκόλληση Κυττάρων σε Επιφάνειες

ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΟΥΡΤΗ

A.M.: 181004

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α΄, Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 09/10/2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται εκτενής χρήση πολυμερών ως υποστρωμάτων για κατευθυνόμενη προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων, και κυρίως των υλικών που αποτρέπουν την προσκόλληση κυττάρων. Προς την κατεύθυνση αυτή, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός νέου φωτολιθογραφικού υλικού που δεν ευνοεί την προσκόλληση των κυττάρων και το οποίο μετά την σχηματοποίηση του θα λειτουργούσε ως υπόστρωμα για την κατευθυνόμενη ανάπτυξη λείων μυϊκών κυττάρων. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστές οι κυτταροαπωθητικές ιδιότητες της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και για αυτό το λόγο συντέθηκε ένα κατά συστάδες συμπολυμερές με απαρχητή πρόδρομη ένωση της PEG και πολυ(μεθακρυλικό-2-τετραϋδροπυραυλεστέρα) (PEG-b-PHPMA). Αρχικά προσδιορίστηκε η αναλογία των δύο μονομερών που πρόσδιδε στο τελικό υλικό κυτταροαπωθητικές ιδιότητες. Για το σκοπό αυτό, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπεριώθρου (IR), ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), τέσσερα συμπολυμερή. Στη συνέχεια, αφού ελέγχθηκε η σταθερότητα των υμενίων και η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων σε αυτά, επιλέχθηκε το πολυμερές PEG₅₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 43% (β/β) PEG και 57% (β/β) PHPMA για περαιτέρω μελέτη. Αφού βελτιστοποιήθηκε η φωτολιθογραφική διαδικασία για τη σχηματοποίηση του συγκεκριμένου πολυμερούς σε δισκία πυριτίου, κατασκευάστηκαν υποστρώματα με εναλλασσόμενες γραμμικές δομές εύρους 17,5 έως 50 μm και μελετήθηκε η προσκόλληση και η ευθυγράμμιση λείων μυϊκών κυττάρων σε αυτά. Βρέθηκε ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα προσκολλώνταν και ευθυγραμμίζονταν σε μεγαλύτερο βαθμό σε επιφάνειες με γραμμικές δομές εύρους 25 και 27,5 μm για τις οποίες μελετήθηκε διεξοδικά η μορφολογία και ο πολλαπλασιασμός των προσκολλημένων κυττάρων. Διαπιστώθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες σε σχέση με την ελεύθερη επιφάνεια πυριτίου και παράλληλα αύξηση της επιμήκυνσης του κυτταροσκελετού και μείωση της επιφάνειας του πυρήνα, ευρήματα ενδεικτικά της διατήρησης του συστατικού φαινοτύπου των κυττάρων. Επομένως, το υλικό και η φωτολιθογραφική διαδικασία που αναπτύχθηκε αναμένεται να βρουν ευρεία εφαρμογή στην κατευθυνόμενη προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων με απώτερη εφαρμογή στη μηχανική ιστών.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Κυτταροαπωθητικά πολυμερικά υλικά

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: συμπολυμερές, πολυαιθυλενογλυκόλη, φωτολιθογραφία, λεία μυϊκά κύτταρα, επιλεκτική προσκόλληση

ABSTRACT

The last decades, polymers, and especially copolymers, are frequently used as substrates for the selective adhesion and growth of cells by combining materials that promote cell adhesion with in particular, cell-repellent polymeric materials. Towards this direction, the aim of the present study was the development of a new photolithographic material that does not favor cell adhesion and would, therefore, serve as a substrate for the selective growth of smooth muscle cells. Based on the well-established cell-repellent properties of polyethylene glycol, a copolymer with polyethylene glycol and poly(2-tetrahydropyranyl methacrylate) (PEG-b-PHPMA) was synthesized. At first the ratio of the two monomers that led to a cell-repellent material was determined. For this purpose, four copolymers were synthesized and characterized by IR, NMR, UV-Vis spectroscopy and size exclusion chromatography (SEC). After testing the stability of the films and the selective adhesion of cells onto them, a polymer PEG₅₀₀₀-b-PHPMA with composition of 43% (w/w) PEG and 57% (w/w) PHPMA was selected for further experimentation. The photolithographic patterning of this material was optimized and applied for the creation of substrates with linear patterns of width ranging from 17.5 to 50 μm was evaluated regarding adhesion and alignment of smooth muscle cells. It was found that the optimum line width for smooth muscle cells adhesion and alignment was between 25 and 27,5 μm . Further study of cell morphology and proliferation onto these micropatterned surfaces revealed a decrease in cell proliferation compared to plain silicon substrates. At the same time, an increase in cytoskeleton elongation and a decrease in nucleus surface area were determined; findings that indicate the preservation of cells contractile phenotype. In conclusion, a novel photolithographic material was developed, which could find wide application in guided cell adhesion and growth and finally in tissue engineering.

SUBJECT AREA: Cell-repellent polymeric materials

KEYWORDS: copolymer, polyethylene glycol, photolithography, smooth muscle cells, selective adhesion

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ	22
1.1 Γενικά	22
1.1.1 Ριζικός πολυμερισμός μεταφοράς ατόμου (ATRP)	24
1.2 Συμπολυμερή	25
1.2.1 Κατά συστάδες συμπολυμερή	27
1.3 Μέθοδοι χαρακτηρισμού	28
1.3.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών	29
1.3.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	29
1.3.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ	31
2.1 Εισαγωγή	31
2.2 Γενικά για τη λιθογραφία	32
2.3 Λιθογραφία με χρήση ελαστικών υλικών ή μαλακή λιθογραφία (soft lithography)	32
2.3.1 Εκτύπωση με μικροεπαφή (microcontact printing, μCP)	33
2.4 Λιθογραφία νανοαποτύπωσης (nanoimprint lithography)	34
2.5 Λιθογραφία με χρήση κολλοειδών σωματιδίων (colloidal lithography)	35
2.6 Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων/ιόντων/πρωτονίων (electron beam lithography /ion beam lithography/proton beam writing)	36
2.7 Φωτολιθογραφία	38
2.7.1 Τα βασικά στάδια μιας φωτολιθογραφικής διαδικασίας	39
2.7.2 Συστήματα λιθογραφίας	43
2.7.3 Πηγές έκθεσης	44
2.8 Λιθογραφικά υλικά	45
2.8.1 Συμβατικά λιθογραφικά υλικά	46

2.8.2	Υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης	47
2.9	Υποστρώματα πυριτίου	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ	
ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ	49
3.1	Εισαγωγή	49
3.1.1	Σχηματοποιημένες επιφάνειες ως υποστρώματα κυτταροκαλιεργειών για τη κατανόηση κυτταρικών λειτουργιών	49
3.1.2	Μηχανική ιστών	50
3.1.3	Κυτταρικοί βιοαισθητήρες.....	50
3.2	Προσκόλληση κυττάρων σε επιφάνειες	51
3.3	Υποστρώματα και πολυμερικά υλικά για προσκόλληση κυττάρων.....	53
3.4	Κατευθυνόμενη προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες.....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ	
ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ	65
4.1	Δομή μυϊκού ιστού.....	65
4.2	Μορφολογικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων	66
4.3	Σχηματοποίηση αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων	68
4.3.1	Στεφανιαία στεντ	69
4.4	Αλληλεπίδραση αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες.....	71
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	74
5.1	Σύνθεση του συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA	74
5.2	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	78
5.3	Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).....	80
5.4	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (GPC)	81

5.5	Τροποποίηση δισκίων πυριτίου με εναπόθεση ατμών εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS)	82
5.6	Επίστρωση υμενίων με διάλυμα PEG-b-PHPMA/ φωτοευαίσθητοποιητή σε δισκία πυριτίου	83
5.7	Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)	85
5.8	Προσδιορισμός πάχους υμενίου συμπολυμερούς με ελλειψόμετρο	86
5.9	Προσδιορισμός υδροφιλικότητας επιφανειών	88
5.10	Σχηματοποίηση επιφανειών με φωτολιθογραφία	89
5.11	Κυτταροκαλλιέργειες.....	91
5.11.1	Απόψυξη.....	93
5.11.2	Ανακαλλιέργεια	93
5.11.3	Ψύξη.....	94
5.12	Καλλιέργεια και έλεγχος προσκόλλησης κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες.....	95
5.12.1	Αποστείρωση σχηματοποιημένων επιφανειών	95
5.12.2	Καταμέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιματοκυτταρόμετρο	96
5.13	Έλεγχος προσκόλλησης κυττάρων και μελέτη μορφολογίας των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	100
6.1	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπολυμερών PEG-b-PHPMA	100
6.1.1	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	101
6.1.2	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	103
6.1.3	Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	105
6.1.4	Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)	107
6.1.5	Αξιολόγηση ομοιομορφίας και σταθερότητας υμενίου φωτοπολυμερούς.	109
6.2	Μελέτη υδροφιλικότητας των υμενίων	112
6.3	Σχηματοποίηση επιφανειών επιστρωμένων με συμπολυμερές με φωτολιθογραφία	113

6.4	Επιλογή πολυμερικού υλικού για την επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων	116
6.5	Έλεγχος επιλεκτικής προσκόλλησης κυττάρων	117
6.6	Προσδιορισμός βέλτιστων διαστάσεων δομών για την επιλεκτική ακινητοποίηση κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες.....	119
6.7	Προσδιορισμός βαθμού ευθυγράμμισης των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες	122
6.7.1	Μελέτη διατήρησης της πιστότητας συναρτήσεως του χρόνου καλλιέργειας στις επιλεχθείσες επιφάνειες.....	124
6.8	Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες..	125
6.9	Μελέτη ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων	128
6.10	Μελέτη επιλεκτικής προσκόλλησης καρκινικών κυττάρων	131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		132
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ		140
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....		142
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		145

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Γενικός μηχανισμός ελεγχόμενου ζωντανού ριζικού πολυμερισμού.....	25
Σχήμα 2: Δομές πολυμερών που μπορούν να παρασκευαστούν με ελεγχόμενο ζωντανό ριζικό πολυμερισμό.	27
Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση παραδειγμάτων αυτο-οργάνωσης συσταδικών συμπολυμερών με τη μορφή: Α) σφαιρικών μικκυλίων, Β) κυλινδρικών μικκυλίων, Γ) διπλοστιβάδων, Δ) μονοστοιβάδας σε επιφάνεια μέσω της προσρόφησης της μίας συστάδας, και Ε) νανοδομημένων υλικών με διάφορες καλά καθορισμένες δομές ανάλογα με τη σύσταση των δύο συστάδων.....	28
Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση κατασκευής δομής σε πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) (PDMS) με τη διαδικασία της μαλακής λιθογραφίας.....	33
Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων αποτύπωση σχήματος σε πολυμερικό υμένιο με εκτύπωση με μικροεπαφή.....	33
Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της λιθογραφίας νανοαποτύπωσης για αποτύπωση σχήματος σε πολυμερικό υμένιο.....	35
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της κolloειδούς λιθογραφίας για την αποτύπωση κυλινδρικών δομών σε πολυμερικό υμένιο: (α) εναπόθεση κolloειδούς μάσκας στο υπόστρωμα, (β) εγχάραξη υποστρώματος, και (γ) απομάκρυνση κolloειδούς μάσκας με υπερήχους ή με διαλύτη (lift off).....	36
Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της φωτολιθογραφίας θετικού και αρνητικού τόνου για την αποτύπωση σχήματος σε φωτοευαίσθητο υμένιο.	39
Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής μιας υδρόφιλης επιφάνειας πυριτίου σε υδρόφοβη μέσω τροποποίησης με HMDS το οποίο αυξάνει τη πρόσφυση των φωτοπολυμερικών υμενίων στο υπόστρωμα.....	40
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση των τριών διαφορετικών ειδών συστημάτων λιθογραφίας (α) με επαφή, (β) με γειτνίαση, και (γ) με προβολή.....	43
Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση κρυστάλλου πυριτίου εμπλουτισμένου με τρισθενές βόριο (αριστερά) ή πεντασθενή φωσφόρο (δεξιά).	48
Σχήμα 12: Γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ της γωνίας επαφής μιας πολυμερικής επιφάνειας και της κυτταρικής προσκόλλησης σε αυτή.....	54

Σχήμα 13: Συντακτικός τύπος του 2-βρωμοϊσοβουτυρικού εστέρα της μεθόξυ πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG bib).....	74
Σχήμα 14: Αντίδραση σύνθεσης του μακροαπαρχητή PEG bib.	74
Σχήμα 15: Συντακτικός τύπος μεθακρυλικού-2-τετραϋδροπυρανυλεστέρα (THPMA). ..	75
Σχήμα 16: Συντακτικός τύπος της N,N,N',N',N"-πενταμέθυλοδιεθυλοτριαμίνης (PMDETA).....	75
Σχήμα 17: Συντακτικός τύπος διμεθυλομεθαναμιδίου (DMF).....	75
Σχήμα 18: Συντακτικός τύπος τετραϋδροφουρανίου (THF).....	76
Σχήμα 19: Συντακτικός τύπος του διαιθυλαιθέρα (DEE).	76
Σχήμα 20: Αντίδραση σύνθεσης του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA.	76
Σχήμα 24: Σχηματική απεικόνιση διάταξης φασματογράφου NMR.	79
Σχήμα 25: Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρου FTIR με συμβολόμετρο. ..	80
Σχήμα 27: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του οργάνου που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.	82
Σχήμα 21: Συντακτικός τύπος γαλακτικού αιθυλεστέρα (EL).....	83
Σχήμα 22: Συντακτικός τύπος εξαφθοροαντιμονικού άλατος τριφαινυλοσουλφωνίου [(TPS)+(SbF6)-].....	84
Σχήμα 23: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επίστρωσης διαλύματος πολυμερούς σε δισκίο: Α) εναπόθεση πολυμερούς πάνω στο δισκίο, Β) περιστροφή με κατάλληλη ταχύτητα και Γ) θέρμανση του δισκίου με το υμένιο σε θερμαινόμενη πλάκα.....	85
Σχήμα 26: Οπτική διαδρομή για το φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού.....	86
Σχήμα 28: Σχηματική απεικόνιση της γεωμετρίας μιας ελλειψομετρικής μέτρησης.	87
Σχήμα 29: Σχηματική απεικόνιση γωνιών επαφής σταγόνας νερού σε υδρόφιλες (αριστερά) και υδρόφοβες επιφάνειες (δεξιά).....	88
Σχήμα 30: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος μέτρησης των γωνιών επαφής.	89
Σχήμα 31: Αντίδραση όξινης υδρόλυσης του εστέρα του THPMA υπό την επίδραση της UV ακτινοβολίας.....	90
Σχήμα 32: Σχηματική απεικόνιση αιματοκυτταρομέτρου Neubauer.	97

Σχήμα 33: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας-καλλιέργειας και χρώσης κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες.....	99
Σχήμα 34: Συντακτικός τύπος του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA με τα χαρακτηριστικά υδρογόνα της χημικής ένωσης.	102
Σχήμα 35: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 43-57.	102
Σχήμα 36: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 53-47.	102
Σχήμα 37: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 34-66.	103
Σχήμα 38: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 28-72.	103
Σχήμα 39: Χρωματογραφήματα από στήλη αποκλεισμού μεγεθών των συμπολυμερών (α) 43-57, (β) 53- 47, (γ) 34-66 και (δ) 28-72.	104
Σχήμα 40: Φάσματα IR των μονομερών (α) PEG με μοριακό βάρος 5000 και, (β) PTHPMA και των συμπολυμερών (γ) PEG-b-PTHPMA 43-57, (δ) PEG-b-PTHPMA 53-47, (ε) PEG-b-PTHPMA 34-66, και (στ) PEG-b-PTHPMA 28-72.....	106
Σχήμα 41: Φάσμα UV-Vis του υμενίου PEG-b-PTHPMA 43-57/φωτοευαίσθητοποιητή TPS-antimonate: (A) μετά την επίστρωση, (B) μετά από θέρμανση (PAB) στους 110° , (Γ) μετά από εμφάνιση σε διάλυμα NaOH, (Δ) μετά από αποστείρωση σε UV ακτινοβολία για 20 min και (E) μετά από εμφάνιση σε θρεπτικό υλικό για 1 ημέρα. ..	108
Σχήμα 42: Φάσμα UV-Vis του υμενίου PEG-b-PTHPMA /TPS-antimonate (A) μετά την επίστρωση, (B) μετά από θέρμανση (PAB) στους 110° , (Γ) μετά από εμφάνιση με διάλυμα NaOH, (Δ) μετά από αποστείρωση σε UV ακτινοβολία για 20 min και (E) μετά από εμφάνιση σε θρεπτικό υλικό για 1 ημέρα.	109
Σχήμα 43: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο επιφάνειας πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA 53-47 σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (α) αμέσως μετά την επίστρωση και (β) μετά από 2 ημέρες.	111
Σχήμα 44: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο επιφάνειας πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA 43-57 σε μεθανόλη.	111
Σχήμα 45: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο επιφάνειας πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA 43-57 σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (α) αμέσως μετά την επίστρωση και (β) μετά από 2 ημέρες.	112
Σχήμα 46: Καμπύλη αντίθεσης του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA 43-57.....	114

Σχήμα 47: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο σχηματοποιημένων υμενίων PEG-b-PTHPMA 43-57 σε επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 μm για χρόνους έκθεσης (α) 20 s, (β) 25 s, (γ) 30 s, και (δ) 35 s.	115
Σχήμα 48: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο υμενίων PEG-b-PTHPMA 43-57 σε επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους (α) 20 μm, (β) 25 μm, και (γ) 27,5 μm.	116
Σχήμα 49: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων μετά από καλλιέργεια για 1 ημέρα σε επιφάνειες με γραμμικές δομές πλάτους 25 μm (α) πυριτίου/PEG-b-PTHPMA 43-57 (β) πυριτίου/PEG-b-PTHPMA 34-66 και (γ) πυριτίου/PEG-b-PTHPMA 28-72. Με πράσινο και κόκκινο χρώμα απεικονίζεται ο κυτταροσκελετός έπειτα από χρώση με φαλοϊδίνη επισημασμένη με τη φθορίζουσα Atto 488 και Atto 546, αντίστοιχα ενώ με μπλε χρώμα απεικονίζεται ο πυρήνας των κυττάρων έπειτα από χρώση με DAPI.	117
Σχήμα 50: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων μετά από καλλιέργεια 1 ημέρας σε μη σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου (α) και επιφάνειες πυριτίου επιστρωμένων με διάλυμα PEG-b-PTHPMA 43-57 χωρίς φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate (β), με διάλυμα PEG-b-PTHPMA 43-57 με φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate (γ) και με διάλυμα PEG-b-PTHPMA 43-57 με φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate έπειτα από εμφάνιση σε διάλυμα NaOH (δ).	118
Σχήμα 51: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων σε σχηματοποιημένη και μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου.	119
Σχήμα 52: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων σε: (α) πυρίτιο, (β) πυρίτιο τροποποιημένο με HMDS, καθώς και σε σχηματοποιημένα υμένια PEG-b-PTHPMA 43-57 με γραμμές εύρους (γ) 17,5 μm, (δ) 20 μm, (ε) 22,5μm, (στ) 25 μm, (ζ) 27,5 μm, (η) 30 μm, και (θ) 50 μm.	121
Σχήμα 53: Αριθμός προσκολλημένων κυττάρων ανα μονάδα επιφανείας στις περιοχές πυριτίου (Si) και στις περιοχές PEG-b-PTHPMA για σχηματοποιημένα υμένια με γραμμικές δομές διαφορετικού πάχους. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.	122
Σχήμα 54: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων στην οποία απεικονίζεται η γωνία θη που σχηματίζει ο μεγάλος άξονας με τις γραμμές της σχηματοποιημένης επιφανείας.	123
Σχήμα 55: Ραβδόγραμμα πιστότητας των λείων μυϊκών κυττάρων συναρτήσει του εύρους γραμμών πυριτίου όταν έχουν καλλιεργηθεί σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με	

γραμμές εύρους 17,5 μm έως 50 μm για 24 h. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.	124
Σχήμα 56: Ραβδόγραμμα πιστότητας των λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί για 1 ημέρα (μωβ στήλες) και 3 ημέρες (κίτρινες στήλες) σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 25 μm και 27,5 μm . Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.	125
Σχήμα 57: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε επιφάνεια πυριτίου (α , β) ή σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 25 μm (γ , δ) ή γραμμές εύρους 27,5 μm (ϵ , $\sigma\tau$) για 1 ημέρα (α , γ , ϵ) και 3 ημέρες (β , δ , $\sigma\tau$), αντίστοιχα.	126
Σχήμα 58: Ραβδόγραμμα επιμήκυνσης του κυτταροσκελετού λείων μυϊκών κυττάρων μετά από 1 (ροζ στήλες) και 3 (γκρι στήλες) ημέρες καλλιέργειας σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου καθώς και σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 και 27,5 μm . Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.	127
Σχήμα 59: Ραβδόγραμμα της επιφάνειας του πυρήνα λείων μυϊκών κυττάρων μετά από 1 και 3 μέρες καλλιέργειας σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου καθώς και σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 και 27,5 μm . Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.	128
Σχήμα 60: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε επιφάνειες πυριτίου χωρίς καμμία τροποποίηση (α , β), σε επιφάνειες πυριτίου τροποποιημένες με HMDS (γ , δ), σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 μm (ϵ , $\sigma\tau$) ή 27,5 μm (ζ , η) για 1 ημέρα (α , γ , ϵ , ζ) και 3 ημέρες (β , δ , $\sigma\tau$, η), αντίστοιχα.	130
Σχήμα 61: Πυκνότητα προσκολλημένων κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας σε συνάρτηση με το χρόνο καλλιέργειας σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου Si (\blacksquare), σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου Si τροποποιημένη με HMDS (\blacktriangle), σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 25 μm (\blacklozenge) και 27,5 μm (\bullet). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.	130
Σχήμα 62: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού καρκινικών κυττάρων της σειράς HT1080 προσκολλημένων σε γραμμές πυριτίου εύρους 25 μm σε επιφάνειες με σχηματοποιημένο υμένιο PEG-b-PHPMA 43-57.	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σύγκριση των τεχνικών (α) λιθογραφία δέσμης πρωτονίων (β) λιθογραφία δέσμης ιόντων (γ) και λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων ως προς τη διείσδυση στο υπόστρωμα.....	37
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσφυση κυττάρων σε επιφάνειες.	52
Εικόνα 3: Σχηματικό μοντέλο ευθυγράμμισης και μετακίνησης των κυττάρων σε σχηματοποιημένη επιφάνεια μέσω φιλοποδίων και ελασματοποδίων.	53
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της υδροφιλικότητας μιας επιφάνειας στην κυτταρική προσκόλληση.....	54
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των τριών ειδών μυϊκού ιστού: Α) σκελετικός μυϊκός ιστός που αποτελείται από σκελετικά μυϊκά κύτταρα και συναντάται κυρίως στους μύες που προσφύονται στα οστά του σκελετού, Β) καρδιακός μυϊκός ιστός που αποτελείται από τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα και συναντάται κυρίως στα τοιχώματα της καρδιάς, και Γ) σκελετικός μυϊκός ιστός που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα και συναντάται κυρίως στα τοιχώματα αγγείων και του γαστρεντερικού σωλήνα.	65
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση: Α) των δομικών χαρακτηριστικών των λείων μυϊκών κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων τους, Β) η χαρακτηριστική μεταβολή του σχήματος των λείων μυϊκών κυττάρων κατά τη συστολή.....	67
Εικόνα 7: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο καλλιέργειας λείων μυϊκών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής αρτηρίας (HUASMC) Α) για 10 και Β) από 17 ημέρες, αντίστοιχα.....	68
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας αρτηρίας με συσσώρευση λιπιδίων, χοληστερίνης και άλλων ουσιών στο τοίχωμα της αρτηρίας με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας που εμποδίζει τη φυσιολογική ροή του αίματος.....	69
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση: Α) μιας αρτηρίας με σταδιακή δημιουργία αθηρωματικής πλάκας που εμποδίζει τη φυσιολογική ροή του αίματος και Β) μιας αρτηρίας με στεφανιαίο στεντ στο εσωτερικό της για την επίτευξη της φυσιολογικής ροής του αίματος.....	70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επίδραση σχηματοποιημένων επιφανειών στη μορφολογία των προσκολλημένων κυττάρων.....	59
Πίνακας 2: Ποσότητες συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των διαφορετικών συμπολυμερών PEG-b-PHPMA.....	78
Πίνακας 3: Σύσταση και συντομογραφία των συμπολυμερών.	101
Πίνακας 4: Μοριακά βάρη και κατανομή αυτών των συμπολυμερών.	105
Πίνακας 5: Τιμές γωνιών επαφής των υποστρωμάτων και των δημιουργούμενων υμενίων.	113
Πίνακας 6: Σύνοψη των ερευνών για την επίδραση σχηματοποιημένων επιφανειών στη μορφολογία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων.	139
Πίνακας 7: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	140
Πίνακας 8: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	142

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τα έτη 2018-2020 στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων-Ανοσοαισθητήρων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», υπό την επίβλεψη της Δρ. Π. Πέτρου, Ερευνήτριας Α΄ Βαθμίδας και του Δρ. Σ. Κακαμπάκου, Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας του Ινστιτούτου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Δρ. Μ. Χατζηχρησιτίδη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για τη διάθεση της εργαστηριακής υποδομής προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Εξίσου θερμά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. Δρ. Μ. Χατζηχρησιτίδη για την ανάθεση του θέματος, την συνεισφορά της στην εργασία μου και την πολύτιμη καθοδήγησή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στη Διευθύντρια Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Δρ. Π. Πέτρου και στο Διευθυντή Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Δρ. Σ. Κακαμπάκο, οι οποίοι με εμπιστεύθηκαν ως μέλος της επιστημονικής τους ομάδας. Κατά τη διάρκεια της εργασίας μου είχα τη συνεχή καθοδήγηση και την επίβλεψή τους με αμείωτο ενδιαφέρον. Οι παρατηρήσεις τους και η βοήθειά τους ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, Δρ. Π. Αργείτη για την παροχή της απαραίτητης οργανολογίας για την επιτυχή εκπόνηση των πειραμάτων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας των Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης Δρ. Μ. Βαμβακάκη και στον Δρ. Θ. Μανουρά που με υποδέχτηκαν στο εργαστήριο τους και με την πολύτιμη καθοδήγησή τους πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των πολυμερών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και για τη συνεχή βοήθεια και για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες μου από το Ι.Ν.Ν. και συγκεκριμένα τον Δρ. Κ. Μισιακό, Ερευνητή Α΄ βαθμίδας, για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. Δρ. Ι. Χριστοφίδη για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Βαθύτατες ευχαριστίες εκφράζω στη Δρ. Α. Κανιούρα 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 και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε κατά την πρόοδο της ερευνάς μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στη Δρ. Α. Νίκα για τις συμβουλές και την καθοδήγηση της ως προς την κατασκευή και το χαρακτηρισμό των επιφανειών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Π. Σαρκίρη για τη βοήθειά του στην εκπόνηση των πειραμάτων που σχετίζονται με τη μέτρηση της υδροφιλικότητας και του πάχους των υμενίων.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλο το προσωπικό του εργαστηρίου και πιο συγκεκριμένα, τη Δρ. Μ. Αγγελοπούλου για την αμέριστη στήριξή της, το Δρ. Γ. Κουκουβίνο, τη Δρ. Ε. Σταύρα, τους υποψήφιους διδάκτορες Β. Αναστασιάδη και Δ. Τσουνίδη, καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μ. Αντωνίου και Χ. Παππού με τους οποίους δημιουργήσαμε ένα εξαιρετικό περιβάλλον εργασίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και τα άτομα που βρίσκονται δίπλα μου καθημερινά για τη στήριξη και την ανοχή τους.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου, η οποία βρίσκεται στο πλευρό μου σε κάθε βήμα της ζωής μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

1.1 Γενικά

Η επιστήμη των πολυμερών παρουσιάζει ραγδαία ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια και αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για τη δημιουργία νέων υλικών με εφαρμογές που εκτείνονται από τη βιομηχανία έως και τη βιοϊατρική. Τα πολυμερή μπορούν να διακριθούν σε φυσικά πολυμερή, όπως οι πρωτεΐνες, το άμυλο, η κυτταρίνη και το φυσικό λάστιχο (καουτσούκ), σε τροποποιημένα φυσικά πολυμερή, όπως το τεχνητό μετάξι, και τέλος σε συνθετικά πολυμερή, όπως είναι τα πλαστικά¹, που κατασκευάζει ο άνθρωπος ως υποκατάστατα φυσικών υλικών.

1.2 Μέθοδοι πολυμερισμού

Η σύνθεση πολυμερών με καθορισμένη σύσταση, αρχιτεκτονική, και λειτουργικότητα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον τόσο για τον ακαδημαϊκό όσο και στον βιομηχανικό τομέα. Τα πολυμερή προκύπτουν από τη συνένωση πολλών μικρών μορίων (μονομερή) μέσω διαδικασιών πολυμερισμού και έχουν μοριακό βάρος πολλαπλάσιο του μοριακού βάρους του μονομερούς. Η ποιότητα και οι ιδιότητες των πολυμερών που παρασκευάζονται με πολυμερισμό επηρεάζονται από διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες από τους οποίους οι σημαντικότεροι είναι η φύση του μονομερούς, το περιβάλλον στο οποίο γίνεται ο πολυμερισμός, η θερμοκρασία, η πίεση και η παρουσία ουσιών που προκαλούν την έναρξη του πολυμερισμού (εκκινήτων ή καταλυτών).

Δύο από τις βασικότερες μεθόδους πολυμερισμού είναι ο ανιοντικός πολυμερισμός και ο κατιοντικός πολυμερισμός που βασίζονται στη χημεία αλυσωτών αντιδράσεων πολυμερισμού μέσω ιόντων. Στον ανιοντικό πολυμερισμό οι τελικές μονομερικές μονάδες του πολυμερούς είναι

φορτισμένες αρνητικά ενώ ο κατιοντικός πολυμερισμός περιγράφεται σαν μια αντίδραση πολυμερισμού προσθήκης όπου η διάδοση επιτυγχάνεται μέσω ενός καρβοκατιόντος το οποίο προέρχεται από ένα βυνιλικό μονομερές και έναν απαρχητή.

Σήμερα, η βιομηχανία επενδύει σημαντικά στην παραγωγή στερεοκανονικών πολυμερών, είτε ισοτακτικών όπου οι συνδεδεμένες ομάδες βρίσκονται στην ίδια πλευρά της πολυμερικής αλυσίδας ή συνδιστακτικών όπου οι συνδεδεμένες ομάδες κατέχουν εναλλασσόμενες θέσεις και στις δύο πλευρές της πολυμερικής αλυσίδας. Έτσι, έχει αναπτυχθεί ραγδαία μία άλλη μορφή πολυμερισμού, ο στερεοκανονικός πολυμερισμός, ο οποίος περιλαμβάνει τον πολυμερισμό σύμπλεξης και τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου. Ο πολυμερισμός σύμπλεξης πραγματοποιείται είτε με τη χρήση διάφορων καταλυτών, όπως οι καταλύτες Ziegler-Natta ή μεταλλοκενικών συμπλόκων, όπως οι ζirkονοκενικοί καταλύτες. Ο μηχανισμός αυτών των πολυμερισμών είναι ανιοντικός. Κατά τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου διασπάται ένας συγκεκριμένος δεσμός στο δακτύλιο και επανασχηματίζεται, αυτή τη φορά μεταξύ δύο διαφορετικών μονομερών σε γραμμική αλληλουχία με τη βοήθεια κατιοντικών ή ανιοντικών εκκινήτων. Μια ακόμη μέθοδος πολυμερισμού αποτελεί ο ριζικός πολυμερισμός που βασίζεται στη χημεία αλυσωτών αντιδράσεων πολυμερισμού μέσω ελευθέρων ριζών. Οι πιο διαδεδομένοι πολυμερισμοί αυτής της κατηγορίας είναι οι ελεγχόμενοι ριζικοί πολυμερισμοί, οι οποίοι χωρίζονται στο ριζικό πολυμερισμό με τη χρήση νιτροξειδικών ριζών (Nitroxide-Mediated Radical Polymerization, NMRP), το ριζικό πολυμερισμό μεταφοράς ατόμου (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) και τον πολυμερισμό αντιστρεπτής μεταφοράς αλυσίδας μέσω προσθήκης-απόσπασης (Reversible Addition Fragmentation Transfer Polymerization, RAFT).

Τέλος, τα πολυμερή μπορούν να παραχθούν τόσο μέσω αλυσωτών αντιδράσεων (chain reactions), οπότε και αποκαλούνται πολυμερή προσθήκης, όσο και μέσω σταδιακών αντιδράσεων (step reactions). Σε αυτήν την κατηγορία αντιδράσεων, οι οποίες αναφέρονται ως αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης, ως μονομερή χρησιμοποιούνται ενώσεις με δύο

δραστικές ομάδες στο μόριό τους. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε βιομηχανικό επίπεδο καθώς μέσω αυτής παράγονται διάφορες πλαστικές ύλες όπως το πολυαιθυλένιο (PET), το νylon και οι πολυσιλοξάνες ή σιλικόνες^{2,3}.

Ακολουθεί μια πιο εκτενής αναφορά στον ριζικό πολυμερισμό μεταφοράς ατόμου ο οποίος εφαρμόστηκε για τη παρασκευή των πολυμερών της παρούσας εργασίας.

1.1.1 Ριζικός πολυμερισμός μεταφοράς ατόμου (ATRP)

Ο συμβατικός ριζικός πολυμερισμός (πολυμερισμός ελευθέρων ριζών) μπορεί να εφαρμοστεί για μεγάλη ποικιλία μονομερών. Οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα υπό ήπιες συνθήκες απουσία οξυγόνου και ολοκληρώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος αυτή δεν παρέχει πλήρη έλεγχο των μοριακών βαρών, της κατανομής τους, της σύστασης και της αρχιτεκτονικής των πολυμερών λόγω των παράλληλων αντιδράσεων τερματισμού και μεταφοράς που λαμβάνουν χώρα.

Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν συστήματα ελεγχόμενου ζωντανού ριζικού πολυμερισμού τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση αναπτυσσόμενων ριζών προκειμένου να περιορίζονται οι αντιδράσεις τερματισμού. Επιπλέον, για την επίτευξη ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού πρέπει η ταχύτητα εκκίνησης του πολυμερισμού να είναι μεγαλύτερη της ταχύτητας διάδοσης του για να μη λαμβάνονται πολυμερή με μεγάλες κατανομές και υψηλότερα μοριακά βάρη από τα αναμενόμενα. Απαραίτητη είναι επίσης και η γρήγορη εναλλαγή μεταξύ χημικών ειδών διαφορετικής δραστηριότητας σε σχέση με τη διάδοση του πολυμερισμού για να μην δημιουργούνται πολυμοριακές κατανομές καθώς και η ύπαρξη ομογενούς συστήματος πολυμερισμού έτσι ώστε τα ενεργά κέντρα να είναι προσιτά στα μόρια του μονομερούς. Τέλος, καθώς οι απενεργοποιημένες αλυσίδες αυξάνονται με την αύξηση του μήκους της μακρόριζας, ο βαθμός πολυμερισμού δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλός, γεγονός που επιτυγχάνεται με υψηλή συγκέντρωση απαρχητή^{2,4}. Ο ριζικός πολυμερισμός μεταφοράς

ατόμου (ATRP) αποτελεί τη πιο διαδεδομένη μέθοδο ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού όπου η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από ένα σύμπλοκο μετάλλου μετάπτωσης. Ο γενικός μηχανισμός του ATRP απεικονίζεται στο σχήμα 1:



Σχήμα 1: Γενικός μηχανισμός ελεγχόμενου ζωντανού ριζικού πολυμερισμού⁵.

Κατά τη μεταφορά ατόμου το μέταλλο υφίσταται οξειδωση ενός ηλεκτρονίου με συνακόλουθη αφαίρεση ενός ατόμου αλογόνου X από το αδρανές μόριο R-X και δημιουργίας της αναπτυσσόμενης ρίζας P•. Αυτή η αντιστρεπτή διαδικασία εξελίσσεται με σταθερά ταχύτητας ενεργοποίησης (k_{act}) και απενεργοποίησης (k_{deact}), καθώς οι πολυμερικές αλυσίδες αυξάνονται με τη προσθήκη των ελευθέρων ριζών στα μονομερή με σταθερά ταχύτητας διάδοσης (k_p). Οι αντιδράσεις τερματισμού (k_t), οφείλονται κυρίως σε σύζευξη των ριζών. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι απαραίτητη η ομοιόμορφη ανάπτυξη όλων των αλυσίδων, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω γρήγορης έναρξης και γρήγορης αντιστρέψιμης απενεργοποίησης. Για να θεωρηθεί ο ATRP ως ένα ελεγχόμενο σύστημα πολυμερισμού, θα πρέπει μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των αναπτυσσόμενων αλυσίδων να υφίσταται τερματισμό. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς αποκαθίσταται μια ισορροπία μεταξύ ενεργών και ανενεργών κέντρων, τα οποία δεν είναι ικανά να προκαλέσουν ούτε διάδοση ούτε τερματισμό. Συνεπώς, ενώ αυξάνεται ουσιαστικά ο χρόνος ζωής των ριζών, αυτές δεν είναι εκτεθειμένες προς τερματισμό^{2,6}.

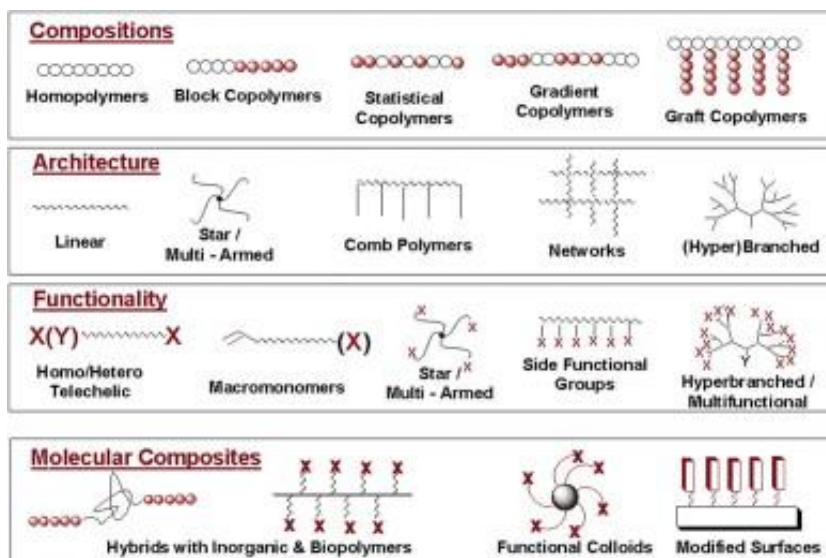
1.2 Συμπολυμερή

Τα πολυμερή χωρίζονται σε ομοπολυμερή, στα οποία οι πολυμερικές αλυσίδες αποτελούνται από ένα είδος μονομερούς και σε συμπολυμερή, στα

οποία οι πολυμερικές αλυσίδες αποτελούνται από δύο ή περισσότερα είδη μονομερών. Το γεγονός ότι το μόριο του συμπολυμερούς περιέχει δύο (ή περισσότερες) διαφορετικές δομικές μονάδες, έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζει χαρακτηριστικά και ιδιότητες και των δύο συστατικών του. Ανάλογα με τις διευθετήσεις στο χώρο που λαμβάνουν τα μονομερή, τα συμπολυμερή χωρίζονται σε:

- ❖ Τυχαία συμπολυμερή (random copolymer), όπου η διάταξη των δομικών μονάδων του συμπολυμερούς είναι τυχαία και τα ομοπολυμερή τμήματά του μικρά
- ❖ Εναλλασσόμενα συμπολυμερή (alternating copolymer), στα οποία οι δύο δομικές μονάδες ακολουθούν εναλλασσόμενη διάταξη
- ❖ Γραμμικά συμπολυμερή κατά συστάδες ή συσταδικά συμπολυμερή (block copolymer), που αποτελούνται από ομοιοπολικά συνδεδεμένες μακρομοριακές συστάδες διαφορετικές μεταξύ τους είτε ως προς τη χημική σύσταση είτε ως προς τη στερεοχημεία
- ❖ Κυκλικά συμπολυμερή (Cyclic Block Copolymers) που προκύπτουν όταν τα δύο άκρα ενός γραμμικού κατά συστάδες συμπολυμερούς ενώνονται.
- ❖ Αστεροειδή πολυμερή (Star Copolymers), τα οποία συνίστανται από τρεις ή περισσότερες αλυσίδες που συνδέονται σε ένα κοινό σημείο μέσω του ενός άκρου τους το οποίο αποτελεί το κέντρο του αστεροειδούς πολυμερούς. Στην περίπτωση κατά την οποία κάθε κλάδος του αστεροειδούς πολυμερούς είναι ένα κατά συστάδες συμπολυμερές τότε η συνολική δομή αποκαλείται αστεροειδές κατά συστάδες συμπολυμερές (star block copolymer) ενώ η ύπαρξη κλάδων με διαφορετική χημική σύσταση συνδεδεμένων στο κέντρο της αστεροειδούς δομής οδηγεί στη δημιουργία μικτόκλωνων αστεροειδών συμπολυμερών (miktoarm star copolymers) ή ετεροκλαδικών αστεροειδών συμπολυμερών (heteroarm block copolymers)
- ❖ Εμβολιασμένα Πολυμερή (graft copolymers), τα οποία συνίστανται από μία κύρια πολυμερική αλυσίδα στην οποία όπου συνδέονται ομοιοπολικά μία ή

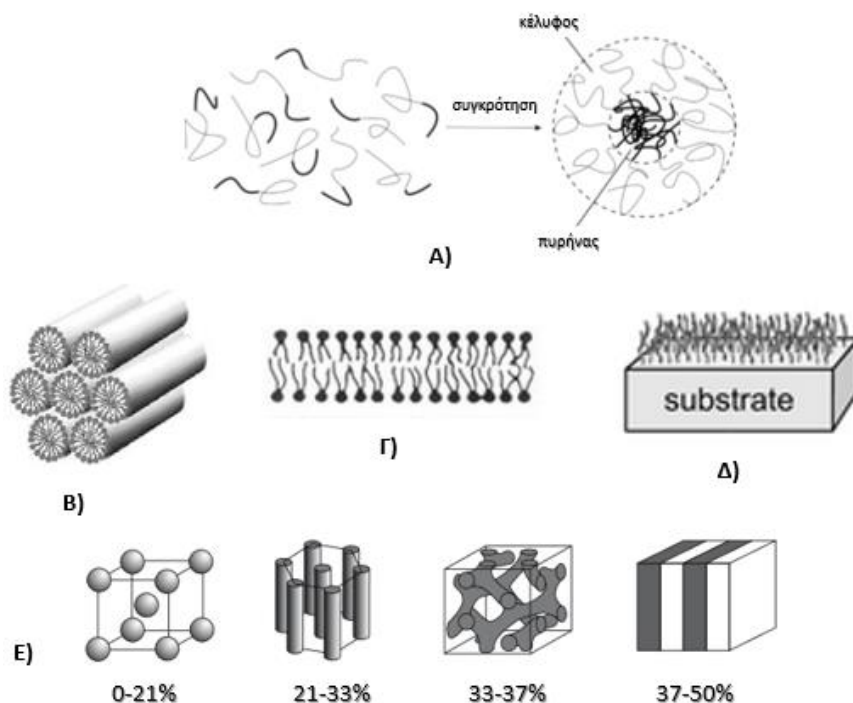
περισσότερες πλευρικές αλυσίδες. Οι κλάδοι αυτοί είναι συνήθως τυχαία κατανομημένοι κατά μήκος της κυρίας αλυσίδας⁶.



Σχήμα 2: Δομές πολυμερών που μπορούν να παρασκευαστούν με ελεγχόμενο ζωντανό ριζικό πολυμερισμό⁷.

1.2.1 Κατά συστάδες συμπολυμερή

Τα κατά συστάδες συμπολυμερή μπορεί να αποτελούνται από δύο υδρόφιλα τμήματα (διυδρόφιλα συμπολυμερή) ή από μία υδρόφοβη και μία υδρόφιλη συστάδα (αμφίφιλα συμπολυμερή). Τα τελευταία χαρακτηρίζονται από μια ιδιότητα που αποκαλείται μικροφασικός διαχωρισμός. Ειδικότερα, καθώς οι αλυσίδες των ανόμοιων ομοπολυμερών είναι ενωμένες μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό δεν ευνοείται ο μακροσκοπικός διαχωρισμός των φάσεων, αντιθέτως ευνοείται ο τοπικός διαχωρισμός φάσεων και η ελαχιστοποίηση των επαφών ανάμεσα στις ανόμοιες αλυσίδες. Λόγω του φαινομένου του μικροφασικού διαχωρισμού τα πολυμερή αυτά έχουν την τάση να αυτο-οργανώνονται και να σχηματίζουν συγκεκριμένες νανοδομές. Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται οι δομές που λαμβάνουν συχνότερα τα κατά συστάδες πολυμερή λόγω του φαινομένου του μικροφασικού διαχωρισμού.



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση παραδειγμάτων αυτο-οργάνωσης συσταδικών συμπολυμερών με τη μορφή: **A)** σφαιρικών μικκυλίων, **B)** κυλινδρικών μικκυλίων, **Γ)** διπλοστοιβάδων, **Δ)** μονοστοιβάδας σε επιφάνεια μέσω της προσρόφησης της μίας συστάδας, και **Ε)** νανοδομημένων υλικών με διάφορες καλά καθορισμένες δομές ανάλογα με τη σύσταση των δύο συσταδών^{1,6,8}.

1.3 Μέθοδοι χαρακτηρισμού

Ο χαρακτηρισμός της σύστασης και της δομής των πολυμερών είναι πολύ σημαντικός καθώς παρέχει πληροφορίες για τη σύσταση και δομή τους και κατά συνέπεια για τις ιδιότητες τους. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός είναι απαραίτητος για τον έλεγχο του τελικού προϊόντος της σύνθεσης ενός πολυμερούς και της ύπαρξης πιθανών παραπροϊόντων όπως μόρια μονομερών ή διαλυτών σε αυτό. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την εύρεση του μοριακού βάρους, της κατανομής των μοριακών βαρών και της αρχιτεκτονικής των πολυμερών. Από την άλλη, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της σύστασης και της δομής των πολυμερών και παράλληλα παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης της στερεοχημικής απεικόνισης (τακτικότητα) και της γεωμετρικής ισομέρειας των

πολυμερών. Τέλος, η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) είναι τεχνικές που επιτρέπουν την αναγνώριση και ταυτοποίηση διάφορων ομάδων στο μόριο του πολυμερούς. Παρακάτω αναλύονται οι προαναφερθέντες τεχνικές, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία⁹.

