



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Πειραματική και Μαθηματική μελέτη νανομηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και ιστών

Ερευνητική Μονάδα Νανομηχανικής & Νανοτεχνολογίας Ε.Μ.Π.

Κ. Α. Χαριτίδης, Αναπλ. Καθηγητής

Γ. Λώλας, Post Doc, Mathematical Biology
Α. Σκαρμούτσου, MSc, Chemical Engineer
Η. Κούμουλος, MSc, Chemical Engineer
Β. Τσικουρκιτούδη, BSc, Chemical Engineer
Δ. Δραγατογιάννης, BSc, Applied Mathematics

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιοϋλικά

✓ *Νανοσωματίδια*

✓ *Νανοκάψουλες – Μικροκάψουλες*

✓ *Ικρίώματα*

Μαθηματικά Μοντέλα

Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)

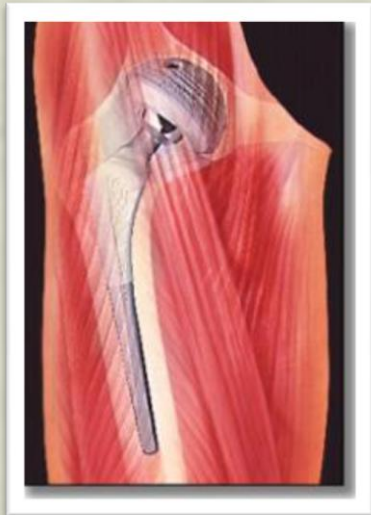
Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών

Συμπεράσματα

ΒΙΟΪΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε ιατρικές διατάξεις/συσσκευές, που προορίζονται να αλληλεπιδράσουν με τα βιολογικά συστήματα.

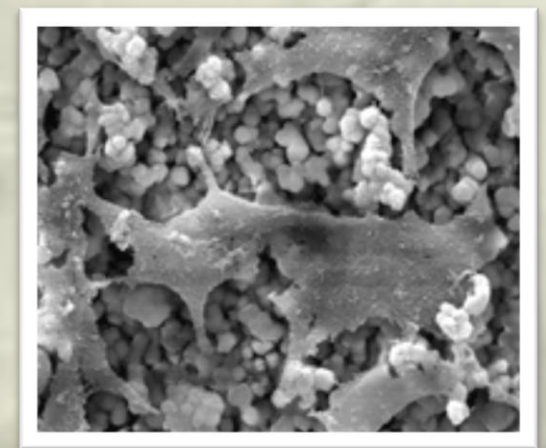
Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα και αυξανόμενος αριθμός εφαρμογών των υλικών στην ιατρική, που χρησιμοποιούνται στην προσθήκη τεχνητών μελών στο σκελετικό σύστημα (τεχνητοί σύνδεσμοι γοφών, γονάτων, αγκώνων ή σύνδεσμοι ώμων, δαχτύλων-άκρων), στην οδοντιατρική (κορώνες, εμφυτεύματα, σφραγίσματα), ως βαλβίδες της καρδιάς, καθετήρες, βηματοδότες, πρότυπα επιδιόρθωσης δέρματος, τεχνητά νεφρά και για την όραση (φακοί, καθώς επίσης φακοί επαφής και εμφυτεύματα φακών στους οφθαλμούς).



Ορθοπεδική



Οδοντιατρική



Αναγεννητική των ιστών

ΒΙΟΪΛΙΚΑ

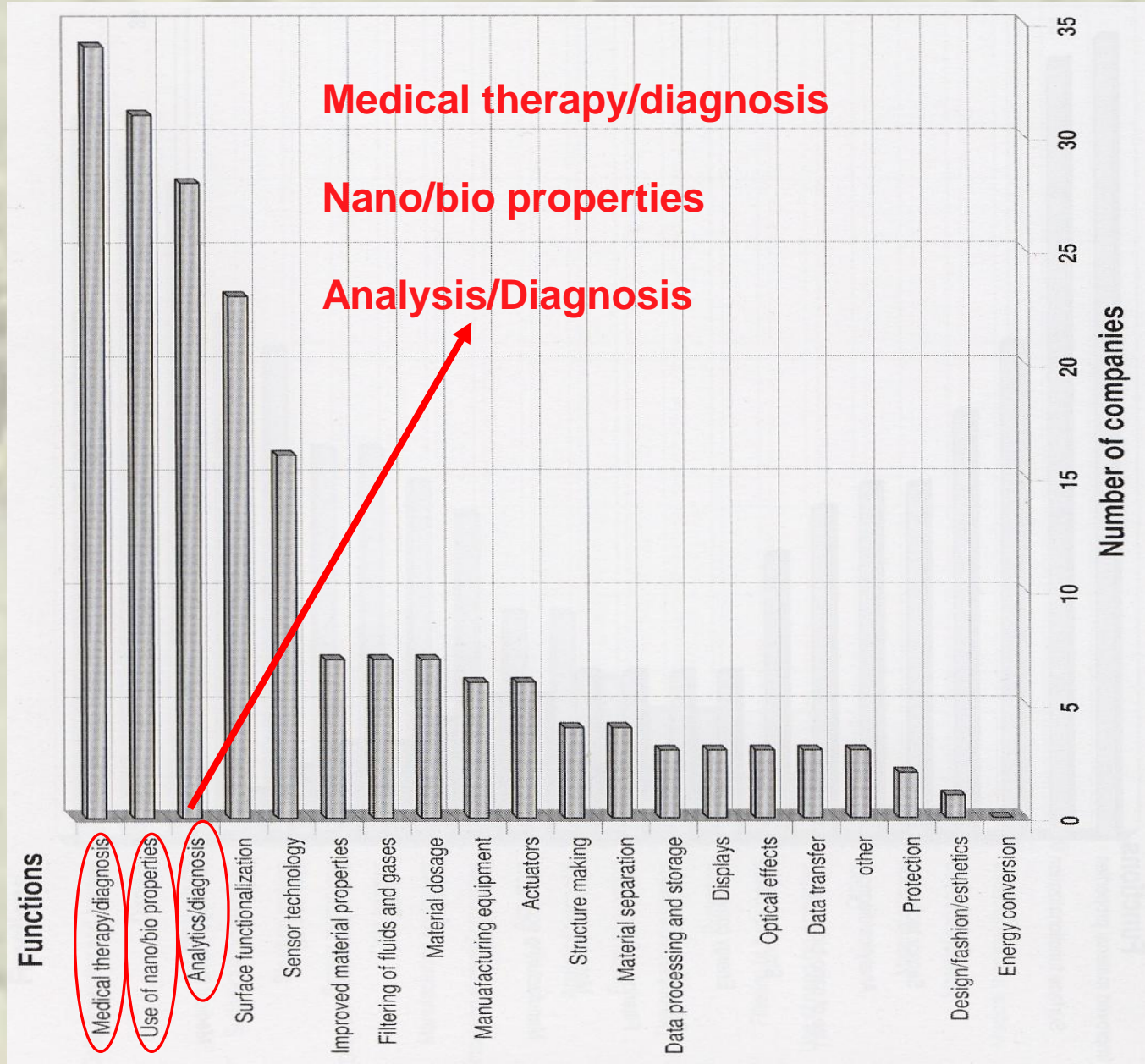
Όλες οι κατηγορίες των υλικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις εφαρμογές των βιοϋλικών, απαιτείται όμως τα υλικά (μέταλλα, κεραμικά, πολυμερή και σύνθετα) να παρουσιάζουν κάποιες συγκεκριμένες **ιδιότητες**:

Απουσία Τοξικότητας Περιορίζεται η επιλογή των μετάλλων (πολλά βαριά μέταλλα είναι αρκετά τοξικά για να χρησιμοποιηθούν). Στα πολυμερή πρέπει να ελέγχεται η διήθηση των μικρού μοριακού βάρους συστατικών (για παράδειγμα ο καταλύτης).