1.3.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών ή χρωματογραφία πηκτώματος (Size Exclusion Chromatography, SEC ή Gel Permeation Chromatography, GPC) είναι μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας που επιτρέπει την ανάλυση μεγαλομορίων όπως τα πολυμερή. Ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε ειδικές στήλες και γίνεται βάσει του μεγέθους των πολυμερικών αλυσίδων, δηλαδή των μοριακών βαρών των πολυμερών. Οι στήλες περιέχουν πορώδες υλικό με μέγεθος πόρων στην περιοχή μεγεθών των μακρομορίων. Τα μεγαλύτερα μόρια διανύουν μικρότερη απόσταση μέσα στη στήλη αφού δεν περνούν από όλους του πόρους και εκκλούνται πρώτα, ενώ τα μικρότερα μόρια περνούν από όλους τους πόρους και έτσι διανύουν μεγαλύτερη απόσταση με αποτέλεσμα να εκκλούνται κατά σειρά μεγέθους από τα μεγαλύτερα προς τα μικρότερα. Στην έξοδο των στηλών τοποθετούνται ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές που ανιχνεύουν τα εκλούμενα μόρια. Η SEC απαιτεί βαθμονόμηση των στηλών η οποία πραγματοποιείται με προσδιορισμό του χρόνου έκλουσης ουσιών με γνωστό μοριακό βάρος⁹.

1.3.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία μορφή φασματοσκοπίας απορρόφησης βάσει των μαγνητικών ιδιοτήτων των πυρήνων των ατόμων, οι οποίοι απορροφούν και επανεκπέμπουν

ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν διεγερθούν από ένα μαγνητικό πεδίο. Η τεχνική NMR εφαρμόζεται σε πυρήνες που παρουσιάζουν μαγνητική συμπεριφορά και έχουν ακέραιο ή ημιακέραιο πυρηνικό spin όπως π.χ., ^1H , ^{13}C και κατά συνέπεια είναι κατάλληλη για εφαρμογή σε οργανικά μόρια όπως είναι τα πολυμερή. Από τα φάσματα NMR μιας ένωσης είναι δυνατόν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τη στερεοχημεία και την τακτικότητα των πολυμερών, καθώς και για τη σύσταση ενός συμπολυμερούς⁹.

1.3.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR)

Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του ορατού και εγγύς υπεριώδους (200-800 nm) εξαιτίας των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Τα εξωτερικά ηλεκτρόνια είναι εκείνα που με την μετάπτωση τους από μια ενεργειακή κατάσταση σε μια άλλη προκαλούν απορρόφηση ενέργειας σε διακριτές κβαντισμένες ποσότητες.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στην αλληλεπίδραση υπέρυθρου φωτός με την ύλη. Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) αλληλεπιδρά με την ύλη είναι δυνατό να απορροφηθεί προκαλώντας τη δόνηση των χημικών δεσμών ενός υλικού¹⁰. Έτσι με τη φασματοσκοπία υπέρυθρου μέσω των χαρακτηριστικών ομάδων των πολυμερών, οι οποίες απορροφούν ακτινοβολία σε συγκεκριμένα και χαρακτηριστικά μήκη κύματος στην περιοχή του υπέρυθρου, μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία ανάπτυξη μεθόδων σχηματοποίησης επιφανειών στην μικρο- και νάνο-κλίμακα οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε ποικίλους τομείς. Για παράδειγμα, η χρήση μικρο/νανο-δομημένων επιφανειών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στον κλάδο της μικροηλεκτρονικής για την κατασκευή ψηφίδων (chips) που χρησιμοποιούνται σε πλήθος εφαρμογών, είτε σε πολύπλοκα συστήματα ελέγχου στη βιομηχανία είτε ως μνήμες ή επεξεργαστές στους ηλεκτρονικούς υπολογιστές¹¹. Συγχρόνως, τις τελευταίες δεκαετίες οι τεχνικές κατασκευής επιφανειών με καθορισμένη γεωμετρία έχουν ανοίξει το δρόμο για εφαρμογές στον τομέα της βιοϊατρικής και της κυτταρικής βιολογίας. Για παράδειγμα, η τεχνολογία σχηματοποίησης επιφανειών αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη χορήγηση φαρμάκων (drug delivery) μέσω του δέρματος χρησιμοποιώντας συστοιχίες μικροσκοπικών βελόνων (microneedle arrays), που διεισδύουν στο δέρμα και χορηγούν το φάρμακο κάτω από την επιφάνεια αυτού. Η μέθοδος αυτή αναγνωρίζεται ευρέως ως μία από τις πιο ελπιδοφόρες τεχνικές χορήγησης ουσιών με ελάχιστη επεμβατικότητα και καταπόνηση για τον ασθενή¹².

Επιπροσθέτως, πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η τοπογραφία του υποστρώματος διαδραματίζει καίριο ρόλο στη μορφολογία και τις λειτουργικές ιδιότητες των κυττάρων που αναπτύσσονται πάνω σε αυτές. Με τη χρήση μικρο/νανοσχηματοποιημένων επιφανειών ως υποστρωμάτων για την καλλιέργεια κυτταρικών σειρών επιτυγχάνεται η δημιουργία ενός *in vitro* περιβάλλοντος που παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με το *in vivo* περιβάλλον των κυττάρων και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να μελετηθεί και κατανοηθεί η συμπεριφορά των κυττάρων¹³. Ως εκ τούτου, οι τεχνικές αυτές είναι πολύ σημαντικές για την ανάπτυξη βιοϊατρικών συσκευών για διαγνωστικές ή θεραπευτικές εφαρμογές όπως είναι οι βιοαισθητήρες¹⁴, τα

στεντ¹⁵, τα εμφυτεύματα και τα τεχνητά μοσχεύματα¹⁶. Οι κυριότερες τεχνικές σχηματοποίησης επιφανειών είναι η λιθογραφία με χρήση ελαστικών υλικών με χαρακτηριστικότερη τεχνική αυτής της κατηγορίας την εκτύπωση με μικροεπαφή, η λιθογραφία νανοαποτύπωσης, η λιθογραφία με χρήση κολλοειδών σωματιδίων, η λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων/ιόντων /πρωτονίων και η φωτολιθογραφία.

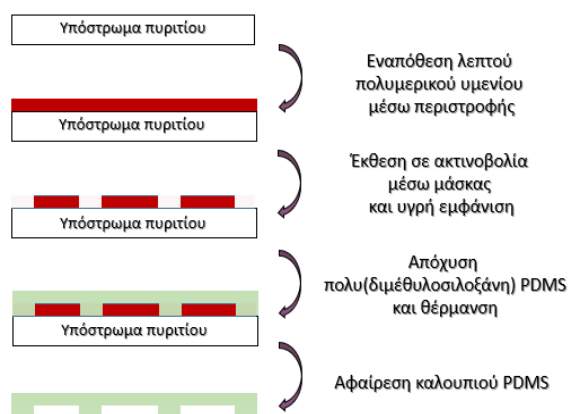
2.2 Γενικά για τη λιθογραφία

Η λιθογραφία εφευρέθηκε το 1796 από τον θεατρικό συγγραφέα και ηθοποιό Alloys Senefelder ο οποίος χρησιμοποίησε ένα λιπαρό και μη διαλυτό σε οξέα μελάνι σε μια λεία πέτρα για την αποτύπωση κειμένου σε χαρτί. Αργότερα, αποδείχτηκε η σημαντικότερη μέθοδος σχηματοποίησης επιφανειών μέσω της μεταφοράς σε ένα υπόστρωμα της επιθυμητής δομής με τη χρήση κατάλληλων μασκών¹⁷. Στην ενότητα αυτή θα αναλυθούν διεξοδικότερα οι πιο διαδεδομένες τεχνικές λιθογραφίας που έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες κατευθυνόμενης προσκόλλησης κυττάρων. Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στη φωτολιθογραφία που είναι η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

2.3 Λιθογραφία με χρήση ελαστικών υλικών ή μαλακή λιθογραφία (soft lithography)

Ο όρος μαλακή λιθογραφία αναφέρεται σε μία σειρά από τεχνικές λιθογραφίας οι οποίες βασίζονται στην ανατύπωση δομών με τη χρήση σφραγίδων και καλουπιών από ελαστομερή υλικά, δηλαδή πολυμερή που είναι μαλακά και μορφοποιήσιμα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, όπως το πολυ-(διμεθυλοσιλοξάνιο) και μπορούν να μορφοποιηθούν εύκολα ώστε να αποκτήσουν καθορισμένη ανάγλυφη δομή. Η τεχνική βασίζεται στην χρήση εκμαγείων που έχουν δημιουργηθεί σε ένα σκληρό υλικό και στο οποίο αποχύνεται ένα προπολυμερές του ελαστομερούς υλικού το οποίο δικτυώνεται στη συνέχεια με θέρμανση και αφού στερεοποιηθεί αποσπάται

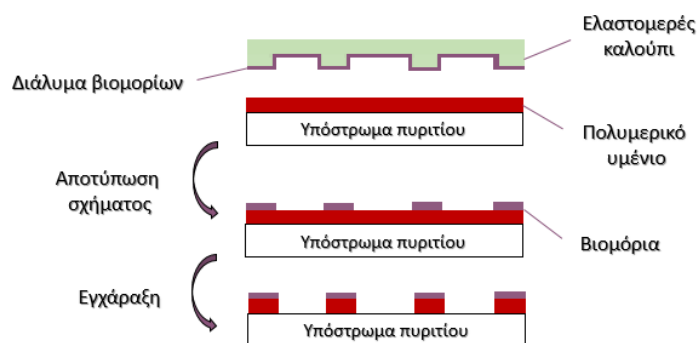
από το εκμαγείο (Σχήμα 4). Με τεχνικές μαλακής λιθογραφίας μπορούν να κατασκευαστούν δομές με διαστάσεις από 30 nm μέχρι 500 μm ^{11,18} στο ελαστομερές υλικό, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να μεταφερθούν σε μια επιφάνεια.



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση κατασκευής δομής σε πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) (PDMS) με τη διαδικασία της μαλακής λιθογραφίας.

2.3.1 Εκτύπωση με μικροεπαφή (microcontact printing, μCP)

Η εκτύπωση με μικροεπαφή είναι η πιο διαδεδομένη από τις τεχνικές μαλακής λιθογραφίας. Σε αυτήν, ελαστομερής σφραγίδα, η οποία κατασκευάζεται με τη διαδικασία που απεικονίζεται στο σχήμα 5, εμβαπτίζεται στο διάλυμα των μορίων ή βιομορίων που επιθυμούμε να σχηματοποιήσουμε και έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα μεταφέροντας τα μόρια και το σχήμα από την σφραγίδα σε αυτό.

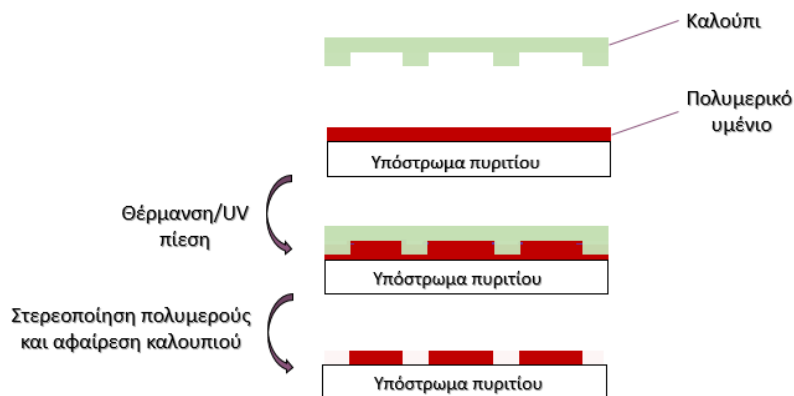


Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων αποτύπωση σχήματος σε πολυμερικό υμένιο με εκτύπωση με μικροεπαφή.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι δεν χρειάζεται το υπόστρωμα να είναι επίπεδο αλλά μπορεί το σχήμα να αποτυπωθεί και σε επιφάνειες με μεγάλη τραχύτητα^{18,19}.

2.4 Λιθογραφία νανοαποτύπωσης (nanoimprint lithography)

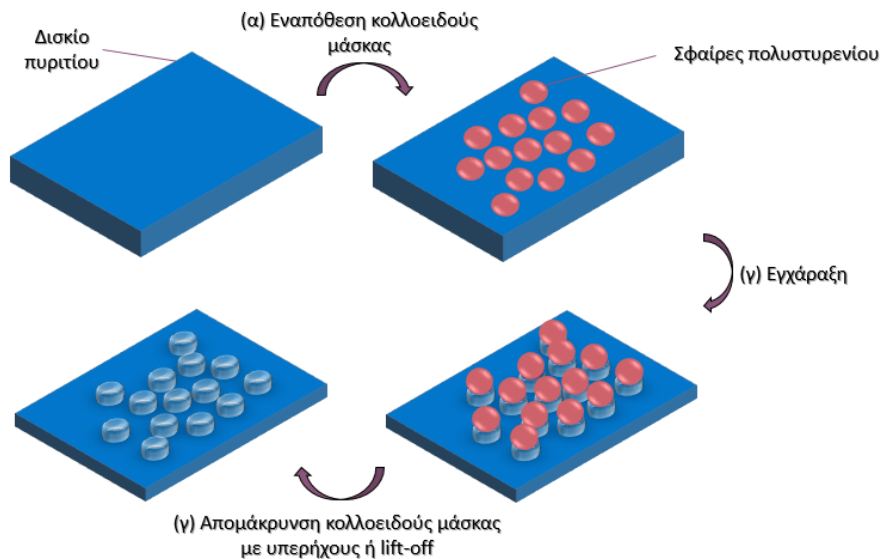
Η διαδικασία της λιθογραφίας νανοαποτύπωσης περιλαμβάνει την πίεση μιας επαναχρησιμοποιούμενης σφραγίδας, που έχει κατασκευαστεί σε ένα σκληρό υλικό, σε ένα ελαστομερές υλικό το οποίο παραμορφώνεται και έτσι αποτυπώνεται το σχήμα της σφραγίδας. Η αποτύπωση υποβοηθείται είτε με θέρμανση είτε με έκθεση του υποστρώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)²⁰ (Σχήμα 6). Στην πρώτη περίπτωση (thermal nanoimprint lithography) χρησιμοποιούνται άκαμπτα καλούπια και το θερμοπλαστικό υλικό που παραμορφώνεται στερεοποιείται μέσω ψύξης. Αυτή η τεχνική είναι γνωστή και ως νανοσφράγιση εν θερμώ (hot embossing). Στη δεύτερη περίπτωση (UV nanoimprint lithography) χρησιμοποιούνται διαφανή καλούπια (χαλαζία ή σίλικα) και η σταθεροποίηση του πολυμερούς γίνεται μέσω αντιδράσεων διασταύρωσης που λαμβάνουν χώρα στο πολυμερικό υμένιο κατά την έκθεση²¹. Μία παραλλαγή αυτής της τεχνικής είναι η Soft UV-Nanoimprint Lithography, κατά την οποία χρησιμοποιούνται καλούπια από ελαστομερή πολυμερή όπως αυτά που χρησιμοποιούνται στη μαλακή λιθογραφία, π.χ., από PDMS και η αποτύπωση της δομής γίνεται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε περίπτωση το τελικό στάδιο είναι η απομάκρυνση του καλουπιού. Η μέθοδος αυτή έχει αποδεχτεί ότι παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως μέθοδος μαζικής παραγωγής δομών σχετικά μεγάλων διαστάσεων (300 nm)²² αλλά και νανοδομών αφού μπορούν να δημιουργηθούν δομές με διαστάσεις έως και 20 nm²³.



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της λιθογραφίας νανοαποτύπωσης για αποτύπωση σχήματος σε πολυμερικό υμένιο.

2.5 Λιθογραφία με χρήση κολλοειδών σωματιδίων (colloidal lithography)

Στη λιθογραφία με χρήση κολλοειδών σωματιδίων ή αλλιώς κολλοειδή λιθογραφία τα διάκενα που σχηματίζονται κατά τη δημιουργία σε μια επιφάνεια ενός στρώματος από κολλοειδή σωματίδια (π.χ., μονοστοιβαδικό στρώμα από νανοσφαίρες πολυστυρενίου) παίζουν το ρόλο μάσκας σε διεργασίες εγχάραξης ή εναπόθεσης που ακολουθούν²⁴. Παρόλο που η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε επίπεδες και καμπύλες επιφάνειες, είναι χαμηλού κόστους τεχνική και δεν απαιτεί πολύπλοκη οργανολογία, δεν αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο λιθογραφίας διότι η δημιουργία της μονοστοιβάδας των κολλοειδών σωματιδίων δεν είναι πλήρως ομογενής με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δομές τυχαίες ή όχι απόλυτα συμμετρικές²⁵. Με την τεχνική της κολλοειδούς λιθογραφίας είναι δυνατόν να κατασκευαστούν διάφορες δυσδιάστατες ή τρισδιάστατες δομές αποτελούμενες από εξογκώματα ή εσοχές επί του υποστρώματος όπως δομές αποτελούμενες από κουκίδες, τρύπες, κύπελλα, κώνους, κολώνες (Σχήμα 6), δακτυλίους ή τρίγωνα. Το εμβαδόν επιφανείας των δημιουργούμενων δομών εξαρτάται από το μέγεθος της διαμέτρου των κολλοειδών σωματιδίων και κυμαίνεται από μερικά μικρόμετρα έως και δεκάδες νανόμετρα²⁶.



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της κολλοειδούς λιθογραφίας για την αποτύπωση κυλινδρικών δομών σε πολυμερικό υμένιο: (α) εναπόθεση κολλοειδούς μάσκας στο υπόστρωμα, (β) εγχάραξη υποστρώματος, και (γ) απομάκρυνση κολλοειδούς μάσκας με υπερήχους ή με διαλύτη (lift off)²⁷.

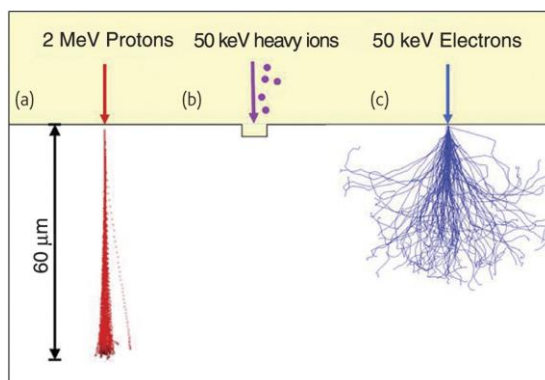
2.6 Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων/ιόντων/πρωτονίων (electron beam lithography /ion beam lithography/proton beam writing)

Στη λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων, μία δέσμη από ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας προσκρούει σε ένα υμένιο φωτοευαίσθητου πολυμερικού υλικού. Τα ηλεκτρόνια αυτά δημιουργούν μια σειρά από δευτερεύοντα ηλεκτρόνια χαμηλότερης ενέργειας, τα οποία δημιουργούν ενεργές ενδιάμεσες ουσίες. Αυτές κατά την αποδιέργυσή τους, πυροδοτούν χημικές αντιδράσεις που οδηγούν σε αλλαγή της διαλυτότητας του υμενίου στις περιοχές που εκτίθενται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των επιθυμητών δομών έπειτα από εμφάνιση με κατάλληλο διαλύτη που απομακρύνει το πολυμερές που έχει εκτεθεί ή δεν έχει εκτεθεί, ανάλογα με το αν το φωτοπολυμερές είναι θετικού ή αρνητικού τόνου αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό αυτής της τεχνικής είναι το φαινόμενο της οπισθοσκέδασης, δηλαδή της σκέδασης των ηλεκτρονίων προς τα πίσω σε μια περιοχή μεγαλύτερη από την επιθυμητή και θολώματος της δέσμης με αποτέλεσμα να μην είναι ικανή να διεισδύσει σε μεγάλο βάθος μέσα στο υπόστρωμα^{11,28}.

Η λιθογραφία δέσμης ιόντων λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με τη δέσμη ηλεκτρονίων με τη διαφορά ότι η δέσμη ηλεκτρονίων αντικαθίσταται με δέσμη ιόντων (π.χ. Ga⁺, H⁺, He⁺). Σε αυτήν την περίπτωση, η απώλεια της ενέργειας των ιόντων είναι μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων κατά την πρόσκρουσή τους στο φωτοπολυμερικό υμένιο και έτσι η διείδυση της δέσμης των ιόντων στην προς την κατεργασία επιφάνεια είναι πολύ μικρότερη από αυτή της δέσμης των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται εκτεταμένα φαινόμενα οπισθοσκέδασης¹¹.

Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των μεθόδων είναι η μεγάλη διακριτική ικανότητα, δηλαδή η ικανότητα αποτύπωσης δομών μικρών διαστάσεων χωρίς παραμόρφωση, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται δομές μεγέθους μέχρι και 5-10 nm^{28,29,30}. Παρά το μικρό μέγεθος των δομών που επιτυγχάνονται με αυτές τις τεχνικές, δεν εφαρμόζονται σε βιομηχανική κλίμακα γιατί είναι πάρα πολύ χρονοβόρες και ακριβές σε σχέση με άλλες τεχνικές. Η κύρια χρήση τους είναι η κατασκευή масκών φωτολιθογραφίας¹¹.

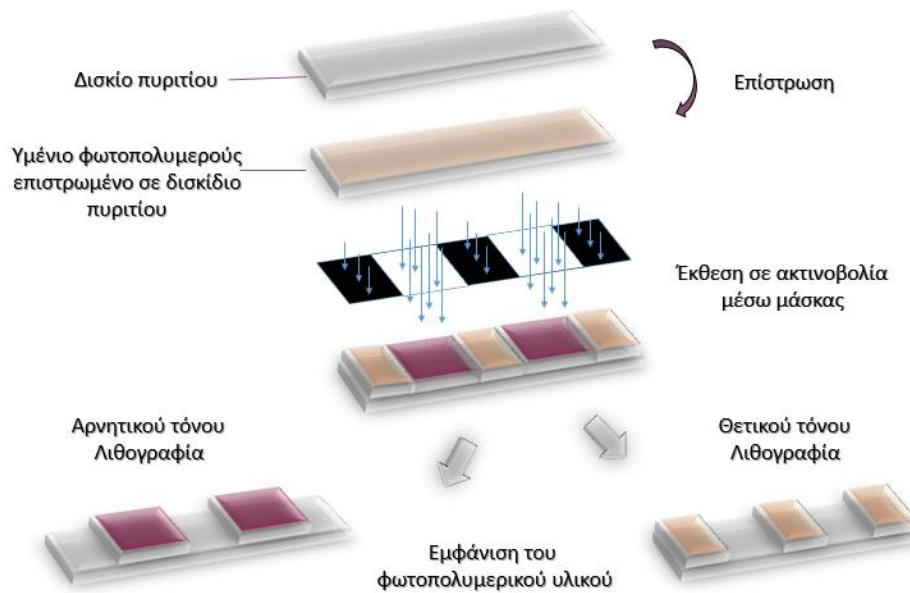
Μία άλλη λιθογραφία δέσμης ιόντων είναι αυτή της δέσμης πρωτονίων. Η δέσμη πρωτονίων δεν παρουσιάζει το πρόβλημα της οπισθοσκέδασης και μπορεί να διεισδύσει σε μεγαλύτερη απόσταση στο υπόστρωμα ακολουθώντας μια ευθεία διαδρομή σε αντίθεση με τις δέσμες ιόντων και ηλεκτρονίων που διαχέονται καθώς διεισδύουν στο υπόστρωμα (Εικόνα 1). Ως εκ τούτου, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την έκθεση παχιών υμενίων και κατασκευάζονται δομές με διαστάσεις μέχρι και 20 nm³¹.



Εικόνα 1: Σύγκριση των τεχνικών (α) λιθογραφία δέσμης πρωτονίων (β) λιθογραφία δέσμης ιόντων (γ) και λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων ως προς τη διείδυση στο υπόστρωμα³¹.

2.7 Φωτολιθογραφία

Η φωτολιθογραφία ή οπτική λιθογραφία είναι μια μέθοδος για τη μεταφορά ενός γεωμετρικού μοτίβου αποτυπωμένου σε μάσκα σε ένα φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο μέσω έκθεσης σε κατάλληλη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Σχήμα 8). Ένα πολυμερικό υμένιο θεωρείται φωτοευαίσθητο όταν οι φυσικοχημικές του ιδιότητες αλλάζουν με την έκθεση σε φως. Η ιδιότητα που μεταβάλλεται συνήθως είναι η διαλυτότητα του υμενίου, η οποία είτε αυξάνεται και οι περιοχές που εκτίθενται στο φως καθίστανται διαλυτές σε κατάλληλο διαλύτη, π.χ. λόγω διάσπασης της βασικής αλυσίδας του πολυμερούς ή μειώνεται καθώς οι περιοχές που εκτίθενται στο φως δικτυώνονται δημιουργώντας σταυροδεσμούς οι οποίοι τις καθιστούν αδιάλυτες³². Στην πρώτη περίπτωση η λιθογραφία και το φωτοευαίσθητο πολυμερές χαρακτηρίζεται ως θετικού τόνου, ενώ στη δεύτερη αρνητικού τόνου. Η αλλαγή διαλυτότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί και με αλλαγή της υδροφιλικότητας κάποιας πλευρικής ομάδας του πολυμερούς οδηγώντας τόσο σε θετικού τόνου όσο και σε αρνητικού τόνου απεικόνιση, αναλόγως του εμφανιστή που θα χρησιμοποιηθεί¹¹. Η μάσκα, η οποία αποτελεί απαραίτητο τμήμα της φωτολιθογραφίας, αποτελείται από διαφανές υλικό, όπως γυαλί ή χαλαζία και φέρει στη μία πλευρά της σχηματοποιημένη μεταλλική επικάλυψη συνήθως χρωμίου. Το φως διέρχεται από τις περιοχές που δεν έχουν μεταλλική επικάλυψη ενώ δεν διέρχεται από τις αδιαφανείς περιοχές του χρωμίου³³. Ανάλογα με το υλικό η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για την έκθεση μπορεί να είναι στην περιοχή του υπεριώδους (UV, 360-460 nm), του βαθέως υπεριώδους (DUV, 248,193,157 nm) ή ακόμα και του ακραίου υπεριώδους (EUV, 0,2-100 nm). Με τη φωτολιθογραφία υπεριώδους ακτινοβολίας μπορούν να κατασκευαστούν μικροδομές με διαστάσεις έως και 0,35 μm ενώ για μικρότερες δομές από αυτές χρησιμοποιείται το βαθύ υπεριώδες με το οποίο μπορούν να δημιουργηθούν δομές έως και περίπου τα 30 nm³⁴. Για την επίτευξη ακόμα μικρότερων δομών (<25 nm) απαιτείται χρήση ακραίας υπεριώδους ακτινοβολίας^{35,36}.



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της φωτολιθογραφίας θετικού και αρνητικού τόνου για την αποτύπωση σχήματος σε φωτοευαίσθητο υμένιο.

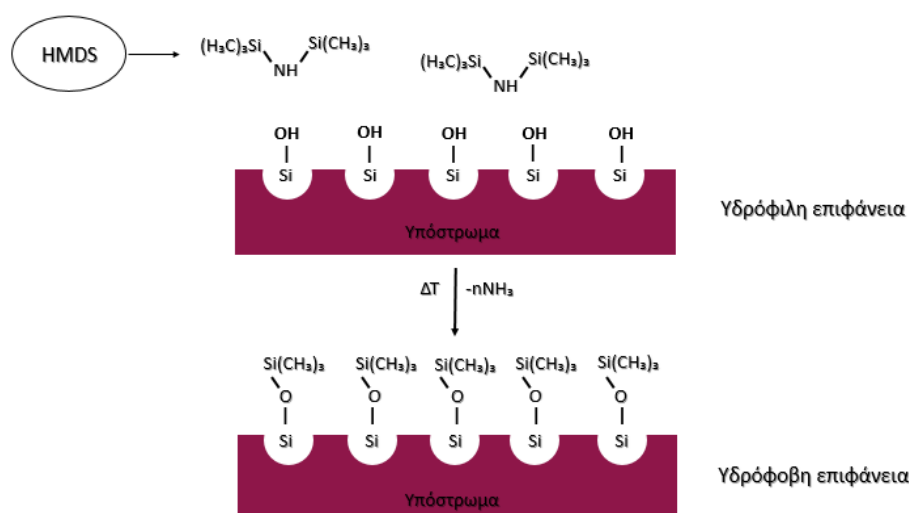
2.7.1 Τα βασικά στάδια μιας φωτολιθογραφικής διαδικασίας

1. Καθαρισμός του υποστρώματος

Η επιφάνεια που θα γίνει η εναπόθεση του φωτοπολυμερούς πρέπει να είναι απολύτως καθαρή για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή πρόσφυση του φωτοπολυμερούς στο υπόστρωμα. Για το λόγο αυτό πρέπει να απομακρυνθούν από την επιφάνεια τυχόν λιπαρές ουσίες, αιωρούμενα σωματίδια αλλά και το στρώμα του φυσικού διοξειδίου του πυριτίου που σχηματίζεται στην επιφάνεια του δισκίου κατά την έκθεση στον αέρα, όπως επίσης και να λειανθούν μικροοπές και ατέλειες της επιφάνειας. Ο πιο απλός τρόπος καθαρισμού είναι η εμβάπτιση του υποστρώματος σε διαλύτες όπως η ακετόνη και η ισοπροπανόλη σε λουτρό υπερήχων. Το επιφανειακό SiO_2 απομακρύνεται εύκολα με αραιό διάλυμα υδροφθορίου (HF), ενώ τα οργανικά υπολείμματα μπορούν να απομακρυνθούν με κατεργασία σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και θειικού οξέος σε αναλογία 1:1, το οποίο είναι γνωστό ως διάλυμα πιράνχα¹¹.

2. Τροποποίηση επιφάνειας (Priming)

Σε πολλές επιφάνειες που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για φωτολιθογραφικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων και των δισκιδίων πυριτίου, δημιουργείται με τη πάροδο του χρόνου και λόγω της αλληλεπίδρασης με τον ατμοσφαιρικό αέρα ένα λεπτό στρώμα οξειδίου. Το επιφανειακό αυτό οξείδιο δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τους υδρατμούς του αέρα, με συνέπεια να επηρεάζεται η καλή πρόσφυση του πολυμερικού υμενίου στην επιφάνεια. Ειδικά για τα δισκίδια πυριτίου, τα άτομα σιλανόλης (SiOH) που δημιουργούνται στη επιφάνεια, την καθιστούν υδρόφιλη και όχι τόσο κατάλληλη για την εναπόθεση φωτοευαίσθητων υμενίων. Γι' αυτό το λόγο, πριν την επίστρωση του φωτοπολυμερούς, πραγματοποιείται η διεργασία του priming, δηλαδή η χημική τροποποίηση του υποστρώματος για τη δημιουργία ενός πιο υδροφοβικού περιβάλλοντος που προάγει την προσκόλληση του φωτοπολυμερούς στο υπόστρωμα. Μια τέτοια ουσία, αποτελεί το εξαμεθυλοδισιλοζάνιο (HMDS), το οποίο αντικαθιστά τις ομάδες υδροξυλίου, δημιουργώντας ευνοϊκό περιβάλλον για την προσκόλληση της φωτοευαίσθητης ουσίας στο υπόστρωμα (Σχήμα 9). Το HMDS εναποτίθεται στο υπόστρωμα είτε με τη μορφή ατμών είτε με επίστρωσή απευθείας στο δισκίο^{37,38}.



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής μιας υδρόφιλης επιφάνειας πυριτίου σε υδρόφοβη μέσω τροποποίησης με HMDS το οποίο αυξάνει τη πρόσφυση των φωτοπολυμερικών υμενίων στο υπόστρωμα.

3. Επίστρωση του φωτοευαίσθητου πολυμερικού υλικού

Η εναπόθεση του φωτοπολυμερούς πραγματοποιείται με έγχυση διαλύματος του φωτοπολυμερούς στην επιφάνεια ενώ αυτή περιστρέφεται με σταθερή γωνιακή ταχύτητα. Το υμένιο που σχηματίζεται πρέπει να είναι ισόπαχο σε όλη την επιφάνεια έτσι ώστε η απορρόφηση της ακτινοβολίας να μην ποικίλει από σημείο σε σημείο. Διαφορετικά και η διαλυτότητα του υμενίου στο στάδιο της εμφάνισης θα ποικίλει από σημείο σε σημείο και η αποτύπωση των δομών δεν θα γίνει με τον ίδιο τρόπο σε όλη την έκταση της επιφάνειας. Τα χαρακτηριστικά του φωτοπολυμερικού υμενίου καθορίζονται από τον χρόνο περιστροφής, την ταχύτητα περιστροφής, τη συγκέντρωση του διαλύματος του πολυμερούς και το εσωτερικό ιξώδες του πολυμερούς³⁹. Προκειμένου να ληφθεί ομοιογενές υμένιο πρέπει να βελτιστοποιηθούν όλες οι προαναφερθείσες παράμετροι.

4. Θέρμανση πριν την έκθεση (soft bake ή post applied bake, PAB)

Μετά την επίστρωση του φωτοπολυμερούς συνήθως πραγματοποιείται θέρμανση της επιφάνεια, π.χ., του δισκιδίου πυριτίου, για να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύτη και να μειωθεί ο ελεύθερος όγκος του υμενίου. Με αυτή τη διεργασία βελτιώνεται επίσης η πρόσφυση του υμενίου, η ομοιομορφία του, η αντοχή στην εγχάραξη και η διακριτική ικανότητα της φωτολιθογραφικής διαδικασίας που ακολουθεί⁴⁰.

5. Έκθεση

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται έκθεση του φωτοπολυμερικού υμενίου σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλου μήκους ή μηκών κύματος για την αποτύπωση του σχήματος της μάσκας στο υμένιο. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης ενεργοποιούνται οι εκτιθέμενες φωτοευαίσθητες περιοχές του υμενίου με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαλυτότητάς τους στην περίπτωση των συμβατικών φωτοπολυμερικών υλικών ή την παραγωγή οξέος από τα μόρια του φωτοευαίσθητοποιητή, το οποίο στη συνέχεια καταλύει ή εκκινεί αντιδράσεις που οδηγούν στην αλλαγή της διαλυτότητας για υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης¹¹.

6. Θέρμανση μετά την έκθεση (post exposure bake, PEB)

Αυτό το στάδιο πρόσθετης θέρμανσης μετά την έκθεση (PEB) είναι κυρίως απαραίτητο για τα χημικώς ενισχυόμενα υλικά αφού αυτή η επιπρόσθετη θέρμανση καθορίζει την κινητική των θερμοχημικών αντιδράσεων, δηλαδή, την κατάλυση ή εκκίνηση, αντιδράσεων που οδηγούν στην αλλαγή της διαλυτότητας του φωτοπολυμερικού υμενίου⁴¹. Αντίθετα, είναι προαιρετικό στην περίπτωση των συμβατικών φωτοπολυμερικών υλικών.

7. Εμφάνιση

Η εμφάνιση γίνεται με εμβάπτιση του δισκιδίου σε διαλύτη κατάλληλο για την απομάκρυνση των διαλυτών περιοχών του φωτοπολυμερούς ώστε να παραμένει στην επιφάνεια το επιθυμητό σχήμα. Εάν η λιθογραφία είναι θετικού τόνου απομακρύνονται οι περιοχές που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία και έχουμε αποτύπωση δομής με αυτή της μάσκας ενώ στην αρνητικού τόνου λιθογραφία δημιουργούνται δομές αντίθετες με αυτές της μάσκας αφού οι δομές που εκτίθενται στην ακτινοβολία καθίστανται αδιάλυτες στον εμφανιστή⁴².

8. Θέρμανση μετά την εμφάνιση (hard bake)

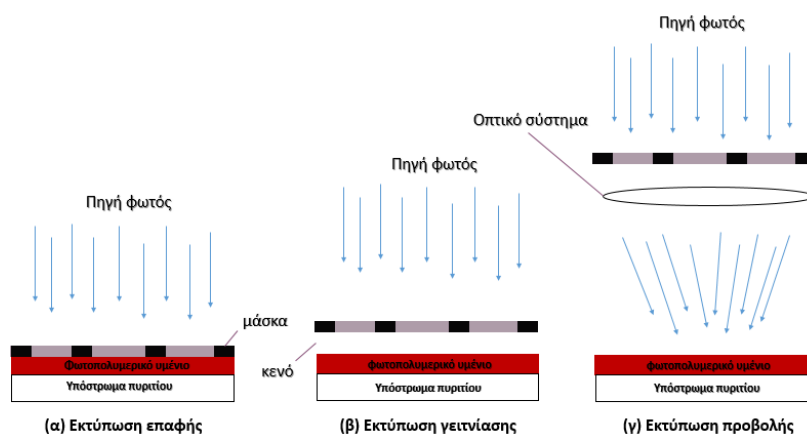
Η θέρμανση μετά την εμφάνιση συμβάλλει στη σκλήρυνση του πολυμερούς, προσδίδει μεγαλύτερη αντοχή στο υμένιο στην εγχάραξη, και απομακρύνει υπολείμματα διαλύτη (εμφανιστή) με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η προσκόλληση του εναπομείναντος πολυμερούς στο υπόστρωμα¹¹.

9. Εγχάραξη

Μετά την εμφάνιση του φωτοπολυμερικού υμενίου μπορεί να γίνει εγχάραξη του υποστρώματος για τη μεταφορά του σχήματος από το υμένιο στο υπόστρωμα και έπειτα απομάκρυνση του εναπομείναντος φωτοπολυμερούς, οπότε το σχηματοποιημένο πολυμερές παίζει το ρόλο μάσκας για την εγχάραξη. Η μεταφορά του σχήματος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με υγρή εγχάραξη με χρήση ισχυρών οξέων, είτε από ιοντισμένο αέριο το οποίο δημιουργείται με ηλεκτρική εκκένωση πλάσματος⁴³. Με την εγχάραξη είναι δυνατόν ένα δισδιάστατο σχήμα να μεταφερθεί στις τρεις διαστάσεις.

2.7.2 Συστήματα λιθογραφίας

Η επιλεκτική διέλευση του υπεριώδους φωτός μέσω μάσκας επιτρέπει τη μεταφορά των γεωμετρικών σχεδίων από τη μάσκα στο φωτοπολυμερικό υμένιο. Η διαδικασία αντιγραφής του σχήματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρία συστήματα λιθογραφίας: α) επαφής (contact printing), β) γειννίαςσης (proximity printing), και γ) προβολής (projection printing) (Σχήμα 10). Στην εκτύπωση επαφής η μάσκα και το υπόστρωμα έρχονται σε άμεση επαφή με αποτέλεσμα υψηλή διακριτική ικανότητα, δηλαδή υψηλή πιστότητα μεταφοράς του σχήματος από τη μάσκα στο υπόστρωμα. Ωστόσο, λόγω της άμεσης επαφής, τυχόν μικροσωματίδια ανάμεσα στη μάσκα και στο υπόστρωμα είναι πιθανόν να δημιουργήσουν ατέλειες στην τελική δομή. Στην εκτύπωση γειννίαςσης υπάρχει ένα μικρό κενό ανάμεσα στη μάσκα και το υπόστρωμα με αποτέλεσμα να μη δημιουργούνται ατέλειες στη δομή λόγω της παρουσίας μικροσωματιδίων. Βέβαια, λόγω των φαινομένων περίθλασης που λαμβάνουν χώρα, μειώνεται η διακριτική ικανότητα. Τέλος, στα συστήματα εκτύπωσης προβολής η μάσκα προβάλλεται μέσα από έναν φακό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται ελαττώματα στην τελική δομή λόγω μικροσωματιδίων και η διακριτική ικανότητα να είναι αρκετά υψηλή αφού δεν υπάρχουν πια φαινόμενα περίθλασης. Παράλληλα, όμως, η μέθοδος αυτή οδηγεί σε σμίκρυνση του σχήματος μέχρι και πέντε φορές σε σχέση με αυτό που έχει αποτυπωθεί στη μάσκα και έχει αρκετά περίπλοκη οργανολογία, αυξάνοντας σημαντικά το κόστος⁴⁴.



Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση των τριών διαφορετικών ειδών συστημάτων λιθογραφίας (α) με επαφή, (β) με γειννίαση, και (γ) με προβολή.

2.7.3 Πηγές έκθεσης

Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί μια φωτολιθογραφική διεργασία είναι η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η λιθογραφία στο υπεριώδες (ultraviolet, UV) (360-460 nm) και στο βαθύ υπεριώδες (deep ultraviolet, DUV) (248, 193 ή 157 nm) αποτελούν τις πιο διαδεδομένες μεθόδους φωτολιθογραφίας. Αρχικά, για την έκθεση των φωτοπολυμερικών υμενίων χρησιμοποιούνταν λυχνίες εκκένωσης Hg και με χρήση φίλτρων απομονώνονταν οι τρεις περιοχές εκπομπής με την ισχυρότερη ένταση στο υπεριώδες, μία στα 436 nm (g-line), μία στα 405 nm (h-line) και μία στα 365 nm (i-line). Αργότερα, αναπτύχθηκαν συστήματα βασισμένα στο βαθύ υπεριώδες για τη δημιουργία ακόμα μικρότερων δομών στα οποία χρησιμοποιήθηκαν πηγές έκθεσης με μονοχρωματικής ακτινοβολίας (excimer lasers) όπως: KrF που εκπέμπει στα 248 nm, ArF που εκπέμπει στα 193 nm, και F₂ που εκπέμπει στα 157 nm^{45,46}.

Όσο μειώνεται το μήκος κύματος της ακτινοβολίας τόσο μικραίνουν και οι δομές που μπορούν να αποτυπωθούν στο υμένιο¹⁸. Η ελάχιστη δομή που μπορεί να αποτυπωθεί με μεγάλη ακρίβεια στο υμένιο και που ορίζει τελικά τη διακριτική ικανότητα της λιθογραφικής διαδικασίας, είναι ανάλογη με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας σύμφωνα με το νόμο του Rayleigh:

$$R=CD_{min} = \frac{k \cdot \lambda}{NA}$$

όπου k: μία παράμετρος που εξαρτάται από τη διαδικασία αποτύπωσης και τις ιδιότητες των υλικών που τυχόν χρησιμοποιούνται σε αυτήν, με τιμές μεταξύ 0.4-1, λ: το μήκος κύματος της ακτινοβολίας έκθεσης και NA: το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού^{11,47}.

Συνεπώς για να κατασκευαστούν ακόμα μικρότερες δομές, της τάξης των νανομέτρων, χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία στο ακραίο υπεριώδες (extreme ultraviolet, EUV) συνήθως με ταινία εκπομπής στα 13,4 nm. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες πηγές εκπομπής ακτινοβολίας στο ακραίο UV παράγονται από πλάσμα είτε επαγόμενο από λέιζερ (laser produced plasma, LPP) ή από εκφόρτιση (discharge produced plasma, DPP)⁴⁸.

2.8 Λιθογραφικά υλικά

Για να χρησιμοποιηθεί ένα πολυμερές ως υλικό λιθογραφίας θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις. Με βάση τα στάδια μιας λιθογραφικής διεργασίας που προαναφέρθηκαν, οι βασικές φωτοχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες ενός πολυμερούς θα πρέπει να είναι οι ακόλουθες^{11,35}:

- ❖ δυνατότητα σχηματισμού ομοιόμορφης επίστρωσης μέσω περιστροφής
- ❖ απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε κατάλληλο μήκος κύματος
- ❖ φωτοχημεία που οδηγεί σε αλλαγή της διαλυτότητας του υλικού μετά από έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία
- ❖ αντίσταση στο μέσο εγχάραξης εάν πρόκειται να πραγματοποιηθεί εγχάραξη μετά τη διεργασία της λιθογραφίας
- ❖ μεγάλη διακριτική ικανότητα, δηλαδή ικανότητα αποτύπωσης δομών μικρών διαστάσεων χωρίς παραμόρφωση
- ❖ αντοχή στη θέρμανση
- ❖ ικανοποιητική πρόσφυση στο υπόστρωμα

Τα περισσότερα λιθογραφικά υλικά αποτελούνται από το πολυμερές, ένα φωτοευαίσθητοποιητή και διάφορα ειδικά πρόσθετα, όλα διαλυμένα σε κατάλληλο διαλύτη. Ο διαλύτης καθορίζει την ποιότητα της επίστρωσης (πρέπει να έχει κατάλληλο σημείο ζέσεως έτσι ώστε να εξατμίζεται αργά κατά την επίστρωση και να γίνεται ομοιόμορφη κατανομή του υλικού) και τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιούνται οι θερμικές κατεργασίες. Ασφαλώς ιδιαίτερο ρόλο για την ομοιόμορφη επίστρωση διαδραματίζει και το ίδιο το πολυμερές, το οποίο θα πρέπει να πληροί τις προδιαγραφές που προαναφέρθηκαν. Ο φωτοευαίσθητοποιητής από την άλλη απορροφά έντονα την ακτινοβολία και συντελεί στην ενεργοποίηση μιας χημικά δραστικής ομάδας είτε στο μόριο του είτε στο πολυμερές με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαλυτότητας του τελευταίου. Το ρόλο του φωτοευαίσθητοποιητή μπορεί να τον έχει και το ίδιο το πολυμερές. Τέλος, τα πρόσθετα εισάγονται για τη βελτίωση κάποιας από τις ιδιότητες του υλικού, π.χ. την αντοχή στην

εγγάραξη. Τα λιθογραφικά υλικά ανάλογα με τη χημική τους σύσταση διακρίνονται σε συμβατικά και μηχανισμού χημικής ενίσχυσης. Και τα δύο είδη χρησιμοποιούνται τόσο στη θετικού όσο και στην αρνητικού τόνου λιθογραφία¹¹.

2.8.1 Συμβατικά λιθογραφικά υλικά

Το κύριο χαρακτηριστικό των συμβατικών λιθογραφικών υλικών είναι ότι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία επιφέρει την επιθυμητή αλλαγή της διαλυτότητας κατά την απορρόφησή της από το ίδιο το πολυμερές κατά τη διάρκεια της έκθεσης, η οποία συνήθως γίνεται σε μήκη κύματος από 350-450 nm. Για παράδειγμα σε συμβατικά υλικά θετικού τόνου, όπως το σύστημα νεολάκας-διαζωναφθοκινόνης⁴⁷, μια υδρόφοβη περιοχή μετατρέπεται σε υδρόφιλη κατά την έκθεση της σε ακτινοβολία, λόγω του παραγόμενου οξέος που καθιστά όλη την περιοχή υδρόφιλη και διαλυτή στο υδατικό διάλυμα βάσης που χρησιμοποιείται ως εμφανιστής. Το πλέον αντιπροσωπευτικό υλικό θετικού τόνου με αλλαγή διαλυτότητας μέσω διάσπασης της κύριας αλυσίδας του πολυμερούς είναι ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας). Το συγκεκριμένο υλικό απαρτίζεται από ένα και μόνο συστατικό, δηλαδή το πολυμερές έχει και το ρόλο του φωτοευαισθητοποιητή. Χαρακτηριστικά υλικά αρνητικού τόνου, δηλαδή υλικά που δημιουργούν σταυροδεσμούς είναι τα υλικά που βασίζονται στη φωτοχημεία των αζιδίων. Τα αζίδια κατά την έκθεση σε ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού ελευθερώνουν N₂ παράγοντας νιτρένια, τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τον διπλό δεσμό των πολυμερικών αλυσίδων δρώντας ως διασταυρωτές. Το κυριότερο μειονέκτημα των υλικών αυτών είναι η μεγέθυνση των δομών που οφείλεται σε διείσδυση του εμφανιστή (οργανικός διαλύτης) στις εκτεθειμένες περιοχές τις οποίες δεν διαλύει. Τα υλικά αυτά, ενώ προσφέρουν μεγάλη διακριτική ικανότητα, παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία καθώς απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι έκθεσης για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων οξέος¹¹.

2.8.2 Υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης

. Ως φωτοπαραγωγοί οξέος χρησιμοποιούνται συνηθέστερα άλατα σουλφωνίου και ιωδωνίου και πιο συγκεκριμένα άλατα Τα υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης χρησιμοποιούνται κυρίως για λιθογραφία σε μήκη κύματος μικρότερα από 350 nm⁴⁹. Περιέχουν έναν φωτοευαισθητοποιητή ή φωτοπαραγωγό οξέος (photo-acid generator, PAG) ο οποίος κατά την έκθεση παράγει φωτοχημικά ένα ισχυρό οξύ. Το οξύ αυτό στη συνέχεια με τη βοήθεια της θέρμανσης (PEB) αναπαράγεται και καταλύει ή εκκινεί αντιδράσεις που οδηγούν σε αλλαγή της διαλυτότητας του πολυμερούς. Η αλλαγή δηλαδή της διαλυτότητας γίνεται μετά την έκθεση⁵⁰ διαρυλοϊωδωνίου⁵¹ και τριαρυλοσουλφονίου⁵². Μετά την έκθεση των υλικών χημικής ενίσχυσης λαμβάνει χώρα συνήθως μία από τις ακόλουθες αντιδράσεις:

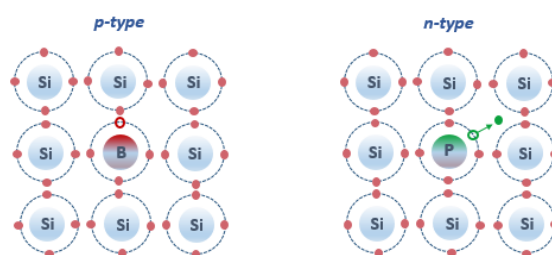
- ❖ Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω πολυμερισμού μιας πλευρικής ομάδας σε υλικά για αρνητική λιθογραφία
- ❖ Οξεοκαταλυόμενη αποπροστασία μιας πλευρικής ομάδας ώστε να επέλθει αλλαγή της διαλυτότητας τόσο για υλικά για θετική όσο και για αρνητική λιθογραφία
- ❖ Οξεοκαταλυόμενη διάσπαση της βασικής αλυσίδας του πολυμερούς σε υλικά για θετική λιθογραφία

Χαρακτηριστικό παράδειγμα υλικού μηχανισμού χημικής ενίσχυσης θετικού τόνου αποτελεί το σύστημα πολυ(4-t-βουτοξυκαρβονυλοξυστυρένιου) (tBOC-στυρένιο) και εξαφθοροαντιμονικού τριφαινυλοσουλφονίου ως φωτοευαισθητοποιητή. Κατά την έκθεση δημιουργείται οξύ, το οποίο με τη θέρμανση διαχέεται και μετατρέπει τις tBOC ομάδες σε πολικές φαινολικές ομάδες. Οι εκτεθειμένες περιοχές απομακρύνονται με εμβάπτιση σε έναν πολικό διαλύτη (υδατικό διάλυμα βάσης) ή παραμένουν όταν χρησιμοποιείται ένας μη πολικός διαλύτης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φωτοπολυμερικών υλικών αρνητικού τόνου αυτής της κατηγορίας είναι το αρωματικό πολυμερές κρεσόλης-φορμαλδεΐδης (νεολάκα) σε συνδυασμό με ένα άλας τριαρυλοσουλφονίου σε ρόλο φωτοευαισθητοποιητή. Η αλλαγή διαλυτότητας βασίζεται σε εκκινώμενη από οξέα δημιουργία σταυροδεσμών μεταξύ των

εποξειδικών δακτυλίων της νεολάκας. Σε αυτού του τύπου τα υλικά η ευαισθησία είναι αρκετά μεγάλη αφού χρειάζονται μικροί χρόνοι έκθεσης για τη παραγωγή μιας μικρής ποσότητας οξέος που δρα ως καταλύτης μετά την έκθεση^{11,47}.

2.9 Υποστρώματα πυριτίου

Ως υποστρώματα για την εναπόθεση πολυμερικών υμενίων και τη σχηματοποίησή τους χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο κρύσταλλοι ημιαγωγών και συγκεκριμένα δισκίδια πυριτίου ως έχουν ή εμπλουτισμένα με προσμίξεις τρισθενών [βόριο (B) ή αλουμίνιο (Al)] ή πεντασθενών στοιχείων [φωσφόρος (P) ή αρσενικό (As)]. Στην πρώτη περίπτωση όπου στον κρύσταλλο πυριτίου προστίθεται τρισθενές στοιχείο το πυρίτιο ονομάζεται p-τύπου (positive) και έχει ένα λιγότερο εξωτερικό ηλεκτρόνιο αφήνοντας έτσι μια οπή στη ζώνη σθένους των ατόμων πυριτίου (αποδέκτης). Αντιθέτως, στον κρύσταλλο πυριτίου που προστίθεται πεντασθενές στοιχείο το πυρίτιο ονομάζεται n-τύπου (negative) και υπάρχει ένα παραπάνω εξωτερικό ηλεκτρόνιο (δότης) στη ζώνη σθένους των ατόμων πυριτίου (Σχήμα 11). Το ηλεκτρόνιο αυτό δεν είναι συνδεδεμένο με το άτομο του πυριτίου με αποτέλεσμα να μετακινείται και να χρησιμεύει ως φορέας φορτίου⁵³. Τα δισκία πυριτίου χρησιμοποιούνται ευρέως ως στερεά υποστρώματα πάνω στα οποία εναποτίθενται επιπλέον στρώματα υλικών, λόγω των χαρακτηριστικών του κρυστάλλου τους (άκαμπος, επίπεδος, λείος) σε συνδυασμό με τη χαμηλού κόστους παραγωγή τους, αφού το πυρίτιο αποτελεί το δεύτερο σε αφθονία χημικό στοιχείο στη γη⁵⁴.



Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση κρυστάλλου πυριτίου εμπλουτισμένου με τρισθενές βόριο (αριστερά) ή πεντασθενή φωσφόρο (δεξιά)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

3.1 Εισαγωγή

Η τοπογραφία και οι χημικές ιδιότητες του υποστρώματος στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα επιδρούν δραματικά στις λειτουργίες του κυττάρου. Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των κυττάρων με το υπόστρωμα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε θεμελιώδεις μελέτες της βιολογίας του κυττάρου, αλλά και σε πληθώρα εφαρμογών που εκτείνονται από τη μηχανική ιστών έως τους κυτταρικούς βιοαισθητήρες⁵⁵. Υπό αυτό το πρίσμα, οι τεχνολογίες κατασκευής υποστρωμάτων με καθορισμένη γεωμετρία επιτρέπουν τον έλεγχο του σχήματος και του μεγέθους των κυττάρων και των πυρήνων τους και κατά συνέπεια επηρεάζουν την πρόσφυση, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ακολουθεί μια σύντομη αναφορά στις κυριότερες εφαρμογές σχηματοποιημένων επιφανειών ως υποστρωμάτων για την ανάπτυξη κυττάρων.

3.1.1 Σχηματοποιημένες επιφάνειες ως υποστρώματα κυτταροκαλλιεργειών για την κατανόηση κυτταρικών λειτουργιών

Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για καλλιέργειες κυττάρων με στόχο την προσομοίωση της υψηλά οργανωμένης δομής του *in vivo* μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων, που αποτελείται από ποικίλες πρωτεΐνες όπως κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες, και τη διατήρηση των *in vivo* χαρακτηριστικών τους σε *in vitro* συνθήκες. Οι μελέτες που πραγματοποιούνται σε τέτοια υποστρώματα αποτελούν βασική πηγή πληροφοριών για την κατανόηση της συμπεριφοράς και της λειτουργίας του κυττάρου^{13,56}. Επίσης, οι σχηματοποιημένες

επιφάνειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως υποστρώματα για συγκαλλιέργειες κυττάρων για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων τύπων κυττάρων που δεν είναι δυνατή στα παραδοσιακά συστήματα συγκαλλιέργειας καθώς δεν ευνοείται η ελεγχόμενη προσκόλληση διαφορετικών τύπων κυττάρων στο ίδιο υπόστρωμα. Επομένως, με τη χρήση επιφανειών με καθορισμένη γεωμετρία επιτυγχάνεται ο έλεγχος της πρόσφυσης διαφόρων τύπων κυττάρων στην ίδια επιφάνεια, παρέχοντας ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της κινητικότητας των κυττάρων, των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων καθώς και τη λειτουργία πολλών οργάνων⁵⁷.

3.1.2 Μηχανική ιστών

Η μηχανική ιστών βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν νέο ιστό όταν καλλιεργούνται σε ένα τεχνητό ικρίωμα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια *in vivo* ως εμφύτευμα. Επομένως, η αρχιτεκτονική και η τοπογραφία ενός εμφυτεύματος είναι εξίσου σημαντική με την επιλογή του υλικού για το σχεδιασμό εμφυτευμάτων. Πειραματικά η ανάπτυξη ενός υλικού και η αξιολόγηση του ως τεχνητό ικρίωμα περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης της επιφάνειας του ικριώματος στην προσκόλληση, την ανάπτυξη, την κινητικότητα, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων⁵⁸.

3.1.3 Κυτταρικοί βιοαισθητήρες

Ως βιοαισθητήρας περιγράφεται μία αναλυτική συσκευή για τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων ενώσεων που αποτελείται από ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης, όπως ένζυμα, ολόκληρα κύτταρα, μιτοχόνδρια, ιστοί, νουκλεϊκά οξέα ή αντισώματα, ακινητοποιημένο στην επιφάνεια ενός μεταλλάκτη σήματος με στόχο τη μετατροπή μίας βιολογικής ή βιοχημικής αντίδρασης σε ηλεκτρικό σήμα⁵⁹. Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν ολόκληρα κύτταρα ως στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης ονομάζονται

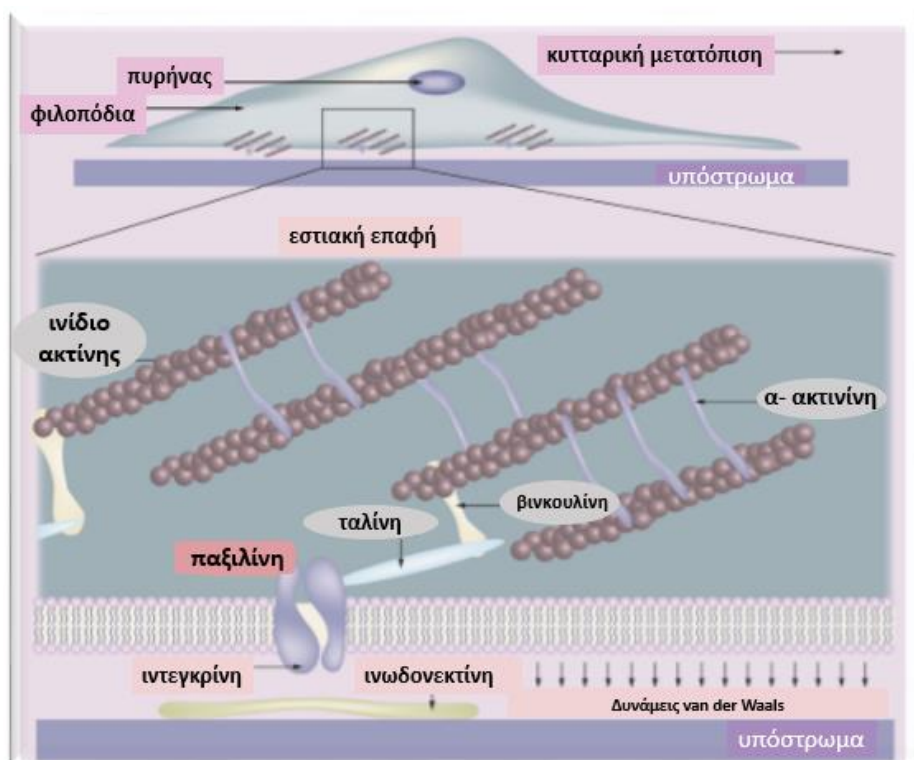
κυτταρικοί βιοαισθητήρες. Ο επιτυχής σχεδιασμός ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα προϋποθέτει την διατήρηση της υψηλά οργανωμένης δομής του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων προκειμένου να επιβιώσουν και να μπορέσουν να ανταποκριθούν σε κάποια βιολογική ουσία. Χρησιμοποιώντας μικροδιαμορφωμένες επιφάνειες επιτυγχάνεται η δημιουργία περιβάλλοντος πανομοιότυπου με το *in vivo* μικροπεριβάλλον των κυττάρων και έτσι εξασφαλίζεται η φυσιολογική ανάπτυξη, λειτουργία και απόκριση των κυττάρων έναντι των ουσιών στόχων¹⁴. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες βρίσκουν εφαρμογές κυρίως στο πεδίο του φαρμακευτικού ελέγχου και της ανίχνευσης παθογόνων και τοξικών ουσιών. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των βιοαισθητήρων είναι η δυνατότητα ταυτόχρονου ελέγχου διαφορετικών παραμέτρων κατά την αξιολόγηση ενός φαρμάκου με χρήση μικρού αριθμού μεμονωμένων κυττάρων σε αντίθεση με τις συμβατικές μελέτες που απαιτούν μεγάλους κυτταρικούς πληθυσμούς ή πειραματόζωα⁶⁰.

3.2 Προσκόλληση κυττάρων σε επιφάνειες

Η ανάπτυξη και φυσιολογική λειτουργία όλων των ιστών του οργανισμού ελέγχεται από ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα είτε μεταξύ των κυττάρων (cell-cell interactions), είτε μεταξύ των κυττάρων και του μεσοκυττάρου περιβάλλοντός τους, δηλαδή με την εξωκυττάρια μήτρα (cell-extracellular matrix interactions). Η δημιουργία δεσμών προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη μεταξύ τους επικοινωνία και συνεπώς στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, την επιβίωση των κυττάρων και γενικότερα τη φυσιολογική ανάπτυξη των ιστών. Τα κύτταρα, λοιπόν, έχουν την ανάγκη να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια μήτρα για να μπορέσουν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν, είτε βρίσκονται εντός είτε εκτός του οργανισμού.

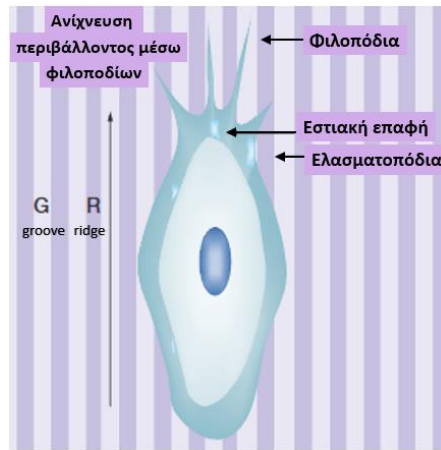
Κατά τη διεργασία της προσκόλλησης των κυττάρων αναπτύσσονται σε αυτά δυνάμεις τόσο εξωκυτταρικές όσο και ενδοκυτταρικές σε εντοπισμένα σημεία της εξωτερικής τους μεμβράνης, που σχηματίζονται από διαμεμβρανικές

πρωτεΐνες που ονομάζονται ιντεγκρίνες, οι οποίες αποτελούνται από δύο διμερείς αλυσίδες (α και β) και προσδένουν το κύτταρο σε άλλα κύτταρα ή σε μια επιφάνεια⁶¹. Πιο ειδικά, κατά την πρόσφυση των κυττάρων σε μια επιφάνεια, το εξωκυττάριο τμήμα των ιντεγκρινών ενώνεται με το υπόστρωμα μέσω πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας όπως η ινωδονεκτίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο, ενώ το ενδοκυττάριο τμήμα τους συνδέεται με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως τα ινίδια ακτίνης, η α-ακτινίνη, η βινκουλίνη και η ταλίνη, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σύμπλεγμα που ονομάζεται εστιακή επαφή (Εικόνα 2)⁶².



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσφυση κυττάρων σε επιφάνειες⁶³.

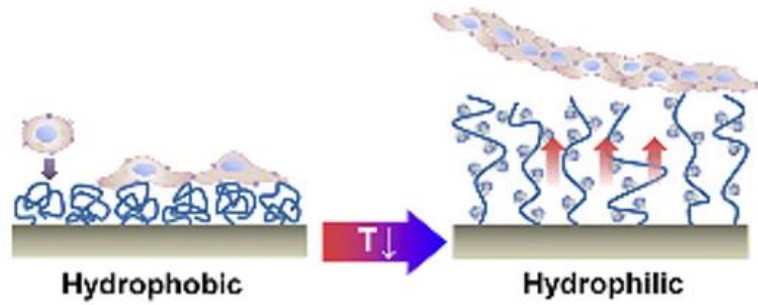
Οι εστιακές επαφές σχηματίζονται κατά κύριο λόγο στα προεξέχοντα μέρη των κυττάρων, όπως τα φιλοπόδια και τα ελασματοπόδια (Εικόνα 3). Τα φιλοπόδια, που έχουν μέγεθος μεταξύ 200 nm και 400 nm, χρησιμεύουν στην ανίχνευση του περιβάλλοντος και λειτουργούν ως άγκυρες για τη μετακίνηση του κυττάρου στις επιφάνειες⁶⁴.



Εικόνα 3: Σχηματικό μοντέλο ευθυγράμμισης και μετακίνησης των κυττάρων σε σχηματοποιημένη επιφάνεια μέσω φιλοποδίων και ελασματοποδίων⁶³.

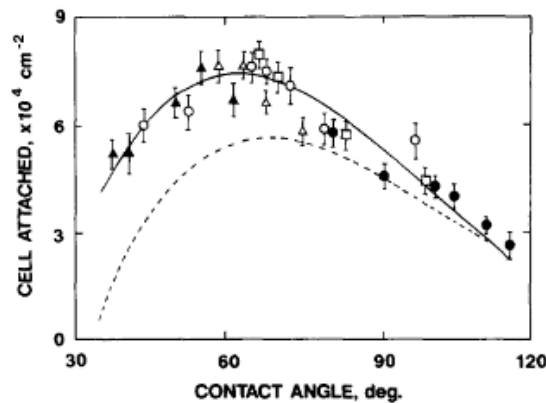
3.3 Υποστρώματα και πολυμερικά υλικά για προσκόλληση κυττάρων

Τα κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να προσκολλώνται και να αναπτύσσονται σε όλες τις επιφάνειες⁶⁵. Ως υποστρώματα για την καλλιέργεια κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα πολυμερικά υλικά καθώς και επιφάνειες από χρυσό, τιτάνιο και πυρίτιο, οι οποίες συνήθως τροποποιούνται με στόχο τη δημιουργία ενεργών ομάδων που ευνοούν την πρόσφυση των κυττάρων σε αυτές⁶⁶. Οι πρωτεΐνες που συνήθως χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση των επιφανειών ώστε να τις καταστήσουν κατάλληλες για την προσκόλληση κυττάρων είναι συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας όπως το κολλαγόνο, η ινωδονεκτίνη και το τριπεπτίδιο RGD⁶⁷. Η τροποποίηση επιφανειών για την προσκόλληση κυττάρων σε αυτές πραγματοποιείται επίσης μέσω αυτοοργανούμενων μονοστρωματικών υμενίων (SAMs), τα οποία φέρουν μια ομάδα που προσδένεται στο υπόστρωμα στο ένα άκρο τους και μια ομάδα στο άλλο άκρο του μορίου κατάλληλη για σύνδεση με πρωτεΐνες, κύτταρα⁶⁸ ή ακόμα και πολυμερή κατάλληλα για την προσκόλληση των κυττάρων⁶⁹. Έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα τείνουν να προσκολλώνται σε σχετικά υδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες παρά σε υδρόφιλες επιφάνειες (Εικόνα 4)⁷⁰.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της υδροφιλικότητας μιας επιφάνειας στην κυτταρική προσκόλληση⁷¹.

Ο Ikada και η ομάδα του αναφέρουν ότι επιφάνειες με γωνίες επαφής περίπου 70° είναι οι βέλτιστες για τη προσκόλληση κυτάρων (Σχήμα 12)⁷².



Σχήμα 12: Γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ της γωνίας επαφής μιας πολυμερικής επιφάνειας και της κυτταρικής προσκόλλησης σε αυτή⁷².

Είναι σημαντικό όμως να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση των κυτάρων με τις επιφάνειες επηρεάζεται και από την χημική σύσταση της επιφάνειας αλλά και από τον τύπο των κυτάρων⁷³. Επιπλέον, τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για καλλιέργειες ή για εφαρμογές στην βιοϊατρική δεν πρέπει να είναι τοξικά για τα κύτταρα.

Στα υλικά που προορίζονται για βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως η μηχανική ιστών και τα τεχνητά μοσχεύματα, είναι απαραίτητη η υψηλή πρόσφυση των κυτάρων, προκειμένου να σχηματιστεί νέος ιστός γύρω από το τεχνητό ικρίωμα⁵⁸. Υλικά που ευνοούν την προσκόλληση και την ανάπτυξη των

κυττάρων σε μια επιφάνεια είναι τα πολυστυρένιο (PS)^{74,75}, πολύ(διμεθυλοσιλοξάνιο) (PDMS)⁷⁶, πολυντοπαμίνη (PDA)^{77,78}, πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA)⁷⁹, πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (PLGA)^{80,81}, πολυλακτίδιο (PLA)⁸¹, πολύ(ουρεθάνη) (PU)⁷⁰, πολυ(γαλακτικο-γλυκολικό) οξύ-co-πολυκαπρολακτόνη (PLGACL)⁸², πολυ-DL-λακτίδιο (PLLA)^{77,75}, πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας) (PHEMA)⁷⁰, πολυκαπρολακτόνη (PCL)^{81,83}, πολυαιθυλενιμίνη (PEI)⁸⁴, πολυ-DL-λακτίδιο (PDLLA)⁸⁵ και πολυ-L-λακτίδιο-co-καπρολακτόνη [P(LLA-CL)]⁸⁶. Επιπρόσθετα, κάποιες πολύ υδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες όπως ο πολυ(3-ύδροξυ βουτυρικός-co-3-ύδροξυ βαλερικός) εστέρας (PHBV)⁸⁷, το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)⁸⁸ και το πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)⁸⁹ πρέπει να τροποποιηθούν με λειτουργικές ομάδες (όπως τα RGD πεπτίδια) που αναγνωρίζονται από τα κύτταρα προκειμένου να καταστεί δυνατή η προσκόλληση των κυττάρων σε αυτές.

Εκτός από τις περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ισχυρή προσκόλληση κυττάρων σε επιφάνειες, σε πολλές εφαρμογές ιατρικών εμφυτευμάτων, όπως τα ενδοαγγειακά στεντ για θεραπεία στεφανιαίας απόφραξης, αλλά και στους βιοαισθητήρες, η κυτταρική προσκόλληση και ενσωμάτωση στην επιφάνεια δεν είναι επιθυμητές⁹⁰. Συνεπώς, για αυτές τις εφαρμογές ενδείκνυται η χρήση υδρόφιλων υλικών που αποτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων όπως τα πολυακρυλικό οξύ (PAA)⁹¹, πολυ(διμεθυλακρυλαμίδιο) (PDMAA)^{92,93}, πολυβινυλική αλκοόλη (PVA)^{77,94}, πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)⁹⁵, πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-b-PMMA)⁹⁶, Πολύ-L-λυσίνη πολυαιθυλενογλυκόλης (PLL-g-PEG)⁹⁷, διακρυλικός εστέρας πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-DA)⁹⁸, πολυλακτίδιο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-PLA)⁸⁰ και διμεθακρυλικός εστέρας πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-DMA)⁹⁹. Γενικά, πολυμερή που φέρουν ομάδες PEG ή πολυαιθυλενοξειδίου (PEO)¹⁰⁰ (τα οποία αποτελούνται από την ίδια δομική μονάδα με μόνη διαφορά ότι τα μόρια της πολυαιθυλενογλυκόλης έχουν μεγαλύτερα μοριακά βάρη σε σχέση με τα μόρια του πολυαιθυλενοξειδίου με αποτέλεσμα κάποιες διαφορές στις ιδιότητες του πολυμερούς), καθώς και τα πολυμερή φθοράνθρακα παρουσιάζουν μη συγκολλητικές για τα κύτταρα ιδιότητες¹⁰¹.

Τέλος, κάποια πολυμερή μπορεί να μεταβάλλουν τις ιδιότητες τους ανάλογα με τις συνθήκες και κατά συνέπεια να επηρεάζεται και η κυτταρική προσκόλληση. Ένα τέτοιο υλικό είναι το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PIPAAm)¹⁰², το οποίο σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τους 32 °C είναι υπερυδρόφιλο και δεν ευνοείται η ανάπτυξη κυττάρων ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες αυξάνεται η υδροφοβικότητά του και συνεπώς είναι εφικτή η προσκόλληση κυττάρων σε αυτό.

Γενικά, ο συνδυασμός υλικών που επιτρέπουν την επιλεκτική προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων, είναι επιθυμητός στα πλαίσια της ανάπτυξης νέων υποστρωμάτων για βιοϊατρικές εφαρμογές⁵⁸. Ένας από τους τρόπους που μπορεί να επιτευχθεί αυτό είναι η σχηματοποίηση επιφανειών για την κατευθυνόμενη προσκόλληση σε συγκεκριμένες περιοχές της επιφάνειας με υλικά που είτε προάγουν είτε εμποδίζουν την κυτταρική προσκόλληση.

3.4 Κατευθυνόμενη προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες.

Οι τεχνικές σχηματοποίησης επιφανειών παρέχουν έναν μοναδικό τρόπο διερεύνησης και κατανόησης ορισμένων βασικών κυτταρικών συμπεριφορών και λειτουργιών όπως η πρόσφυση, η μετανάστευση, η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων¹⁰³. Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί εκατοντάδες μελέτες με διαφορετικά είδη κυττάρων σε επιφάνειες που φέρουν διάφορες δομές οι οποίες έχουν σχηματιστεί με διαφορετικές μεθόδους με στόχο την πλήρη κατανόηση της κυτταρικής συμπεριφοράς και της επίδρασης μιας νανο/μικρο-δομημένης επιφάνειας σε αυτά.

Στον πίνακα 1 αναφέρονται μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με διάφορα είδη κυττάρων σε μια ποικιλία σχηματοποιημένων επιφανειών σχετικά με την επίδραση αυτών των επιφανειών στο μέγεθος, στη μορφολογία, στη διαφοροποίηση και στην ευθυγράμμιση των κυττάρων. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι είναι δυνατή η καθοδηγούμενη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων¹⁰⁴ σε οστεοκύτταρα¹⁰⁵, κύτταρα τένοντα¹⁰⁶, χονδροκύτταρα¹⁰⁷, λιποκύτταρα¹⁰⁵ και

μυϊκά κύτταρα¹⁰⁸ μέσω της καλλιέργειάς τους σε σχηματοποιημένες επιφάνειες που έφεραν δομές διαφορετικού μεγέθους και σχήματος.

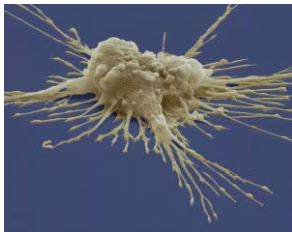
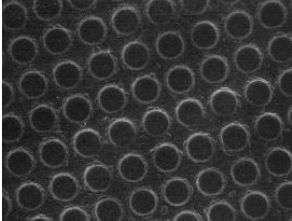
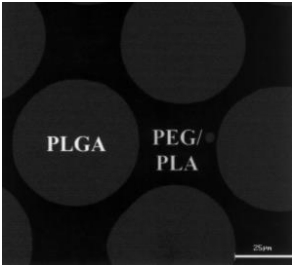
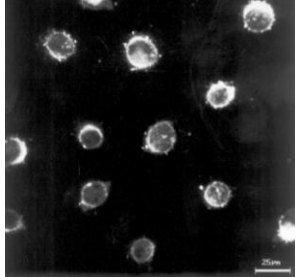


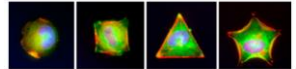

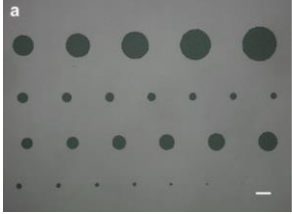
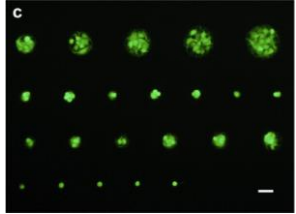
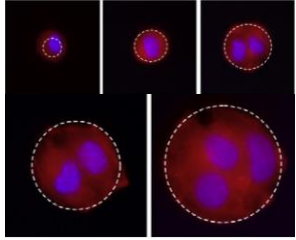
Φυσικά, πολλές φορές δεν αρκεί μόνο η τοπογραφία μιας επιφάνειας για τη διαφοροποίηση των κυττάρων, αλλά ο συνδυασμός κατάλληλης τοπογραφίας και χημείας. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων σε επιφάνειες με ευθυγραμμισμένες δομές δεν είχε καμία επίδραση όσον αφορούσε την διαφοροποίησή τους. Ωστόσο, όταν η καλλιέργεια στις επιφάνειες συνδυάστηκε με ελεγχόμενη παρουσία ακινητοποιημένου αυξητικού παράγοντα PDGF, δημιουργήθηκε μια αρχιτεκτονική που προσομοίαζε τον ιστό του τένοντα και είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα τένοντα, όπως διαπιστώθηκε από την αυξημένη έκφραση δεικτών σχετιζόμενων με κύτταρα του τένοντα¹⁰⁹.


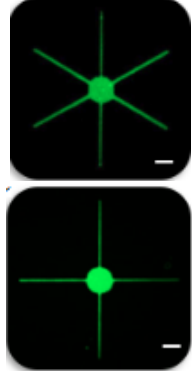
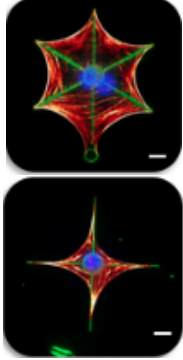

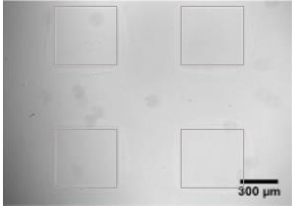
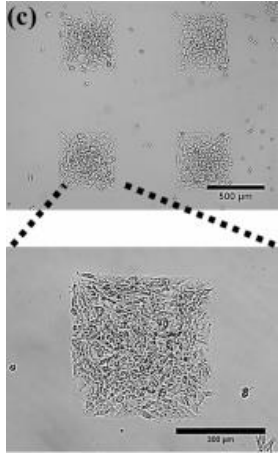
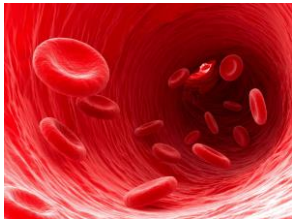
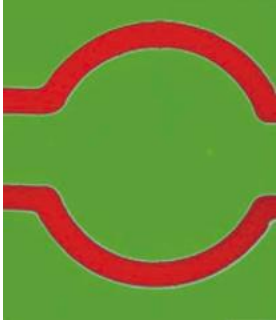
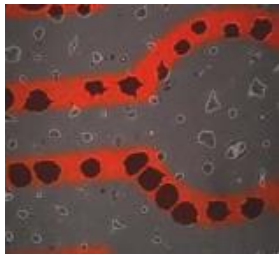

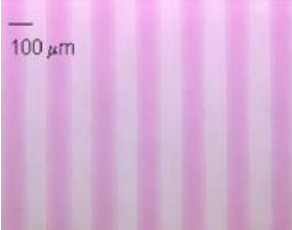
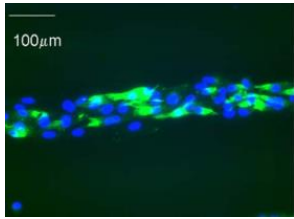
Η ευθυγράμμιση των κυττάρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες διαδικασίες, όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η μετεγκατάσταση των μεμβρανοπρωτεϊνών, η έκφραση γονιδίων του πυρήνα και η αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας. Επιπλέον, ασκεί σημαντική επίδραση στην αναγέννηση των ιστών (π.χ., στους νευρώνες) και ρυθμίζει τις μηχανικές ιδιότητες ιστών όπως ο σκελετός, ο καρδιακός μυς και οι τένοντες⁵⁶. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη δημιουργία υποστρωμάτων που επιτρέπουν την *in vitro* ευθυγράμμιση κυττάρων κυρίως με τη δημιουργία επιφανειών που φέρουν αυλάκια, νησίδες και κολώνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τοπογραφία μιας επιφάνειας ενδέχεται να δρα διαφορετικά στο βαθμό προσκόλλησης, πολλαπλασιασμού, ευθυγράμμισης ή μετανάστευσης των κυττάρων για διαφορετικά είδη κυττάρων. Για παράδειγμα, η S.A. Biela και η ομάδα της μελέτησαν τη συμπεριφορά τριών διαφορετικών τύπων κυττάρων (ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα) σε επιφάνειες που έφεραν αυλακώσεις με διαφορετικές διαστάσεις και συμπέραναν ότι ο βαθμός ευθυγράμμισης, επιμήκυνσης και κατευθυνόμενης μετανάστευσής κατά μήκος των αυλακώσεων των ινοβλαστών ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τους άλλους δύο τύπους κυττάρων¹¹⁰.

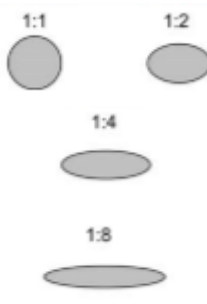
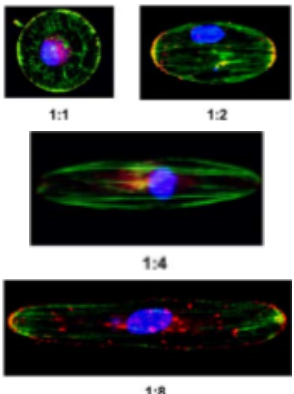
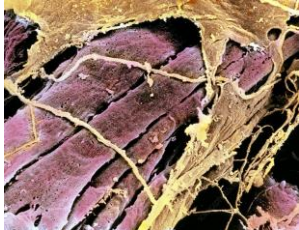
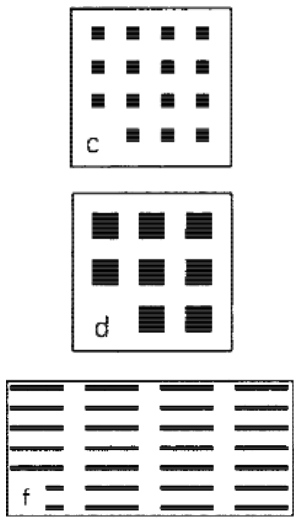
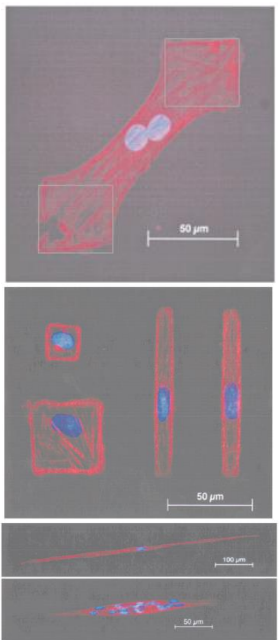

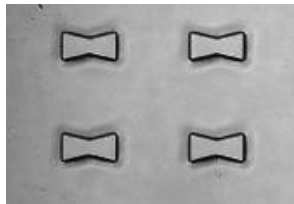
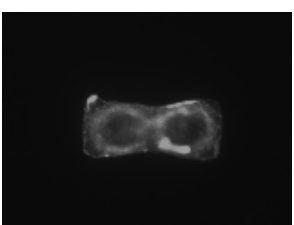
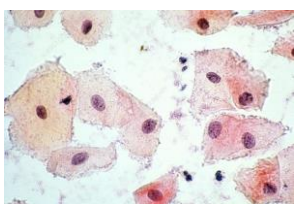
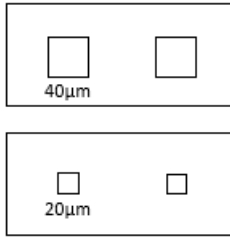
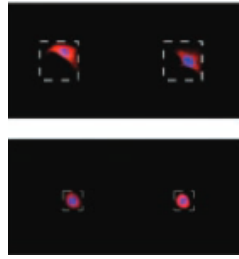
Επιπροσθέτως, σε έρευνες που έγιναν για τη μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων προσκολλημένων σε επιφάνειες αποδείχτηκε ότι

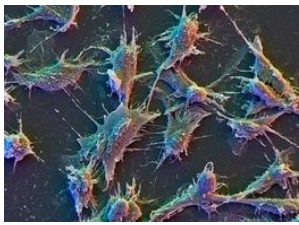

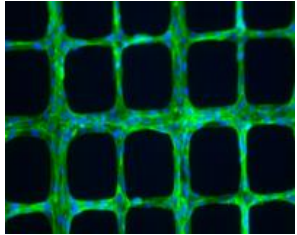
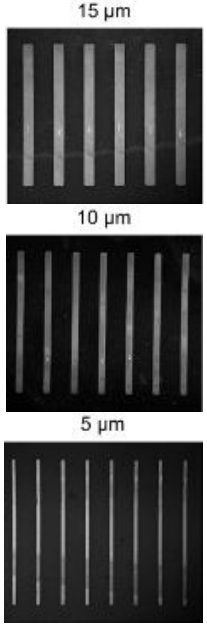
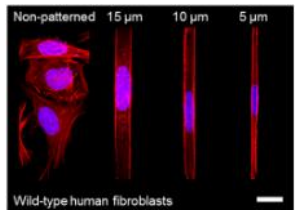
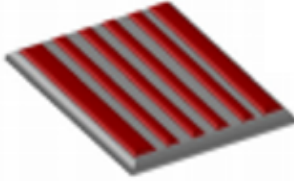
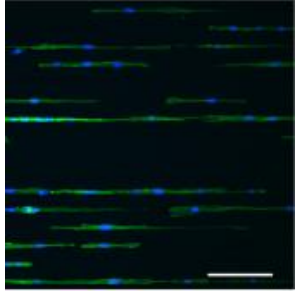
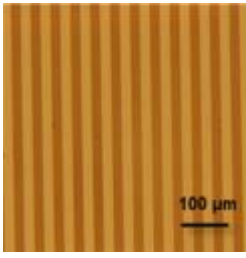
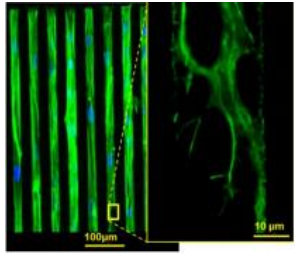
ενώ η αυξημένη επιμήκυνση των λείων μυϊκών κυττάρων συνεπάγεται τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους¹¹¹, η επιμήκυνση ενδοθηλιακών κυττάρων δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους αν και έχει πολύ σημαντική επίδραση στην κυτταροσκελετική δυσκαμψία και συστατικότητα¹¹². Παρ' όλα αυτά, δείχτηκε ότι σε νανοδομημένες επιφάνειες PLGA αυξήθηκαν οι πυκνότητες και των δύο ειδών κυττάρων σε σύγκριση με τις αντίστοιχες επίπεδες επιφάνειες¹¹³. Γενικά, παρότι υπάρχουν πολλές μελέτες που αφορούν υποστρώματα με διαφορετική τοπογραφία και χημεία, με στόχο διαφορετικούς ιστούς, κύτταρα και κυτταρικές αποκρίσεις, εξακολουθεί να μην υπάρχει καθολικός κανόνας που να ισχύει για τα κύτταρα και όλες τις επιφάνειες και σε κάθε περίπτωση οι βέλτιστες για κάθε εφαρμογή συνθήκες πρέπει να προσδιορίζονται πειραματικά. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί περιγράφονται πιο αναλυτικά οι μελέτες που αφορούν την προσκόλληση σε σχηματοποιημένες επιφάνειες λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία αποτελούν και το τύπο κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

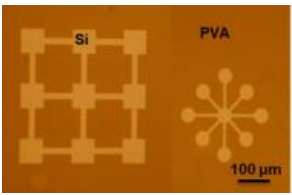
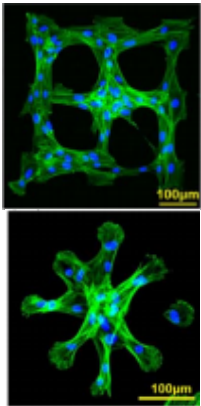

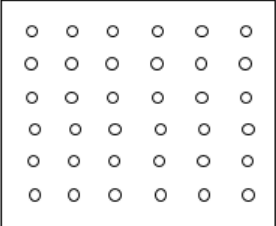
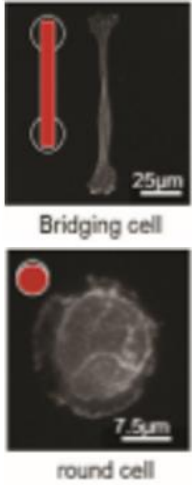
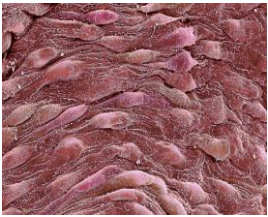
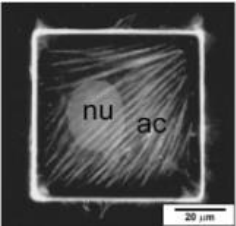
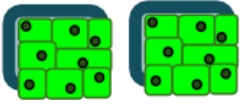
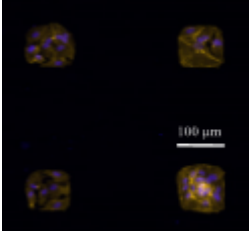

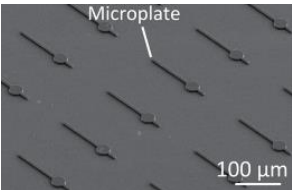
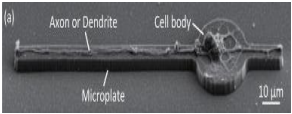
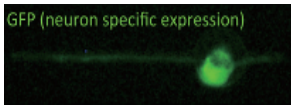
Πίνακας 1: Επίδραση σχηματοποιημένων επιφανειών στη μορφολογία των προσκολλημένων κυττάρων.