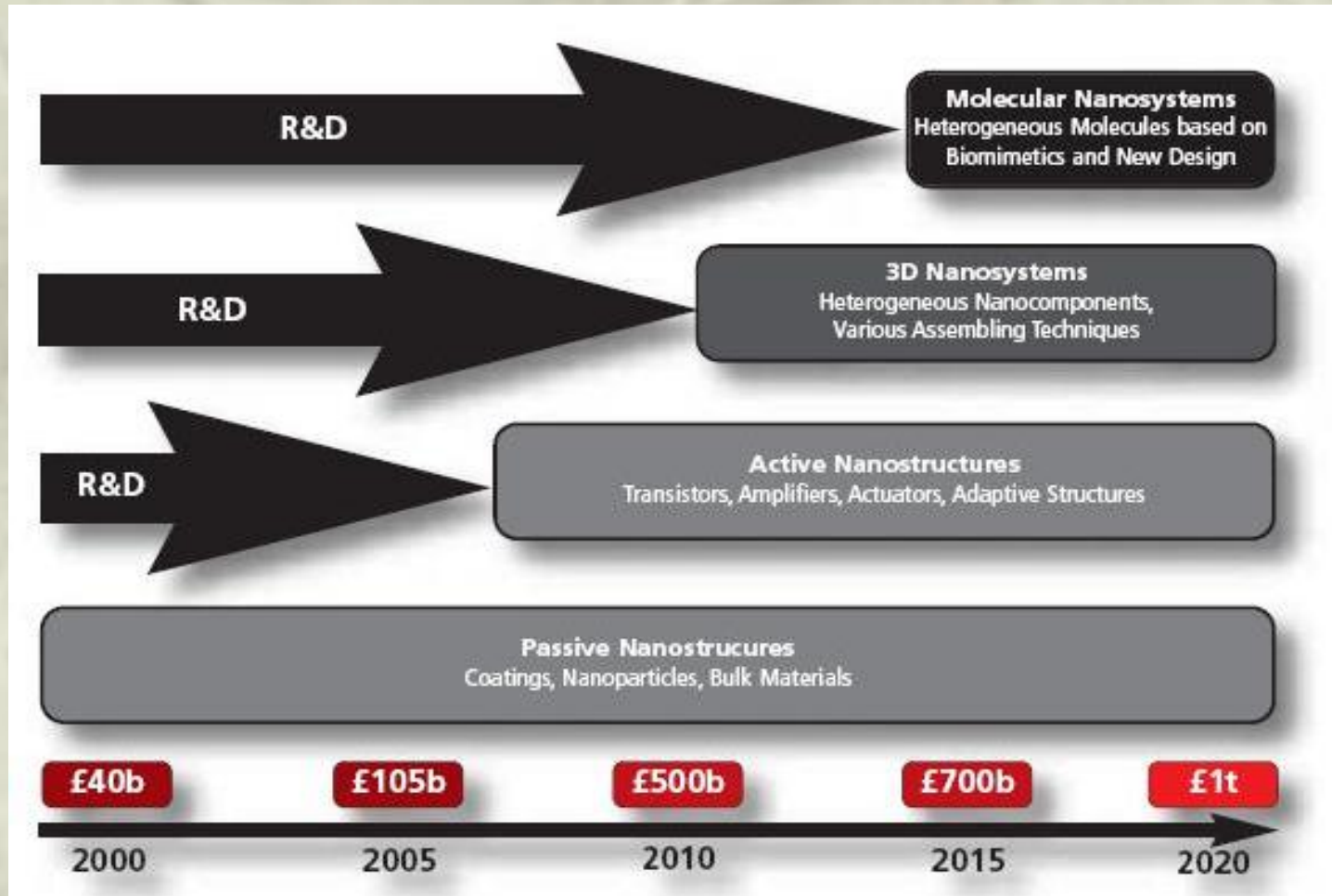
Αντίσταση στη Διάβρωση Τα περιβάλλον του σώματος προσομοιάζεται με αυτό του αλατόνευρου, δηλαδή είναι χημικά διαβρωτικό. Τα υλικά και ειδικά τα μέταλλα πρέπει να επιλέγονται ώστε να διατηρούν τη λειτουργικότητα τους για μεγάλες περιόδους.

Βιοσυμβατότητα Ένα υλικό που χρησιμοποιείται στο ανθρώπινο σώμα δεν πρέπει να προκαλεί δυσμενείς αντιδράσεις, όπως θρόμβωση του αίματος ή προσκόλληση βακτηριδίων. Η βιοσυμβατότητα ενός υλικού με το σώμα είναι πολύ δύσκολο να οριστεί. Πολύ συχνά βασίζεται στην εμπειρία, αν δηλαδή το υλικό αντέχει στο σώμα, επομένως, κρίνεται βιοσυμβατό. Η σύσταση και οι ιδιότητες της επιφάνειας είναι σημαντικές για τη βιοσυμβατότητα, επομένως, μερικές επιφανειακές κατεργασίες έχουν αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό.