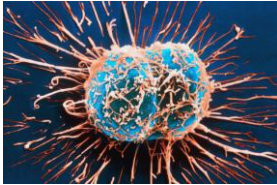
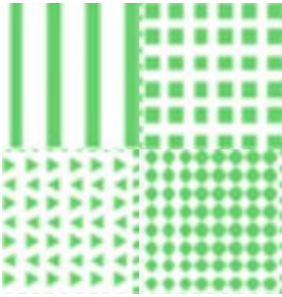
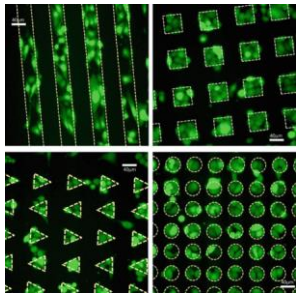
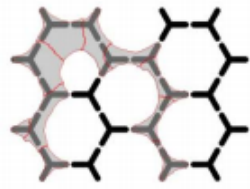
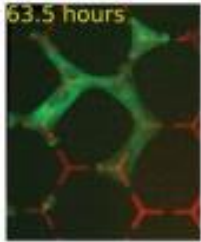
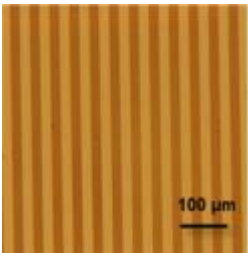
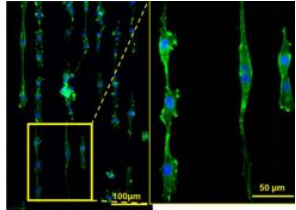
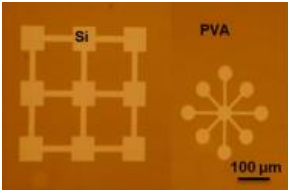
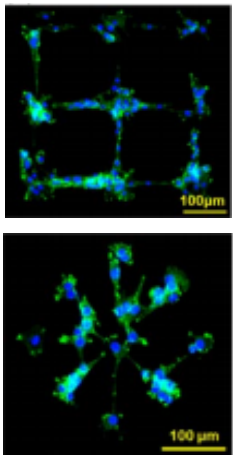
<i>Είδη κυττάρων</i>	<i>Μορφολογία κυττάρου</i>	<i>Δομή επιφάνειας</i>	<i>Απεικόνιση κυττάρου στη σχηματοποιημένη επιφάνεια</i>	
Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα		 		114 80
		 <p>RGD/PEG hydrogels</p>	 <p>← λιποκύτταρα οστεοβλάστες →</p>	115 116
Οστεοβλαστικά κύτταρα			 	115 97

<p>Οστεοκύτταρα</p>				<p>115 117</p>
<p>Λιποκύτταρα</p>				<p>114 118</p>
<p>Ερυθροκύτταρα</p>		 <p>στρεπταβιδίνη (3 μm πλάτος)/BSA υπόστρωμα</p>		<p>119 120</p>
<p>Καρδιακά μυϊκά κύτταρα</p>		 <p>Chitosan/υπόστρωμα γυαλιού</p>		<p>115 121</p>

		 <p>RDG/Au υποστρώματα</p>		<p>115 122</p>
<p>Λεία μυϊκά κύτταρα</p>		 <p>Fluorocarbon/tetraglyme υπόστρωμα</p>		<p>115 101</p>
<p>Δερματικά κύτταρα (κερατινοκύτταρα)</p>		 <p>hexadecanethiol/ Ti/Au υποστρώματα.</p>		<p>114 123</p>
<p>Επιθηλιακά κύτταρα</p>				<p>115 124</p>

<p>Ινοβλάστες,</p> 	 <p>PEG-DA/PDMS υποστρώματα</p>		<p>125 98</p>
	 <p>15 μm 10 μm 5 μm</p>	 <p>Non-patterned 15 μm 10 μm 5 μm Wild-type human fibroblasts</p>	<p>125 38</p>
	 <p>Si/PVA γραμμές πλάτους 22,5 μm</p>		<p>125 126</p>
	 <p>Si/PVA γραμμές πλάτους 22,5 μm</p>		<p>125 127</p>

				125 127
Χονδροκύτταρα				115 118
Ενδοθηλιακά κύτταρα		<p>methyl-terminated SAMs επικαλυμμένα με ινωδονεκτίνη σε σχήμα τετραγώνου/ (EG)3- terminated SAM υπόστρωμα</p>		115 128
		 <p>Σχήμα τετραγώνου μεγαλύτερης διάστασης</p>		115 129
Νευρικά κύτταρα				115
				130

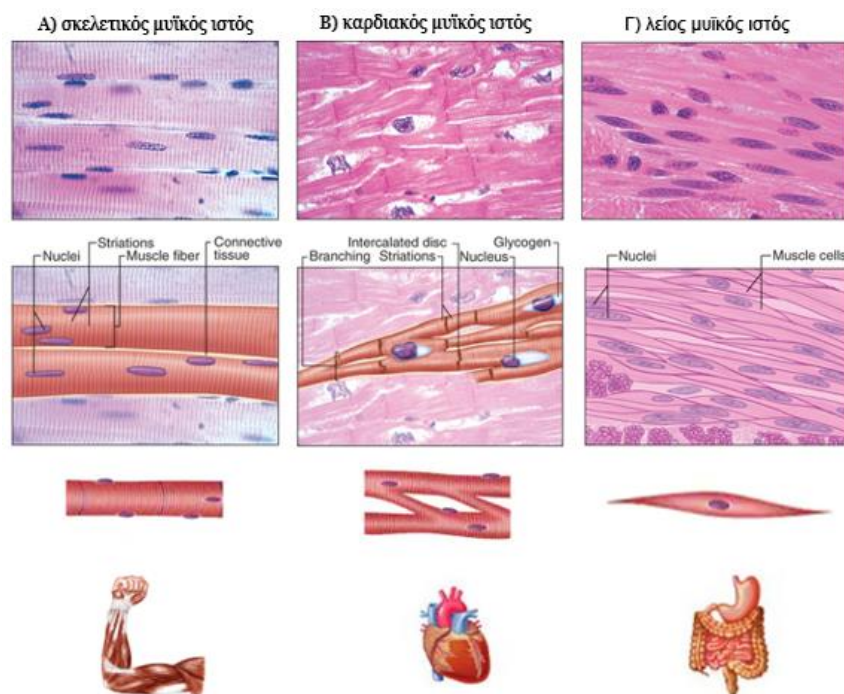
Καρκινικά κύτταρα				114 131
				114 132
				114 127
				114 127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

4.1 Δομή μυϊκού ιστού

Ο μυϊκός ιστός αποτελείται από κύτταρα, τις μυϊκές ίνες, που έχουν την ικανότητα να συστέλλονται. Οι δυνάμεις που είναι απαραίτητες για τη συστολή των μυών, η οποία καθορίζει την κίνηση εντός των οργάνων, του αίματος και του σώματος στο σύνολό του, ρυθμίζονται από τα ινίδια ακτίνης και διάφορες πρωτεΐνες που συνδέονται σε αυτά. Υπάρχουν τρεις τύποι μυϊκού ιστού: ο σκελετικός μυϊκός ιστός, ο μυϊκός ιστός της καρδιάς και ο λείος μυϊκός ιστός (Εικόνα 5).



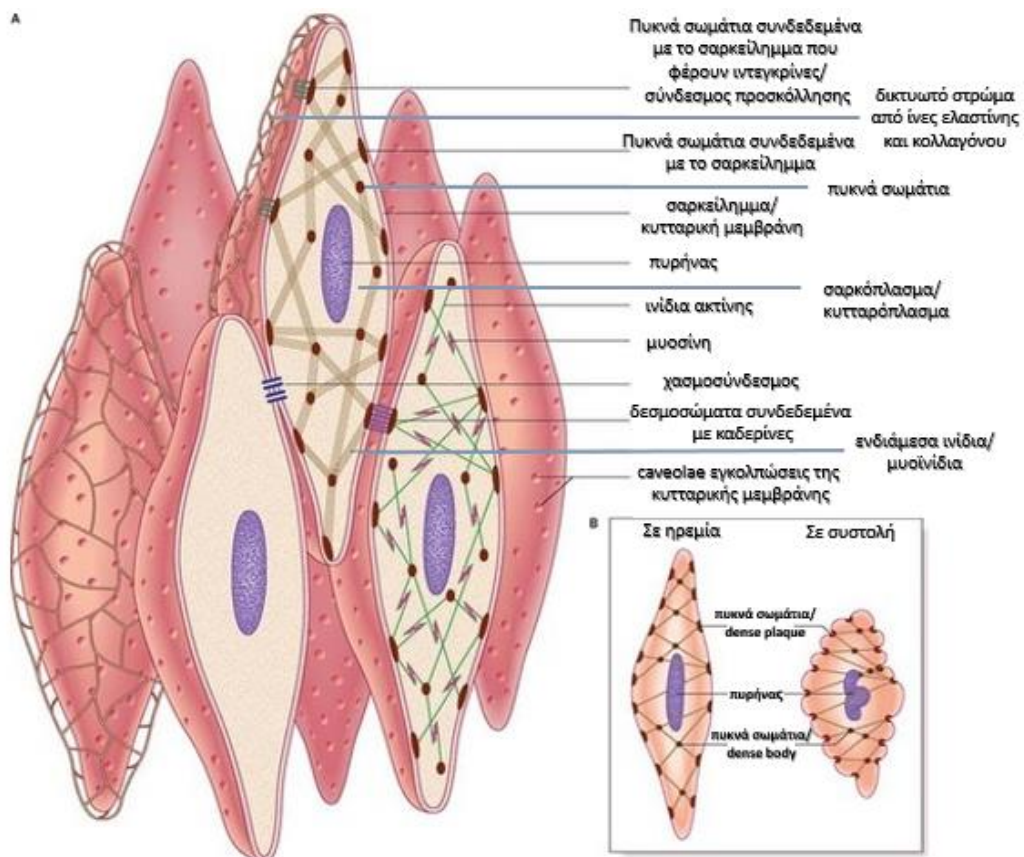
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των τριών ειδών μυϊκού ιστού: A) σκελετικός μυϊκός ιστός που αποτελείται από σκελετικά μυϊκά κύτταρα και συναντάται κυρίως στους μύες που προσφύονται στα οστά του σκελετού, B) καρδιακός μυϊκός ιστός που αποτελείται από τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα και συναντάται κυρίως στα τοιχώματα της καρδιάς, και Γ) λείος μυϊκός ιστός που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα και συναντάται κυρίως στα τοιχώματα αγγείων και του γαστρεντερικού σωλήνα¹³³.

Ο σκελετικός μυϊκός ιστός αποτελείται από πολυπύρηνες σχετικά μακριές κυλινδρικές μυϊκές ίνες με διάμετρο 10-100 μm , που φέρουν διασταυρούμενες γραμμώσεις και η συστολή τους γίνεται εκούσια. Ο μυϊκός ιστός της καρδιάς (μυοκάρδιο) αποτελείται από επιμήκη κύτταρα με κυλινδρική δομή και διάμετρο 15-30 μm , τα οποία φέρουν διασταυρούμενες γραμμώσεις και η συστολή τους γίνεται ακούσια. Τέλος, ο λείος μυϊκός ιστός επενδύει κυρίως τοιχώματα όπως αυτά του οισοφάγου, του στομαχιού, του γαστρεντερικού σωλήνα, της μήτρας, της ουρήθρας, της ουροδόχου κύστης και των αιμοφόρων αγγείων. Αποτελείται από ατρακτοειδείς και χωρίς γραμμώσεις μυϊκές ίνες με διάμετρο 5-10 μm . Οι συσπάσεις των λείων μυών είναι ακούσιες, αργές και σταθερές και λαμβάνουν χώρα υπό την επίδραση ορμονών, εξωτερικών ερεθισμάτων ή και αυτόνομων νεύρων¹³³.

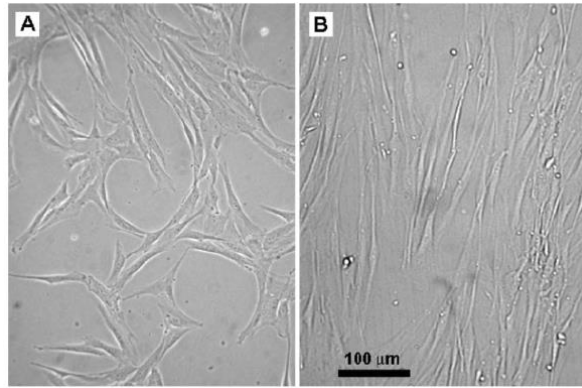
4.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων

Οι ίνες των λείων μυών είναι επιμήκη κωνικά και χωρίς γραμμώσεις κύτταρα (Εικόνα 7) που διαχωρίζονται με διάκενο 40-80 nm και καθένα από αυτά περιβάλλεται από ένα εξωτερικό υμένα (basal lamina), ένα δίκτυο λεπτής ελαστικής και ένα δίκτυο ινών κολλαγόνου τύπου I και τύπου III, γνωστό ως ενδομύιο. Το μήκος των κυττάρων ποικίλλει από 20 μέχρι 200 μm σε μικρά αιμοφόρα αγγεία και μπορεί να φτάσει και έως 500 μm στο τοίχωμα της μήτρας κατά την κύηση, ενώ η διάμετρος τους είναι 5-10 μm . Κάθε κύτταρο περιέχει έναν επιμήκη πυρήνα στο κέντρο του. Στο σαρκόπλασμα, δηλαδή στο κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών κυττάρων, περιέχονται ινίδια ακτίνης και μυοσίνης που είναι υπεύθυνα για τη συστολή των κυττάρων αυτών καθώς και πυκνά σωμάτια με κύριο συστατικό την α -ακτινίνη που χρησιμεύουν για τη μεταφορά της δύναμης συστολής όχι μόνο εντός των κυττάρων, αλλά και μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα του λείου μυός περιέχουν ενδιάμεσα ινίδια που αποτελούνται κυρίως από δεσμίνη, ενώ στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα συναντάται επιπλέον και η πρωτεΐνη βιμεντίνη ως συστατικό των ενδιάμεσων ινιδίων. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των λείων

μυϊκών κυττάρων αποτελεί η παρουσία εγκολπώσεων της κυτταρικής μεμβράνης που προσομοιάζουν με σπηλιές (caveolae), οι οποίες συνδέονται με πολλούς υποδοχείς, κανάλια ιόντων και κινάσες, και το περιφερειακό σαρκοπλασματικό δίκτυο και έτσι μπορούν να δρουν είτε ως υποδοχείς μονοπατιών σηματοδότησης ή ως εξειδικευμένες δομές που εμπλέκονται στη μεταφορά υγρών και ηλεκτρολυτών στο κύτταρο. Τέλος, σε αντίθεση με κύτταρα άλλων ιστών όπου υπάρχουν άφθονα μιτοχόνδρια, τα λεία μυϊκά κύτταρα περιέχουν σχετικά λίγα μιτοχόνδρια αφού το μεγαλύτερο μέρος τους αποτελείται από μυοϊνίδια και συνδετικό ιστό (Εικόνα 6)^{133,134}.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση: A) των δομικών χαρακτηριστικών των λείων μυϊκών κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων τους, B) η χαρακτηριστική μεταβολή του σχήματος των λείων μυϊκών κυττάρων κατά τη συστολή¹³⁴.



Εικόνα 7: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο καλλιέργειας λείων μυϊκών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής αρτηρίας (HUASMC) A) για 10 και B) από 17 ημέρες, αντίστοιχα¹³⁵.

Τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (VSMCs) συναντώνται στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, στα οποία παρέχουν δομική ακεραιότητα και ρυθμίζουν τη ροή του αίματος μέσω της συστολής και της χαλάρωσης τους. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους, τον συσταλτικό και τον συνθετικό. Η πλειονότητα των κυττάρων σε υγιή αιμοφόρα αγγεία εμφανίζει το συσταλτικό φαινότυπο που επιτρέπει στα κύτταρα να συστέλλονται και να ρυθμίζουν τη διάμετρο της αορτής. Ωστόσο, κατά τη σωματική άσκηση, την κυοφορία, μετά από τραυματισμό ή γενικότερα κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης των κυττάρων, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα μεταβαίνουν στον συνθετικό φαινότυπο και είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας όπως του κολλαγόνου και των ελαστικών ινών, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός τους και η ικανότητά τους να μεταναστεύουν^{136,137}.

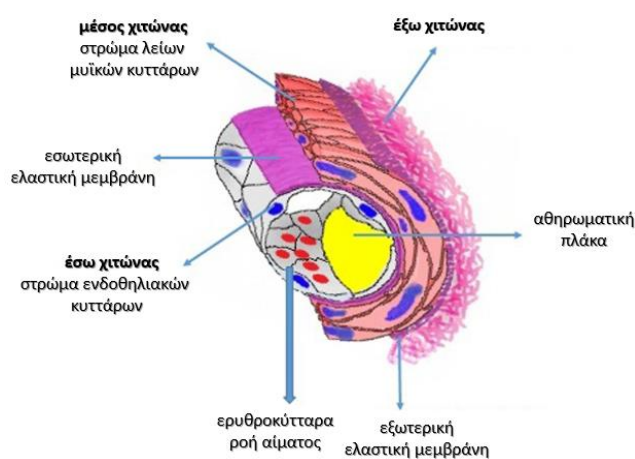
4.3 Σχηματοποίηση αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων

Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα και η μηχανική διέγερση είναι παράγοντες που επηρεάζουν τη φαινοτυπική διαμόρφωση. Έτσι, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα *in vitro* εμφανίζουν επί το πλείστον συνθετικό φαινότυπο με τυχαία οργάνωση και ελάχιστη ευθυγράμμιση.

Συνεπώς, αναμένεται ότι η χρήση επιφανειών με καθορισμένη αρχιτεκτονική θα επηρεάζει τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων με αποτέλεσμα να προάγεται ο συσταλτικός φαινότυπος, ο οποίος προσομοιάζει στην *in vivo* μορφή των κυττάρων¹³⁸. Με χρήση επομένως σχηματοποιημένων υποστρωμάτων καλλιέργειας, είναι δυνατή η διερεύνηση του τρόπου αλλαγής και συντήρησης των φαινοτύπων των αγγειακών μυϊκών κυττάρων και της συμπεριφοράς τους που αποτελεί απαραίτητο κομμάτι για τη μελέτη της βιολογίας αυτών των κυττάρων, της κατανόησης της εμφάνισης αγγειακών παθήσεων που σχετίζονται με το συνθετικό φαινότυπο όπως η υπέρταση και η αθηροσκλήρωση, καθώς και για εφαρμογές μηχανικής ιστών αιμοφόρων αγγείων^{137,138}.

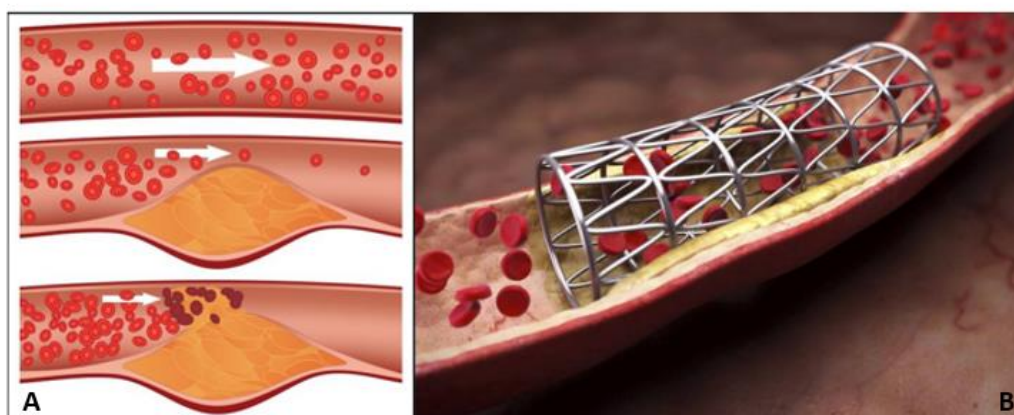
4.3.1 Στεφανιαία στεντ

Η αθηροσκλήρωση είναι μία προοδευτική πολυπαραγοντική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιπιδίων, ινωδών στοιχείων και άλλων συστατικών του αίματος στον έσω χιτώνα των αρτηριών με τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 8). Οι αρτηρίες γίνονται δύσκαμπτες και σκληρές και αρχίζουν να περιορίζουν τη ροή του αίματος στα όργανα και τους ιστούς. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου ή στην πρόκληση εγκεφαλικού επεισοδίου¹³⁹.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας αρτηρίας με συσσώρευση λιπιδίων, χοληστερίνης και άλλων ουσιών στο τοίχωμα της αρτηρίας με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας που εμποδίζει τη φυσιολογική ροή του αίματος¹⁴⁰.

Η συνήθης θεραπεία γίνεται με στεφανιαία αγγειοπλαστική δηλαδή εισαγωγή εμφυτεύματος, που ονομάζεται στεντ, στο εσωτερικό της αρτηρίας για την αποτροπή απόφραξης της (Εικόνα 9). Η τεχνολογία των στεντ παρότι αποτελεί την κύρια θεραπεία της αγγειακής νόσου, παρουσιάζει περιορισμένη κλινική αποτελεσματικότητα λόγω της επαναστένωσης ή της εμφάνισης καθυστερημένης θρόμβωσης του στεντ κυρίως λόγω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων¹⁵.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση: Α) μιας αρτηρίας με σταδιακή δημιουργία αθηρωματικής πλάκας που εμποδίζει τη φυσιολογική ροή του αίματος και Β) μιας αρτηρίας με στεφανιαίο στεντ στο εσωτερικό της για την επίτευξη της φυσιολογικής ροής του αίματος.

Ο αρτηριακός τραυματισμός είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια των επεμβατικών διαδικασιών για την εμφύτευση του ενδοστεφανιαίου εμφυτεύματος. Ως εκ τούτου, τα αγγειακά κύτταρα, δηλαδή τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα λείου μυός, εμφανίζουν μη φυσιολογική δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό, πολλοί οι ερευνητές αναπτύσσουν μεθόδους που επιτρέπουν την αναγέννηση των κατεστραμμένων ενδοθηλιακών κυττάρων και τη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των λείων μυϊκών κυττάρων μετά την εισαγωγή του στεντ. Στην κατεύθυνση αυτή έχουν καταβληθεί πολλές προσπάθειες για τη τροποποίηση της επιφάνειας του στεντ και έχει δειχθεί ότι αυτή η τροποποίηση μπορεί να περιορίσει τα

προβλήματα που εγκύπτουν κατά ή μετά την εισαγωγή του¹⁴¹. Για παράδειγμα, ο E.A. Sprague και η ομάδα του, ανέφεραν ότι σε πειράματα που έγιναν σε χοίρους, στεντ με μικροσχηματοποιημένες επιφάνειες που φέρουν παράλληλες αυλακώσεις περιορίζουν σημαντικά τη στεφανιαία επαναστένωση σε σύγκριση με τα στεντ με λείες επιφάνειες¹⁴². Μεγάλο ενδιαφέρον υπάρχει επίσης για την ανάπτυξη αγγειακών εμφυτευμάτων από νέα υλικά, τα οποία πρέπει να είναι βιοσυμβατά, να έχουν αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και ταυτόχρονα να επιταχύνουν την ενδοθηλιακή ανάπτυξη και αναγέννηση. Ειδικότερα, προκειμένου να παραταθεί ο χρόνος ζωής των αγγειακών μοσχευμάτων είναι ζωτικής σημασίας να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη πρόσφυση κυττάρων και πρωτεϊνών. Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι στεντ με νέα υλικά και τροποποιήσεις επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένων μικρο-ή νανο-δομημένων επιφανειών, πολυμερών και υλικών επικαλυμμένων με κατάλληλες φαρμακευτικές ουσίες¹⁴³.

4.4 Αλληλεπίδραση αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες

Πειραματικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η νανο/μικρο-τοπογραφία μπορεί να αξιοποιηθεί για τον έλεγχο των κυτταρικών λειτουργιών των προσκολλημένων σε μια επιφάνεια κυττάρων, υποδεικνύοντας την ενδεχόμενη εφαρμογή τέτοιων επιφανειών στην κατασκευή εμφυτευμάτων. Στην περίπτωση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων που είναι τοποθετημένα περιφερειακά στα αιμοφόρα αγγεία, η παράλληλη ευθυγράμμιση των κυττάρων μιμείται περισσότερο το φυσικό τους περιβάλλον¹⁴⁴. Γι' αυτό το λόγο, οι περισσότερες μελέτες γίνονται με επιφάνειες που φέρουν παράλληλες γραμμικές δομές και περιορίζουν την εξάπλωση των λείων μυϊκών κυττάρων προς μία κατεύθυνση με αποτέλεσμα μια πιο επιμήκη μορφολογία και χαμηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού¹⁴⁵. Συμπερασματικά, έχει αποδειχθεί ότι με μικροσχηματοποιημένες επιφάνειες είναι δυνατή η ρύθμιση της μορφολογίας, του σχήματος, του ρυθμού πολλαπλασιασμού, της ρύθμισης του φαινοτύπου και της εξάπλωσης των κυττάρων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι εφαρμογές πολυμερικών υλικών στην βιοϊατρική και κυρίως οι εφαρμογές μικροσχηματοποιημένων επιφανειών ως υποστρωμάτων κυτταροκαλιεργειών, για την παρασκευή εμφυτευμάτων ή τεχνητών μοσχευμάτων αλλά και για την ανάπτυξη διαγνωστικών συσκευών όπως οι βιοαισθητήρες. Η ανάγκη για νέα υλικά και μεθόδους σχηματοποίησης με βελτιωμένες ιδιότητες, όσον αφορά την αλληλεπίδραση τους με κύτταρα ή την *in vivo* χρήση τους, αποτέλεσε το έναυσμα για την σύνθεση, ανάπτυξη και μελέτη νέων πολυμερικών υλικών που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την κατασκευή μικροσχηματοποιημένων επιφανειών και κατ' επέκταση στη μηχανική ιστών και γενικότερα στη βιοϊατρική. Τα υλικά που μελετώνται μπορεί να ευνοούν την κυτταρική πρόσφυση όπως το PS, το PDMS ή το PLGA, είτε να δρουν ως κυτταροαπωθητικά όπως η PVA, η PEG ή συμπολυμερή αυτών. Με βάση αυτά τα υλικά, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι σχηματοποίησης επιφανειών, ανάμεσα από τις οποίες εξέχοντα ρόλο κατέχουν οι λιθογραφικές τεχνικές και κυρίως η φωτολιθογραφία. Βασικό πλεονέκτημα της φωτολιθογραφίας σε σχέση με τις άλλες τεχνικές σχηματοποίησης αποτελεί η δημιουργία δομών καθορισμένης γεωμετρίας με κρίσιμο μέγεθος έως και 30 nm μέσω έκθεσης στο βαθύ υπεριώδες (DUV, 248,193,157 nm) εύκολα, γρήγορα και με χαμηλό κόστος.

Έχοντας ως στόχο την κατασκευή σχηματοποιημένων επιφανειών που να ευνοούν την επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων, στην παρούσα εργασία συντέθηκε ένα νέο συμπολυμερές το οποίο μετά από φωτολιθογραφική διαμόρφωση αποκτά κυτταροαπωθητικές ιδιότητες. Το ένα από τα δύο συστατικά του συμπολυμερούς ήταν η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και το δεύτερο ένα πολυμερές μεθακρυλικού εστέρα, συγκεκριμένα μεθακρυλικού 2-τετραϋδροπυραυλεστέρα (PTHMPA). Η PEG αναμενόταν να προσδώσει στο συμπολυμερές τις κυτταροαπωθητικές ιδιότητες ενώ ο PTHMPA την δυνατότητα φωτολιθογραφικής σχηματοποίησης καθώς σε όξινες συνθήκες ο εστέρας μπορεί να υποστεί υδρόλυση με συνακόλουθη αλλαγή της διαλυτότητας του πολυμερούς. Επιπλέον, αναμένεται ότι κατά την επίστρωση του σε δισκία πυριτίου το συμπολυμερές, το οποίο αναφέρεται για συντομία

ως PEG-b-PHPMA, θα αποκτούσε τέτοια διαμόρφωση ώστε το περισσότερο υδρόφοβο συστατικό, δηλαδή το PHPMA, να κατευθύνεται προς το υπόστρωμα ενώ το υδρόφιλο, δηλαδή η PEG, προς τον αέρα. Προκειμένου να βρεθεί το βέλτιστο για το σκοπό της εργασίας υλικό, συντέθηκαν τέσσερα πολυμερικά υλικά με τη μέθοδο του ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού μεταφοράς ατόμου (ATRP) και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία IR, NMR, UV-Vis και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Πιο συγκεκριμένα, συντέθηκαν τα εξής συμπολυμερή: PEG₅₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 53% PEG και 47% PHPMA, PEG₅₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 43% PEG και 57% PHPMA, PEG₁₀₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 34% PEG και 66% PHPMA και PEG₂₀₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 28% PEG και 72% PHPMA.

Σε πρώτο στάδιο, επιλέχθηκαν τα υλικά τα οποία σχημάτιζαν σταθερά στον χρόνο υμένα και στη συνέχεια βελτιστοποιήθηκε η φωτολιθογραφική σχηματοποίηση τους με χρήση μάσκας που περιελάμβανε γραμμικές δομές διαφορετικού εύρους. Οι επιφάνειες αυτές αποτέλεσαν υπόστρωμα για καλλιέργεια κυττάρων ώστε να επιλεγεί το συμπολυμερές με τις καλύτερες κυτταροαπωθητικές ιδιότητες. Σχηματοποιημένες επιφάνειες που παρασκευάστηκαν με το επιλεγθέν υλικό χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων με στόχο τη μελέτη της επίδρασης της αλλαγής της μορφολογίας τους στην υιοθέτηση συστατικού φαινοτύπου. Για την εκδήλωση αυτού του φαινοτύπου είναι απαραίτητη η επιμηκυμένη μορφολογία των κυττάρων, η οποία μιμείται τη μορφολογία τους σε *in vivo* συνθήκες. Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκαν σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμικές δομές εύρους 17,5 έως 50 μm με στόχο να προσδιοριστεί η δομή στην οποία επιτυγχανόταν η βέλτιστη προσκόλληση και ευθυγράμμιση των κυττάρων. Η ευθυγράμμιση των κυττάρων προσδιορίστηκε μέσω υπολογισμού της πιστότητας ακινητοποίησης των κυττάρων σε σχέση με την σχηματοποίηση της επιφάνειας. Στις δομές που επετεύχθη η βέλτιστη ευθυγράμμιση πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη για τον προσδιορισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού και τη διατήρησης της ευθυγράμμισης και της επιμηκυμένης μορφολογίας των κυττάρων, καθώς και της επίδρασης της στο εμβαδό του πυρήνα.

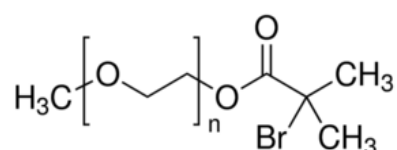
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Σύνθεση του συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA

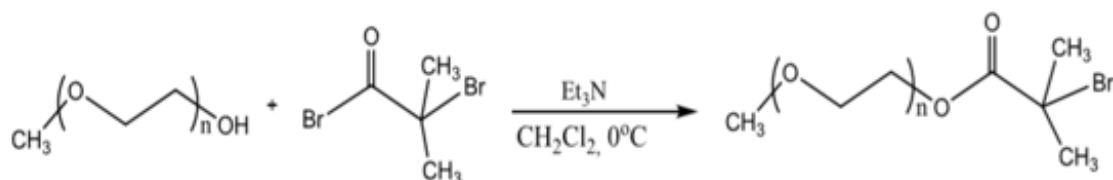
Υλικά

- Μακροαπαρχητής 2-βρωμοϊσοβουτυρικός εστέρας της μεθόξυ πολυαιθυλενογλυκόλης [Poly (ethylene glycol) methyl ether 2-bromoisobutyrate, mPEG bromoisobutyrate ή PEG bib] (Σχήμα 13)



Σχήμα 13: Συντακτικός τύπος του 2-βρωμοϊσοβουτυρικού εστέρα της μεθόξυ πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG bib).

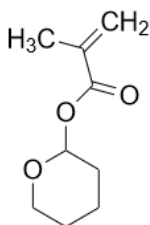
Η σύνθεση του μακροαπαρχητή, επιτεύχθηκε με αντίδραση του πολυμερούς του μονομεθυλαιθέρα της πολυαιθυλενογλυκόλης της εταιρίας Sigma-Aldrich, μοριακού βάρους 5000, που φέρει μια ακραία ελεύθερη υδροξυλομάδα με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο 2-βρωμοϊσοβουτυλοϋλο βρωμίδιο (2-bromoisobutyryl bromide, 2-BIBB, $d=1.86$ gr/ml, $M_n=229.90$ gr/mol) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Αντίδραση σύνθεσης του μακροαπαρχητή PEG bib.

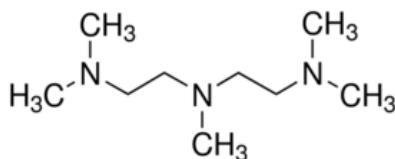
- Μεθακρυλικός 2-τετραϋδροπυρανουλεστέρας (2-tetrahydropyranyl methacrylate, THPMA) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 15)

Είναι διαφάνες υγρό, με μοριακό βάρος 170,21 g/mol και πυκνότητα 1,007 g/mL. Το T_g του ομοπολυμερούς PTHPMA είναι 63°C.



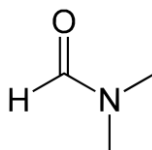
Σχήμα 15: Συντακτικός τύπος μεθακρυλικού-2-τετραϋδροπυρανουλεστέρα (THPMA).

- Χλωριούχος χαλκός (Copper(I) chloride, CuCl) της εταιρίας Sigma-Aldrich
- Υποκαταστάτης N,N,N',N',N''-πενταμέθυλοδιεθυλοτριάμινη (N,N,N',N',N''-Pentamethyldiethylenetriamine, PMDETA) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 16)



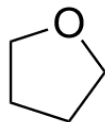
Σχήμα 16: Συντακτικός τύπος της N,N,N',N',N''-πενταμέθυλοδιεθυλοτριάμινης (PMDETA).

- Διμεθυλομεθαναμίδιο (Dimethylformamide, DMF) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 17)



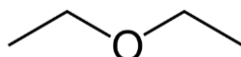
Σχήμα 17: Συντακτικός τύπος διμεθυλομεθαναμιδίου (DMF).

- Άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (TetraHydroFuran, THF) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 18)



Σχήμα 18: Συντακτικός τύπος τετραϋδροφουρανίου (THF).

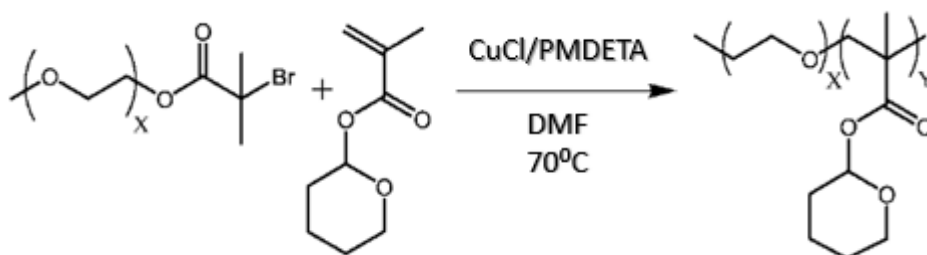
- Διαιθυλαιθέρας (DiEthylEther, DEE) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 19)



Σχήμα 19: Συντακτικός τύπος του διαιθυλαιθέρα (DEE).

Αρχή μεθόδου

Η σύνθεση των πολυμερών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του ριζικού πολυμερισμού μεταφοράς ατόμου, ATRP (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Αντίδραση σύνθεσης του συμπολυμερούς PEG-b-PTHMPMA¹⁴⁶.

Αρχικά, σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες διαλύτη, καταλύτη και υποκαταστάτη έτσι ώστε να παραχθεί το καταλυτικό σύμπλοκο του πολυμερισμού. Έπειτα, προστίθενται ο απαρχητής και το μονομερές, και το μίγμα τοποθετείται για 2 min σε λουτρό υπερήχων και στην συνέχεια αναδεύεται συνεχώς έως ότου διαλυθούν όλα τα αντιδραστήρια. Η αντίδραση πολυμερισμού ευνοείται απουσία οξυγόνου. Γι' αυτό το λόγο, πραγματοποιούνται 3 κύκλοι κατά τους οποίους κάτω από το φιαλίδιο στο

οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση τοποθετείται δοχείο με υγρό άζωτο και αφού παγώσει το φιαλίδιο, το δοχείο απομακρύνεται και το φιαλίδιο ξεπαγώνει υπό κενό σε περίπου 15 min. Ακολούθως, ξαναπαγώνει το φιαλίδιο σε υγρό άζωτο, ενώ ταυτόχρονα παρέχεται άζωτο στο εσωτερικό της φιάλης και μέσω μιας βελόνας απομακρύνεται από τη φιάλη το εγκλωβισμένο οξυγόνο σε περίπου 15 min. Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία το φιαλίδιο τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 70 °C και αφήνεται για μία ημέρα. Στη συνέχεια, το μείγμα διαλύεται σε 150 mL THF, ο οποίος διαλύει και το πολυμερές, και πραγματοποιείται απομάκρυνση του καταλυτικού συμπλόκου μέσω προσρόφησης σε στήλες από αλουμίνα. Στο κατώτερο μέρος της στήλης τοποθετείται ένα στρώμα βάμβακος και στην συνέχεια η στήλη πακετάρεται με aluminum oxide 90 neutral. Ακολουθεί έκπλυση του πληρωτικού υλικού της στήλης δύο έως τρεις φορές με THF. Έπειτα, στη στήλη τοποθετείται το διάλυμα του πολυμερούς και ακολουθεί έκπλυση με THF μέχρις ότου συλλεχθεί όλο το συμπολυμερές. Στη συνέχεια, το διάλυμα του συμπολυμερούς που συλλέγεται από τη στήλη, συμπυκνώνεται και ξηραίνεται υπό κενό. Το τελικό στάδιο της σύνθεσης είναι η καταβύθιση του συμπολυμερούς, που επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός διαλύτη στον οποίο το πολυμερές είναι αδιάλυτο αλλά αναμιγνύεται πλήρως με τα THF και DMF. Έτσι, σε ένα ποτήρι ζέσης προστίθεται διαιθυλαιθέρας σε αναλογία 10:1 ως προς τον όγκο του διαλύματος του πολυμερούς και προστίθεται το περιεχόμενο της φιάλης με ταυτόχρονη ανάδευση στους 60°C. Ο διαιθυλαιθέρας είναι διαλύτης κατάλληλος για την καταβύθιση του συμπολυμερούς και επιπλέον και για τις αλυσίδες του απαρχητή που περιέχουν PEG, επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα καθαρισμό του τελικού προϊόντος. Ακολουθεί διήθηση για παραλαβή του καταβυθισμένου συμπολυμερούς και ξήρανση του για τη λήψη του τελικού στερεού προϊόντος. Με αυτόν τον τρόπο παράχθηκαν τέσσερα συμπολυμερή χρησιμοποιώντας τις ποσότητες αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ποσότητες συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των διαφορετικών συμπολυμερών PEG-b-PTHPMA.

	PEG ₅₀₀₀ -b-PTHPMA με σύσταση 43% PEG και 57% PTHPMA	PEG ₅₀₀₀ -b-PTHPMA με σύσταση 53% PEG και 47% PTHPMA	PEG ₁₀₀₀₀ -b-PTHPMA με σύσταση 34% PEG και 66% PTHPMA	PEG ₂₀₀₀₀ -b-PTHPMA με σύσταση 28% PEG και 72% PTHPMA
Απαρχητής	1,42 g	1,43 g	0,71 g	0,36 gr
Καταλύτης CuCl	0,041 g	0,041 g	0,0205 g	0,0103 g
Υποκαταστάτης DMTETA	0,2 mL	0,2 mL	0,1 mL	0,05 mL
Μονομερές THPMA	2,6 g	2 g	2 g	2 g
Διαλύτης DMF	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL

Για τη σύνθεση των συμπολυμερών PEG₅₀₀₀-b-PTHPMA με σύσταση 43% (β/β) PEG και 57% (β/β) PTHPMA ή 53% (β/β) PEG και 47% (β/β) PTHPMA χρησιμοποιήθηκε απαρχητής PEG bib 5000, ενώ αντίστοιχα για τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEG₁₀₀₀₀-b-PTHPMA με σύσταση 34% (β/β) PEG και 66% (β/β) PTHPMA χρησιμοποιήθηκε απαρχητής PEG bib 10000 και για τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEG₂₀₀₀₀-b-PTHPMA με σύσταση 28% (β/β) PEG και 72% (β/β) PTHPMA χρησιμοποιήθηκε απαρχητής PEG bib 20000.

5.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Υλικά

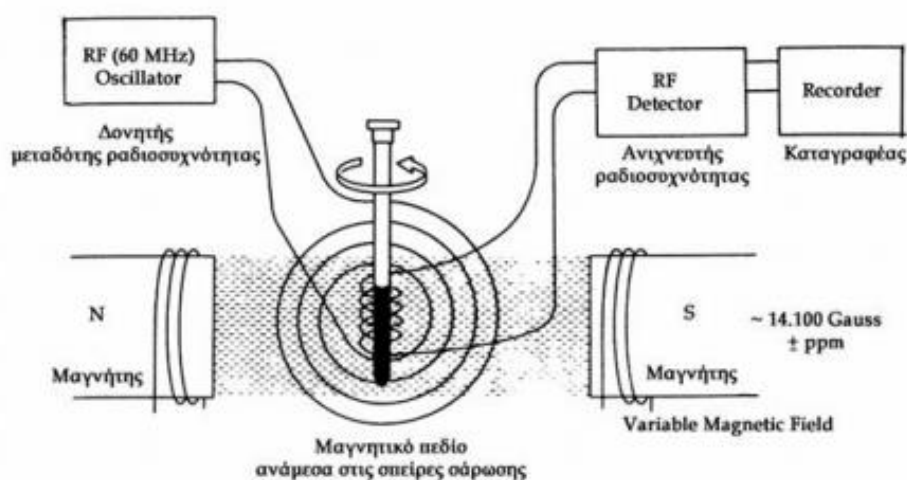
- PEG-b-PTHPMA
- Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃)

Όργανα

- Bruker Advance DPX 300 NMR Spectrometer (300 MHz).

Πειραματική πορεία

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του συμπολυμερούς και τον προσδιορισμό της σύστασής του. Για τη λήψη των φασμάτων NMR παρασκευάστηκαν αραιό διάλυμα του συμπολυμερούς σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το δείγμα τοποθετήθηκε στο εσωτερικό του οργάνου όπου ασκείται το ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Το spin των πυρήνων υδρογόνου ευθυγραμμίζεται με ή αντίθετα με το εφαρμοζόμενο εξωτερικό πεδίο και η απορρόφηση ενέργειας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων προκαλεί αλλαγές στην φορά περιστροφής των πυρήνων που καταγράφονται στο φάσμα NMR του συμπολυμερούς. Η απορρόφηση κάθε πυρήνα υδρογόνου επηρεάζεται από τα μαγνητικά πεδία των γειτονικών πυρήνων και έτσι από το φάσμα NMR είναι δυνατόν να εξαχθεί η δομή του μορίου που εξετάζεται.



Σχήμα 21: Σχηματική απεικόνιση διάταξης φασματογράφου NMR.

5.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Υλικά

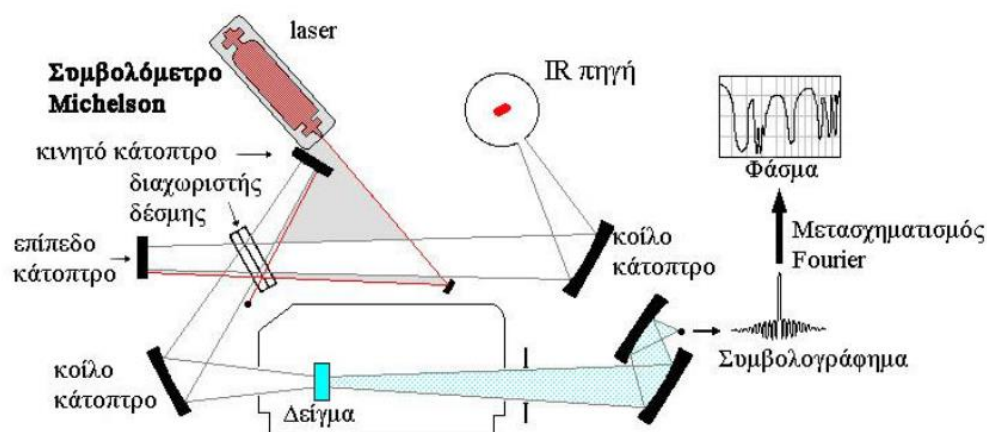
- PEG μοριακού βάρους 5000
- PTHPMA
- PEG-b-PTHPMA

Όργανα

- Thermo Nicolet 6700 εξοπλισμένο με κρύσταλλο διαμαντιού (Smart OrbitTM, Thermo Electron Corporation)

Πειραματική πορεία

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) αποτελεί μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους ταυτοποίησης ενώσεων. Η λήψη του φάσματος γίνεται με την τεχνική αποσβενόμενης ολικής ανάκλασης (attenuated total reflection, ATR). Το πολυμερές τοποθετείται στο όργανο και πραγματοποιείται σάρωση σε μήκη κύματος από 4000 έως 500 cm^{-1} με διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} και καταγράφεται η διαπερατότητα. Κάθε δείγμα σαρώνεται 32 φορές και το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των 32 φασμάτων σαν μεταβολή της % διαπερατότητας.



Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρου FTIR με συμβολόμετρο.

5.4 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (GPC)

Υλικά

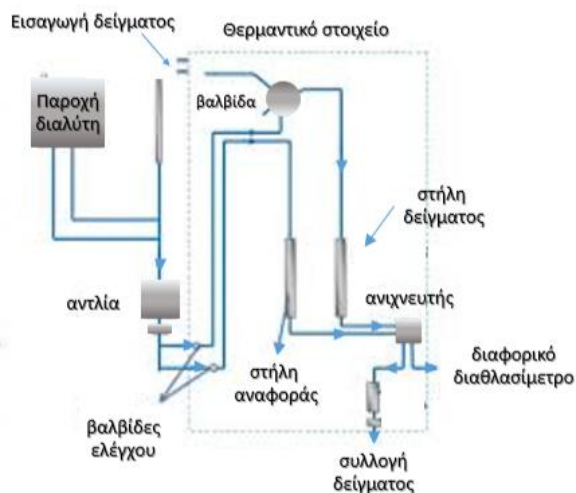
- PEG-b-PHPMA
- Τετραϋδροφουράνιο (THF)

Όργανα

- Αντλία Waters 515ιαφορικό
- Διαθλασίμετρο Waters 410

Πειραματική πορεία

Στην τεχνική της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών χρησιμοποιήθηκε αντλία Waters 515 για τη συνεχή παροχή του φέροντος διαλύτη και διαφορικό διαθλασίμετρο Waters 410 ως ανιχνευτής στην έξοδο της στήλης. Ο φέρων διαλύτης ήταν τετραϋδροφουράνιο με παροχή 1mL/min σε θερμοκρασία 40°C. Το όργανο είναι εφοδιασμένο με δύο στήλες PLgel και η βαθμονόμηση του πραγματοποιήθηκε με διαλύματα PMMA γνωστού μοριακού βάρους. Το δείγμα ενίεται στο όργανο και μεταφέρεται από το φέροντα διαλύτη στις κατάλληλα πακεταρισμένες με πορώδες υλικό μεγάλου εύρους πόρων στήλες. Τα μακρομόρια εκλούνται κατά σειρά μειούμενου μοριακού βάρους και από το χρωματογράφημα του κάθε συμπολυμερούς προσδιορίζεται ο χρόνος έκλυσης. Από τον χρόνο έκλυσης υπολογίζεται το μέσο μοριακό βάρος του συμπολυμερούς βάση της καμπύλης μοριακών βαρών – χρόνου έκλυσης που ελήφθη από τα πρότυπα PMMA.



Σχήμα 23: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του οργάνου που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.

5.5 Τροποποίηση δισκίων πυριτίου με εναπόθεση ατμών εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS)

Υλικά

- Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS)
- Δισκία πυριτίου διαμέτρου 3 ιντσών n-type
- Γυάλινα τριβλία (petri)

Αρχή μεθόδου

Η εναπόθεση ατμών (vapor deposition) αποτελεί μια κατηγορία διεργασιών κατά την οποία εναποτίθεται ένα υλικό από την αέρια φάση με τη μορφή κορεσμένων ατμών σε κατάλληλο διαλύτη στην επιφάνεια ενός υποστρώματος με ή χωρίς τη μεσολάβηση κάποιας χημικής αντίδρασης. Το υλικό που εναποτίθεται έχει συνήθως τη μορφή λεπτού υμενίου.