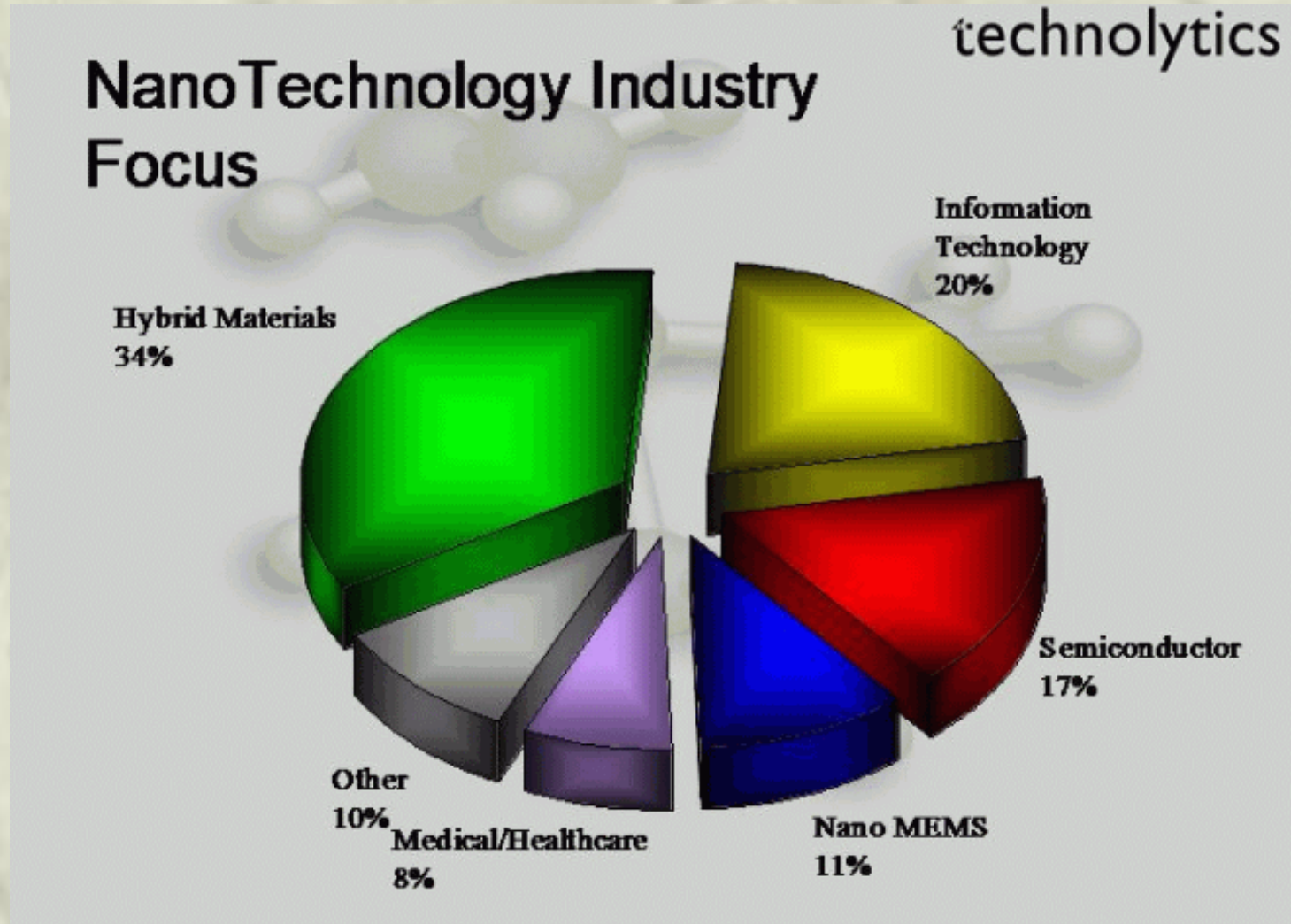
Διαμόρφωση της αγοράς στο πεδίο των εφαρμογών της Ιατρικής τεχνολογίας/Υγείας



Διαμόρφωση της αγοράς στο πεδίο των εφαρμογών της Ιατρικής Τεχνολογίας/Υγείας



*Διαμόρφωση της αγοράς στο πεδίο των εφαρμογών της Ιατρικής
Τεχνολογίας/Υγείας*



ΒΙΟΪΛΙΚΑ

ΣΤΟΧΟΣ

Σύνθεση βιοϋλικών που θα:

- ✓ **Απομακρύνονται** από τον οργανισμό μόλις επιτελέσουν το σκοπό τους
- ✓ **Αποικοδομούνται** έτσι ώστε να μην απαιτείται επιπλέον χειρουργική επέμβαση για την απομάκρυνση τους
- ✓ **Απορροφούνται** από τον οργανισμό χωρίς να προκαλούν τοξικότητα.

Νανοςωματίδια
Νανοκάψουλες - Μικροκάψουλες
Ίκτριώματα
Γενικά πολυμερικά υλικά



Βιολογικά Υλικά
Κύτταρα & Ιστοί

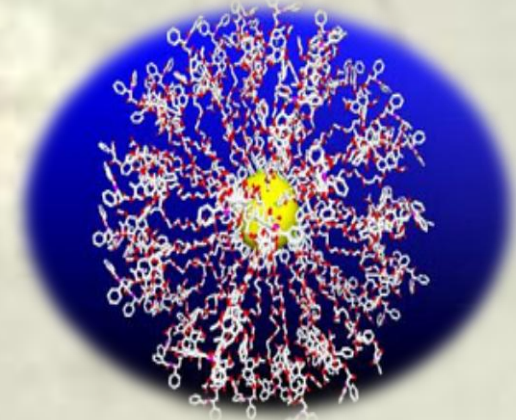
Νανοσωματίδια

Διάγνωση ασθενειών

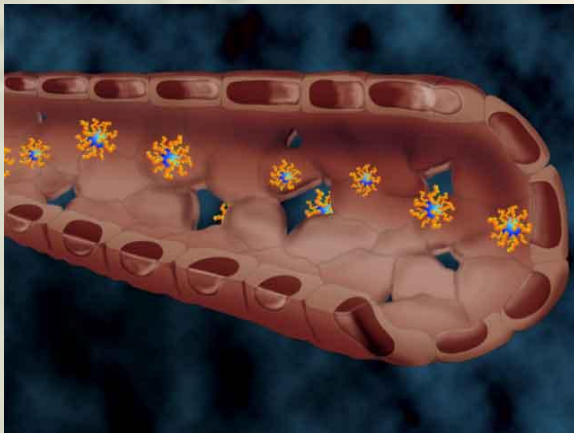
Μεταφορά φαρμάκων

Στοχευμένη αποδέσμευση φαρμάκων

- ✓ Μικρά σωματίδια που κυμαίνονται από 15-150 nm.
- ✓ Ανόργανοι πυρήνες που παρουσιάζουν μαγνητικές ή οπτικές ιδιότητες.
- ✓ Επιφανειακή τροποποίηση των πυρήνων ώστε να ενώνονται ή να προσκολλώνται στην επιφάνεια τους παράγοντες αναγνώρισης (πρωτεΐνες, ένζυμα ή DNA) ή/και φαρμακευτικές ουσίες.
- ✓ Επικαλύπτονται με οργανικές ουσίες για προστασία από το ανοσοποιητικό σύστημα (stealth shielding effect).



Νανοσωματίδιο Au



Κίνηση νανοσωματιδίων *in vivo*



Τα νανοσωματίδια εισάγονται στον οργανισμό για να αποδεσμεύσουν τις φαρμακευτικές ουσίες στους παθολόγους ιστούς.

Απαιτείται τα νανοσωματίδια να παρουσιάζουν συγκεκριμένες **φυσικοχημικές ιδιότητες** για την επιτυχή λειτουργία τους **αποφεύγοντας την εμφάνιση τοξικότητας**.

Φυσικοχημικές ιδιότητες

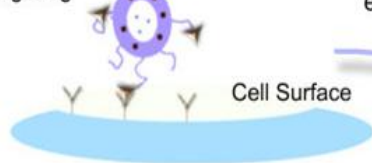
- **Μορφολογία:** **ανισοτροπικό** σχήμα, δηλαδή μη σφαιρικά και μη ραβδοειδή νανοσωματίδια, ώστε να αποφεύγεται η βιολογική αποβολή τους και να παρουσιάζουν μεγαλύτερο λόγο μήκους-πλάτους ώστε να αυξάνει ο χρόνος ημιζωής τους στο κυκλοφορικό σύστημα (*in vivo* εφαρμογή)^[1].
- **Υδροδυναμικό μέγεθος:** δηλαδή η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στις φλέβες^[2], η επίδραση του μηχανισμού καθαρισμού των νανοσωματιδίων και η διαπερατότητα τους από το αγγειακό σύστημα^[3].
- **Ιδιότητες της επιφάνειας:** **φορτίο** νανοσωματιδίων και **υδροφοβικότητα** επηρεάζουν τη βιοκατανομή περιορίζοντας ή ενισχύοντας την αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα, της πρωτεΐνες του πλάσματος, τις εξωκυτταρικές μήτρες και τα μη στοχευόμενα κύτταρα^[4].
- Φαρμακοκινητική, η *in vivo* κυτταρική πρόληψη και η ικανότητα τους να αντιμετωπίζουν τα βιολογικά εμπόδια ρυθμίζουν τη σωστή λειτουργία τους.