Πειραματική πορεία

Δισκίο πυριτίου θερμαίνεται σε πλάκα στους 180°C για 1 h. Έπειτα, το δισκίο τοποθετείται σε γυάλινο δοχείο petri, το οποίο περιέχει ένα μικρότερο δοχείο

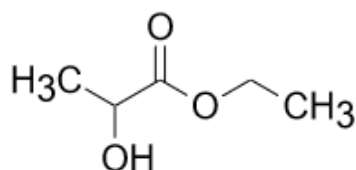
με HMDS, στεγανοποιείται με parafilm και αφήνεται από μία έως 24 h. Ο λόγος που χρησιμοποιείται γυάλινο δοχείο petri είναι για να επέλθει γρήγορα ισορροπία των ατμών του HMDS με την υγρή φάση. Στη συνέχεια, ανοίγεται το δοχείο και το δισκίο τοποθετείται απευθείας σε θερμαντική πλάκα στους 120°C για 15 min.

5.6 Επίστρωση υμενίων με διάλυμα PEG-b-PTHPMA/ φωτοευαίσθητοποιητή σε δισκία πυριτίου

Υλικά

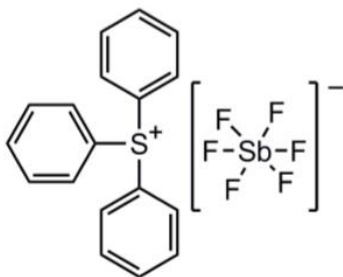
- Δισκία πυριτίου διαμέτρου 3 ιντσών n-type
- PEG-b-PTHPMA
- Γαλακτικός αιθυλεστέρας (ethyl lactate, EL) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Σχήμα 21)

Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στην παρασκευή των διαλυμάτων των συμπολυμερών. Είναι άχρωμο υγρό με μοριακό βάρος 118,13 g/mol και σημείο ζέσης 154° C.



Σχήμα 24: Συντακτικός τύπος γαλακτικού αιθυλεστέρα (EL).

- Φωτοευαίσθητοποιητής εξαφθοροαντιμονικό άλας τριφαινυλοσουλφωνίου (Triphenylsulfonium Hexafluoroantimonate, [(TPS)⁺(SbF₆)⁻]) που προμηθεύτηκε από την εταιρία General Electric (Σχήμα 22) με μοριακό βάρος 499.12 g/mol.



Σχήμα 25: Συντακτικός τύπος εξαφθοροαντιμονικού άλατος τριφαινυλοσουλφονίου [(TPS)⁺(SbF₆)⁻].

Όργανα

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

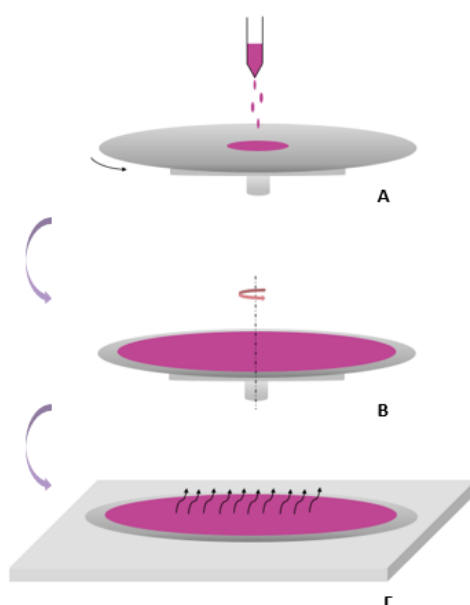
Αρχή μεθόδου

Η επίστρωση πολυμερικών υμενίων δια περιστροφής βασίζεται στην εξάπλωση και κατανομή ενός διαλύματος πολυμερούς σε ένα περιστρεφόμενο δισκίο λόγω της κεντρομόλου δύναμης. Το διάλυμα τοποθετείται στη μέση του δισκίου και στη συνέχεια αυτό περιστρέφεται αρχικά με σταθερή επιτάχυνση ώσπου να φτάσει την επιθυμητή ταχύτητα όπου και παραμένει για κάποιο χρονικό διάστημα, ώστε να δημιουργηθεί ένα υμένιο επιθυμητού και ομοιόμορφου πάχους σε όλη την επιφάνεια του δισκίου. Έπειτα, ακολουθεί θέρμανση του πολυμερούς σε θερμαινόμενη πλάκα (hot plate) ώστε να επιτευχθεί η σταθεροποίηση του στην επιφάνεια του δισκίου (Σχήμα 23).

Πειραματική πορεία

Για την κατασκευή του πολυμερικού υμενίου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA σε γαλακτικό αιθυλεστέρα, το οποίο αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 ημέρα ώστε να επιτευχθεί πλήρης

διαλυτοποίηση του πολυμερούς. Έπειτα, για τη παρασκευή του φωτοευαίσθητου λιθογραφικού υλικού προστέθηκε 5% (β/β), ως προς το βάρος του πολυμερούς, φωτοευαισθητοποιητής TPS-SbF₆ και το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ημέρα και ακολούθως διηθήθηκε από φίλτρο PTFE μεγέθους πόρων 0,20 μm. Με αυτόν το τρόπο παρασκευάστηκαν διαλύματα με τελική συγκέντρωση συμπολυμερούς 2%, 3%, 5% κατά βάρος. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση των υλικών αυτών σε δισκίο πυριτίου δια περιστροφής στις 2000 στροφές το λεπτό (rpm) για 30 s. Μετά την επίστρωση ακολούθησε θέρμανση στους 110 °C για 2 min, και τα δισκίδια υποβλήθηκαν στην φωτολιθογραφική διαδικασία.



Σχήμα 26: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επίστρωσης διαλύματος πολυμερούς σε δισκίο: Α) εναπόθεση πολυμερούς πάνω στο δισκίο, Β) περιστροφή με κατάλληλη ταχύτητα και Γ) θέρμανση του δισκίου με το υμένιο σε θερμαινόμενη πλάκα.

5.7 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)

Υλικά

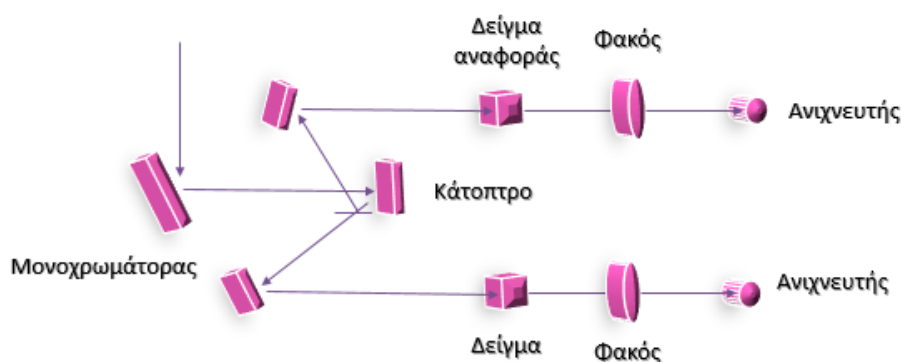
- Διάλυμα PEG-b-PTHPMA
- Διάλυμα PEG-b-PTHPMA/TPS-antimonate
- Δισκίδια χαλαζία

Όργανα

- Perkin Elmer UV-Vis Lamda 40.

Πειραματική πορεία

Η φασματοσκοπία UV-Vis είναι πολύ σημαντική για τις λιθογραφικές διαδικασίες καθώς από τα φάσματα που λαμβάνονται μπορεί να καθοριστεί η απορρόφηση των υλικών στο μήκος κύματος της ακτινοβολίας που γίνεται η έκθεση. Για τη λήψη των φασμάτων δισκία χαλαζία επιστρώνονται με διάλυμα της προς ανάλυση ουσίας σε περιστρεφόμενο επιστρωτή στις 2000 rpm για 30 s. Έπειτα, τα δισκία τοποθετούνται στην υποδοχή του φασματοφωτόμετρου έτσι ώστε η δέσμη φωτός να προσκρούεται στο κέντρο του δείγματος και λαμβάνεται το φάσμα UV-Vis με σάρωση στην περιοχή από 200 έως 400 nm.



Σχήμα 27: Οπτική διαδρομή για το φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.8 Προσδιορισμός πάχους υμενίου συμπολυμερούς με ελλειψόμετρο

Υλικά

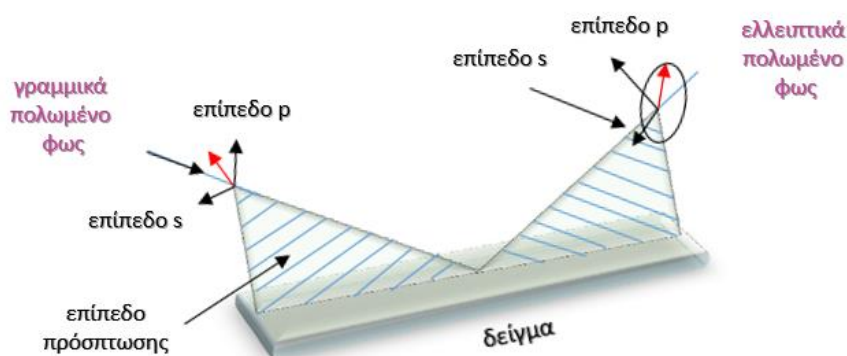
- Δισκία πυριτίου επιστρωμένα με υμένιο HMDS
- Δισκία πυριτίου επιστρωμένα με διάλυμα PEG-b-PHPMA

Όργανα

- Ελλειψόμετρο περιστρεφόμενου αναλυτή Gaertner L116B – 85B.

Αρχή μεθόδου

Η ελλειψομετρία είναι μία ευαίσθητη τεχνική προσδιορισμού του πάχους λεπτών υμενίων. Η τεχνική της ελλειψομετρίας στηρίζεται στην αλλαγή της κατάστασης πόλωσης δέσμης ανακλώμενου φωτός όταν προσκρούει στο δείγμα, αλληλεπιδρά με αυτό και ανακλάται. Λόγω της αλληλεπίδρασης της δέσμης με το δείγμα, η πόλωση του φωτός μετατρέπεται από γραμμική σε ελλειπτική. Μέσω ανάλυσης του ανακλώμενου φωτός με εφαρμογή των εξισώσεων Fresnel, υπολογίζονται οι οπτικές σταθερές, όπως για παράδειγμα ο δείκτης διάθλασης και ο συντελεστής απορρόφησης του υλικού αλλά και το πάχος του υμενίου. Στα περισσότερα ελλειψόμετρα η πηγή της δέσμης φωτός είναι ένα λέιζερ χαμηλής ισχύος. Η ανακλώμενη δέσμη διέρχεται μέσα από έναν πολωτή και στη συνέχεια προσπίπτει στο φωτοανιχνευτή που μετατρέπει το φως σε ηλεκτρικό ρεύμα με ένταση ανάλογη της έντασης του φωτός (Σχήμα 28).



Σχήμα 28: Σχηματική απεικόνιση της γεωμετρίας μιας ελλειψομετρικής μέτρησης.

Πειραματική πορεία

Η προς μελέτη επιφάνεια τοποθετείται στο κέντρο του μηχανήματος έτσι ώστε η δέσμη φωτός να προσκρούει στο κέντρο της επιφάνειας. Ο προσδιορισμός του πάχους πραγματοποιείται με επεξεργασία του ανακλώμενου φωτός από το λογισμικό του οργάνου.

5.9 Προσδιορισμός υδροφιλικότητας επιφανειών

Υλικά

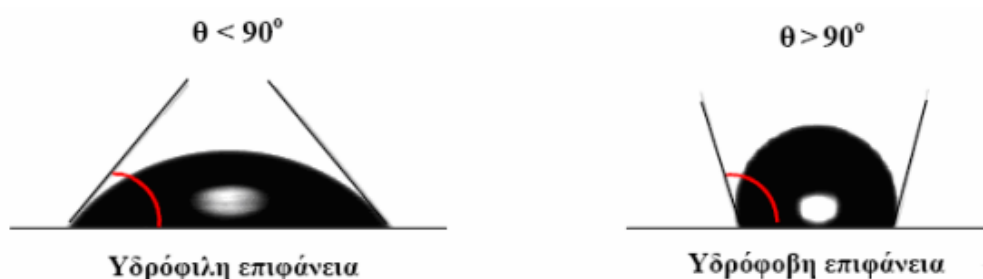
- Δισκία πυριτίου επιστρωμένα με υμένιο HMDS
- Δισκία πυριτίου επιστρωμένα με διάλυμα PEG-b-PHPMA

Όργανα

- Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής GBX Digidrop Contact Angle Measurement System

Αρχή μεθόδου

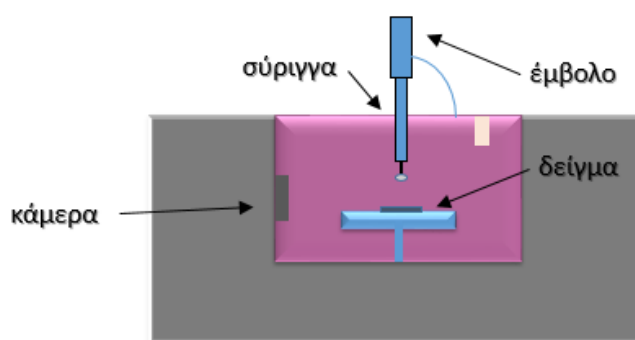
Η γωνία επαφής θ (CA) μιας στερεής επιφάνειας με μια σταγόνα νερού αποτελεί μία τυπική έκφραση της υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας της υπό εξέταση επιφάνειας. Επιφάνειες με τιμές γωνίας επαφής νερού $<90^\circ$ χαρακτηρίζονται ως υδρόφιλες ενώ επιφάνειες με τιμές γωνίας επαφής $>90^\circ$ χαρακτηρίζονται ως υδρόφοβες. Αύξηση της τιμής της γωνίας επαφής συνεπάγεται την αύξηση της υδροφοβικότητας της επιφάνειας του στερεού (Σχήμα 29). Όταν μεταβάλλουμε τη χημική σύσταση μιας επιφάνειας μέσω της εναπόθεσης ενός υμενίου πολυμερούς μπορεί να αλλάξει και η υδροφιλικότητα της.



Σχήμα 29: Σχηματική απεικόνιση γωνιών επαφής σταγόνας νερού σε υδρόφιλες (αριστερά) και υδρόφοβες επιφάνειες (δεξιά).

Πειραματική πορεία

Το σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής αποτελείται από μια βάση πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα και μια μικρομετρική σύριγγα, η οποία πληρώνεται με απεσταγμένο νερό και τοποθετείται κάθετα ως προς το δείγμα. Η επιφάνεια προς μελέτη διαβρέχεται από μία σταγόνα νερού και στη συνέχεια προσδιορίζεται η γωνία θ που σχηματίζει η σταγόνα με την υπό μελέτη επιφάνεια. Για τον σκοπό αυτό, 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 κάμερα για την καταγραφή των δεδομένων και λογισμικό για την ανάλυση των εικόνων (Σχήμα 30). Το λογισμικό αυτό προσδιορίζει το σχήμα και την περίμετρο της σταγόνας και εξάγει τις γωνίες επαφής (γωνία στην δεξιά και αριστερή μεριά επαφής της σταγόνας με την επιφάνεια).



Σχήμα 30: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος μέτρησης των γωνιών επαφής.

5.10 Σχηματοποίηση επιφανειών με φωτολιθογραφία

Υλικά

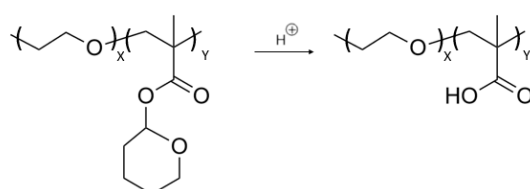
- Δισκία πυριτίου επιστρωμένα με διάλυμα φωτοπολυμερούς (PEG-b-PTHPMA/TPS-antimonate)
- Διάλυμα NaOH 0,1 M
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Θερμαινόμενες πλάκες (Bioline Scientific)
- Λάμπα έκθεσης σε βαθύ υπεριώδες, DUV (Oriol Hg-Xe)
- Ακτινόμετρο
- Οπτικό μικροσκόπιο Imager.A1m (Zeiss) με τέσσερις φακούς (5x, 10x, 20x και 50x) και διακριτική ικανότητα $1,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$

Αρχή μεθόδου

Η φωτολιθογραφία βασίζεται στην έκθεση μέσω μάσκας ενός φωτοευαίσθητου πολυμερικού υμενίου σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η έκθεση οδηγεί σε μεταφορά του σχεδίου της μάσκας στο υμένιο λόγω αλλαγής της διαλυτότητας του φωτοπολυμερικού υλικού στις περιοχές που εκτίθενται σε σχέση με αυτές που δεν εκτίθενται. Η φωτολιθογραφική διεργασία που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία είναι λιθογραφία θετικού τόνου καθώς οι περιοχές που εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία διαλυτοποιούνται και απομακρύνονται κατά την εμφάνιση. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την επίδραση της UV ακτινοβολίας στα πολυμερικά υμένια που αναπτύχθηκαν είναι η όξινη υδρόλυση της πλευρικής ομάδας εστέρα του THPMA υπό την επίδραση του ισχυρού οξέος που απελευθερώνεται από τον φωτοευαίσθητοποιητή κατά την έκθεση (Σχήμα 31).



Σχήμα 31: Αντίδραση όξινης υδρόλυσης του εστέρα του THPMA υπό την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Πειραματική πορεία

Η λυχνία που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση εκπέμπει στο βαθύ υπεριώδες (220-280 nm). Λόγω του ότι η δόση έκθεσης του φωτοπολυμερικού υμενίου

εξαρτάται από την ισχύ της πηγής και το χρόνο έκθεσης, πριν την έκθεση πραγματοποιείται ακτινομέτρηση της λάμπας, ώστε η δόση της ακτινοβολίας του φωτοπολυμερικού υμενίου να διατηρείται σταθερή, στα $5,1 \text{ mJ/cm}^2$ για λυχνία ισχύος 450 W. Στη συνέχεια, το επιστρωμένο με το διάλυμα πολυμερούς δισκίο πυριτίου τοποθετείται κάτω από τη λυχνία και επάνω τοποθετείται μάσκα από χαλαζία που φέρει τις επιθυμητές δομές σχηματοποιημένες σε υμένιο χρωμίου. Έπειτα, το δείγμα εκτίθεται για όσο χρόνο υπολογίσθηκε με βάση την ακτινομέτρηση υπό κενό και ακολουθεί θέρμανση (Post Exposure Bake, PEB) στους 110°C για 2 min σε θερμαινόμενη πλάκα. Η θέρμανση στο στάδιο αυτό είναι απαραίτητη για την εκκίνηση της αντίδρασης μεταξύ του φωτοχημικά παραγόμενου οξέος και των ομάδων του πολυμερούς, με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαλυτότητας. Τέλος, για την εμφάνιση, οι επιφάνειες εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα NaOH 0,1 M, ξεπλένονται με νερό και ακολουθεί ξήρανση με άζωτο. Κατά το στάδιο της εμφάνισης πραγματοποιείται η διαλυτοποίηση και απομάκρυνση του υμενίου του φωτοπολυμερικού υλικού από τις περιοχές που έχουν εκτεθεί στο βαθύ υπεριώδες. Η επιτυχή σχηματοποίηση του πολυμερικού υμενίου επιβεβαιώνεται με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο ανάκλασης.

5.11 Κυτταροκαλλιέργειες

Κυτταρική καλλιέργεια είναι η διαδικασία με την οποία ευκαρυωτικά ή προκαρυωτικά κύτταρα αναπτύσσονται υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται κατάλληλα θρεπτικά υλικά, τα οποία παρέχουν στα κύτταρα όλα τα απαραίτητα συστατικά όπως γλυκόζη, αμινοξέα, βιταμίνες και νουκλεοτίδια, καθώς και τα 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 ή βασικό, μέσω μεταβολής του χρώματος από χρυσοκόκκινο σε κίτρινο ή μωβ, αντίστοιχα. Η μεταβολή αυτή του χρώματος είναι ενδεικτική συνθηκών κορεσμού της καλλιέργειας οπότε και πρέπει να αλλαχθεί το θρεπτικό υλικό. Η

διαδικασία διατήρησης των κυτταρικών σειρών περιλαμβάνει απόψυξη των κυττάρων, ανακαλλιέργεια, 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 στείρες συνθήκες. Η επώαση των κυττάρων για πολλαπλασιασμό πραγματοποιείται σε ειδικούς κλιβάνους σε συνθήκες κορεσμού υγρασίας, παρουσία 5% (ο/ο) CO₂ και σε θερμοκρασία σταθερή στους 37°C.

Υλικά

- Εμβρυικός ορός βοός, FBS, (Biochrom AG)
- Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 100 Units/mL και 10 mg/mL, αντίστοιχα (Biochrom AG)
- Διάλυμα L- γλουταμίνης 200 mM (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 (ο/ο), 1% (ο/ο) διαλύματος L-γλουταμίνης, 1% (ο/ο) διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης
- Διάλυμα ψύξης: 10% (ο/ο) DMSO σε FBS
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05%/0,02% σε PBS χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺, (Biochrom AG)
- Φυσιολογικά ανθρώπινα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (Human Brachiocephalic Artery Smooth Muscle cells, HBcASMC) (European collection of cell cultures, ECACC, Cell Applications Inc)
- Καρκινικές σειρές: HT1080 (Sigma Aldrich)

Όργανα

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert 25 Zeiss)
- Επωαστικός κλιβάνος με παροχή CO₂ (Format Scientific)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (ELMED)

- Δοχείο υγρού αζώτου (Forma)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Christ)
- Φιάλες κυτταροκαλιεργειών 25 cm² (Greiner Bio- one)
- Σιφώνια ακριβείας (Greiner Bio-one)
- Κρυοάντοχα μικροσωληνάρια ψύξης κυττάρων των 2 mL (Greiner Bio- one)
- Πιπέττες παστέρ (Greiner Bio-one)

5.11.1 Απόψυξη

Κατά τη διαδικασία της απόψυξης, κύτταρα τα οποία φυλάσσονται για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο επαναφέρονται σε συνθήκες καλλιέργειας. Η διαδικασία γίνεται υπό στείρες συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα μετά την απόψυξη των κυττάρων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το χρονικό διάστημα έκθεσης των κυττάρων στο DMSO, το οποίο περιλαμβάνεται στο υλικό διατήρησης των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά σε θερμοκρασία δωματίου είναι τοξικό για τα κύτταρα. Αναλυτικά, τα κύτταρα αφού εξέλθουν από το υγρό άζωτο (-196 °C), όπου διατηρούνται μέσα σε ειδικά κρυοάντοχα μικροσωληνάρια, μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμαινόμενο στους 37°C, έως ότου ξεπαγώσουν. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάρια φυγοκέντρωσης που περιέχουν εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό προθερμασμένο στους 37°C και φυγοκέντρωση για 10 min στα 1500 g προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε φιάλες καλλιέργειας και τοποθετούνται στον ειδικό επωαστικό κλίβανο όπου και καλλιεργούνται.

5.11.2 Ανακαλλιέργεια

Τα κύτταρα που έχουν τοποθετηθεί στον επωαστικό κλίβανο ελέγχονται καθημερινά με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και προσδιορίζεται το ποσοστό κάλυψης του πυθμένα της φιάλης στην οποία καλλιεργούνται. Δεδομένου ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται

και οι μεταβολικές τους διαδικασίες επηρεάζονται σε συνθήκες έλλειψης χώρου, όταν καλυφθεί το 80-90% του πυθμένα της φιάλης πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Η ανακαλλιέργεια περιλαμβάνει αποκόλληση των κυττάρων από τη φιάλη με χρήση ενζύμων όπως η θρυψίνη, αραίωση και κατανομή τους σε νέες φιάλες και εκ νέου καλλιέργεια. Αναλυτικά, οι φιάλες 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 αναστέλλουν τη δράση της θρυψίνης. Ακολούθως, προστίθενται 1 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA ανά φιάλη και τοποθετούνται πάλι στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 5 λεπτά ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα της φιάλης. Η αποκόλληση των κυττάρων επιβεβαιώνεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Εν συνεχεία, με την βοήθεια πιπέτας γίνεται επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση και διοχέτευση με πίεση του εναιωρήματος στη φιάλη, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυττάρων που βρίσκονται στο εναιώρημα με τη μορφή συσσωματωμάτων. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων κατανέμεται σε 2 μικρές φιάλες και προστίθενται σε κάθε μία 5 mL εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού. Οι φιάλες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο και ακολουθεί καλλιέργεια των κυττάρων.

5.11.3 Ψύξη

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 η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 80-90% της επιφάνειας της φιάλης καλλιέργειας. Επιπλέον, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων, καταψύχονται παρουσία DMSO (10% σε εμβρυϊκό ορό βοός). Αναλυτικά, κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης αποκολλώνται από τη φιάλη στην οποία καλλιεργούνται όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο εδάφιο. Στη συνέχεια,

μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούνται για 10 min στα 1500 g. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος ψύξης και μεταφέρεται σε ειδικά κρουάντοχα μικροσωληνάρια. Τα μικροσωληνάρια τοποθετούνται διαδοχικά στους 4°C για μία ώρα, στους -20°C για 4 ώρες, στους -80°C για 12 ώρες και τέλος μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

5.12 Καλλιέργεια και έλεγχος προσκόλλησης κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες

Η καλλιέργεια των κυττάρων στις μικροσχηματοποιημένες επιφάνειες περιλαμβάνει αποστείρωση των επιφανειών, υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων στην αρχική καλλιέργεια, σπορά και καλλιέργεια των κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες. Η προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες ελέγχεται με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

5.12.1 Αποστείρωση σχηματοποιημένων επιφανειών

Όργανα

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

Πειραματική πορεία

Οι προς μελέτη επιφάνειες μεταφέρονται σε στείρα τριβλία και αποστειρώνονται με έκθεση σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (η οποία βρίσκεται μέσα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής) για 20 min. Έπειτα, ακολουθεί σπορά των κυττάρων και επώασή τους στον κλίβανο για διάστημα καλλιέργειας που ορίζεται από τη παράμετρο που μελετάτε σε εκάστοτε πείραμα.

5.12.2 Καταμέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιματοκυτταρόμετρο

Υλικά

- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05%/0,02% σε PBS χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} , (Biochrom AG)

Όργανα

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert 25 Zeiss)
- Αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer)
- Σιφώνια ακριβείας (Greiner Bio-one)
- Πιπέττες παστέρ (Greiner Bio-one)

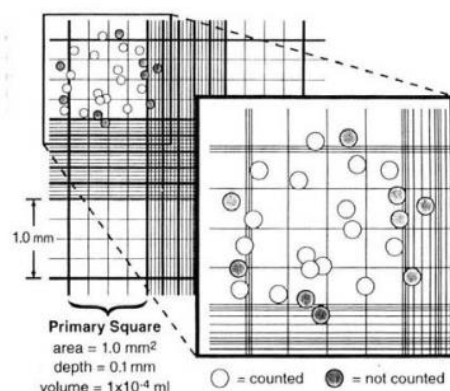
Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο είναι μια άμεση και εύκολη μέθοδος προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων σε εναιώρημα γνωστού όγκου. Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε λεία επιφάνεια φέρει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (Σχήμα 32).

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, να εξαπλώνεται σε όλη την τετραγωνισμένη επιφάνεια, λόγω τριχοειδών φαινομένων.

Τα κύτταρα καταμετρώνται 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 mm², 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.



Σχήμα 32: Σχηματική απεικόνιση αιματοκυτταρομέτρου Neubauer.

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 και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος μέσω της σχέσης: μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα $\times 10^4$.

5.13 Έλεγχος προσκόλλησης κυττάρων και μελέτη μορφολογίας των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), 0.1 M, pH 7.4
- Διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4%, PFA (BioChemica)
- Διάλυμα Triton X-100 (Sigma Aldrich)
- Οραλβουμίνη βοός (BSA), pH 5, 96-100% πρωτεΐνη (Acros Organics)
- Φαλλοϊδίνη επισημασμένη με φθορίζουσα Atto 488 (Sigma Aldrich)
- 4,6-Διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη, DAPI (Sigma Aldrich)

- ρ- Φαινυλενοδιαμίνη (Vectashield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)
- Φυσιολογικά ανθρώπινα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (Human Brachiocephalic Artery Endothelial cells, HBcAEC) (European collection of cell cultures, ECACC, Cell Applications Inc)
- Καρκινικές σειρές: HT1080 (Sigma Aldrich)

Όργανα

- Μικροσκόπιο φθορισμού (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss)
- Πιπέτες Pasteur (Greiner Bio-one)
- μ-slide 12 φρεατίων (ibidi)
- Καλυπτρίδες

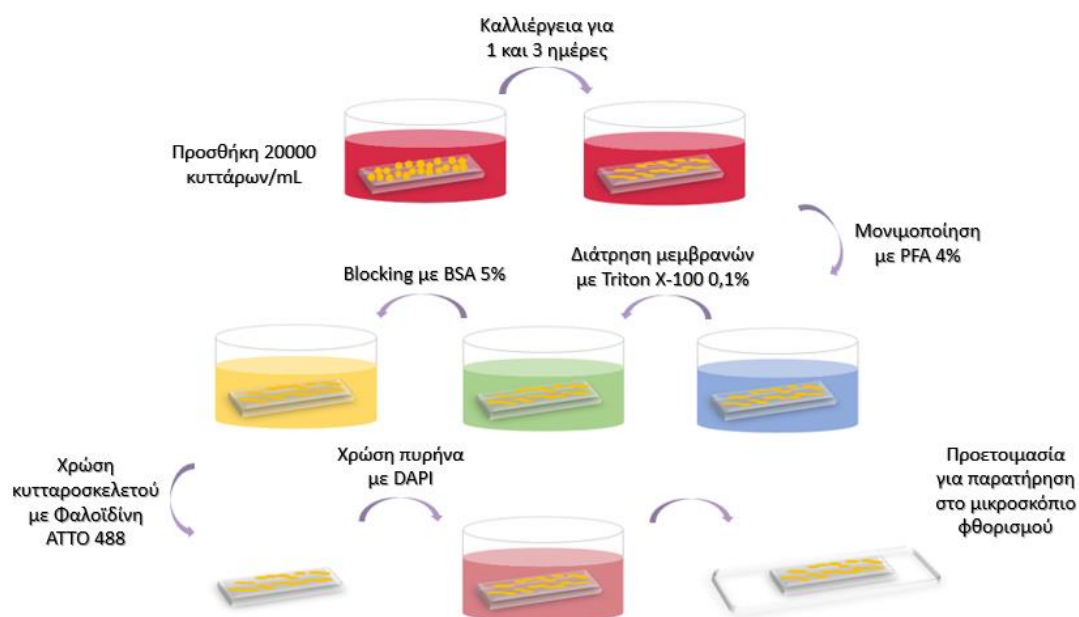
Αρχή μεθόδου

Η παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες πραγματοποιήθηκε με χρήση φθορίζοντων ή φθορισμοεπισημασμένων ενώσεων που δεσμεύονται ειδικά σε συγκεκριμένα συστατικά του κυττάρου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε φαλλοϊδίνη επισημασμένη με την φθορίζουσα ουσία Atto 480, η οποία δεσμεύεται στην F-ακτίνη του κυτταροσκελετού και 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.

Πειραματική πορεία

Οι προς μελέτη επιφάνειες επώαστηκαν με κύτταρα για 1 και 3 ημέρες. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με PBS με σκοπό την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων. Στη συνέχεια, τα προσκολλημένα στις επιφάνειες κύτταρα μονιμοποιήθηκαν μέσω επώασης με διάλυμα παραφορμαλδεϋδης (PFA) 4% (β/ο) σε PBS για 15 min. Ακολούθησε

έκπλυση των επιφανειών με PBS 3 φορές επί 5 min και προσθήκη διαλύματος 0.1% (o/o) Triton X-100, για 10 min, προκειμένου οι κυτταρικές μεμβράνες να καταστούν διαπερατές σε μεγαλομόρια. Μετά από έκπλυση με PBS δύο φορές, πραγματοποιήθηκε επώαση των επιφανειών με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας (5% β/o BSA σε PBS 50 mM, pH 7,4). Έπειτα, οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα φαλλοϊδίνης επισημασμένης με την φθορίζουσα Atto 488 συγκέντρωσης 100 nM σε PBS επί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε χρώση του πυρήνα των κυττάρων μέσω επώασης με διάλυμα DAPI συγκέντρωσης 150 ng/mL σε PBS για 10 min. Τέλος, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με PBS 2 φορές επί 2 min, τοποθετήθηκε μία σταγόνα ρ-φαινυλενοδιαμίνης για προστασία των φθοριζόντων ουσιών από αποχρωματισμό (bleaching) κατά τη παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού, καλύφθηκαν με καλυπτρίδα, και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 33). Χρησιμοποιώντας ειδικά ζεύγη φίλτρων διέγερσης/εκπομπής για τις φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση των κυττάρων (365/420 nm για το DAPI και 493/520 nm για τη φθορίζουσα Atto 488), ελήφθησαν φωτογραφίες και πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των πυρήνων για μια περιοχή ίδιου εμβαδού σε κάθε επιφάνεια με χρήση του προγράμματος επεξεργασίας εικόνας Image Pro Plus 7.0.



Σχήμα 33: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας-καλλιέργειας και χρώσης κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε ένα νέο φωτοπολυμερικό υλικό καθώς και μέθοδος σχηματοποίησής του προκειμένου να δημιουργηθούν υποστρώματα για την κατευθυνόμενη προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε σύνθεση συμπολυμερών PEG-b-PHPMA διαφορετικών μοριακών βαρών και συστάσεων και ακολούθησε χαρακτηρισμός αυτών. Έπειτα, βελτιστοποιήθηκε η φωτολιθογραφική διαδικασία και μελετήθηκε η επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων στις περιοχές του υποστρώματος από τις οποίες είχε απομακρυνθεί το υμένιο PEG-b-PHPMA έναντι των μη εκτεθειμένων περιοχών. Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν λεία μυϊκά κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινα αγγεία αορτής. Αφού επιλέχθηκε το υλικό που παρείχε σχηματοποιημένες επιφάνειες υψηλής πιστότητας, στις οποίες το εναπομείναν πολυμερικό υμένιο διατηρούσε τις ιδιότητες μειωμένης προσκόλλησης κυττάρων, κατασκευάστηκαν επιφάνειες με εναλλασσόμενες γραμμικές δομές υποστρώματος πολυμερούς διαφόρων διαστάσεων. Τέλος, προσδιορίστηκε το βέλτιστο εύρος γραμμών στο οποίο επιτυγχανόταν η μεγαλύτερη επιμήκυνση και ευθυγράμμιση κυττάρων χωρίς να παρεμποδίζεται η ανάπτυξή τους.

6.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπολυμερών PEG-b-PHPMA

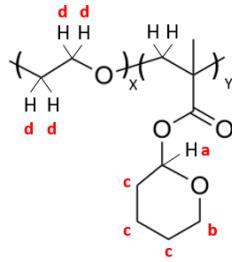
Συντέθηκαν τέσσερα πολυμερικά υλικά PEG-b-PHPMA, τα οποία διέφεραν ως προς την αναλογία των δύο μονομερών που συνθέτουν το συμπολυμερές, καθώς και ως προς τα μοριακά βάρη και χαρακτηριστικά διαβροχής τους. Τα πολυμερή αυτά χαρακτηρίστηκαν με τις ακόλουθες τεχνικές: NMR, χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, IR, UV-Vis με στόχο την ταυτοποίηση των πολυμερών, τον προσδιορισμό των συστάσεων των διαφορετικών συμπολυμερών, των μοριακών τους βαρών και την κατανομή αυτών.

6.1.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

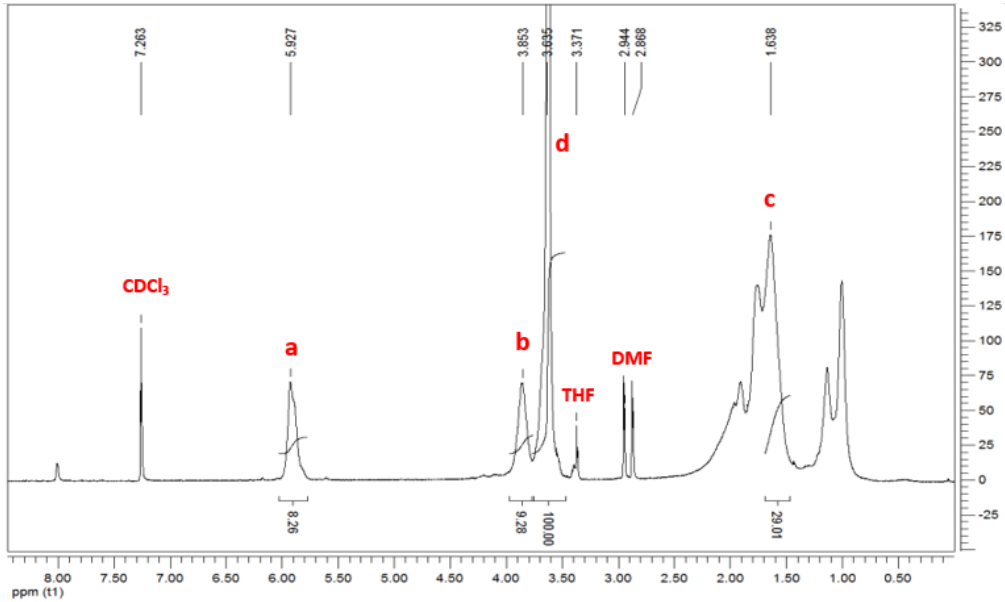
Τα συμπολυμερή PEG-b-PHPMA χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$), όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές και η αντιστοιχία τους με τα διάφορα είδη πρωτονίων του συμπολυμερούς (Σχήματα 35-38). Τα φάσματα ελήφθησαν σε αραιό διάλυμα δευτεριωμένου χλωροφορμίου (CDCl_3), το οποίο δίνει κορυφή στα 7,26 ppm. Επίσης παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή για τον διαλύτη THF στα 3,37 ppm και οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές για τον διαλύτη DMF στα 2,87 και 2,95 ppm. Από τις ολοκληρώσεις των κορυφών προκύπτει ότι οι αναλογίες των πρωτονίων στο φάσμα είναι ίδιες με αυτές των πρωτονίων της πολυμερικής αλυσίδας. Εκτός από την ταυτοποίηση του πολυμερούς ως η χημική ένωση PEG-b-PHPMA, από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ υπολογίστηκε και η σύσταση του κάθε συμπολυμερούς. Έτσι προσδιορίστηκαν οι συστάσεις των τεσσάρων συμπολυμερών που συντέθηκαν και είναι οι ακόλουθες: PEG₅₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 53% (β/β) PEG και 47% (β/β) PHPMA, PEG₅₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 43% (β/β) PEG και 57% (β/β) PHPMA, PEG₁₀₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 34% (β/β) PEG και 66% (β/β) PHPMA και PEG₂₀₀₀₀-b-PHPMA με σύσταση 28% (β/β) PEG και 72% (β/β) PHPMA. Στον Πίνακα 3 αναφέρεται η σύσταση της κάθε ένωσης που υπολογίστηκε από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ της κάθε ένωσης και η συντομογραφία του κάθε συμπολυμερούς.

Πίνακας 3: Σύσταση και συντομογραφία των συμπολυμερών.

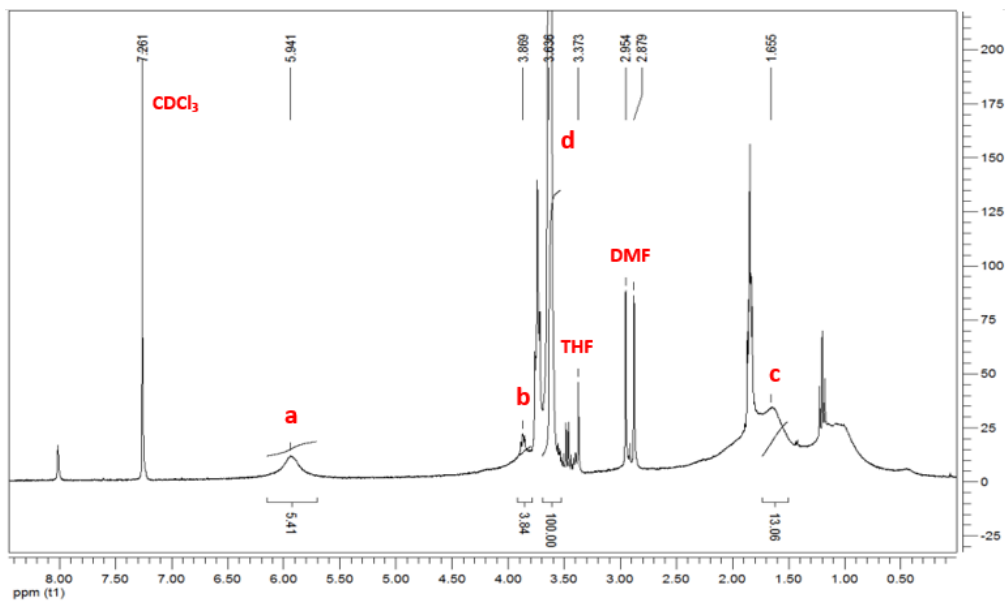
Συμπολυμερές	Σύσταση (% β/β)	Συντομογραφία
PEG ₅₀₀₀ -b-PHPMA	43% PEG και 57% PHPMA	43-57
PEG ₅₀₀₀ -b-PHPMA	53% PEG και 47% PHPMA	53-47
PEG ₁₀₀₀₀ -b-PHPMA	34% PEG και 66% PHPMA	34-66
PEG ₂₀₀₀₀ -b-PHPMA	28% PEG και 72% PHPMA	28-72



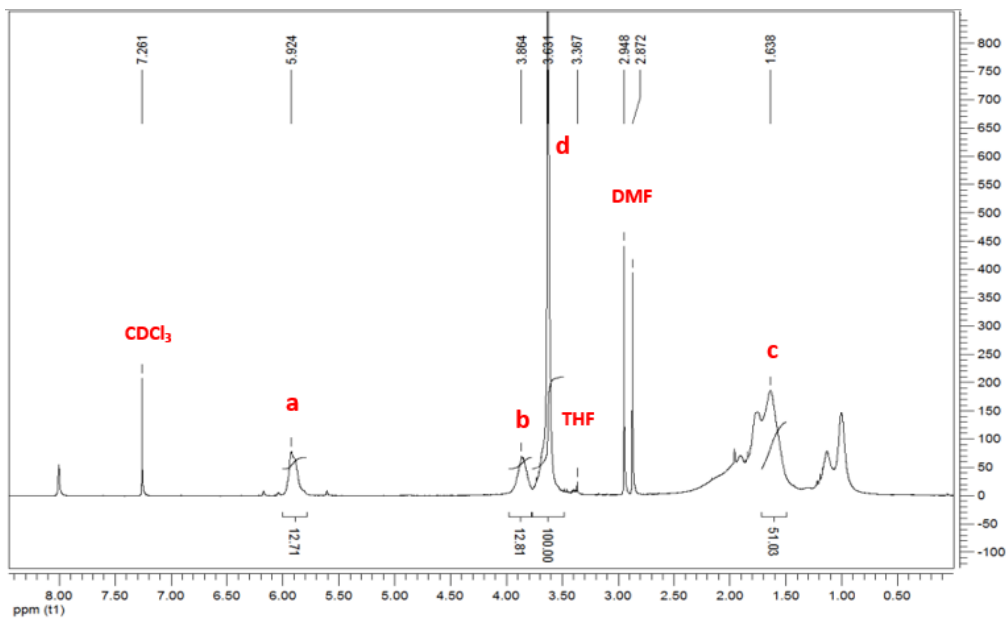
Σχήμα 34: Συντακτικός τύπος του συμπολυμερούς PEG-b-PTHMPMA με τα χαρακτηριστικά υδρογόνα της χημικής ένωσης.



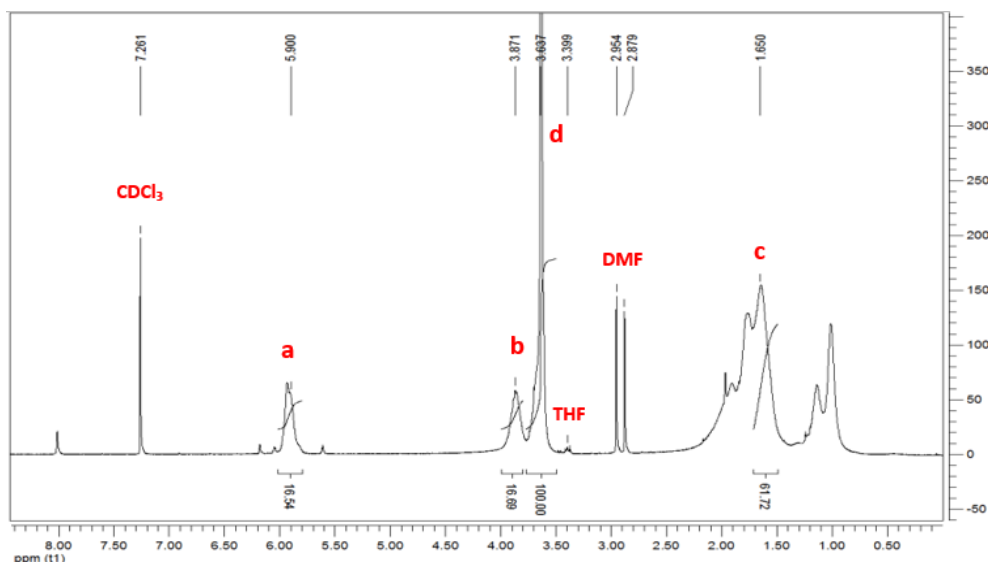
Σχήμα 35: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 43-57.



Σχήμα 36: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 53-47.



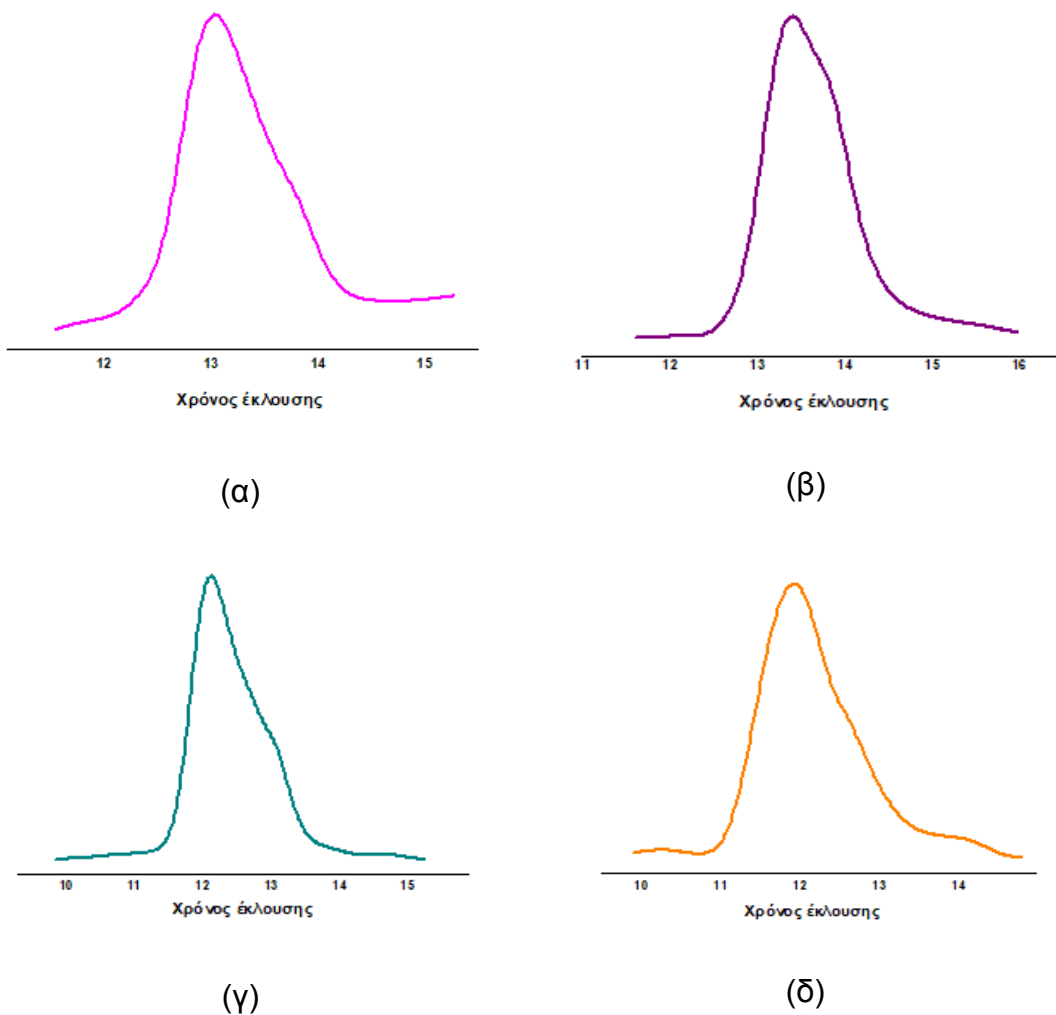
Σχήμα 37: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 34-66.



Σχήμα 38: Φάσμα ^1H -NMR του συμπολυμερούς 28-72.

6.1.2 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Στο σχήμα 39 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα αποκλεισμού μεγεθών των συμπολυμερών που συντέθηκαν.



Σχήμα 39: Χρωματογραφήματα από στήλη αποκλεισμού μεγεθών των συμπολυμερών (α) 43-57, (β) 53- 47, (γ) 34-66 και (δ) 28-72.

Για καθένα από τα τέσσερα συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν προσδιορίστηκε με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος (M_w), το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό (M_n), καθώς και η κατανομή μοριακών βαρών. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 4.

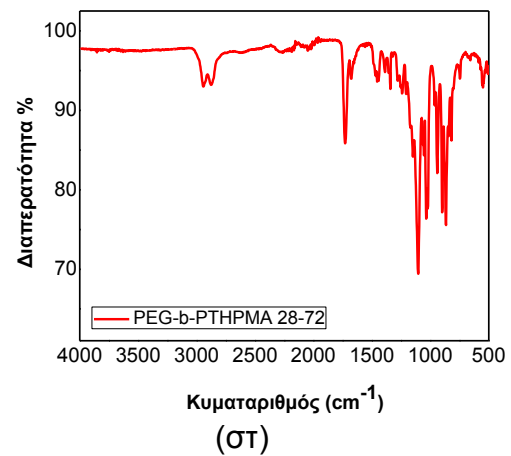
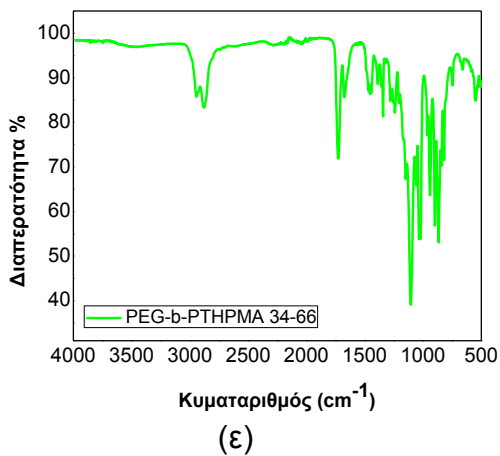
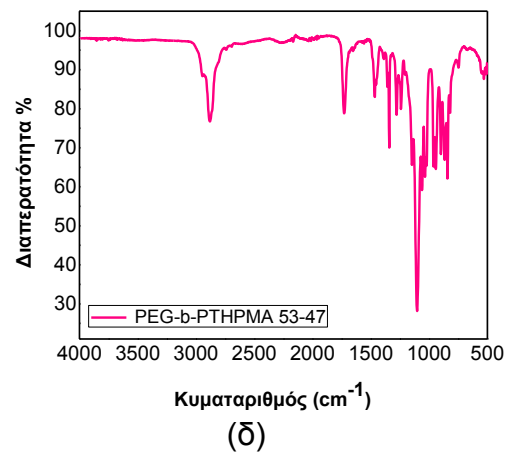
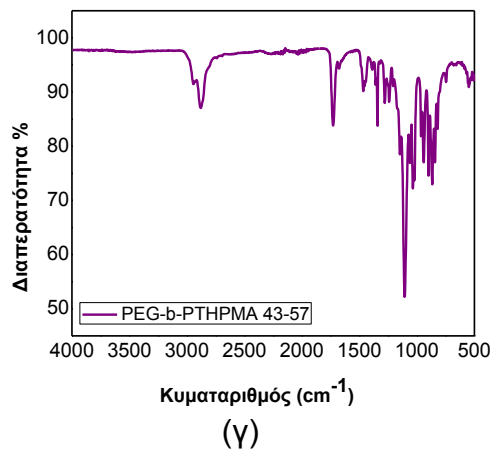
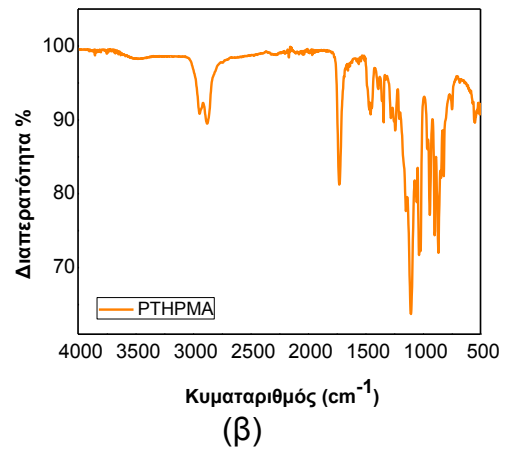
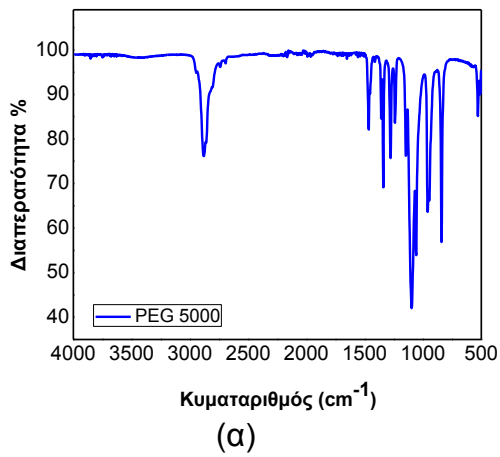
Πίνακας 4: Μοριακά βάρη και κατανομή αυτών των συμπολυμερών.

Συμπολυμερές PEG-b-PHPMA	M _w	M _n	I=M _w /M _n
43-57	29.224	25.470	1,15
53-47	20.972	18.241	1,15
34-66	77.124	65.256	1,18
28-72	88.076	72.275	1,21

6.1.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Για την ταυτοποίηση των συμπολυμερών που συντέθηκαν χρησιμοποιήθηκε επίσης φασματοσκοπία IR. Στο σχήμα 40 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης IR των συμπολυμερών PEG-b-PHPMA και των επιμέρους μονομερών τους, PEG και PHPMA, χωριστά.

Στο φάσμα του σχήματος 40(α) που αφορά το μονομερές PEG 5000 διακρίνονται η δόνηση τάσης του δεσμού C-H των μεθυλομάδων στα 3000 cm^{-1} , οι δονήσεις τάσης των δεσμών C-O και C-C στα 840, 1058 και στα 1097 cm^{-1} , η δόνηση τάσης του δεσμού C-O στα 1145 cm^{-1} και η δόνηση κάμψης των δεσμών CH₂ στα 840, 960, 1058, 1241, 1278, 1341 και στα 1466 cm^{-1} . Στο φάσμα του μονομερούς PHPMA (Σχήμα 40β) διακρίνεται στα 3000 cm^{-1} κορυφή που οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H των μεθυλομάδων η οποία είναι μικρότερης έντασης από την αντίστοιχη στο φάσμα της PEG. Επιπλέον, διακρίνονται η δόνηση κάμψης των δεσμών C-H των μεθυλομάδων στα 825 cm^{-1} , η δόνηση κάμψης του δεσμού C-O στα 1030 cm^{-1} , η ασύμμετρη δόνηση τάσης του δεσμού C-O-C στα 1250 cm^{-1} και η συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού C-O-C στα 1120 cm^{-1} , καθώς και η χαρακτηριστική κορυφή της δόνησης τάσης του δεσμού C=O στα 1730 cm^{-1} . Στα φάσματα των συμπολυμερών (Σχήμα 40γ-στ) παρατηρούνται όλες οι παραπάνω κορυφές, γεγονός που πιστοποιεί την επιτυχή σύνθεση αυτών.

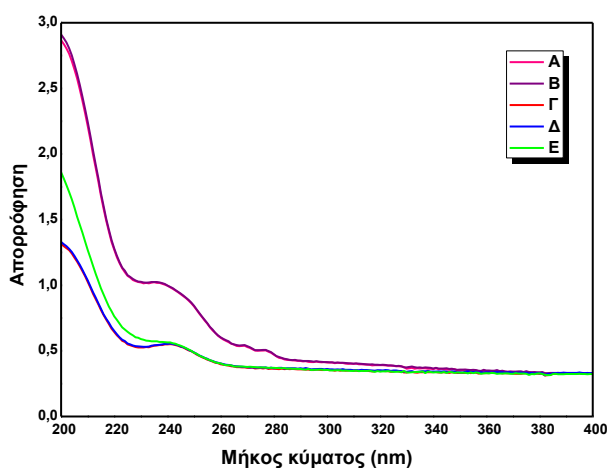


Σχήμα 40: Φάσματα IR των μονομερών (α) PEG με μοριακό βάρος 5000 και, (β) PTHPMA και των συμπολυμερών (γ) PEG-b-PTHPMA 43-57, (δ) PEG-b-PTHPMA 53-47, (ε) PEG-b-PTHPMA 34-66, και (στ) PEG-b-PTHPMA 28-72.

6.1.4 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η απορρόφηση του φωτοπολυμερικού υμενίου στα μήκη κύματος που συνήθως χρησιμοποιούνται για έκθεση στις φωτολιθογραφικές διαδικασίες. Επίσης, μέσω των φασμάτων ορατού-υπεριώδους παρακολουθήθηκαν οι μεταβολές στο υλικό κατά τα διάφορα στάδια της φωτολιθογραφικής διαδικασίας. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε διάλυμα του κάθε πολυμερούς PEG-b-PTHPMA σε γαλακτικό αιθυλεστέρα και προστέθηκε φωτοευαισθητοποιητής TPS-antimonate σε κατά βάρος αναλογία 3% (β/β) ως προς το πολυμερές. Το διάλυμα αυτό επιστρώθηκε με περιστροφή σε δισκία χαλαζία, τα οποία δεν απορροφούν σε μήκη κύματος μικρότερα από 330 nm, σε αντίθεση με το γυαλί, και ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης στην περιοχή 400-200 nm.

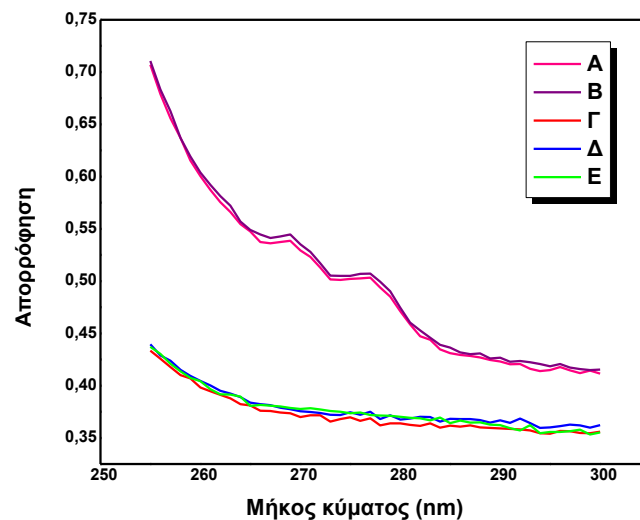
Στο σχήμα 41 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis του συμπολυμερούς 43-57 με προσθήκη του φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate, αμέσως μετά την επίστρωση (ροζ γραμμή), μετά από θέρμανση (PAB) στους 110 °C (μωβ γραμμή), μετά από εμφάνιση με διάλυμα NaOH (κόκκινη γραμμή), μετά από αποστείρωση της επιφάνειας σε UV ακτινοβολία για 20 min (μπλε γραμμή) και τέλος, μετά από εμφάπτιση σε θρεπτικό υλικό για 1 ημέρα (πράσινη γραμμή). Από τα φάσματα αυτά είναι εμφανής η μείωση της κορυφής στα 240 nm στα στάδια που ακολουθούν την έκθεση και εμφάνιση ενώ δεν παρατηρείται μεταβολή στο φάσμα του υμενίου κατά την αποστείρωση στο UV όπως και την παραμονή σε θρεπτικό υλικό, γεγονός που επιβεβαιώνει την ανθεκτικότητα του υμενίου σε αυτές τις κατεργασίες.



Σχήμα 41: Φάσμα UV-Vis του υμενίου PEG-b-PHPMA 43-57/φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate: (A) μετά την επίστρωση, (B) μετά από θέρμανση (PAB) στους 110°, (Γ) μετά από εμφάνιση σε διάλυμα NaOH, (Δ) μετά από αποστείρωση σε UV ακτινοβολία για 20 min και (E) μετά από εμφύσηση σε θρεπτικό υλικό για 1 ημέρα.

Στο διάγραμμα του σχήματος 42, παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή του φάσματος που αντιστοιχεί σε μήκη κύματος από 255 έως 300 nm, στο οποίο παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης των αρωματικών δακτυλίων του τριφαινυλοσουλφονικού κατιόντος του φωτοευαισθητοποιητή στα 268 και 276 nm, οι οποίες δεν υπάρχουν στα φάσματα του υμενίου μετά την εμφάνιση. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι κατά το στάδιο της εμφάνισης ο φωτοευαισθητοποιητής TPS-antimonate απομακρύνεται πλήρως από το υμένιο. Το εύρημα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να είναι τοξικός για τα κύτταρα και επομένως δεν είναι επιθυμητή η παρουσία του στις επιφάνειες που προορίζονται για καλλιέργεια κυττάρων.

Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και για τα υπόλοιπα πολυμερικά υλικά.



Σχήμα 42: Φάσμα UV-Vis του υμενίου PEG-b-PHPMA /TPS-antimonate (A) μετά την επίστρωση, (B) μετά από θέρμανση (PAB) στους 110°, (Γ) μετά από εμφάνιση με διάλυμα NaOH, (Δ) μετά από αποστείρωση σε UV ακτινοβολία για 20 min και (E) μετά από εμφάπτιση σε θρεπτικό υλικό για 1 ημέρα.

6.1.5 Αξιολόγηση ομοιομορφίας και σταθερότητας υμενίου φωτοπολυμερούς

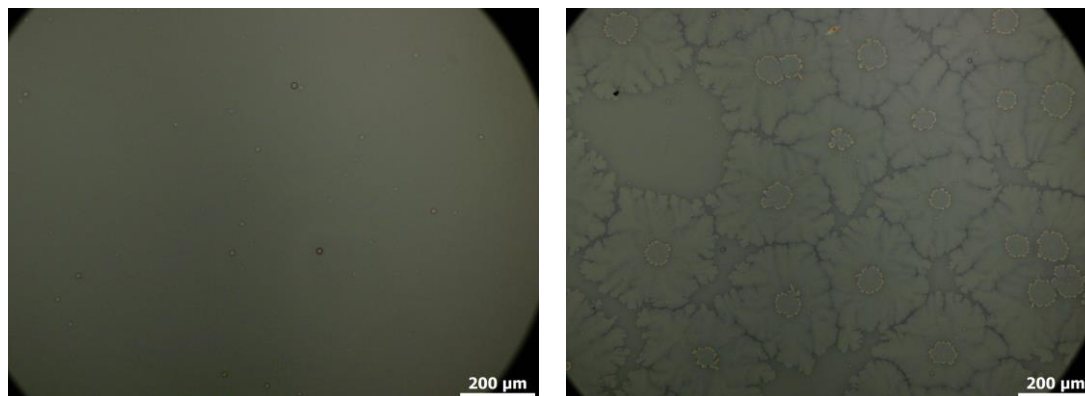
Προκειμένου να επιλεγεί το πλέον κατάλληλο πολυμερικό υλικό μεταξύ των συμπολυμερών που συντέθηκαν για τη κατασκευή των φωτοευαίσθητων υμενίων πραγματοποιήθηκε επίστρωση με περιστροφή των υλικών σε δισκίδια πυριτίου και αξιολογήθηκε η ομοιομορφία του υμενίου με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες αναφορικά με την περιεκτικότητα του διαλύματος (2%, 3% και 5% β/β) και αποδείχτηκε ότι η ελάχιστη περιεκτικότητα σε συμπολυμερές με σκοπό τη δημιουργία ομοιογενούς υμενίου ήταν 3%. Προκειμένου να μεταβληθούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του συμπολυμερούς με την επίδραση του φωτός ήταν απαραίτητη η προσθήκη φωτοευαίσθητοποιητή στα διαλύματα συμπολυμερούς. Βάσει της βιβλιογραφίας ως κατάλληλος φωτοευαίσθητοποιητής επιλέχθηκε το TPS-antimonate σε περιεκτικότητα 5% (β/β) ως προς το βάρος του πολυμερούς.

Από προκαταρκτικά πειράματα διαπιστώθηκε ότι ανεξαρτήτως του συμπολυμερούς που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά για την παρασκευή των υμενίων, η πρόσφυση με την επιφάνεια πυριτίου όπως και η σταθερότητα των υμενίων κατά τις διάφορες διαδικασίες ενισχυόταν σημαντικά όταν αυτή είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλοζάνιο (HMDS). Πραγματοποιήθηκε μελέτη για τον τρόπο εναπόθεσης του υμενίου HMDS στο δισκίο πυριτίου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εναπόθεση στο υπόστρωμα μέσω επίστρωσης με περιστροφή (5000 rpm/30") και εναπόθεση μέσω ατμών όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 5.5 για 1, 4 και 24 h. Το δισκίο θερμάνθηκε και στις 2 περιπτώσεις πριν και μετά τη διεργασία εναπόθεσης όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.5. Έπειτα, ακολούθησε η διαδικασία επίστρωσης των πολυμερικών υμενίων και η εμβάπτισή τους σε θρεπτικό υλικό για 3 ημέρες. Βρέθηκε ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα λαμβάνονταν όταν η επιφάνεια είχε επωαστεί 4 h με ατμούς HMDS, οπότε αυτή η προ-κατεργασία των δισκιδίων πυριτίου υιοθετήθηκε για όλες τις επιφάνειες στις οποίες επιστρώθηκαν τα συμπολυμερή PEG-b-PHPMA.

Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι όταν τα φωτοπολυμερικά υλικά επιστρώνονταν σε δισκία πυριτίου p-type, τα υμένια αποκολλώνταν από το δισκίο κατά το στάδιο της εμφάνισης, ενώ όταν τα δισκία πυριτίου ήταν n-type δεν παρατηρείτο τέτοιο φαινόμενο. Τα p-type δισκία πυριτίου περιέχουν στον κρύσταλλό τους προσμίξεις τρισθενών στοιχείων (βόριο, αλουμίνιο ή γάλλιο), ενώ τα n-type δισκία προσμίξεις πεντασθενών στοιχείων (φώσφορο ή αρσενικό). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει ένα επιπλέον εξωτερικό ηλεκτρόνιο στα n-type δισκία πυριτίου, γεγονός που μπορεί να ευνοεί την πρόσφυση του πολυμερικού υμενίου. Για το λόγο αυτό, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δισκία πυριτίου n-type.

Στο σχήμα 43 παρέχονται φωτογραφίες που ελήφθησαν από οπτικό μικροσκόπιο από επιφάνειες πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 53-47 σε γαλακτικό αιθυλεστέρα αμέσως μετά την επίστρωση και ύστερα από 2 ημέρες. Όπως φαίνεται, το υμένιο με την πάροδο του χρόνου αλλοιώνεται και δημιουργούνται κρύσταλλοι στην

επιφάνεια του, γεγονός που το καθιστά ακατάλληλο για τη μετέπειτα φωτολιθογραφική επεξεργασία.

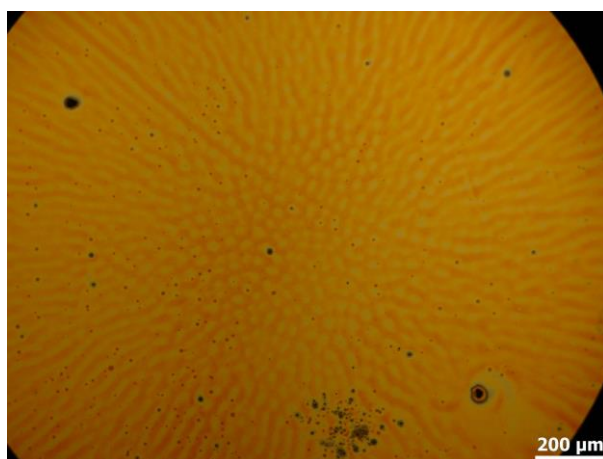


(α)

(β)

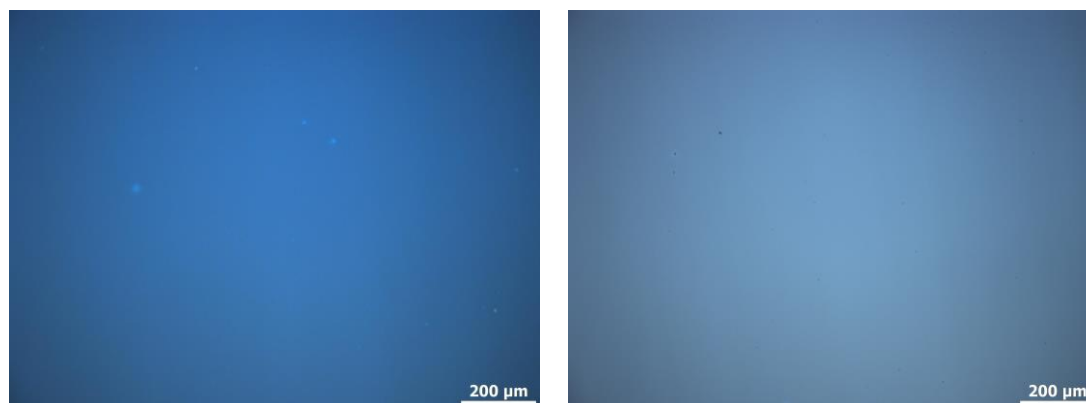
Σχήμα 43: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο επιφάνειας πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PTHMPMA 53-47 σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (α) αμέσως μετά την επίστρωση και (β) μετά από 2 ημέρες.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με το συμπολυμερές PEG-b-PTHMPMA 43-57. Αρχικά, ως διαλύτης του συμπολυμερούς χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη αλλά το δημιουργούμενο υμένιο δεν παρουσίαζε ομοιομορφία, όπως παρατηρείται και στο σχήμα 44.



Σχήμα 44: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο επιφάνειας πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PTHMPMA 43-57 σε μεθανόλη.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης του συμπολυμερούς γαλακτικός αιθυλεστέρας και διαπιστώθηκε η δημιουργία ομοιογενούς και σταθερού με την πάροδο του χρόνου υμενίου (Σχήμα 46).



(α)

(β)

Σχήμα 45: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο επιφάνειας πυριτίου επιστρωμένου με διάλυμα του συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (α) αμέσως μετά την επίστρωση και (β) μετά από 2 ημέρες.

Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και για τα πολυμερή 34-66 και 28-72. Επομένως, για όλα τα υλικά επιλέχθηκε ως διαλύτης γαλακτικός αιθυλεστέρας για την παρασκευή των διαλυμάτων προς επίστρωση.

6.2 Μελέτη υδροφιλικότητας των υμενίων

Η επιλογή των συστατικών του συμπολυμερούς έγινε με στόχο κατά την επίστρωση η συστάδα του PHPMA να προτιμά, ως πιο υδρόφοβη, το υπόστρωμα του πυριτίου, ενώ η συστάδα του PEG, ως πιο υδρόφιλη, να προτιμά να έρθει σε επαφή με τον αέρα. Με το τρόπο αυτό το υμένιο θα ήταν αρκετά υδρόφιλο ώστε να απωθεί τα κύτταρα. Στον πίνακα 5 παρατίθενται οι τιμές των γωνιών επαφής νερού που προσδιορίστηκαν για τα διαφορετικά υποστρώματα πυριτίου και τα υμένια που δημιουργούνται είτε μετά την επικάλυψη με HMDS είτε μετά την επίστρωση των συμπολυμερών και του μονομερούς PHPMA. Από τον πίνακα προκύπτει πως η γωνία επαφής των

δισκιδίων πυριτίου αυξάνει σημαντικά όσο αυξάνει ο χρόνος έκθεσης στους ατμούς του HMDS γεγονός που υποδηλώνει τη δημιουργία ενός υμενίου μεγαλύτερου πάχους ενώ με την επίστρωση των συμπολυμερών η γωνία επαφής μειώνεται στις ~50-56° από 72-78° των δισκίων πυριτίου. Δεδομένου ότι η γωνία επαφής δισκίου επιστρωμένου με ομοπολυμερές PTHPMA είναι 90°, η μείωση της γωνίας επαφής μετά την επίστρωση του συμπολυμερούς είναι ενδεικτική της διαμόρφωσης του πολυμερούς με την υδρόφοβη συστάδα PTHPMA προς τη πλευρά του δισκίου πυριτίου και της υδρόφιλης συστάδας PEG προς την εξωτερική επιφάνεια του υμενίου.

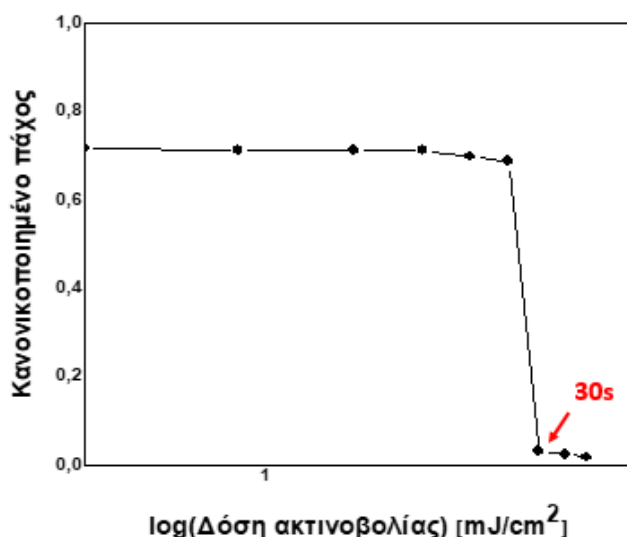
Πίνακας 5: Τιμές γωνιών επαφής των υποστρωμάτων και των δημιουργούμενων υμενίων.

Υλικό	Si n type	Si p type	Si HMDS (με επίστρωση)	Si HMDS (1 h)	Si HMDS (4 h)	Si HMDS (24 h)
Γωνία επαφής	78°	72°	66°	78° ± 2°	93° ± 2°	90° ± 2°
Υλικό	PEG-b- PTHPMA 43-57 χωρίς PAG	PEG-b- PTHPMA 43-57 /PAG	PEG-b- PTHPMA 34-66 /PAG	PEG-b- PTHPMA 28-72 /PAG	PEG-b- PTHPMA 43-57 /PAG με εμφάνιση	PTHPMA
Γωνία επαφής	50° ± 2°	52° ± 3°	56° ± 3°	55° ± 3°	51° ± 2°	90°

6.3 Σχηματοποίηση επιφανειών επιστρωμένων με συμπολυμερές με φωτολιθογραφία

Η λιθογραφική συμπεριφορά των υλικών, τόσο θετικού όσο και αρνητικού τόνου απεικόνισης, χαρακτηρίζεται από τις καμπύλες ευαισθησίας ή αντίθεσης. Οι καμπύλες αυτές απεικονίζουν το κανονικοποιημένο πάχος του υμενίου, δηλαδή το πάχος του υμενίου μετά την εμφάνιση διαιρεμένο με το αρχικό του πάχος (πριν την έκθεση), για διάφορες δόσεις έκθεσης συναρτήσει της δόσης έκθεσης σε λογαριθμική κλίμακα. Από τις καμπύλες αντίθεσης

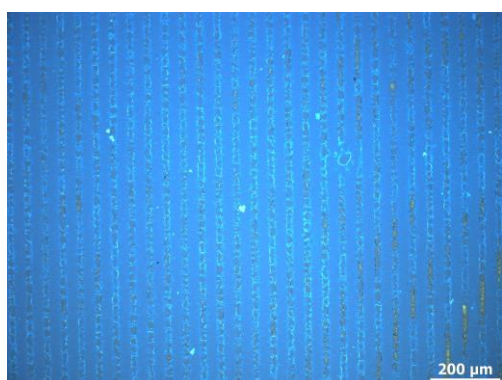
προκύπτουν οι δόσεις που χαρακτηρίζουν και την ευαισθησία των υλικών στο φως καθώς και η τιμή της αντίθεσής τους. Για την κατασκευή της καμπύλης αντίθεσης του συμπολυμερούς, υμένα σταθερού πάχους εκτέθηκαν σε διάφορες δόσεις ακτινοβολίας και προσδιορίστηκε το πάχος τόσο των εκτεθειμένων όσο και ανέκθετων περιοχών μετά την εμφάνιση, με ελλειψόμετρο. Το πάχος μετά την επίστρωση και πριν την έκθεση υπολογίστηκε στα $81,62 \pm 0,25$ nm, ενώ το πάχος του υμενίου μετά την έκθεση και την εμφάνιση υπολογίστηκε στα $65 \pm 0,2$ nm. Με βάση αυτά τα πάχη, υπολογίστηκαν τα κανονικοποιημένα πάχη για τις διάφορες δόσεις ακτινοβολίας και κατασκευάστηκε η καμπύλη αντίθεσης που παρατίθεται στο σχήμα 46. Από την καμπύλη προκύπτει ότι πρόκειται για θετικού τόνου υλικό, καθώς οι περιοχές που εκτέθηκαν στην ακτινοβολία UV απομακρύνονται κατά την εμφάνιση. Από την καμπύλη αντίθεσης συμπεραίνεται επίσης ότι για υμένα με τα παραπάνω πάχη, η κατάλληλη δόση ακτινοβολίας είναι τα $5,1 \text{ mJ/cm}^2$. Παράλληλα, προκύπτει ότι το συμπολυμερές εμφανίζει μεγάλη τιμή αντίθεσης, συνεπώς μειώνεται η επίδραση των φαινομένων περίθλασης του φωτός και αυξάνεται η διακριτική ικανότητα του υλικού.



Σχήμα 46: Καμπύλη αντίθεσης του συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57.

Για την κατασκευή δομών με εναλλασσόμενες γραμμές πυριτίου/PEG-b-PHPMA 43-57 ίδιου πλάτους χρησιμοποιήθηκε μάσκα κατασκευασμένη από

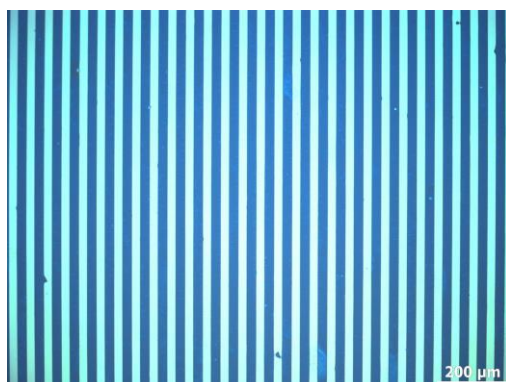
χαλαζία. Στο σχήμα 47 παρατίθενται εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο υμενίων του φωτολιθογραφικού υλικού για διάφορους χρόνος έκθεσης από τις οποίες προκύπτει ότι με έκθεση για 30 s λαμβάνονται γραμμικές δομές με αναλογία πλάτους 1:1 (Σχήμα 47γ). Στην περίπτωση έκθεσης του υμενίου σε μικρότερο χρόνο είτε δεν πραγματοποιείται η αλλαγή στη διαλυτότητα του υλικού και παραμένουν υπολείμματα του υμενίου στις περιοχές που έχουν εκτεθεί (σχήμα 47α) ή οι γραμμές του συμπολυμερούς είναι μεγαλύτερες από τις γραμμές πυριτίου (σχήμα 47β). Αντίθετα, στην περίπτωση έκθεσης σε μεγαλύτερους χρόνους οι γραμμές του συμπολυμερούς είναι μικρότερες από αυτές του πυριτίου (σχήμα 47δ).



(α)



(β)



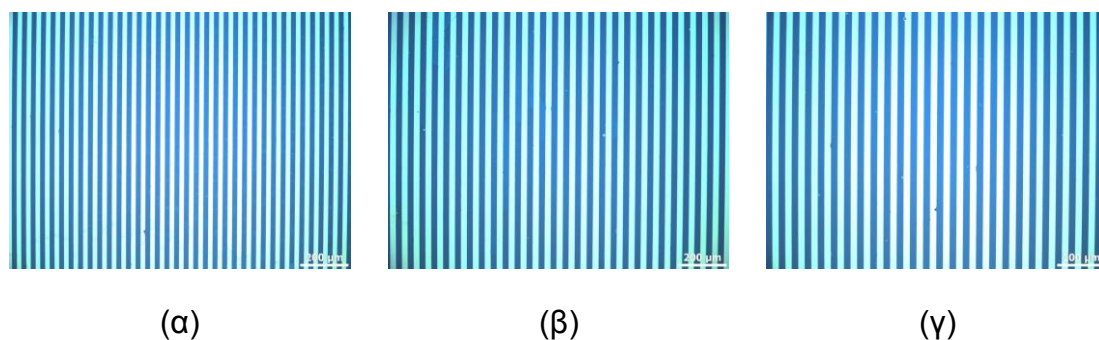
(γ)



(δ)

Σχήμα 47: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο σχηματοποιημένων υμενίων PEG-b-PTHMPMA 43-57 σε επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 μm για χρόνους έκθεσης (α) 20 s, (β) 25 s, (γ) 30 s, και (δ) 35 s.

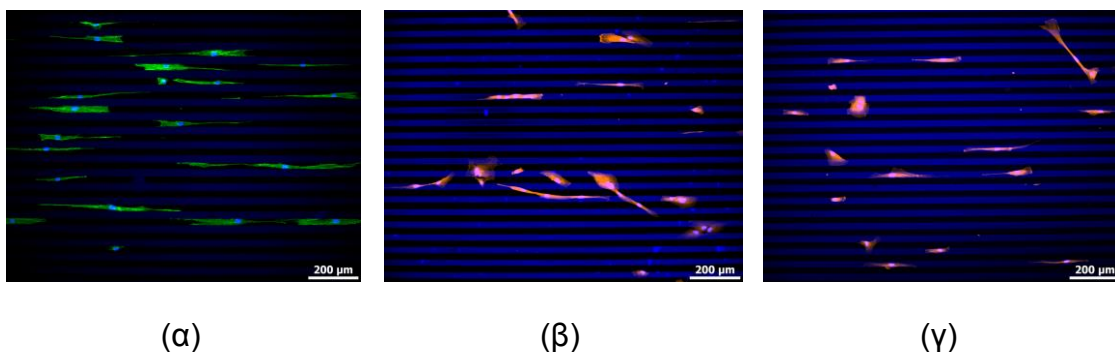
Αφού επιλέχθηκε ο χρόνος έκθεσης για τη δημιουργία γραμμικών δομών με αναλογία πλάτους 1:1, κατασκευάστηκαν επιφάνειες με διάφορα εύρη γραμμών, όπως φαίνεται στο σχήμα 48.



Σχήμα 48: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο υμενίων PEG-b-PTHPMA 43-57 σε επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους (α) 20 μm, (β) 25 μm, και (γ) 27,5 μm.

6.4 Επιλογή πολυμερικού υλικού για την επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων

Φωτολιθογραφικά υλικά που περιείχαν τα συμπολυμερή που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιστρώθηκαν σε δισκίδια και σχηματοποιήθηκαν ώστε να αξιολογηθεί η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Από την εικόνα από το μικροσκόπιο φθορισμού που παρατίθεται στο σχήμα 49α προκύπτει ότι τα κύτταρα προσκολλώνται επιλεκτικά στις γραμμές πυριτίου ενώ δεν προσκολλώνται σχεδόν καθόλου στις περιοχές του συμπολυμερούς 43-57. Αντίθετα, προσκολλώνται σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος στις επιφάνειες που φέρουν σχηματοποιημένα υμένα από τα δύο άλλα υλικά (συμπολυμερή 34-66 και 28-72) στα οποία η περιεκτικότητα του συμπολυμερούς σε PTHPMA είναι πολύ μεγαλύτερη (Σχήμα 49β και 49γ). Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε το υλικό με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε PTHPMA για περαιτέρω μελέτη της επιλεκτικής προσκόλλησης των λείων μυϊκών κυττάρων.

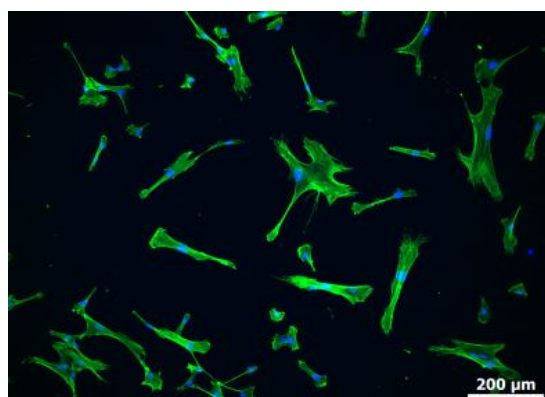


Σχήμα 49: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων μετά από καλλιέργεια για 1 ημέρα σε επιφάνειες με γραμμικές δομές πλάτους 25 μm (α) πυριτίου/PEG-b-PHPMA 43-57 (β) πυριτίου/PEG-b-PHPMA 34-66 και (γ) πυριτίου/PEG-b-PHPMA 28-72. Με πράσινο και κόκκινο χρώμα απεικονίζεται ο κυτταροσκελετός έπειτα από χρώση με φαλοϊδίνη επισημασμένη με τη φθορίζουσα Atto 488 και Atto 546, αντίστοιχα ενώ με μπλε χρώμα απεικονίζεται ο πυρήνας των κυττάρων έπειτα από χρώση με DAPI.

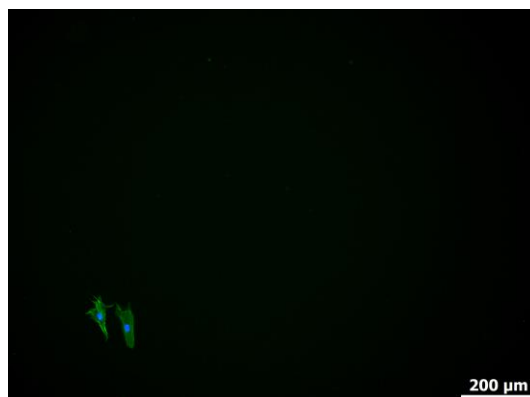
6.5 Έλεγχος επιλεκτικής προσκόλλησης κυττάρων

Η επιλεκτική προσκόλληση φυσιολογικών ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων στις επιφάνειες με τα σχηματοποιημένα υμένια PEG-b-PHPMA 43-57 επιβεβαιώθηκε μέσω καλλιέργειας των κυττάρων στις ακόλουθες επιφάνειες: επιφάνεια πυριτίου που δεν είχε υποστεί καμία κατεργασία, επιφάνεια πυριτίου επιστρωμένη με υμένιο συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 χωρίς φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate, επιφάνεια πυριτίου επιστρωμένη με υμένιο συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 με φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate καθώς και επιφάνεια πυριτίου επιστρωμένη με υμένιο συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA με φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate μετά από εμβάπτιση σε υδατικό διάλυτη NaOH 0,1 M για εμφάνιση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 50, τα κύτταρα προσκολλώνται ανεμπόδιστα στην επιφάνεια πυριτίου που δεν έχει υποστεί καμία κατεργασία όπως και στην επιφάνεια που είχε επιστρωθεί με υμένιο συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 με φωτοευαισθητοποιητή. Αντίθετα, τα κύτταρα προσκολλώνται ελάχιστα στις επιφάνειες που είχαν επιστρωθεί με υμένιο συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 χωρίς προσθήκη του

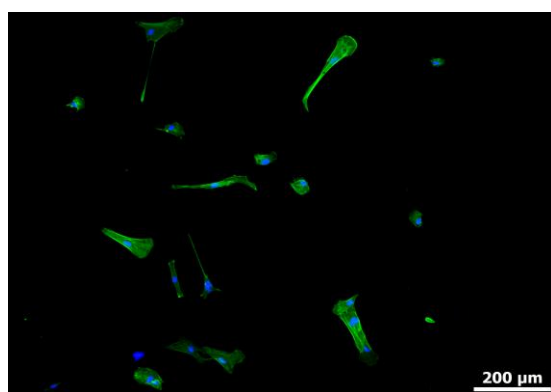
φωτοευαισθητοποιητή και καθόλου σε αυτές που ακολούθησε η διαδικασία εμφάνισης.



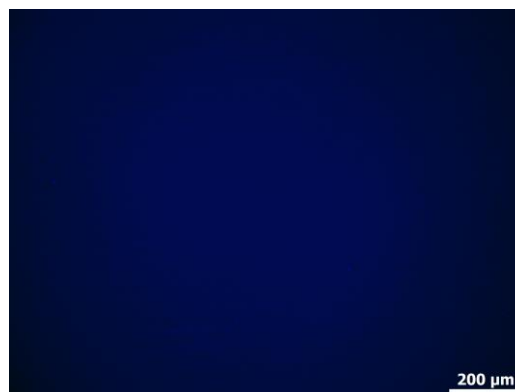
(α)



(β)



(γ)

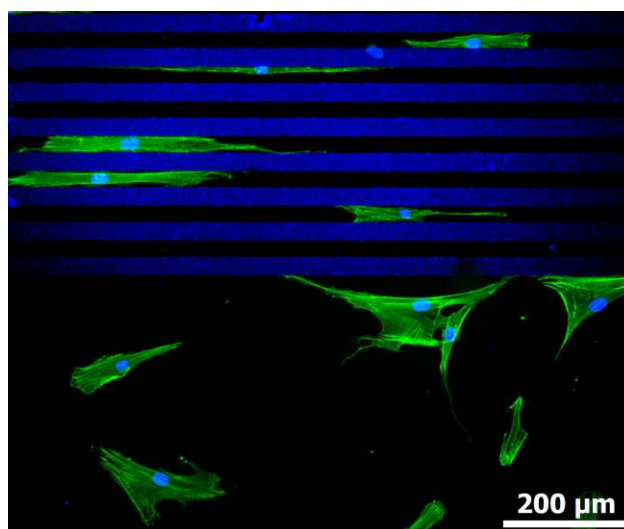


(δ)

Σχήμα 50: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων μετά από καλλιέργεια 1 ημέρας σε μη σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου (α) και επιφάνειες πυριτίου επιστρωμένων με διάλυμα PEG-b-PHPMA 43-57 χωρίς φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate (β), με διάλυμα PEG-b-PHPMA 43-57 με φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate (γ) και με διάλυμα PEG-b-PHPMA 43-57 με φωτοευαισθητοποιητή TPS-antimonate έπειτα από εμφάνιση σε διάλυμα NaOH (δ).

Μετά την διαπίστωση ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα προσκολλώνται στις επιφάνειες πυριτίου αλλά όχι σε επιφάνειες με υμένιο PEG-b-PHPMA 43-57/φωτοευαισθητοποιητή μετά την εμφάνιση, ελέγχθηκε η επιλεκτική ακινητοποίηση τους σε σχηματοποιημένες επιφάνειες. Στο σχήμα 51, παρουσιάζεται η επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων στην επιφάνεια πυριτίου

έναντι των περιοχών συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA 43-57 στις οποίες τα κύτταρα δεν προσκολλώνται καθώς και η επίδραση της σχηματοποιημένης επιφάνειας στη μορφολογία των λείων μυϊκών κυττάρων.



Σχήμα 51: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων σε σχηματοποιημένη και μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου.