Σχηματική αναπαράσταση μορφοποιημένων νανοσωματιδίου και προσκόλληση νανοσωματιδίου-κυττάρου.

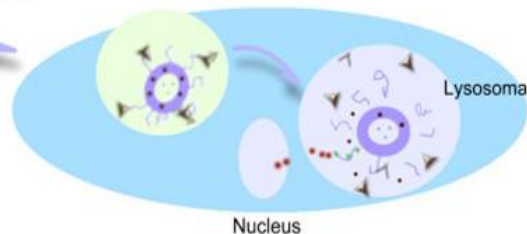
FNPs Structure



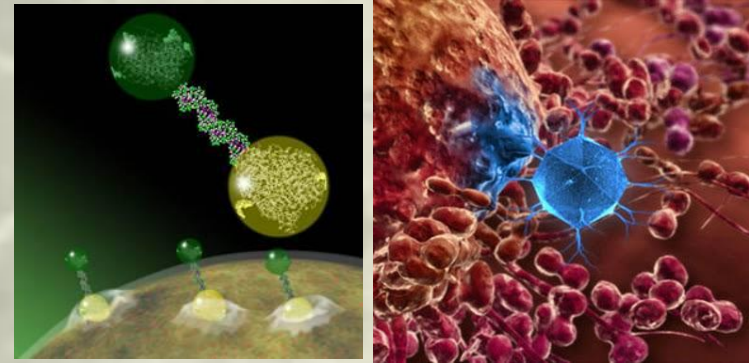
Active Targeting



Mechanism of FNPs endocytosis



Peptide-Drug: GFLG-Drug
Folic targeting group
FITC
Cathepsin B
PEG or
Biodegradable polymer



[1]Y. Geng et al., *Nature Nanotechnology* 2 (2007) 249–255.

[2]M.D. Chavanpatil, A. Khair, J. Panyam, *J. Nanoscience and Nanotechnology* 6 (2006) 2651–2663.

[3]M.E. Davis, *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002) 128–131.

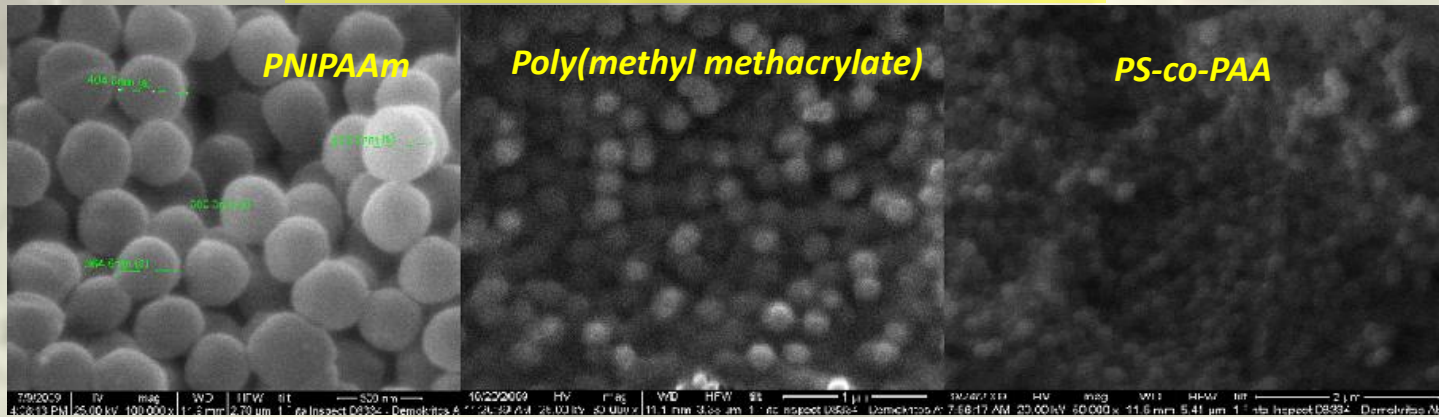
[4]M.D. Rowe et al., *Langmuir* 25 (2009) 9487–99.

Νανοκάψουλες - Μικροκάψουλες

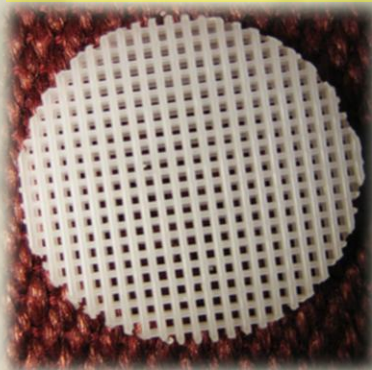


- ✓ Οργανικές (βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή) σφαίρες στη νανο- ή/και μικροκλίμακα για στοχευμένη αποδέσμευση φαρμάκων.
- ✓ Σχηματίζουν μεμβράνες (2D) για μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών ή επούλωση τραυμάτων.
- ✓ Σχηματίζουν 3D δομές – ικρίωματα (scaffolds) για εφαρμογή στην αναγεννητική μηχανική.

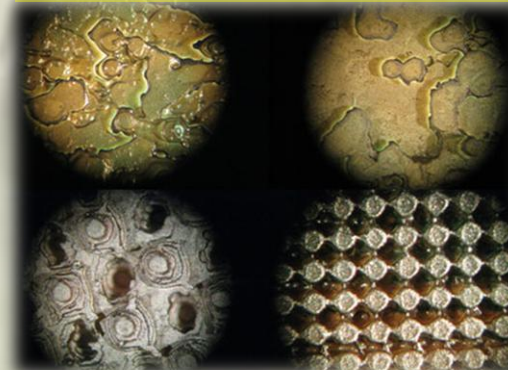
Εικόνες SEM από πολυμερικές μικροσφαίρες



Πορώδες ικρίωμα PCL



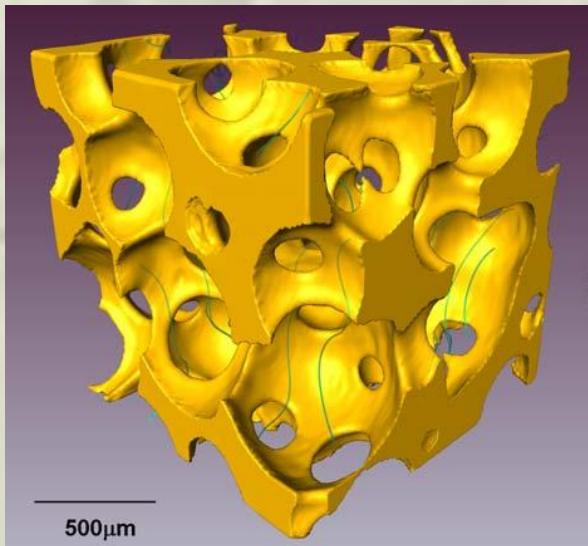
Πρότυπα 2D & 3D ικρίωματα



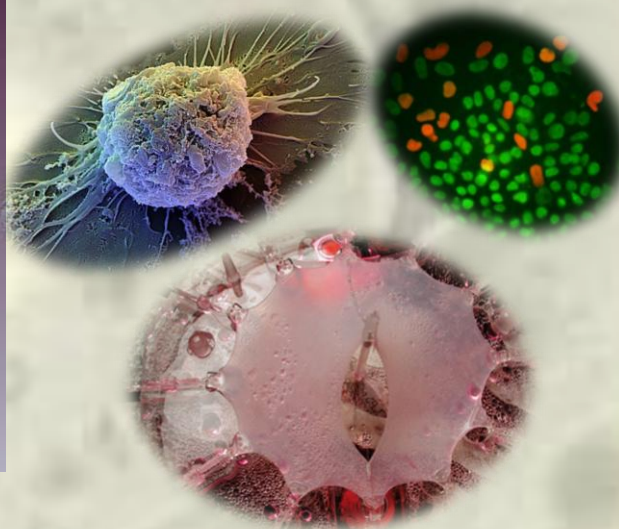
ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ

- Το ιδανικό ικρίωμα θα πρέπει να είναι κατ' αρχήν βιοσυμβατό και να μην προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση των παρακείμενων ιστών, να προάγει την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων και κυττάρων και την ανάπτυξη του ιστού έτσι ώστε να διασφαλίζει την πλήρη συνοχή του ^[1,2].
- Να εξασφαλίζει το κατάλληλο θρεπτικό περιβάλλον για την καλλιέργεια των κυττάρων και την ανάπτυξη του ιστού.
- Να παρέχει μηχανική στήριξη (μηχανική αντοχή) σε περιπτώσεις αποκατάστασης οστών.
- Να είναι βιοαποικοδομήσιμο.

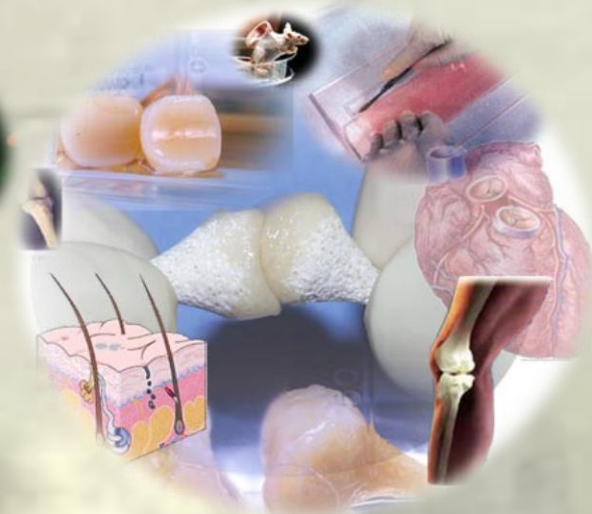
3D δομή ικριώματος για ανάπτυξη ιστών.



Βλαστικά κύτταρα και κυτταρικές καλλιέργειες εγκλωβίζονται σε ικρίωματα



Ανάπλαση Ιστών

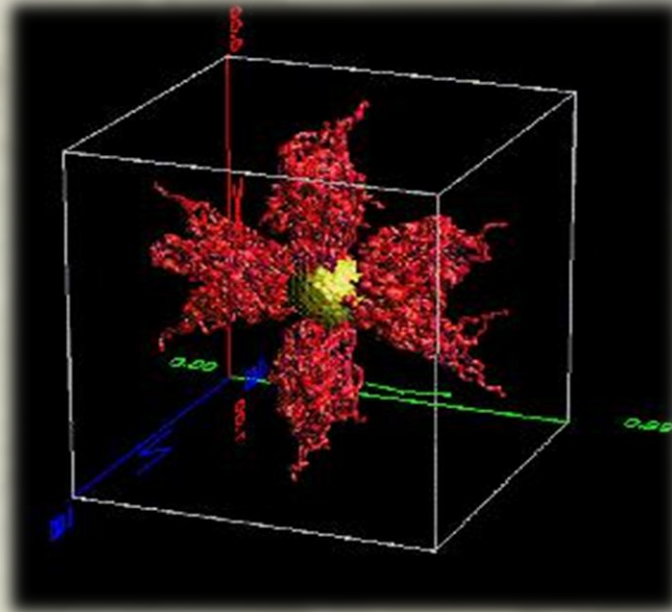


[1]J.L. Sang, et al. *Biomaterials*, 27:3466-3472 (2006).

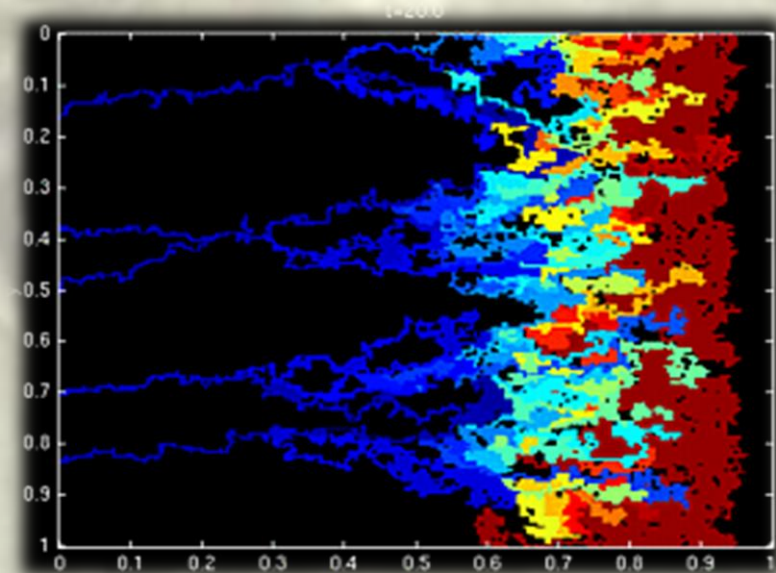
[2]K. Rezwan, et al. *Biomaterials*, 27:3413-3431 (2006).

Μαθηματικά Μοντέλα

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει παρατηρηθεί μεγάλη ανάπτυξη στην **δυναμική μελέτη βιο-ιατρικών συστημάτων με την χρήση μαθηματικών μεθόδων**. Με την χρήση διακριτών και συνεχών μοντέλων επιτρέπεται η προσομοίωση βιολογικών συστημάτων και καθίσταται δυνατή τόσο η **κατανόηση** όσο και η **πρόβλεψη** της συμπεριφοράς των κυτταρικών πληθυσμών σε σχέση με το εξωκυτταρικό περιβάλλον.



3D απεικόνιση μαθηματικής μοντελοποίησης της αγγειογένεσης όπου ο πρωτοπαθής όγκος έχει τοποθετηθεί στο κέντρο και τα αιμοφόρα αγγεία έχουν ήδη φτάσει σε αυτόν ως αποτέλεσμα των χημικών παραγόντων που αυτός εκκρίνει.