6.6 Προσδιορισμός βέλτιστων διαστάσεων δομών για την επιλεκτική ακινητοποίηση κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες

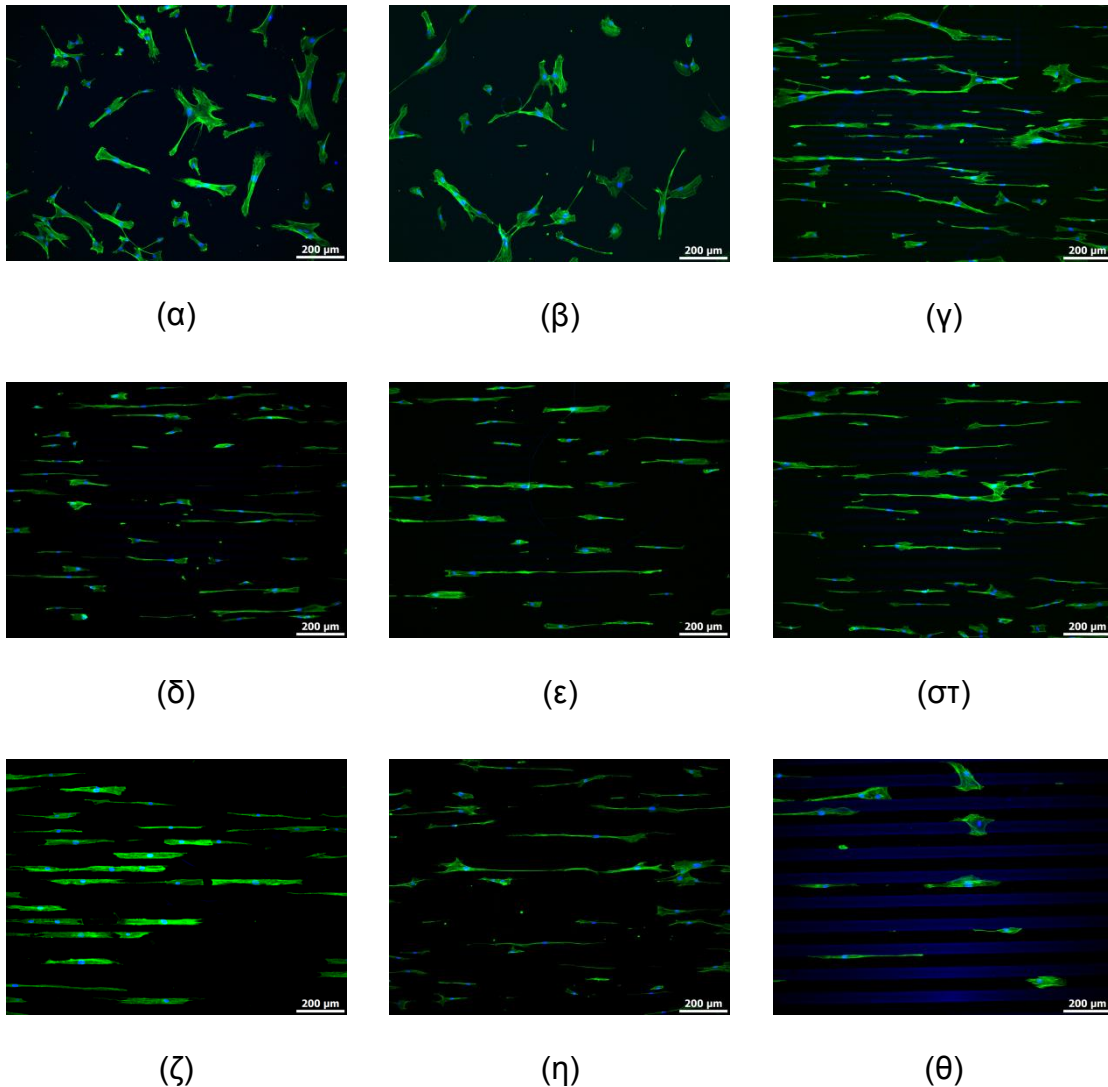
Αφού διαπιστώθηκε ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα εμφανίζουν επιλεκτική προσκόλληση στις επιφάνειες πυριτίου έναντι των περιοχών PEG-b-PTHPMA 43-57, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες διαστάσεις δομών ώστε να επιτευχθεί η υψηλότερη πιστότητα των προσκολλημένων σε αυτές κυττάρων, καθώς και η ανεμπόδιστη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός τους στις επιφάνειες αυτές.

Η μελέτη των λείων μυϊκών κυττάρων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς είναι υπεύθυνα για τη κίνηση των μυών όταν εμφανίζουν συσταλτικό φαινόμενο, τον οποίο εκδηλώνουν όταν το σχήμα τους είναι επιμηκυμένο. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκαν σχηματοποιημένες επιφάνειες με εναλλασσόμενες γραμμές πυριτίου και συμπολυμερούς PEG-b-PTHPMA 43-57 πλάτους από 17,5 έως 50 μm , προκειμένου να προσδιοριστούν οι

βέλτιστες διαστάσεις για την πλήρη ευθυγράμμιση των κυττάρων σε συνδυασμό με τον ανεμπόδιο πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξή τους.

Για το σκοπό αυτό, έγινε σπορά κυττάρων από εναιώρημα πυκνότητας $2 \cdot 10^4$ κύτταρα/mL σε όλες τις υπό εξέταση επιφάνειες και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες, όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 5.12. Μετά το πέρας του χρόνου καλλιέργειας τα δείγματα εκπλύθηκαν με ισότονο διάλυμα φωσφορικών, pH 7,4 (PBS), ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα ή νεκρά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε χρώση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, οι επιφάνειες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού και αξιολογήθηκε ο βαθμός επιλεκτικής προσκόλλησης τους στις γραμμές πυριτίου (Σχήμα 52).

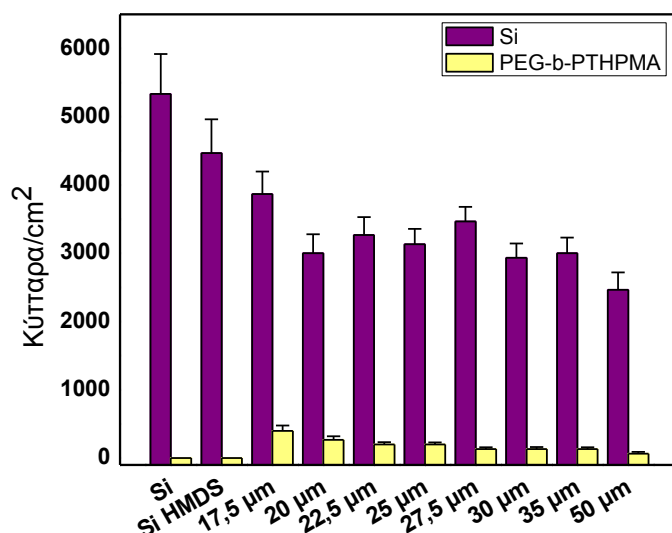
Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 52γ, στις γραμμές εύρους 17,5 μm παρατηρείται αυξημένη προσκόλληση χωρίς ευθυγράμμιση των κυττάρων στις γραμμές πυριτίου, ενώ κάποια από αυτά φαίνεται να επεκτείνονται και στις γραμμές συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 προφανώς λόγω του ότι το μέγεθος των κυττάρων είναι μεγαλύτερο από το εύρος της γραμμής πυριτίου. Αντίθετα, τα κύτταρα προσκολλώνται με μεγάλη επιλεκτικότητα στις γραμμές πυριτίου με μεγαλύτερο εύρος χωρίς να παρατηρείται προσκόλληση αυτών στις γειτονικές γραμμές συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57. Επιπλέον, στις γραμμές εύρους 22,5 έως 27,5 μm (Σχήμα 52ε, στ και ζ) παρατηρείται εκτός από αυξημένη προσκόλληση και ευθυγράμμιση των κυττάρων με τις γραμμές πυριτίου ενώ στις γραμμές εύρους 50 μm (Σχήμα 52θ) παρότι το κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιορίζεται μεταξύ των γραμμών συμπολυμερούς PEG-b-PHPMA 43-57 εκτείνεται σε διάφορες κατευθύνσεις μέσα στις γραμμές, δηλαδή τα κύτταρα δεν είναι ευθυγραμμισμένα ως προς τις δομές της επιφάνειας.



Σχήμα 52: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων σε: (α) πυρίτιο, (β) πυρίτιο τροποποιημένο με HMDS, καθώς και σε σχηματοποιημένα υμένα PEG-b-PHPMA 43-57 με γραμμές εύρους (γ) 17,5 μm, (δ) 20 μm, (ε) 22,5μm, (στ) 25 μm, (ζ) 27,5 μm, (η) 30 μm, και (θ) 50 μm.

Η εικόνα αυτή αποτυπώνεται ποσοτικά στο σχήμα 53, όπου παρουσιάζεται με μορφή ραβδογράμματος η πυκνότητα του πληθυσμού των λείων μυϊκών κυττάρων μετά από 1 ημέρα καλλιέργειας στις μη σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου, καθώς και στις περιοχές πυριτίου και τις αντίστοιχες περιοχές PEG-b-PHPMA 43-57 στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Από το σχήμα προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων στο συμπολυμερές μειώνεται με αύξηση του εύρους των γραμμών, ενώ ο

μεγαλύτερος αριθμός προσκολλημένων κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας πυριτίου καταγράφηκε στις σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 22,5 έως 27,5 μm . Πριν την επιλογή των βέλτιστων επιφανειών προσδιορίστηκε και ο βαθμός ευθυγράμμισης των προσκολλημένων κυττάρων ως προς τις δομές της επιφάνειας.



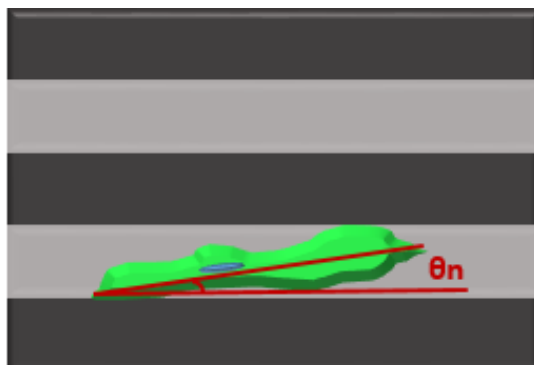
Σχήμα 53: Αριθμός προσκολλημένων κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας στις περιοχές πυριτίου (Si) και στις περιοχές PEG-b-PTHMA για σχηματοποιημένα υμένια με γραμμικές δομές διαφορετικού πάχους. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.

6.7 Προσδιορισμός βαθμού ευθυγράμμισης των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες

Η ευθυγράμμιση των κυττάρων που προσκολλώνται στις γραμμές πυριτίου εύρους από 17,5 έως 50 μm εκφράστηκε προσδιορίζοντας την πιστότητα ακινητοποίησης των κυττάρων σε σχέση με την σχηματοποίηση της επιφάνειας σύμφωνα με τον τύπο :

$$\text{Πιστότητα} = 1 - \left| \frac{\theta n}{90} \right|$$

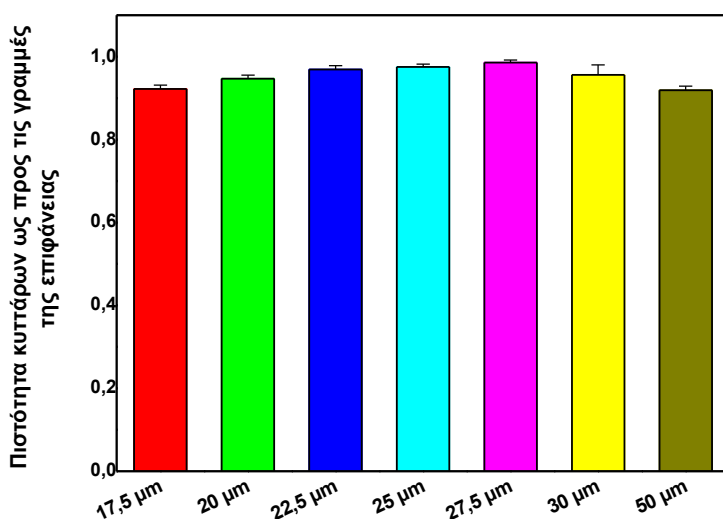
όπου θ_n η γωνία που σχηματίζει ο μεγάλος άξονας του κυττάρου ως προς τη διεύθυνση των γραμμών (Σχήμα 54). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα κύτταρα θεωρούνται ευθυγραμμισμένα όταν η πιστότητα κυμαίνεται μεταξύ $0,9-1^{149}$.



Σχήμα 54: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων στην οποία απεικονίζεται η γωνία θ_n που σχηματίζει ο μεγάλος άξονας με τις γραμμές της σχηματοποιημένης επιφάνειας.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η πιστότητα με την οποία τα κύτταρα προσκολλώνται στις γραμμές πυριτίου έγινε σπορά και καλλιέργεια των κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες για 24 h. Μετά το πέρας του χρόνου καλλιέργειας ακολούθησε ανοσοκυτταρολογία. Για την χρώση του κυτταροπλάσματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φαλλοϊδίνης επισημασμένης με την φθορίζουσα Atto 488 και για την χρώση του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε 4,6-διαμινο-2 φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI). Η διεργασία της ανοσοκυτταρολογίας παρουσιάζεται αναλυτικά στο εδάφιο 5.13. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 55, προκύπτει ότι η πιστότητα των προσκολλημένων κυττάρων είναι μεγαλύτερη στις δομές πυριτίου με γραμμές εύρους 25 μm και 27,5 μm . Η μείωση της ευθυγράμμισης των κυττάρων στις γραμμές μεγαλύτερου εύρους οφείλεται στο ότι τα κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν στην διαθέσιμη περιοχή με τρόπο ώστε να σχηματίζουν γωνία θ_n μεγαλύτερη από 10° . Ενώ η απόκλιση από την πλήρη ευθυγράμμιση στις γραμμές με μικρότερο εύρος οφείλεται στο ότι η διαθέσιμη επιφάνεια δεν επαρκεί για τα κύτταρα τα οποία τείνουν να εκτείνονται εκτός των γραμμών. Με το τρόπο αυτό, προσδιορίστηκε ότι το ιδανικό πλάτος γραμμής πυριτίου για την ευθυγράμμιση των λείων μυϊκών κυττάρων και τη

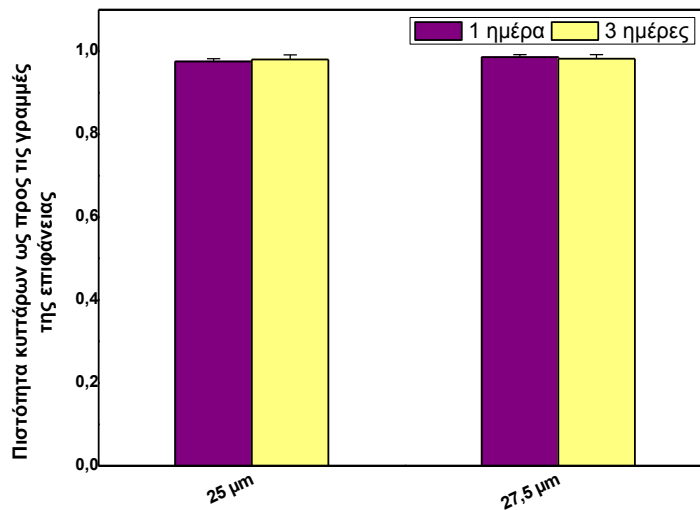
δημιουργία γραμμικών συστοιχιών μεμονωμένων κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες κυμαίνεται από 25 μm και 27,5 μm .



Σχήμα 55: Ραβδόγραμμα πιστότητας των λείων μυϊκών κυττάρων συναρτήσει του εύρους γραμμών πυριτίου όταν έχουν καλλιεργηθεί σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 17,5 μm έως 50 μm για 24 h. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.

6.7.1 Μελέτη διατήρησης της πιστότητας συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας στις επιλεχθείσες επιφάνειες

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της ευθυγράμμισης των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας σε επιφάνειες πυριτίου με πλάτος γραμμών 25 και 27,5 μm . Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 56, η βέλτιστη ευθυγράμμιση επιτυγχάνεται μετά από καλλιέργεια των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες για 1 ημέρα. Παρατηρείται επίσης ότι η ευθυγράμμιση των κυττάρων στις εν λόγω επιφάνειες διατηρείται και μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας (Σχήμα 56).

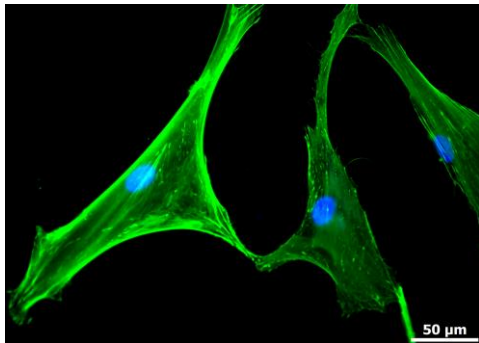


Σχήμα 56: Ραβδόγραμμα πιστότητας των λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί για 1 ημέρα (μωβ στήλες) και 3 ημέρες (κίτρινες στήλες) σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 25 μm και 27,5 μm. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.

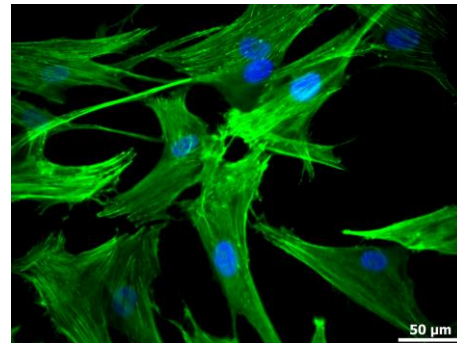
6.8 Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες

Μελετήθηκε η μορφολογία του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος των λείων μυϊκών κυττάρων στις επιλεχθείσες σχηματοποιημένες επιφάνειες και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη μορφολογία των κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε μη σχηματοποιημένες επιφάνειες (Σχήμα 57). Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εδάφιο 5.12 για χρόνους καλλιέργειας 1 και 3 ημέρες. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις ήταν $2 \cdot 10^4$ κύτταρα/ mL. Ακολούθησε ανοσοκυταρολογία με χρώση του κυτταροπλάσματος με φαλλοϊδίνη επισημασμένη με Atto 488 καθώς και χρώση των πυρήνων με DAPI (Εδάφιο 5.13). Από τις εικόνες που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο φθορισμού προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων Image Pro Plus7 διάφορες παράμετροι

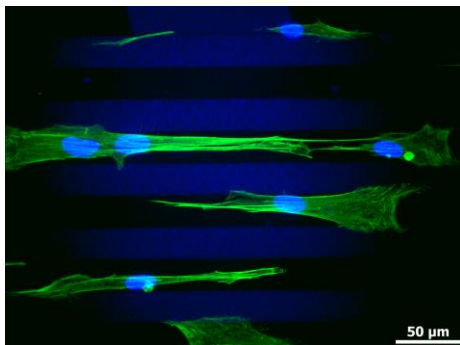
της μορφολογίας των κυττάρων, όπως η επιμήκυνση του κυτταροσκελετού και το εμβαδό του πυρήνα.



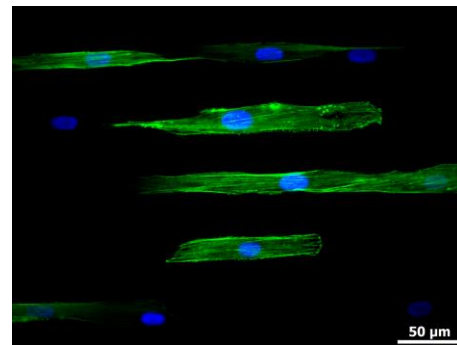
(α)



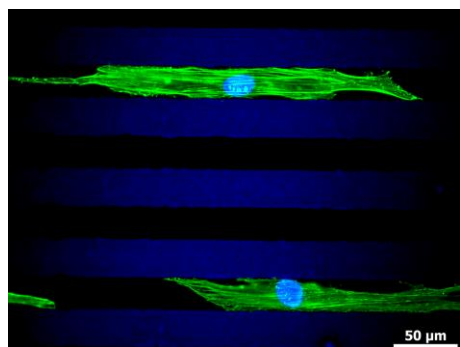
(β)



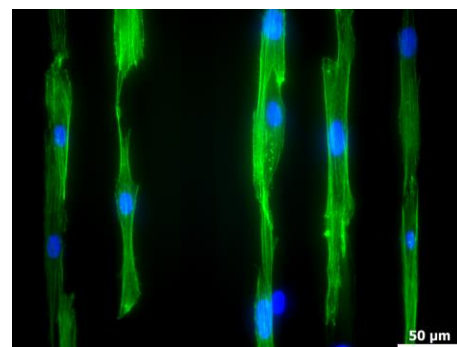
(γ)



(δ)



(ε)

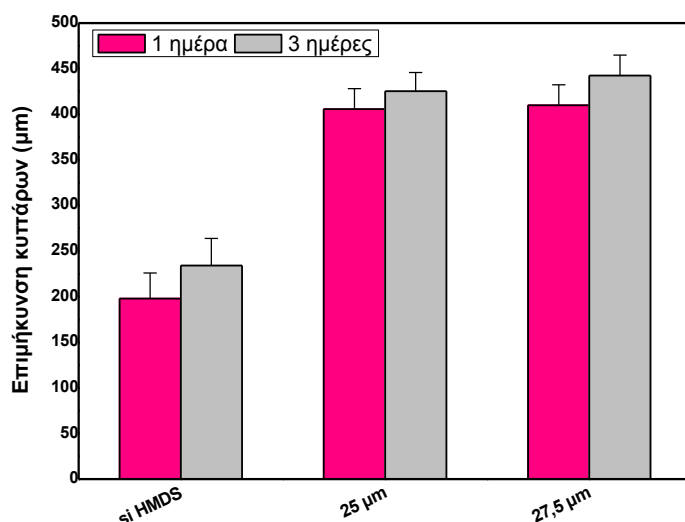


(στ)

Σχήμα 57: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε επιφάνεια πυριτίου (α, β) ή σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 25 μm (γ,δ) ή γραμμές εύρους 27,5 μm (ε, στ) για 1 ημέρα (α, γ, ε) και 3 ημέρες (β, δ, στ), αντίστοιχα.

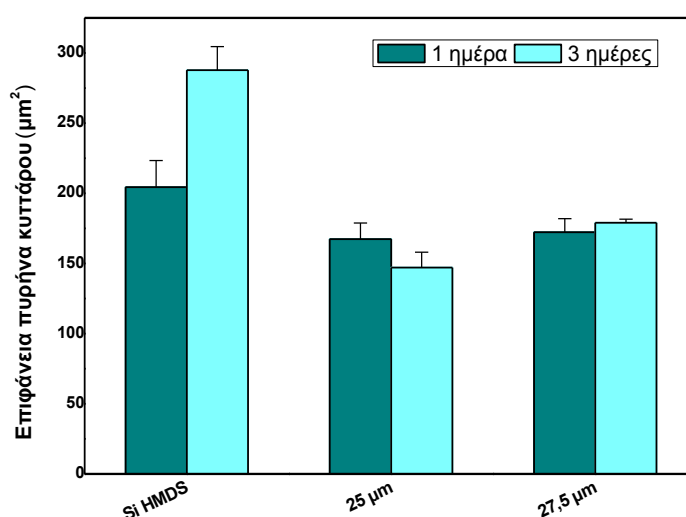
Όπως προκύπτει από το σχήμα 57, όταν τα λεία μυϊκά κύτταρα καλλιεργούνται σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου, χαρακτηρίζονται από ατρακτοειδές σχήμα για χρόνο καλλιέργειας 1 ημέρας, το οποίο διατηρούν και μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας, στις οποίες είναι εμφανής η αύξηση του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων. Από την άλλη, όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 ή 27,5 μm εμφανίζουν επιμηκυμένη μορφολογία και παρατηρείται ευθυγράμμιση των ινών ακτίνης του κυτταροσκελετού με τις γραμμές του πυριτίου και για τους δύο χρόνους καλλιέργειας.

Βάσει των ανωτέρω εικόνων εξήχθη το διάγραμμα της επιμήκυνσης του κυτταροσκελετού των λείων μυϊκών κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 και 27,5 μm συγκριτικά με τη μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου (Σχήμα 58). Διαπιστώθηκε επιμήκυνση του κυτταροσκελετού των λείων μυϊκών κυττάρων κατά περίπου 2 φορές στις σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου σε σχέση με την ελεύθερη επιφάνεια πυριτίου και για τους δύο χρόνους καλλιέργειας.



Σχήμα 58: Ραβδόγραμμα επιμήκυνσης του κυτταροσκελετού λείων μυϊκών κυττάρων μετά από 1 (ροζ στήλες) και 3 (γκρι στήλες) ημέρες καλλιέργειας σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου καθώς και σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 και 27,5 μm . Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.

Η παρατηρούμενη παραμόρφωση του κυτταροσκελετού συνοδεύεται από αντίστοιχη συρρίκνωση της επιφάνειας του πυρήνα, όπως αποδεικνύεται από το ραβδόγραμμα του σχήματος 59 στο οποίο παρουσιάζεται η επιφάνεια του πυρήνα των λείων μυϊκών κυττάρων, όταν αυτά έχουν καλλιεργηθεί για 1 και 3 ημέρες σε μη σχηματοποιημένες καθώς και σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου, αντίστοιχα. Αναλυτικά, μετά από μία ημέρα καλλιέργειας η επιφάνεια του πυρήνα συρρικνώνεται κατά ~15% στις σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου συγκριτικά με τη μη σχηματοποιημένη επιφάνεια, ενώ η συρρίκνωση αυτή αγγίζει το 40% μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας.

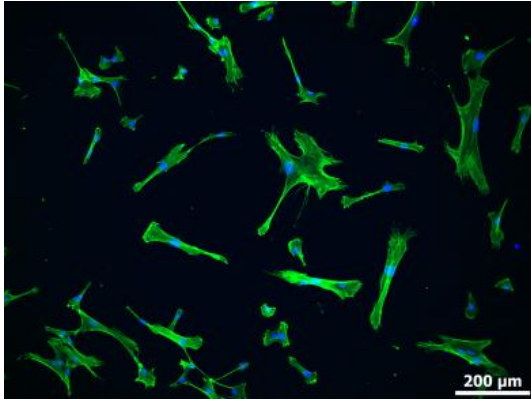


Σχήμα 59: Ραβδόγραμμα της επιφάνειας του πυρήνα λείων μυϊκών κυττάρων μετά από 1 και 3 μέρες καλλιέργειας σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου καθώς και σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 και 27,5 μm. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.

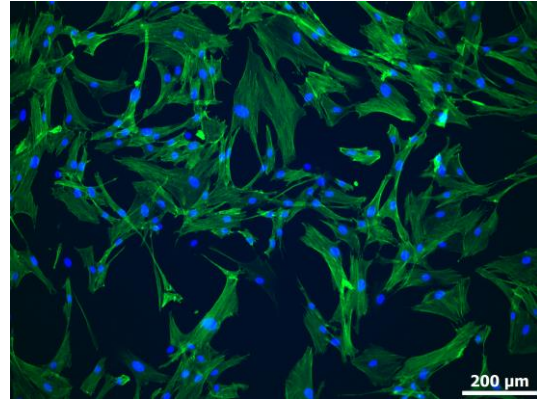
6.9 Μελέτη ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων

Στις σχηματοποιημένες επιφάνειες με διάταξη γραμμών 25 και 27,5 μm στις οποίες επιτυγχάνεται η βέλτιστη γραμμική διάταξη κυττάρων μελετήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, έγινε σπορά του ίδιου αριθμού κυττάρων σε επιφάνειες σχηματοποιημένες με την βέλτιστη διάταξη γραμμών καθώς και σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου και

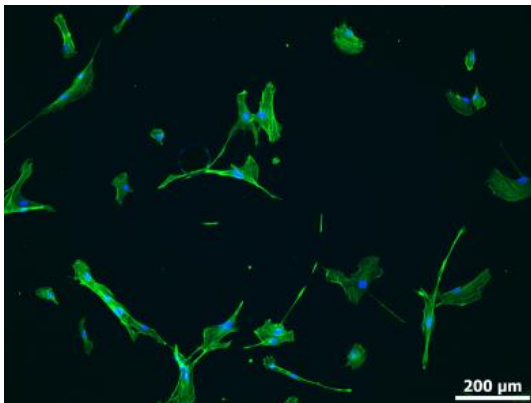
ακολούθησε καλλιέργεια για 1 και 3 ημέρες. Στο σχήμα 60 παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες κυττάρων σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου, σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου που έχει τροποποιηθεί με HMDS, όπως επίσης σε επιφάνειες πυριτίου σχηματοποιημένες με τις επιλεγμένες δομές.



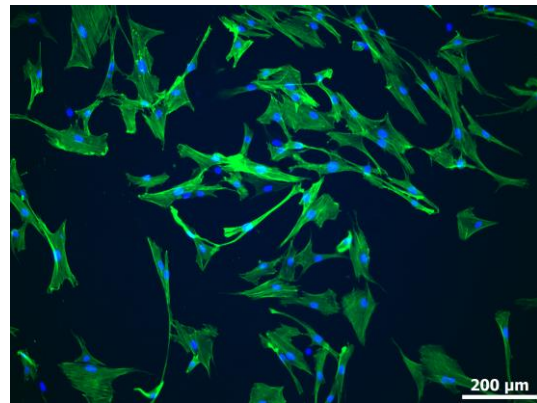
(α)



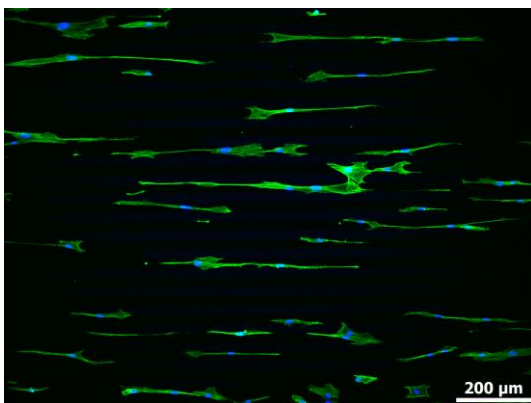
(β)



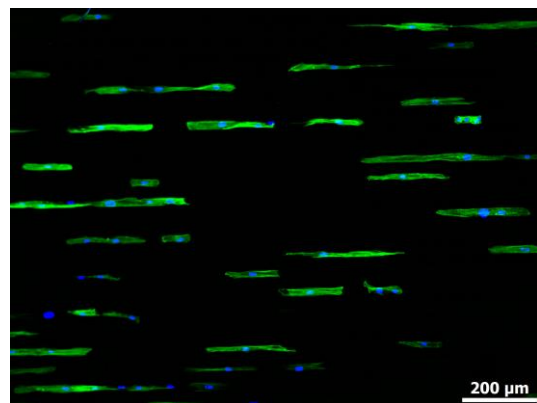
(γ)



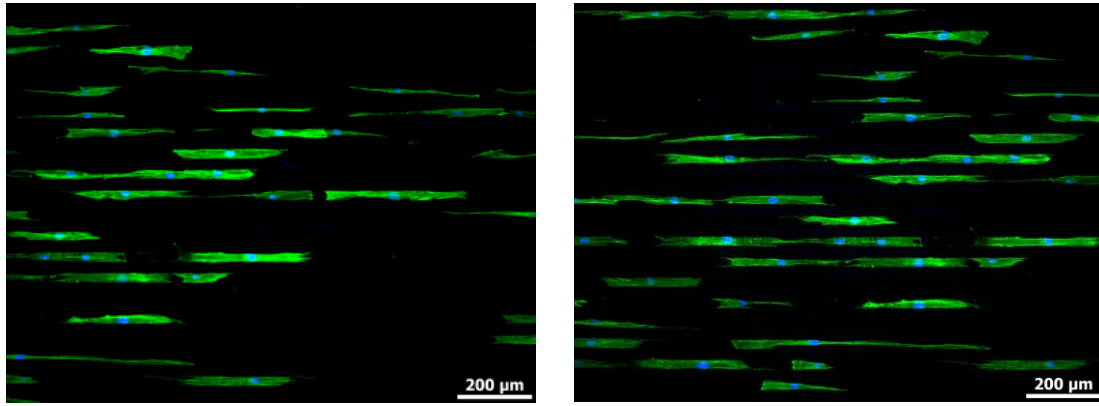
(δ)



(ε)



(στ)

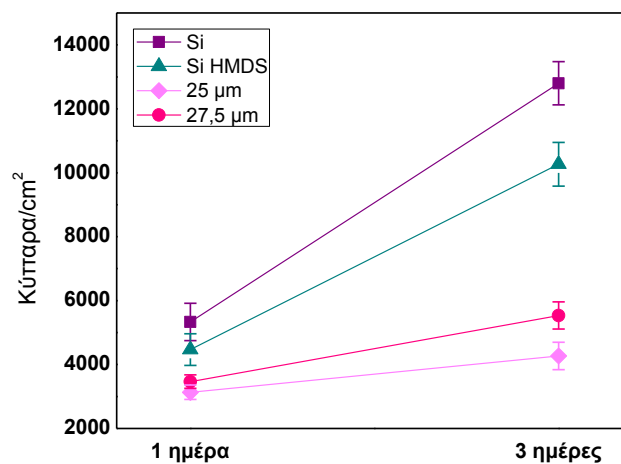


(ζ)

(η)

Σχήμα 60: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε επιφάνειες πυριτίου χωρίς καμμία τροποποίηση (α, β), σε επιφάνειες πυριτίου τροποποιημένες με HMDS (γ,δ), σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με γραμμές εύρους 25 μm (ε, στ) ή 27,5 μm (ζ, η) για 1 ημέρα (α, γ, ε, ζ) και 3 ημέρες (β, δ, στ, η), αντίστοιχα.

Απο τις εικόνες αυτές εξήχθη το γράφημα που παρουσιάζεται στο Σχήμα 61, από το οποίο προσδιορίστηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού.

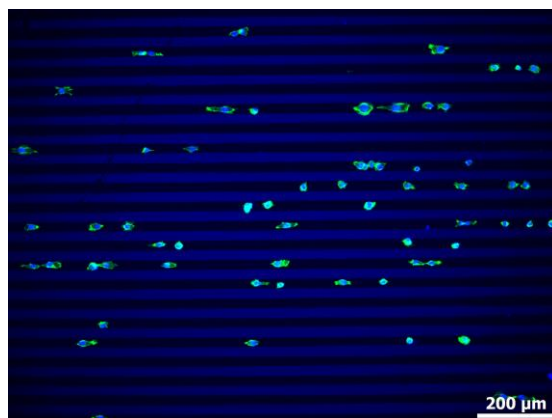


Σχήμα 61: Πυκνότητα προσκολλημένων κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας σε συνάρτηση με το χρόνο καλλιέργειας σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου Si (■), σε μη σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου Si τροποποιημένη με HMDS (▲), σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμές εύρους 25 μm (◆) και 27,5 μm (●). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων από τρεις επιφάνειες ± 1 τυπική απόκλιση.

Ως ρυθμός πολλαπλασιασμού ορίζεται ο λόγος του αριθμού των προσκολλημένων στις επιφάνειες κυττάρων μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας ως προς τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων μετά από μία ημέρα καλλιέργειας. Στις μη σχηματοποιημένες επιφάνειες μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας παρατηρείται αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων κατά ~2,5 φορές σε σχέση με τη 1 ημέρα, ενώ στις σχηματοποιημένες επιφάνειες ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων αυξάνεται κατά ~1,2 φορές. Με άλλα λόγια, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των λειών μυϊκών κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες μειώνεται κατά ~50% σε σχέση με το ρυθμό πολλαπλασιασμού στις μη σχηματοποιημένες επιφάνειες. Επίσης, βρέθηκε ότι η τροποποίηση της επιφάνειας με HMDS δεν επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των λειών μυϊκών κυττάρων.

6.10 Μελέτη επιλεκτικής προσκόλλησης καρκινικών κυττάρων

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επιλεκτική προσκόλληση και άλλων ειδών κυττάρων στις υπό μελέτη σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκαν καρκινικά κύτταρα της σειράς HT1080 σε σχηματοποιημένη επιφάνεια πυριτίου με εύρος γραμμών 25 μm για 1 ημέρα (Σχήμα 62). Παρατηρήθηκε, ότι και αυτό το είδος κυττάρων προσκολλάται επιλεκτικά στις γραμμές πυριτίου έναντι των γραμμών του συμπολυμερούς. Επομένως το συγκεκριμένο συμπολυμερές μπορεί να βρει ευρύτερη εφαρμογή για την κατευθυνόμενη προσκόλληση και ανάπτυξη κυττάρων.



Σχήμα 62: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού καρκινικών κυττάρων της σειράς HT1080 προσκολλημένων σε γραμμές πυριτίου εύρους 25 μm σε επιφάνειες με σχηματοποιημένο υμένιο PEG-b-PHPMA 43-57.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται πολλές μελέτες που αφορούν την ανάπτυξη νέων πολυμερικών υλικών για εφαρμογές στη βιοϊατρική. Τα πολυμερή που μελετώνται μπορεί να είναι είτε φυσικά, όπως οι πρωτεΐνες, το άμυλο, η κυτταρίνη και το φυσικό λάστιχο (καουτσούκ), ή συνθετικά πολυμερή. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη σύνθεση συμπολυμερών, δηλαδή πολυμερών που αποτελούνται από δύο ή περισσότερα είδη μονομερών. Ανάλογα με τις διευθετήσεις στο χώρο που λαμβάνουν τα μονομερή, τα συμπολυμερή διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες μεταξύ των οποίων τα γραμμικά συμπολυμερή κατά συστάδες ή συσταδικά συμπολυμερή (block copolymer) που αποτελούνται από διαφορετικές μακρομοριακές συστάδες ομοιοπολικά συνδεδεμένες μεταξύ τους.

Για βιοϊατρικές εφαρμογές, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η κατασκευή μικροσχηματοποιημένων επιφανειών, οι οποίες αξιοποιούνται στην ανάπτυξη συσκευών για διαγνωστικό ή θεραπευτικό σκοπό όπως είναι οι βιοαισθητήρες, τα στεντ, τα εμφυτεύματα και τα τεχνητά μוסχεύματα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πληθώρα μεθόδων σχηματοποίησης επιφανειών, οι κυριότερες από τις οποίες είναι η λιθογραφία με χρήση εύπλαστων υλικών, με χαρακτηριστικότερη τεχνική την εκτύπωση με μικροεπαφή, η λιθογραφία νανοαποτύπωσης, η λιθογραφία με χρήση κολλοειδών σωματιδίων, η λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων/ιόντων/πρωτονίων και η φωτολιθογραφία. Βασικό πλεονέκτημα της φωτολιθογραφίας σε σχέση με τις άλλες τεχνικές αποτελεί η δημιουργία δομών καθορισμένης γεωμετρίας με κρίσιμο μέγεθος έως και 30 nm μέσω έκθεσης σε βαθύ υπεριώδες (DUV, 248,193,157 nm) εύκολα, γρήγορα και με σχετικά χαμηλό κόστος. Οι επιφάνειες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την καλλιέργεια κυττάρων προκειμένου να δημιουργηθεί ένα *in vitro* μικροπεριβάλλον, το οποίο θα προσομοιάζει τις *in vivo* συνθήκες του οργανισμού. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να ρυθμιστούν *in vivo* κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με

την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση, καθώς και την έκφραση πρωτεϊνών των κυττάρων.

Προς αυτή τη κατεύθυνση τα τελευταία χρόνια καταβάλλεται προσπάθεια για την σύνθεση κατάλληλων πολυμερών για χρήση στην κατασκευή μικροσχηματοποιημένων επιφανειών. Έχουν μελετηθεί τόσο υλικά που προάγουν την πρόσφυση των κυττάρων, όσο και υλικά που απωθούν τα κύτταρα, στα οποία ανήκουν η πολυβινυλική αλκοόλη και η πολυαιθυλενογλυκόλη.

Στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων και Ανοσοαισθητήρων του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α σε συνεργασία με την ομάδα των Υλικών για Νανολιθογραφία και Οργανικά Ηλεκτρονικά του Ι.Ν.Ν. και το εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ι.Β.Ε. του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» πραγματοποιήθηκαν πρόσφατα μελέτες καλλιέργειας φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων σε σχηματοποιημένες με φωτολιθογραφία επιφάνειες πυριτίου που έφεραν υμένιο πολυβινυλικής αλκοόλης. Αποδείχτηκε ότι φυσιολογικοί ινοβλάστες δέρματος και καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG προσκολλήθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν ανεμπόδιστα στις περιοχές πυριτίου των σχηματοποιημένων επιφανειών αλλά όχι στις περιοχές της πολυβινυλικής αλκοόλης. Επιπλέον, επετεύχθη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος PC12 σε νευρικά κύτταρα σε σχηματοποιημένες με πολυβινυλική αλκοόλη επιφάνειες πυριτίου παρουσία κατάλληλων αυξητικών παραγόντων διαφοροποίησης. Βάσει των ανωτέρω ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων αλλά και του γενικότερου ενδιαφέροντος για τη μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων σε σχηματοποιημένες επιφάνειες, τόσο για *in vivo*, όσο και για *in vitro* εφαρμογές, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός ενός νέου συμπολυμερούς το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός φωτοευαίσθητου και κυτταροαπωθητικού υλικού. Η επιλογή του υλικού που συντέθηκε και μελετήθηκε στηρίχθηκε σε βιβλιογραφικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα κύτταρα δεν προσκολλώνται σε επιφάνειες τροποποιημένες με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η σύνθεση ενός συμπολυμερούς στο οποίο το ένα από τα δύο συστατικά ήταν η PEG και το

δεύτερο ένα πολυμερές μεθακρυλικού 2-τετραϋδροπυρατυλεστέρα (ΡΤΗΡΜΑ), στο οποίο ο εστέρας μπορεί να υποστεί υδρόλυση υπό όξινες συνθήκες με συνακόλουθη αλλαγή της διαλυτότητας του πολυμερούς. Το συμπολυμερές αναφέρεται για λόγους συντομίας PEG-b-ΡΤΗΡΜΑ και αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχει μελετηθεί έως τώρα ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια κυττάρων.

Αρχικά, συντέθηκαν τέσσερα συμπολυμερή PEG-b-ΡΤΗΡΜΑ με διαφορετικά μοριακά βάρη και συστάσεις αλλάζοντας την αναλογία των μονομερών. Αναλυτικά, συντέθηκαν τα εξής πολυμερικά υλικά: PEG₅₀₀₀-b-ΡΤΗΡΜΑ με σύσταση 53% (β/β) PEG και 47% (β/β) ΡΤΗΡΜΑ, PEG₅₀₀₀-b-ΡΤΗΡΜΑ με σύσταση 43% (β/β) PEG και 57% (β/β) ΡΤΗΡΜΑ, PEG₁₀₀₀₀-b-ΡΤΗΡΜΑ με σύσταση 34% (β/β) PEG και 66% (β/β) ΡΤΗΡΜΑ και PEG₂₀₀₀₀-b-ΡΤΗΡΜΑ με σύσταση 28% (β/β) PEG και 72% (β/β) ΡΤΗΡΜΑ. Η σύνθεση των πολυμερών πραγματοποιήθηκε με ελεγχόμενο ριζικό πολυμερισμό μεταφοράς ατόμου που αποτελεί μια εύκολη και γρήγορη μέθοδο πολυμερισμού. Έπειτα, τα συμπολυμερή που συντέθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία IR, NMR, UV-Vis και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν από τις χαρακτηριστικές κορυφές των δονήσεων τάσης και κάμψης των διαφόρων δεσμών στα φάσματα IR^{147,148}, ενώ από τις χαρακτηριστικές κορυφές και την αντιστοιχία τους με τα διάφορα είδη πρωτονίων του μορίου συμπολυμερούς στα φάσματα ¹H-NMR, εκτός από την ταυτοποίηση των ενώσεων, πραγματοποιήθηκε και υπολογισμός της σύστασης των διαφορετικών συμπολυμερών από τις αναλογίες των κορυφών. Συγχρόνως, από τα χρωματογραφήματα αποκλεισμού μεγέθους προσδιορίστηκαν τα μέσα μοριακά βάρη των πολυμερών και η κατανομή αυτών, η οποία κυμαινόταν από 1,15 έως 1,2, γεγονός που καταδεικνύει ότι το πολυμερές έχει μικρή μοριακή διασπορά. Τέλος, με τη φασματοσκοπία UV-Vis διαπιστώθηκαν οι δομικές μεταβολές του υμενίου σε κάθε στάδιο της φωτολιθογραφικής διαδικασίας και ιδιαίτερα κατά το στάδιο της εμφάνισης.

Το επόμενο βήμα ήταν να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης για τη δημιουργία διαλυμάτων τα οποία θα επιστρώνονταν σε δισκία πυριτίου. Αφού επιλέχθηκε ο γαλακτικός αιθυλεστέρας ως ο καταλληλότερος διαλύτης, προστέθηκε ο

φωτοευαισθητοποιητής εξαφθοροαντιμονικό άλας τριφαινυλοσουλφωνίου (TPS-antimonate) ώστε να δημιουργηθεί το φωτολιθογραφικό υλικό. Κατά την ακτινοβόληση της επιφάνειας με ακτινοβολία DUV λαμβάνει χώρα φωτοχημική μεταβολή του φωτοευαισθητοποιητή με απελευθέρωση ισχυρού οξέος, το οποίο στην συνέχεια προκαλεί όξινη υδρόλυση του εστέρα του PTHMA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι εκτεθειμένες περιοχές της επιφάνειας να μετατρέπονται από αδιάλυτες σε διαλυτές και να απομακρύνονται κατά την εμφάνιση σε κατάλληλους διαλύτες (θετικού τόνου λιθογραφία). Όλα τα διαλύματα που ελέγχθηκαν για τη δημιουργία των φωτοευαισθητών υμενίων περιείχαν 3% (β/β) από το εκάστοτε συμπολυμερές και 5% (β/β) ως προς το πολυμερές TPS-antimonate.

Αρχικά, μέσω παρατήρησης στο οπτικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε ότι για το υλικό PEG₅₀₀₀-b-PTHMA με σύσταση 53% PEG και 47% PTHMA το υμένιο που σχηματιζόταν αλλοιωνόταν με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που το καθιστούσε ακατάλληλο για την μετέπειτα επεξεργασία του, ενώ τα υπόλοιπα υλικά παρέμεναν αναλλοίωτα στο χρόνο. Αντίθετα, τα τρία υπόλοιπα υλικά σχημάτιζαν ομοιόμορφα και σταθερά κατά τη παραμονή τους υμένια, και ως εκ τούτου για αυτά προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες έκθεσης και ο βέλτιστος εμφανιστής για τη δημιουργία δομών υψηλής πιστότητας. Παρατηρήθηκε ότι όταν τα φωτοπολυμερικά υλικά επιστρώνονταν σε δισκία πυριτίου p-type, τα υμένια αποκολλώνταν από το δισκίο κατά το στάδιο της εμφάνισης, ενώ όταν τα δισκία πυριτίου ήταν n-type δεν παρατηρείτο τέτοιο φαινόμενο. Τα p-type δισκία πυριτίου περιέχουν στον κρύσταλλό τους προσμίξεις τρισθενών στοιχείων (βόριο, αλουμίνιο ή γάλλιο), ενώ τα n-type δισκία προσμίξεις πεντασθενών στοιχείων (φώσφορο ή αρσενικό). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει ένα επιπλέον εξωτερικό ηλεκτρόνιο στα n-type δισκία πυριτίου, γεγονός που μπορεί να ευνοεί την πρόσφυση του πολυμερικού υμενίου. Για το λόγο αυτό, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δισκία πυριτίου n-type. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η πρόσφυση και η σταθερότητα των υμενίων του συμπολυμερούς ενισχυόταν σημαντικά όταν η επιφάνεια των δισκίων είχε τροποποιηθεί πριν την επίστρωση με εξαμεθυλοδισιλοζάνιο.