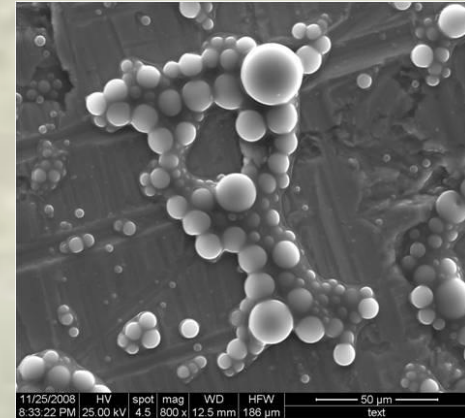
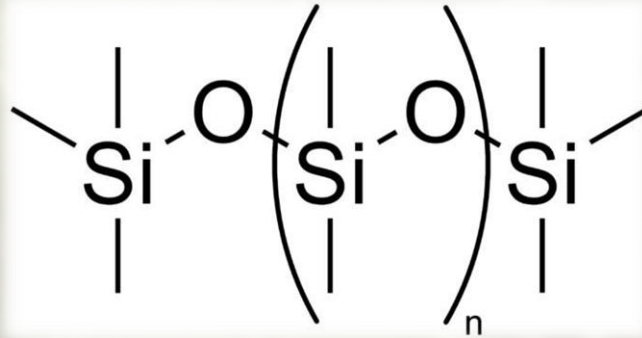
2D απεικόνιση της ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων κατά την διάρκεια της αγγειογένεσης. Ενώ αρχικά είχαμε 5 αιμοφόρα αγγεία (αριστερά) της εικόνας, στην συνέχεια παρατηρείτε η δυναμική ανάπτυξη αυτών όσο αυτά πλησιάζουν τον όγκο (δεξιά) με τις συνεχείς αναστομώσεις (anastomosis) και τις διακλαδώσεις (branching) τους ^[1].

Σύνθετα Βιολογικά Υλικά από Σιλικόνη (PDMS)

- 1) Χαρακτηριστικά Σιλικόνης
- 2) Βιοϊατρικές Εφαρμογές Σιλικόνης
- 3) Μηχανική Συμπεριφορά σύνθετων βιολογικών υλικών PDMS: ομοιότητα με ιστούς και κύτταρα
 1. Χαρακτηριστικές συμπεριφορές
 2. Κατηγορίες Μαλακής ύλης
 3. Αλληλεπιδράσεις επιφάνειας με ακίδα μέτρησης νανομηχανικών ιδιοτήτων
 4. Πρόσφυση της μαλακής ύλης στην επιφάνεια της ακίδας.

Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)

PDMS (poly dimethyl siloxane): ανήκει στην κατηγορία των ιξωδών ρευστών, τα οποία μετατρέπονται σε στερεά ελαστομερή μέσω αντίδρασης βουλκανισμού.



Εικόνα SEM από υδρόφιλα σωματίδια PDMS

Κύρια χαρακτηριστικά σιλικόνης

Θερμική και Οξειδωτική σταθερότητα

Ευκολία στο χειρισμό

Αδρανές υλικό

Βιοσυμβατότητα και χαμηλή τοξικότητα

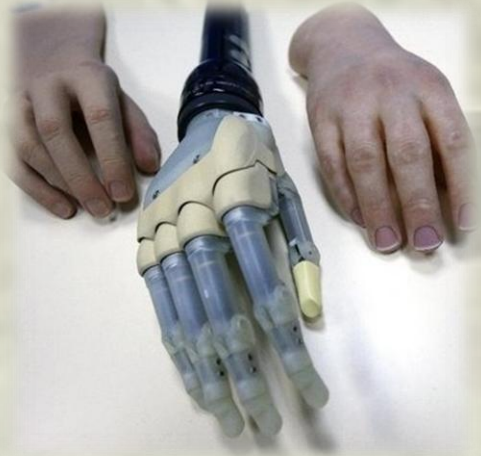
Χαμηλό μέτρο ελαστικότητας



Βιοαισθητήρας από PDMS

Βιοϊατρικές Εφαρμογές Σιλικόνης

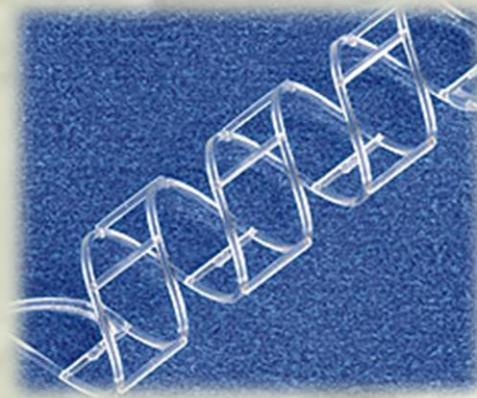
Γναθοπροσωπική Ανακατασκευή και Προσθετική άλλων μελών



Αποκατάσταση
άκρου με χρήση
σιλικόνης.

**Αποκαθίστανται ακόμα και
αρθρώσεις δακτύλων και
άλλων οστών**

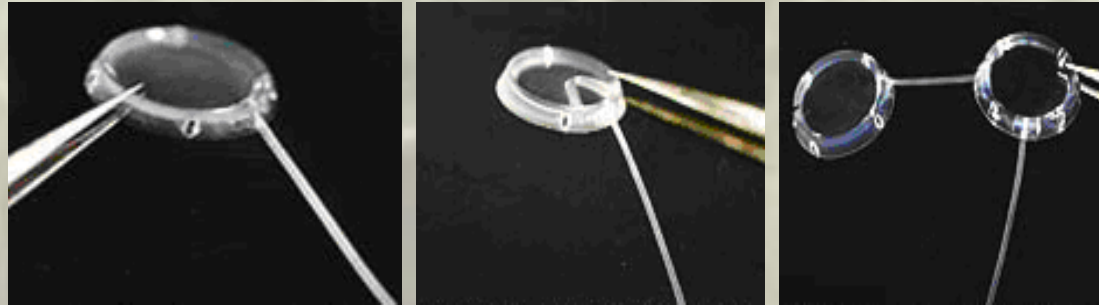
**Βηματοδότες, μαστικές προσθέσεις,
τεχνητό δέρμα και οισοφάγο, ιατρικές
προσφύσεις, επικαλύψεις για
κοχλιωτά μοσχεύματα, καθετήρες,
αναπνευστικά βοηθήματα**



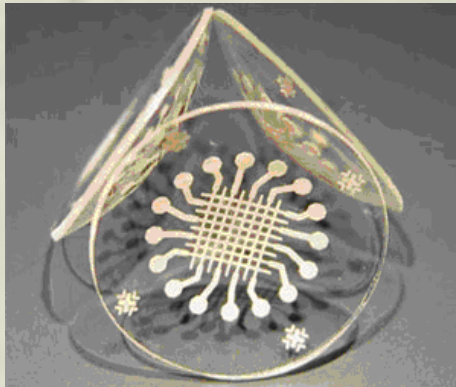
Βιοδιασπώμενο stent
για διάνοιξη
αρτηριών

Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)

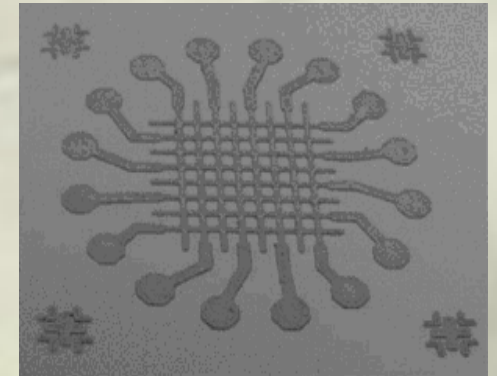
Φακοί επαφής και ξηρά μοσχεύματα για εφαρμογές στο γλαύκωμα



Μοσχεύματα για γλαύκωμα (Molteno Ophthalmic Ltd) για τον έλεγχο της πίεσης και της ροής αίματος στο μάτι.



Έξυπνοι φακοί διάγνωσης (μήτρα PDMS με sensors) για να προσδιορίζουν την πίεση του ματιού και να ενημερώνουν για πιθανή εμφάνιση γλαυκώματος



Μειονεκτήματα και κίνδυνοι πολυμερικών βιολογικών υλικών

Υγιεινή της προσθετικής απαιτείται ένα μη πορώδες, ικανό να καθαρίζεται και να μην μολύνεται υλικό, το οποίο δεν θα ερεθίζει τους ιστούς κατά την επαφή.

Επιπρόσθετα μη τοξικό, μη αλλεργικό και να μην προκαλεί καρκινογενέσεις, ενώ η διάρκεια ζωής, η ευκολία στο χειρισμό και το λογικό κόστος συνιστούν σημαντικά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει το υλικό επιλογής.

Η **σιλικόνη** τείνει να σχηματίζει ένα **επιφανειακό μικροβιακό φιλμ**



ανθεκτικό σε φάρμακα: οδηγεί σε μολύνσεις και σε κάποιες περιπτώσεις παρεμπόδιση της λειτουργίας της συσκευής

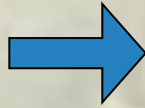
Υψηλός συντελεστή τριβής: επώδυνη η εισαγωγή και εξαγωγή ιατρικών συσκευών κατασκευασμένων από PDMS.

ΣΤΟΧΟΣ

**Συστήματα Μεταφοράς
Φαρμάκων (μέσω
διατάξεων PDMS)**

- Διατήρηση της επιθυμητής συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα με ελάχιστη διακύμανση
- Προβλέψιμη αποδέσμευση φαρμάκου για σημαντική-μεγάλη διάρκεια (π.χ. σε διαβητικούς)
- Αύξηση της δράσης φαρμάκων μικρής διάρκειας ζωής
- Περιορισμός παρενεργειών, συχνή ανανέωση της δόσης και έλεγχος της ποσότητας φαρμάκων
- Βέλτιστη θεραπεία

Νέα Εφαρμογή Σιλικόνης

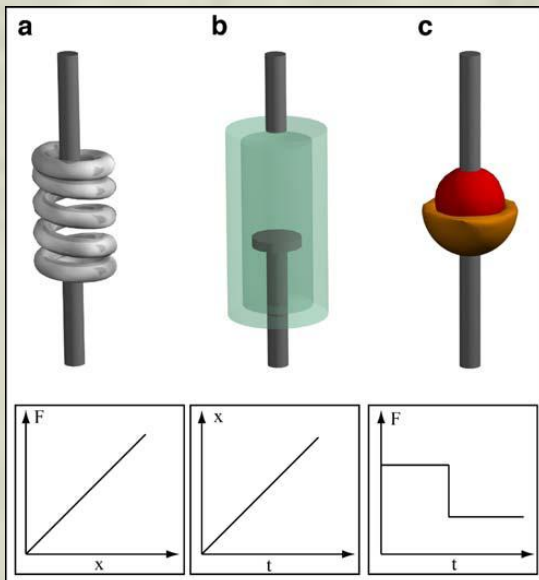


Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων & Βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες

- Εύκολη ενσωμάτωση φαρμάκου, αλλά απαιτείται βελτιστοποίηση στο σχεδιασμό της μήτρας.
- **PDMS + NanoClays:** βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες.

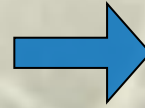
Η **μελέτη** όμως των μηχανικών ιδιοτήτων των πολυμερικών υλικών (μαλακή ύλη) παρουσιάζει **προκλήσεις** λόγω της φύσης των υλικών.

Η μαλακή ύλη παρουσιάζει 3 χαρακτηριστικές συμπεριφορές:



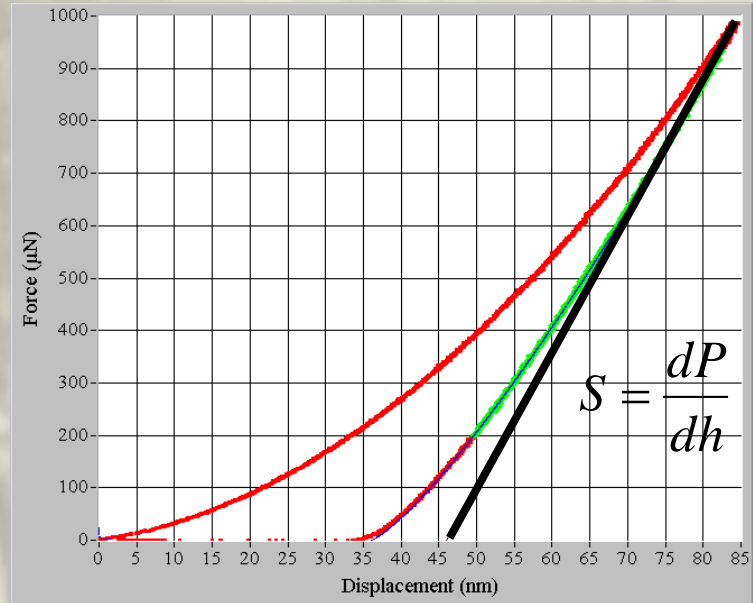
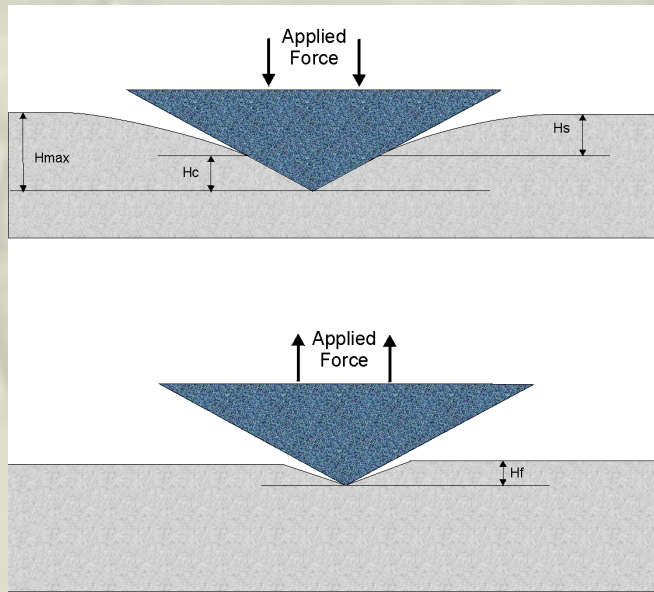
- Καθαρά **ελαστική συμπεριφορά** γραμμική εξάρτηση δύναμης και μετατόπισης
- Ιξώδη συμπεριφορά** του υλικού, η μετατόπιση είναι χρονικά εξαρτώμενη, με επιβολή σταθερής δύναμης
- Παρατηρείται **θραύση δεσμών**, επομένως δημιουργείται χαλάρωση και μεταβολές στις καμπύλες φόρτισης. Η ρήξη των δεσμών είναι μια διαδικασία θερμικής ενεργοποίησης. Οι μεταβολές εξαρτώνται από το ρυθμό.