Μετά την επιλογή του υποστρώματος και των πλέον υποσχόμενων φωτολιθογραφικών υλικών προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την φωτολιθογραφική διαδικασία η οποία περιλάμβανε: έκθεση των υμενίων για 30 s (όπως υπολογίσθηκε από το διάγραμμα καμπύλης αντίθεσης), θέρμανση στους 110° C για 2 min (PEB), εμφάνιση σε υδατικό διάλυμα NaOH 0,1 M, εμφάππιση σε H₂O και τέλος ξήρανση των επιφανειών με άζωτο. Μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis δείχθηκε η πλήρης απομάκρυνση του φωτοευαισθητοποιητή από τις περιοχές του συμπολυμερούς που έχουν εκτεθεί μετά το στάδιο την εμφάνισης.

Απώτερος σκοπός της ανάπτυξης φωτολιθογραφικής διαδικασίας κατασκευής σχηματοποιημένων επιφανειών ήταν η χρησιμοποίησή τους ως υποστρώματα για την καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων. Τα λεία μυϊκά κύτταρα στον οργανισμό υιοθετούν συστατικό φαινότυπο που τους επιτρέπει να συστέλλονται όταν η μορφολογία τους είναι επιμηκυμένη. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκαν μικροσχηματοποιημένες επιφάνειες με γραμμικές δομές διαφορετικού εύρους προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα δημιουργίας περιβάλλοντος που να προσομοιάζει τις *in vivo* συνθήκες και συνεπώς να προάγει τον συστατικό φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων. Προκειμένου οι σχηματοποιημένες επιφάνειες να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για κυτταρικές καλλιέργειες, ήταν απαραίτητη η αποστείρωσή τους. Η αποστείρωση των επιφανειών πραγματοποιήθηκε μέσω έκθεσης σε UV σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για 20 min και επιβεβαιώθηκε η σταθερότητα του υμενίου μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis. Επιπλέον, με χρήση της ίδιας τεχνικής αποδείχτηκε ότι το θρεπτικό υλικό των κυττάρων δεν αλλοιώνει τις επιφάνειες.

Αφού δείχτηκε ότι οι σχηματοποιημένες επιφάνειες αποτελούν σταθερό υπόστρωμα επιφανειών για κυτταρική καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε αυτές σπορά λείων μυϊκών κυττάρων γνωστής πυκνότητας και επώασή τους για 1 ημέρα για να μελετηθεί η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις γραμμές πυριτίου σε σχέση με τις γειτονικές γραμμές των τριών συμπολυμερών. Αποδείχτηκε ότι την ιδιότητα να απωθεί την προσκόλληση κυττάρων είχε μόνο το υλικό με το συμπολυμερές που απαρτιζόταν κατά 43%

από PEG και 57% από PTHPMA. Τα άλλα δύο συμπολυμερή, των οποίων η περιεκτικότητα σε PTHPMA είναι πολύ μεγαλύτερη, τα κύτταρα προσκολλώνταν τόσο στις περιοχές του πυριτίου όσο και στις περιοχές του υλικού. Επομένως, για τη συνέχεια της μελέτης επιλέχθηκε το συμπολυμερές PEG₅₀₀₀-b-PTHPMA με σύσταση 43% (β/β) PEG και 57% (β/β) PTHPMA.

Με το επιλεγμένο φωτολιθογραφικό υλικό κατασκευάστηκαν γραμμικές δομές εύρους 17,5 έως 50 μm με στόχο να προσδιοριστεί η δομή για την οποία επιτυγχάνεται η βέλτιστη προσκόλληση και ευθυγράμμιση των κυττάρων. Η ευθυγράμμιση των κυττάρων προσδιορίστηκε μέσω υπολογισμού της πιστότητας ακινητοποίησης των κυττάρων σε σχέση με την σχηματοποίηση της επιφάνειας και βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη πιστότητα (>0,97) επιτεύχθηκε για δομές εύρους 25 και 27,5 μm. Έπειτα, στις δομές αυτές πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη για τον προσδιορισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά και τη διατήρηση της ευθυγράμμισης και της επιμηκυμένης μορφολογίας αυτών για μεγαλύτερους χρόνους καλλιέργειας. Αποδείχτηκε ότι η πιστότητα διατηρούνταν και μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας ενώ τα κύτταρα ήταν κατά περίπου 2 φορές πιο επιμηκυμένα σε σχέση με την ελεύθερη επιφάνεια πυριτίου για τους χρόνους καλλιέργειας 1 και 3 ημερών. Παράλληλα, παρατηρήθηκε συρρίκνωση της επιφάνειας του πυρήνα κατά 15 και 40% μετά από 1 και 3 ημέρες καλλιέργειας, αντίστοιχα, στις σχηματοποιημένες επιφάνειες σε σχέση με τις μη σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου. Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι στις μη σχηματοποιημένες επιφάνειες μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας αυξήθηκε ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων κατά ~2,5 φορές ενώ στις σχηματοποιημένες επιφάνειες κατά ~1,2 φορές σε σχέση με τη 1 ημέρα καλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της επιμήκυνσης των λείων μυϊκών κυττάρων σε συνδυασμό με τη μείωση της επιφάνειας του πυρήνα και του ρυθμού πολλαπλασιασμού είναι ενδεικτικά της υιοθέτησης από τα κύτταρα του συσταλτικού φαινοτύπου σύμφωνα και με άλλες έρευνες, τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται στον πίνακα 6.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τη χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου σχηματοποίησης και του PEG-b-PTHPMA αναφορικά με την κατευθυνόμενη ανάπτυξη και υιοθέτηση συστατικού φαινοτύπου από τα λεία μυϊκά κύτταρα είναι εφάμιλλα με τα αντίστοιχα μεθόδων της βιβλιογραφίας. Επομένως, το φωτολιθογραφικό υλικό με κυτταροαπωθητικές ιδιότητες που συντέθηκε και αξιολογήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, θα μπορούσε να βρει ευρεία εφαρμογή στον τομέα της βιοϊατρικής και της μηχανικής ιστών, και ειδικότερα στη δημιουργία στεντ νέας τεχνολογίας.

Πίνακας 6: Σύνοψη των ερευνών για την επίδραση σχηματοποιημένων επιφανειών στη μορφολογία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων.

Τύπος κυττάρου	Τεχνική σχηματοποίησης	Δομές	Αποτελέσματα	
SMCs αρτηρίας βοός	Αποτύπωση με μικρορευστο-μηχανικό κανάλι (Microfluidic patterning)	Γραμμές κολλαγόνου ή PLGA πλάτους 20 μm	Επιμηκυμένο σχήμα, μειωμένη εξάπλωση και πολλαπλασιασμός	111
		Γραμμές κολλαγόνου ή PLGA πλάτους 30 μm	Επιμηκυμένο σχήμα και μειωμένος πολλαπλασιασμός	
SMCs καρωτίδας αρτηρίας κουνελιού	Εκτύπωση με μικροεπαφή	Γραμμές poly(MMA/HPOEM/POEM)/ PS ή γυαλί πλάτους 10, 20 και 30 μm	Αυξημένη επιμήκυνση και ευθυγράμμιση όσο μειώνεται το πλάτος των γραμμών	138
Υπερπλαστικά αγγειακά SMCs	Νανοσφράγιση με UV (UV embossing)	Μικροκανάλια PCLLGA με πλάτος 300 μm	Μείωση σύνθεσης εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και αύξηση συσταλτικού φαινοτύπου	149
SMCs αρτηρίας αρουραίου	Φωτολιθογραφία σε συνδυασμό με πολυμερισμό πλάσματος (Plasma Lithography)	5x5 έως 60x60 μm ² τετράγωνα και 10x100 μm ² ορθογώνια Φθοράνθρακα/ τετραμεθοξυαιθάνιο	Το σχήμα και το μέγεθος των πυρήνων των κυττάρων επηρεάζονται από το συνολικό σχήμα	101
SMCs ανθρώπινης αρτηρίας	Εκτύπωση με μικροεπαφή	Γραμμές ινωδονεκτίνης πλάτους 10 μm	Επιμηκυμένο σχήμα, μειωμένος όγκος πυρήνα, μειωμένη εξάπλωση και πολλαπλασιασμός των κυττάρων	145
SMCs αρτηρίας αρουραίου	Νανοσφράγιση με UV (UV embossing)	Μικροκανάλια PCLLGA πλάτους 80, 120 και 160 μm	Αυξημένος πολλαπλασιασμός για χαμηλή πυκνότητά κυττάρων/ αύξηση της πυκνότητας συνεπάγεται μονοκατευθυντικό κυτταρικό προσανατολισμό, αύξηση συσταλτικού φαινοτύπου και αύξηση ευθυγράμμισης	150
SMCs αρτηρίας αρουραίου	Νανοσφράγιση με UV (UV embossing)	Μικροκανάλια PLGACL πλάτους 25 μm	Επιμηκυμένο σχήμα, μειωμένος πολλαπλασιασμός	82
		40 μm	Σφαιρικό σχήμα, μειωμένη εξάπλωση	
		80 μm	Ατρακτοειδές σχήμα	
SMCs ανθρώπινης αρτηρίας	Φωτολιθογραφία DUV	Γραμμές PEG-b-PHPMA/Si με πλάτος 25 και 27,5 μm	Επιμηκυμένο σχήμα, μειωμένη επιφάνεια πυρήνα, μειωμένη εξάπλωση και πολλαπλασιασμός, αυξημένη ευθυγράμμιση	

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 7: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Alternating copolymer	Εναλλασσόμενο συμπολυμερές
Atom Transfer Radical Polymerization	Ριζικός πολυμερισμός μεταφοράς ατόμου
Block copolymers	Κατά συστάδες συμπολυμερή
Colloidal lithography	Λιθογραφία με χρήση κολλοειδών σωματιδίων
Contact printing	Λιθογραφία επαφής
Cyclic block copolymer	Κυκλικό συμπολυμερές
Deep ultraviolet	Βαθύ υπεριώδες
Diblock copolymer	Δισυσταδικό συμπολυμερές
Drug delivery	Χορήγηση φαρμάκων
Electron beam lithography /ion beam lithography/proton beam writing	Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων/ιόντων/πρωτονίων
Excimer laser	Μονοχρωματική ακτινοβολία
Extreme ultraviolet	Ακραίο υπεριώδες
Gel Permeation Chromatography	Χρωματογραφία πηκτώματος
Graft copolymer	Εμβολιασμένο συμπολυμερές
Hard bake	Θέρμανση μετά την εμφάνιση
Heteroarm block copolymer	Ετεροκλαδικό αστεροειδές συμπολυμερές
Hot embossing	Νανοσφράγιση εν θερμώ
Micro contact printing	Εκτύπωση με μικροεπαφή

Microfluidic patterning	Αποτύπωση με μικρορευστομηχανικό κανάλι
Optical photolithography	Φωτολιθογραφία
Photo-acid generator	Φωτοπαραγωγός οξέος
Post exposure bake	Θέρμανση μετά την έκθεση
Priming	Τροποποίηση επιφάνειας
Projection printing	Λιθογραφία προβολής
Proximity printing	Λιθογραφία γεινίασης
Random copolymer	Τυχαίο συμπολυμερές
Reversible Addition Fragmentation Transfer Polymerization	Πολυμερισμό αντιστρεπτής μεταφοράς αλυσίδας μέσω προσθήκης-απόσπασης
Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Soft bake ή post applied bake	Θέρμανση πριν την έκθεση
Soft lithography	Λιθογραφία με χρήση ελαστομερών σφραγίδων ή μαλακή λιθογραφία
Star block copolymer	Αστεροειδές συμπολυμερές
Tenogenic markers	Δείκτες σχετιζόμενοι με κύτταρα του τένοντα
Thermal nanoimprint lithography	Λιθογραφία νανοαποτύπωσης με θέρμανση
TPS-antimonate	Εξαφθοροαντιμονικού άλατος τριφαινυλοσουλφωνίου
Ultraviolet	Υπεριώδες
UV nanoimprint lithography	Λιθογραφία νανοαποτύπωσης με υπεριώδες
Vapor deposition	Εναπόθεση ατμών

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 8: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ATRP	Ριζικός πολυμερισμός μεταφοράς ατόμου
BSA	Οραλβουμίνη βοός
CDCl_3	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CuCl	Χλωριούχος χαλκός
DAPI	4,6-Διαμιδινο-2-φαινυλο-ινδόλη
DEE	Διαιθυλαιθέρας
DMF	Διμεθυλομεθαναμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
DUV	Βαθύ υπεριώδες
EL	Γαλακτικός αιθυλεστέρας
EUV	Ακραίο υπεριώδες
FBS	Εμβρυικός ορός βοός
GPC	Χρωματογραφία πηκτώματος
HF	Υδροφθόριο
HMDS	Εξαμεθυλοδισιλοζάνιο
IR	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
P(LLA-CL)	Πολυ-L-λακτίδιο-co-καπρολακτόνη
PAA	Πολυακρυλικό οξύ
PAB	Θέρμανση πριν την έκθεση
PAG	Φωτοπαραγωγός οξέος
PBS	Phosphate buffer solution
PCL	Πολυκαπρολακτόνη

PDA	Πολυντοπαμίνη
PDGF	Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια
PDLLA	Πολυ-DL-λακτίδιο
PDMAA	Πολυ(διμεθυλακρυλαμίδιο)
PDMS	Πολύ(διμεθυλοσιλοξάνιο)
PEB	Θέρμανση μετά την έκθεση
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
PEG-b-PMMA	Πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) πολυαιθυλενογλυκόλης
PEG-DA	Διακρυλικός εστέρας πολυαιθυλενογλυκόλης
PEG-DMA	Διμεθακρυλικός εστέρας πολυαιθυλενογλυκόλης
PEG-PLA	Πολυλακτίδιο πολυαιθυλενογλυκόλης
PEI	Πολυαιθυλενιμίνη
PEO	Πολυαιθυλενοξείδιο
PET	Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο
PFA	Παραφορμαλδεΐδη
PHBV	Πολυ(3-ύδροξυ βουτυρικός-co-3-ύδροξυ βαλερικός) εστέρας
PHEMA	Πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας)
PLA	Πολυγαλακτικό οξύ ή πολυλακτίδιο
PLGA	Πολυ(γαλακτικο-γλυκολικό) οξύ
PLGACL	Πολυ(γαλακτικο-γλυκολικό) οξύ-co-πολυκαπρολακτόνη
PLL	Πολύ-L-λυσίνη
PLLA	Πολυ-L-λακτίδιο
PLL-g-PEG	Πολύ-L-λυσίνη πολυαιθυλενογλυκόλης
PMMA	Πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)

PS	Πολυστυρένιο
PTFE	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο
PU	Πολύ(ουρεθάνη)
PVA	Πολυβινυλική αλκοόλη
PEG bib	2-βρωμοϊσοβουτυρικός εστέρας της μεθόξυ πολυαιθυλενογλυκόλης
PMDETA	N,N,N',N',N''-πενταμέθυλοδιεθυλοτριαμίνη
RGD	Αλληλουχία αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος
SAMs	Αυτοοργανούμενα μονοστρωματικά υμένα
SEC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Si	Πυρίτιο
SiO ₂	Οξείδιο πυριτίου
SiOH	Σιλανόλη
tBOC-στυρένιο	Πολυ(4-t-βουτοξυκαρβονυλοξυστυρένιο)
THF	Τετραϋδροφουράνιο
THPMA	Μεθακρυλικός-2-τετραϋδροπυρανυλεστέρας
TPS-SbF ₆ ή [(TPS) ⁺ (SbF ₆) ⁻]	Εξαφθοροαντιμονικού άλατος τριφαινυλοσουλφονίου
UV	Υπεριώδες
UV-Vis	Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους
VSMCs	Αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 P. C. Lodge and T. P. Hiemenz, *Χημεία πολυμερών*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2014.
- 2 Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Ν. Χατζηχρηστίδης, Γ. Πνευματικάκης, Π. Μηνακάκη and Κ. Μερτής, *Σύνθεση πολυμερών με καθορισμένη αρχιτεκτονική*, σημειώσεις μαθήματος στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της», 1998.
- 3 Α. Δ. Ντόντος, *Συνθετικά μακρομόρια-βασική θεώρηση*, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2013.
- 4 W. A. Braunecker and K. Matyjaszewski, *Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives*, *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 32, no. 1. Elsevier BV, pp. 93–146, Jan. 01, 2007.
- 5 K. Matyjaszewski and J. Xia, *Atom transfer radical polymerization*, *Chemical Reviews*, vol. 101, no. 9, 2001, pp. 2921–2990.
- 6 V. Abetz and P. F. W. Simon, *Phase behaviour and morphologies of block copolymers*, *Advances in Polymer Science*, vol. 189, no. 1. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 125–212, 2005.
- 7 K. Matyjaszewski and J. Spanswick, *Controlled/living radical polymerization*, *Materials Today*, vol. 8, no. 3, 2005, pp. 26–33.
- 8 C. Park, J. Yoon, and E. L. Thomas, *Enabling nanotechnology with self assembled block copolymer patterns*, *Polymer*, vol. 44, no. 22, 2003, pp. 6725–6760.
- 9 Ν. Χατζηχρηστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης and Π. Πίσσης, *Μέθοδοι χαρακτηρισμού πολυμερών*, σημειώσεις μαθήματος στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της», 1998.
- 10 D. A. Skoog, J. F. Holler and S. R. Crouch, *Αρχές ενόργανης ανάλυσης*,

- Τμήμα 3: Μοριακή φασματοσκοπία*, 6η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007.
- 11 M. Χατζηχρησιτίδη and M. Πιτσικάλης, *Ειδικά θέματα επιστήμης πολυμερών*, σημειώσεις μαθήματος, 2010.
 - 12 R. Daniels, *Strategies for Skin Penetration Enhancement*, Skin Care Forum Online Issue 37, 2004.
 - 13 M. Théry, *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*, Journal of Cell Science, vol. 123, no. 24, 2010, pp. 4201–4213.
 - 14 H. J. Lee, S. W. Han, U. S. Chung, and W. G. Koh, *Application of cellular micropatterns to miniaturized cell-based biosensor*, Biomedical Engineering Letters, vol. 3, no. 3, 2013, pp. 117–130.
 - 15 J. M. Caves and E. L. Chaikof, *The evolving impact of microfabrication and nanotechnology on stent design*, Journal of Vascular Surgery, vol. 44, no. 6, 2006, pp. 1363–1368.
 - 16 J. Rychly and B. Nebe, *Interface biology of implants*, Cell Adhesion and Migration, vol. 3, no. 4, 2009.
 - 17 *Fundamentals and Applications of Nano Silicon in Plasmonics and Fullerenes: Current and Future Trends*, Micro and Nano Technologies, 2018, pp. 89–137.
 - 18 Y. Xia, J. A. Rogers, K. E. Paul, and G. M. Whitesides, *Unconventional Methods for Fabricating and Patterning Nanostructures*, Chemical Reviews, vol. 99, no. 7, 1999, pp. 1823–1848.
 - 19 A. Flores and M. R., *Soft Lithographic Fabrication of Micro Optic and Guided Wave Devices*, Lithography, no. February, 2010.
 - 20 L. R. P. Kassab and C. B. De Araujo, *Metal nanostructures for photonics*. Elsevier, 2018.
 - 21 K. T. M. Tran and T. D. Nguyen, *Lithography-based methods to manufacture biomaterials at small scales*, Journal of Science: Advanced

- Materials and Devices, vol. 2, no. 1, 2017, pp. 1–14.
- 22 H. Lan and H. Liu, *UV-nanoimprint lithography: Structure, materials and fabrication of flexible molds*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol. 13, no. 5, 2013, pp. 3145–3172.
- 23 A. Cattoni, J. Chen, D. Decanini, J. Shi, and A.-M. Haghiri-Gosnet, *Soft UV Nanoimprint Lithography: A Versatile Tool for Nanostructuring at the 20nm Scale*, Recent Advances in Nanofabrication Techniques and Applications, 2011.
- 24 H. W. Deckman and J. H. Dunsmuir, *Applications of Surface Textures Produced With Natural Lithography.*, Journal of Vacuum Science and Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, vol. 1, no. 4, 1983, pp. 1109–1112.
- 25 G. Zhang and D. Wang, *Colloidal lithography - The art of nanochemical patterning*, Chemistry - An Asian Journal, vol. 4, no. 2, 2009, pp. 236–245.
- 26 B. Ai, H. Möhwald, D. Wang, and G. Zhang, *Advanced Colloidal Lithography Beyond Surface Patterning*, Advanced Materials Interfaces, vol. 4, no. 1, 2017.
- 27 P. Cools, N. De Geyter, and R. Morent, *Non-thermal plasma assisted lithography for biomedical applications: An overview*, in *International Journal of Nanotechnology*, 2016, vol. 13, no. 10–12, pp. 695–715.
- 28 M. Altissimo, *E-beam lithography for micro-/nanofabrication*, Biomicrofluidics, vol. 4, no. 2, 2010, pp. 2–7.
- 29 R. M. Langford, *Focused ion beam nanofabrication: A comparison with conventional processing techniques*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol. 6, no. 3, 2006, pp. 661–668.
- 30 K. Yamazaki and H. Namatsu, *5-nm-Order electron-beam lithography for nanodevice fabrication*, in *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers*, Jun. 2004, vol. 43, no. 6 B, pp. 3767–3771.

- 31 F. Watt, M. B. H. Breese, A. A. Bettioli, and J. A. van Kan, *Proton beam writing*, *Materials Today*, vol. 10, no. 6, 2007, pp. 20–29.
- 32 C. Acikgoz, M. A. Hempenius, J. Huskens, and G. J. Vancso, *Polymers in conventional and alternative lithography for the fabrication of nanostructures*, *European Polymer Journal*, vol. 47, no. 11, 2011, pp. 2033–2052.
- 33 M. J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology, Third Edition, Volume Two: Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology*. 2011.
- 34 A. Hand, *Infrastructure steps closer to EUV lithography*, *semiconductor international*, vol. 28, no. 10, 2005, pp. 38-42.
- 35 Q. Lin, *Properties of Photoresist Polymers*, 2007, pp. 965–979.
- 36 K. Fujiwara, *Novel EUV resist development for sub-14 nm half pitch*, *China Semiconductor Technology International Conference 2017, CSTIC 2017*, 2017, pp. 14–15.
- 37 X. C. Ong, G. K. Fedder, and P. J. Gilgunn, *Modulation of Parylene-C to silicon adhesion using HMDS priming*, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 24, no. 10, 2014.
- 38 M. Bautista, A. Fernandez, and F. Pinaud, *A micropatterning strategy to study nuclear mechanotransduction in cells*, *Micromachines*, vol. 10, no. 12, 2019, pp. 8–12.
- 39 K. Norrman, A. Ghanbari-Siahkali, and N. B. Larsen, *Studies of spin-coated polymer films*, *Annual Reports on the Progress of Chemistry - Section C*, vol. 101, 2005, pp. 174–201.
- 40 C. A. Mack, *Modeling Solvent Effects in Optical Lithography*, *Dissertation.*, no. Desember, 1998, p. 12.
- 41 W. D. Hinsberg, F. A. Houle, M. I. Sanchez, and G. M. Wallraff, *Chemical and physical aspects of the post-exposure baking process used for positive-tone chemically amplified resists*, *IBM Journal of Research and Development*, vol. 45, no. 5, 2001, pp. 667–681.

- 42 B. Sharma Rao, M. N. Asri, U. Hashim, and T. Adam, *Conventional photolithography and process optimization of pattern- size expansion technique for nanogap biosensor fabrication*, *Advanced Materials Research*, vol. 832, 2014, pp. 89–94.
- 43 S. Manakasettharn, J. A. Taylor and T. Krupenkin, *Superhydrophobicity at Micron and Submicron Scale*, *Comprehensive Nanoscience and Technology*, 2011, pp. 383–411.
- 44 J. D. Plummer, M. D. Deal, and P. B. Griffin, *Silicon VLSI Technology*, *Prentice Hall*, 2000.
- 45 M. K. Yapici and I. Farhat, *UV-LED exposure system for low-cost photolithography*, *Optical Microlithography XXVII*, vol. 9052, no. November, 2014, p. 90521T.
- 46 L. R. Harriott, *Limits of lithography*, *Proceedings of the IEEE*, vol. 89, no. 3, 2001, pp. 366–374.
- 47 G. M. Wallraff and W. D. Hinsberg, *Lithographic Imaging Techniques for the Formation of Nanoscopic Features*, *Chemical Reviews*, vol. 99, no. 7, 1999, pp. 1801–1821.
- 48 R. M. M. Hasan and X. Luo, *Promising Lithography Techniques for Next-Generation Logic Devices*, *Nanomanufacturing and Metrology*, vol. 1, no. 2, 2018, pp. 67–81.
- 49 H. Ito, *Dissolution behavior of chemically amplified resist polymers lithography The aqueous base development step is one*, *IBM Journal of Research and Development*, vol. 45, no. 5, 2001, pp. 683–695.
- 50 E. Reichmanis, F. Houlihan, O. Nalamasu, and T. X. Neenan, *Chemical Amplification Mechanisms for Microlithography*, *Chemistry of Materials*, vol. 3, no. 3, 1991, pp. 394–407.
- 51 J. L. Dektar and N. P. Hacker, *Photochemistry of Diaryliodonium Salts*, *Journal of Organic Chemistry*, vol. 55, no. 2, 1990, pp. 639–647.
- 52 J. L. Dektar and N. P. Hacker, *Photochemistry of Triarylsulfonium Salts*, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no. 16, 1990, pp.

- 6004–6015.
- 53 W. Chen, D. Qi, X. Gao, and A. T. S. Wee, *Surface transfer doping of semiconductors*, *Progress in Surface Science*, vol. 84, no. 9–10, 2009, pp. 279–321.
- 54 L. Rassaei, P. S. Singh, and S. G. Lemay, *Lithography-based nanoelectrochemistry*, *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 11, 2011, pp. 3974–3980.
- 55 M. Ermis, E. Antmen, and V. Hasirci, *Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective*, *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 3. KeAi Communications Co., pp. 355–369, Sep. 01, 2018.
- 56 Y. Li *et al.*, *Engineering cell alignment in vitro*, *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 2, 2014, pp. 347–365.
- 57 L. Wen-Wen, C. Zhen-Ling, and J. Xing-Yu, *Methods for cell micropatterning on two-dimensional surfaces and their applications in biology*, *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 37, no. 7, 2009, pp. 943–949.
- 58 A. del Campo and E. Arzt, *Fabrication approaches for generating complex micro- and nanopatterns on polymeric surfaces*, *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 3, 2008, pp. 911–945.
- 59 D. R. Thvenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, *Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report)*, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 71, no. 12, 1999, pp. 2333–2348.
- 60 D. Castel, A. Pitaval, M. A. Debily, and X. Gidrol, *Cell microarrays in drug discovery*, *Drug Discovery Today*, vol. 11, no. 13–14, 2006, pp. 616–622.
- 61 A. A. Khalili and M. R. Ahmad, *A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications*, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 8, 2015, pp. 18149–18184.

- 62 A. F. Horwitz, *Extracellular Matrix Cell Membrane*, no. May, 1997, [Online]. Available: [http://facstaff.uwa.edu/dsalter/biochemistry/sp02/biochem lit first one/454568.pdf](http://facstaff.uwa.edu/dsalter/biochemistry/sp02/biochem%20lit%20first%20one/454568.pdf).
- 63 V. Hasirci and B. J. Pepe-Mooney, *Understanding the cell behavior on nano-/micro-patterned surfaces*, *Nanomedicine*, vol. 7, no. 9, 2012, pp. 1375–1389.
- 64 B. Wehrle-Haller, *Structure and function of focal adhesions*, *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 24, no. 1, 2012, pp. 116–124.
- 65 M. H. Dang, *Toxicity Screening of Biodegradable Polymers. I. Selection and Evaluation of Cell Culture Test Methods*, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, vol. 4, no. 3, 1996, pp. 197–203.
- 66 A. Mace and C. R. Laromaine, *Organic Nanomaterials: Synthesis, Characterization, and Device Applications, Chapter 17: Self-assembled monolayers as model biosurfaces*, 2013, pp. 369–392.
- 67 K. Anselme, L. Ploux, and A. Ponche, *Cell/material interfaces: Influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion*, *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 24, no. 5, 2010, pp. 831–852.
- 68 J. L. Eisenberg, J. L. Piper, and M. Mrksich, *Using Self-assembled monolayers to model cell adhesion to the 9th and 10th type III domains of fibronectin*, *Langmuir*, vol. 25, no. 24, 2009, pp. 13942–13951.
- 69 P. Murugan, M. Krishnamurthy, S. N. Jaisankar, D. Samanta, and A. B. Mandal, *Controlled decoration of the surface with macromolecules: Polymerization on a self-assembled monolayer (SAM)*, *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 10, 2015, pp. 3212–3243.
- 70 M. Kiremitçi, A. I. Şerbetçi, R. Çolak, and E. Pişkin, *Cell attachment to PU and PHEMA based biomaterials: Relation to structural properties*, *Clinical Materials*, vol. 8, no. 1–2, 1991, pp. 9–16.
- 71 E. Lih, S. H. Oh, Y. K. Joung, J. H. Lee, and D. K. Han, *Polymers for cell/tissue anti-adhesion*, *Progress in Polymer Science*, vol. 44, 2015,

- pp. 28–61.
- 72 Y. Tamada and Y. Ikada, *Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces*, *Polymer*, vol. 34, no. 10, 1993, pp. 2208–2212.
- 73 S. M. Oliveira, W. Song, N. M. Alves, and J. F. Mano, *Chemical modification of bioinspired superhydrophobic polystyrene surfaces to control cell attachment/proliferation*, *Soft Matter*, vol. 7, no. 19, 2011, pp. 8932–8941.
- 74 L. Bačáková, V. Mareš, M. G. Bottone, C. Pellicciari, V. Lisá, and V. Švorčík, *Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture*, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 49, no. 3, 2000, pp. 369–379.
- 75 B. N. Lourenço *et al.*, *Wettability influences cell behavior on superhydrophobic surfaces with different topographies*, *Biointerphases*, vol. 7, no. 1–4, 2012, pp. 1–11.
- 76 J. N. Lee, X. Jiang, D. Ryan, and G. M. Whitesides, *Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane)*, *Langmuir*, vol. 20, no. 26, 2004, pp. 11684–11691.
- 77 M. Lu and J. Yu, *Mussel-Inspired Biomaterials for Cell and Tissue Engineering*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1077, 2018, pp. 451–474.
- 78 Y. H. Ding, M. Floren, and W. Tan, *Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization*, *Biosurface and Biotribology*, vol. 2, no. 4, 2016, pp. 121–136.
- 79 M. Katschnig *et al.*, *Cell Morphology on Poly(methyl methacrylate) Microstructures as Function of Surface Energy*, *International Journal of Biomaterials*, vol. 2019, 2019.
- 80 L. Lu, K. Nyalakonda, L. Kam, R. Bizios, A. Göpferich, and A. G. Mikos, *Retinal pigment epithelial cell adhesion on novel micropatterned surfaces fabricated from synthetic biodegradable polymers*, *Biomaterials*, vol. 22, no. 3, 2001, pp. 291–297.

- 81 N. R. Richbourg, N. A. Peppas, and V. I. Sikavitsas, *Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications*, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 13, no. 8, 2019, pp. 1275–1293.
- 82 A. Zhu, R. Chen, and M. B. Chan-Park, *Patterning of a random copolymer of poly[lactide-co-glycolide-co-(ϵ - caprolactone)] by UV embossing for tissue engineering*, *Macromolecular Bioscience*, vol. 6, no. 1, 2006, pp. 51–57.
- 83 T. Patrício, M. Domingos, A. Gloria, and P. Bártolo, *Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering*, *Procedia CIRP*, vol. 5, 2013, pp. 110–114.
- 84 A. R. Vancha, S. Govindaraju, K. V. L. Parsa, M. Jasti, M. González-García, and R. P. Ballesterro, *Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer*, *BMC Biotechnology*, vol. 4, 2004, pp. 1–12.
- 85 H. Wilda and J. E. Gough, *In vitro studies of annulus fibrosus disc cell attachment, differentiation and matrix production on PDLLA/45S5 Bioglass® composite films*, *Biomaterials*, vol. 27, no. 30, 2006, pp. 5220–5229.
- 86 X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation*, *Biomaterials*, vol. 25, no. 10, 2004, pp. 1883–1890.
- 87 H. Kenar, A. Kocabas, A. Aydinli, and V. Hasirci, *Chemical and topographical modification of PHBV surface to promote osteoblast alignment and confinement*, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 85, no. 4, 2008, pp. 1001–1010.
- 88 Y. Lei, M. Remy, C. Labrugere, and M. C. Durrieu, *Peptide immobilization on polyethylene terephthalate surfaces to study specific endothelial cell adhesion, spreading and migration*, *Journal of Materials*

- Science: Materials in Medicine, vol. 23, no. 11, 2012, pp. 2761–2772.
- 89 M. Gabriel, M. Dahm, and C. F. Vahl, *Wet-chemical approach for the cell-adhesive modification of polytetrafluoroethylene*, Biomedical Materials, vol. 6, no. 3, 2011.
- 90 F. Awaja, D. Stifter, and N. Laidani, *Anti-adhesion of thin polymer films as cells/biofilm repellent for biomedical devices*, Surfaces and Interfaces, vol. 4, 2016, pp. 18–26.
- 91 E. N. Chiang, R. Dong, C. K. Ober, and B. A. Baird, *Cellular responses to patterned poly(acrylic acid) brushes*, Langmuir, vol. 27, no. 11, 2011, pp. 7016–7023.
- 92 P. Aliuos *et al.*, *Inhibition of fibroblast adhesion by covalently immobilized protein repellent polymer coatings studied by single cell force spectroscopy*, Journal of Biomedical Materials Research - Part A, vol. 102, no. 1, 2014, pp. 117–127.
- 93 T. Kojima *et al.*, *PnBA/PDMAA-Based Iron-Loaded Micropillars Allow for Discrete Cell Adhesion and Analysis of Actuation-Related Molecular Responses*, Advanced Materials Interfaces, vol. 7, no. 7, 2020, p. 1901806.
- 94 A. Tserepi *et al.*, *Plasma Nanotextured Polymeric Surfaces for Controlling Cell Attachment and Proliferation: A Short Review*, Plasma Chemistry and Plasma Processing, vol. 36, no. 1, 2016, pp. 107–120.
- 95 M. C., V. A., and M. Diez, *Cell Adhesion and Spreading on an Intrinsically Anti-Adhesive PEG Biomaterial*, in *Biomaterials - Physics and Chemistry*, InTech, 2011.
- 96 K. Na, J. Jung, B. Shin, and J. Hyun, *Micropatterning of cell-repellent polymer on a glass substrate for the highly resolved virus microarray*, Langmuir, vol. 22, no. 26, 2006, pp. 10889–10892.
- 97 I. Poudel, J. S. Lee, L. Tan, and J. Y. Lim, *Micropatterning-retinoic acid co-control of neuronal cell morphology and neurite outgrowth*, Acta Biomaterialia, vol. 9, no. 1, 2013, pp. 4592–4598.

- 98 M. E. Moustafa, V. S. Gadepalli, A. A. Elmak, W. Lee, R. R. Rao, and V. K. Yadavalli, *Large area micropatterning of cells on polydimethylsiloxane surfaces*, *Journal of Biological Engineering*, vol. 8, no. 1, 2014, pp. 1–10.
- 99 K. Y. Suh, J. Seong, A. Khademhosseini, P. E. Laibinis, and R. Langer, *A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning*, *Biomaterials*, vol. 25, no. 3, 2004, pp. 557–563.
- 100 A. de Mel, G. Jell, M. M. Stevens, and A. M. Seifalian, *Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review*, *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 11, 2008, pp. 2969–2979.
- 101 A. Goessl, D. F. Bowen-Pope, and A. S. Hoffman, *Control of shape and size of vascular smooth muscle cells in vitro by plasma lithography*, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 57, no. 1, 2001, pp. 15–24.
- 102 A. Kikuchi and T. Okano, *Nanostructured designs of biomedical materials: Applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs*, *Journal of Controlled Release*, vol. 101, no. 1-3 SPEC. ISS., 2005, pp. 69–84.
- 103 C. Yan, J. Sun, and J. Ding, *Critical areas of cell adhesion on micropatterned surfaces*, *Biomaterials*, vol. 32, no. 16, 2011, pp. 3931–3938.
- 104 E. Martínez *et al.*, *Stem cell differentiation by functionalized micro- and nanostructured surfaces*, *Nanomedicine*, vol. 4, no. 1, 2009, pp. 65–82.
- 105 K. A. Kilian, B. Bugarija, B. T. Lahn, and M. Mrksich, *Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 11, 2010, pp. 4872–4877.
- 106 J. Huang *et al.*, *The relationship between substrate topography and*

- stem cell differentiation in the musculoskeletal system*, Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 76, no. 3, 2019, pp. 505–521.
- 107 L. Gao, R. McBeath, and C. S. Chen, *Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through rac1 and N-cadherin*, Stem Cells, vol. 28, no. 3, 2010, pp. 564–572.
- 108 T. Nakamoto, X. Wang, N. Kawazoe, and G. Chen, *Influence of micropattern width on differentiation of human mesenchymal stem cells to vascular smooth muscle cells*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 122, 2014, pp. 316–323.
- 109 S. K. Madhurakkat Perikamana *et al.*, *Harnessing biochemical and structural cues for tenogenic differentiation of adipose derived stem cells (ADSCs) and development of an in vitro tissue interface mimicking tendon-bone insertion graft*, Biomaterials, vol. 165, 2018, pp. 79–93.
- 110 S. A. Biela, Y. Su, J. P. Spatz, and R. Kemkemer, *Different sensitivity of human endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts to topography in the nano-micro range*, Acta Biomaterialia, vol. 5, no. 7, 2009, pp. 2460–2466.
- 111 R. G. Thakar, F. Ho, N. F. Huang, D. Liepmann, and S. Li, *Regulation of vascular smooth muscle cells by micropatterning*, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 307, no. 4, 2003, pp. 883–890.
- 112 P. Roca-Cusachs, J. Alcaraz, R. Sunyer, J. Samitier, R. Farré, and D. Navajas, *Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation*, Biophysical Journal, vol. 94, no. 12, 2008, pp. 4984–4995.
- 113 D. C. Miller, A. Thapa, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster, *Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features*, Biomaterials, vol. 25, no. 1, 2004, pp. 53–61.
- 114 ThoughtCo. Types of Cells in the Human Body.

- 115 Sciencephotolibrary
- 116 R. Peng, X. Yao, and J. Ding, *Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion*, *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, 2011, pp. 8048–8057.
- 117 C. Yvanoff, G. Garbenciute, V. Navikas, R. Valiokas, and R. Willaert, *Controlling the Formation of Osteoblast-Osteocyte Interactions By Micropatterning To Study Bone Cell Mechanobiology*, no. October, 2019, pp. 302–303.
- 118 G. Y. Kim, H. H. Jeong, C. S. Lee, and C. Roh, *Simple fabrication of adipocyte cell chip using micropatterning*, *Korean Chemical Engineering Research*, vol. 54, no. 2, 2016, pp. 223–228.
- 119 *Infographic: Red Blood Cell Shape*, *The scientist: exploring life, inspiring innovation*, Infographic: Red Blood Cell Shape.
- 120 D. Cuvelier, O. Rossier, P. Bassereau, and P. Nassoy, *Micropatterned “adherent/repellent” glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates*, *European Biophysics Journal*, vol. 32, no. 4, 2003, pp. 342–354.
- 121 J. M. Karp *et al.*, *A photolithographic method to create cellular micropatterns*, *Biomaterials*, vol. 27, no. 27, 2006, pp. 4755–4764.
- 122 D. Zhang, M. B. Sun, J. Lee, A. A. Abdeen, and K. A. Kilian, *Cell shape and the presentation of adhesion ligands guide smooth muscle myogenesis*, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 104, no. 5, 2016, pp. 1212–1220.
- 123 M. Zhou, X. Yuan, H. Yin, and J. E. Gough, *Restoration of chondrocytic phenotype on a two-dimensional micropatterned surface*, *Biointerphases*, vol. 10, no. 1, 2015, p. 011003.
- 124 C. M. Nelson, D. Khauv, M. J. Bissell, and D. C. Radisky, *Change in cell shape is required for matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition of mammary epithelial cells*, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 105, no. 1, 2008, pp. 25–33.

- 125 Science source, fibroblast.
- 126 A. Papadopoulou, A. Kanioura, P. S. Petrou, P. Argitis, S. E. Kakabakos, and D. Kletsas, *Reacquisition of a spindle cell shape does not lead to the restoration of a youthful state in senescent human skin fibroblasts*, *Biogerontology*, vol. 8, 2020.
- 127 A. Bourkoula *et al.*, *Guided cell adhesion, orientation, morphology and differentiation on silicon substrates photolithographically micropatterned with a cell-repellent cross-linked poly(vinyl alcohol) film*, *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 14, no. 1, 2019.
- 128 X. Jiang and G. M. Whitesides, *Engineering Microtools in Polymers to Study Cell Biology*, *Engineering in Life Sciences*, vol. 3, no. 12, 2003, pp. 475–480.
- 129 E. D’Arcangelo and A. P. McGuigan, *Micropatterning strategies to engineer controlled cell and tissue architecture in vitro*, *BioTechniques*, vol. 58, no. 1, 2015, pp. 13–23.
- 130 S. Yoshida, M. Kato-Negishi, and S. Takeuchi, *Assembly and connection of micropatterned single neurons for neuronal network formation*, *Micromachines*, vol. 9, no. 5, 2018, pp. 1–10.
- 131 J. Foncy *et al.*, *Fabrication of biomolecule microarrays for cell immobilization using automated microcontact printing*, in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1771, Humana Press Inc., 2018, pp. 83–95.
- 132 P. J. Albert and U. S. Schwarz, *Modeling cell shape and dynamics on micropatterns*, *Cell Adhesion and Migration*, vol. 10, no. 5, 2016, pp. 516–528.
- 133 A. L. Mescher, *Junqueira’s Basic Histology: Text and Atlas, 15 edition, Chapter 10: Muscle Tissue*, 2018.
- 134 *No Title*, *Smooth muscle and the cardiovascular and lymphatic systems*, *clinical gate*, 2015.
- 135 E. Cairrão, A. J. Santos-Silva, E. Alvarez, I. Correia, and I. Verde, *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells*

- expressing functional calcium channels*, In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, vol. 45, no. 3–4, 2009, pp. 175–184.
- 136 R. P. Metz, J. L. Patterson, and E. Wilson, *Vascular smooth muscle cells: Isolation, culture, and characterization*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 843, 2012, pp. 169–176.
- 137 S. S. M. Rensen, P. A. F. M. Doevendans, and G. J. J. M. Van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*, *Netherlands Heart Journal*, vol. 15, no. 3. Bohn Stafleu van Loghum, pp. 100–108, 2007.
- 138 C. Williams, X. Q. Brown, E. Bartolak-Suki, H. Ma, A. Chilkoti, and J. Y. Wong, *The use of micropatterning to control smooth muscle myosin heavy chain expression and limit the response to transforming growth factor β 1 in vascular smooth muscle cells*, *Biomaterials*, vol. 32, no. 2, 2011, pp. 410–418.
- 139 A. J. Lusis, *Atherosclerosis step by step*, vol. 407, no. September, 2000, pp. 233–241.
- 140 S. F. Karkan, S. Davaran, R. Rahbarghazi, R. Salehi, and A. Akbarzadeh, *Electrospun nanofibers for the fabrication of engineered vascular grafts*, *Journal of Biological Engineering*, vol. 13, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–13, Nov. 11, 2019.
- 141 I. Jun *et al.*, *Ultrathin Metal Films with Defined Topographical Structures as In Vitro Cell Culture Platforms for Unveiling Vascular Cell Behaviors*, *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, no. 18, 2016, pp. 2396–2405.
- 142 E. A. Sprague, F. Tio, S. H. Ahmed, J. F. Granada, and S. R. Bailey, *Impact of parallel micro-engineered stent grooves on endothelial cell migration, proliferation, and function: An in vivo correlation study of the healing response in the coronary swine model*, *Circulation: Cardiovascular Interventions*, vol. 5, no. 4, 2012, pp. 499–507.
- 143 A. Strohbach and R. Busch, *Polymers for Cardiovascular Stent Coatings*, *International Journal of Polymer Science*, 2015.

- 144 J. S. Choi, Y. Piao, and T. S. Seo, *Circumferential alignment of vascular smooth muscle cells in a circular microfluidic channel*, *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, 2014, pp. 63–70.
- 145 R. G. Thakar *et al.*, *Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation*, *Biophysical Journal*, vol. 96, no. 8, 2009, pp. 3423–3432.
- 146 M. Pelletier, J. Babin, L. Tremblay, and Y. Zhao, *Investigation of a new thermosensitive block copolymer micelle: Hydrolysis, disruption, and release*, *Langmuir*, vol. 24, no. 21, 2008, pp. 12664–12670.
- 147 N. S. Vrandečić, M. Erceg, M. Jakić, and I. Klarić, *Kinetic analysis of thermal degradation of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene oxide)s of different molecular weight*, *Thermochimica Acta*, vol. 498, no. 1–2, 2010, pp. 71–80.
- 148 J. Wang, M. Pelletier, H. Zhang, H. Xia, and Y. Zhao, *High-frequency ultrasound-responsive block copolymer micelle*, *Langmuir*, vol. 25, no. 22, 2009, pp. 13201–13205.
- 149 Y. Cao, Y. F. Poon, J. Feng, S. Rayatpisheh, V. Chan, and M. B. Chan-Park, *Regulating orientation and phenotype of primary vascular smooth muscle cells by biodegradable films patterned with arrays of microchannels and discontinuous microwalls*, *Biomaterials*, vol. 31, no. 24, 2010, pp. 6228–6238.
- 150 J. Y. Shen *et al.*, *Three-dimensional microchannels in biodegradable polymeric films for control orientation and phenotype of vascular smooth muscle cells*, *Tissue Engineering*, vol. 12, no. 8, 2006, pp. 2229–2240.