Μηχανική συμπεριφορά των βιολογικών υλικών



Νανοσκληρομέτρηση

Νανοσκληρομέτρηση: Ακίδα γνωστής γεωμετρίας διεισδύει, με επιβολή δύναμης, στην επιφάνεια του δείγματος, ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται το βάθος διείσδυσης. Η σκληρότητα (H), το μέτρο ελαστικότητας (E) και η ακαμψία (S) του δείγματος υπολογίζονται.



$$P = A(h - h_f)^m$$

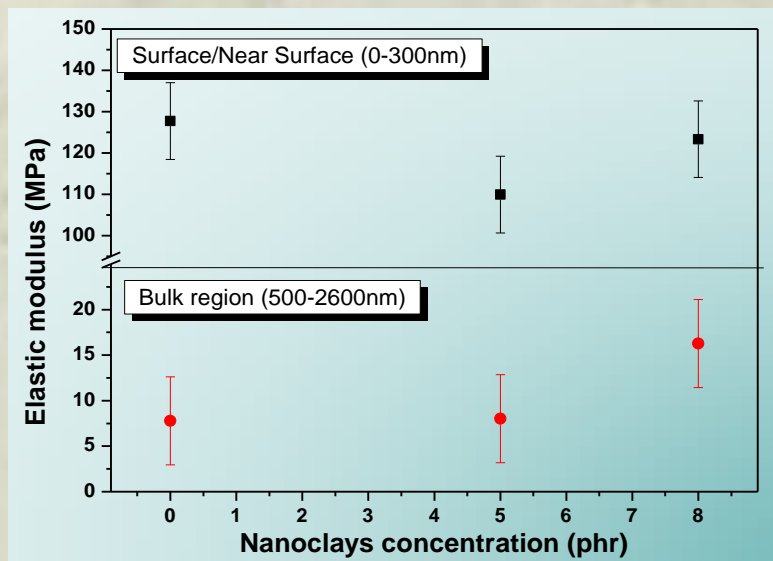
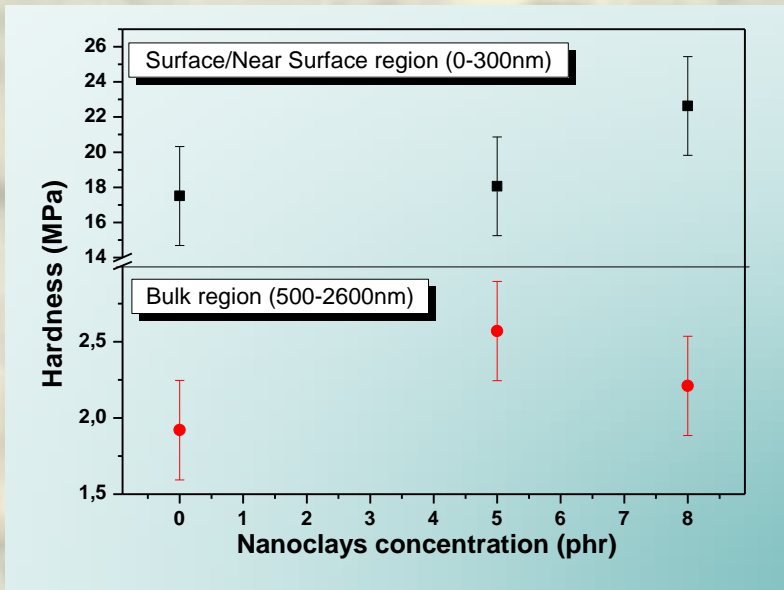
$$S = \frac{dP}{dh}(h_{\max}) = mA(h_{\max} - h_f)^{m-1}$$

$$h_c = h_{\max} - \varepsilon \frac{P_{\max}}{S}$$

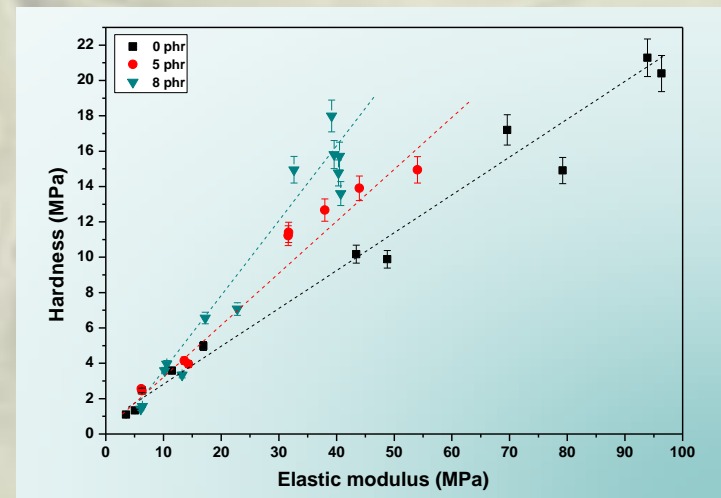
$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A_c}}$$

$$H = \frac{P_{\max}}{A_c}$$

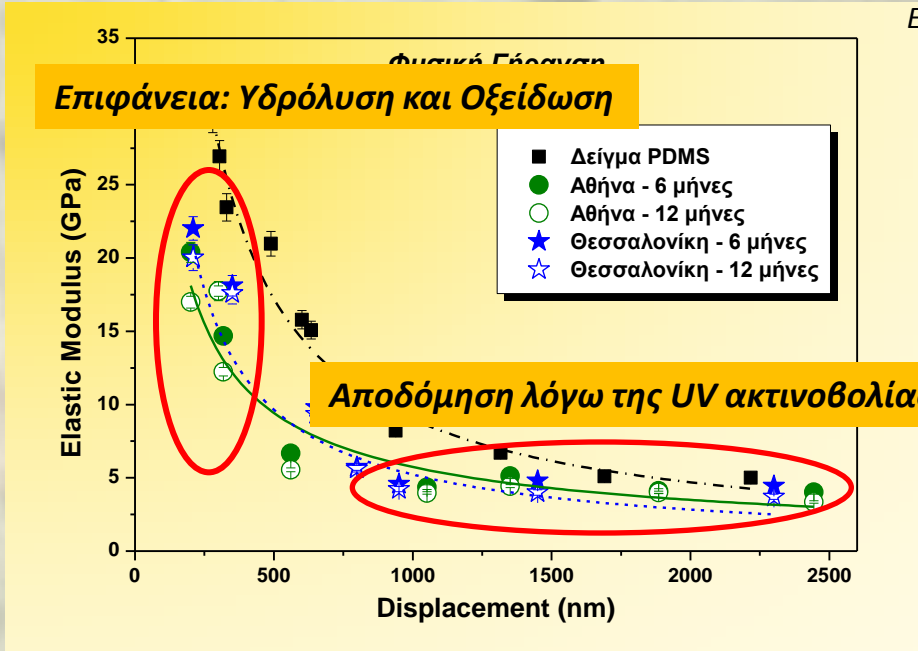
Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)



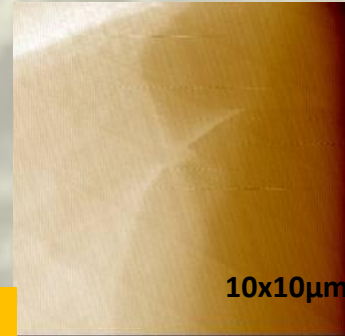
- ✓ Υψηλότερες τιμές σκληρότητας και μέτρου ελαστικότητας στην επιφάνεια, προκαλούνται λόγω διασταυρώσεων.
- ✓ Παρατηρείται ολίσθηση του υλικού στα όρια επαφής, και η επιφάνεια επαφής αυξάνει κατά τη διείδυση.
- ✓ Η τάση που σχηματίζεται από αιχμηρές ακίδες είναι μεγάλη, επομένως η ζώνη πλαστικής παραμόρφωσης του δείγματος είναι κυρίως κάτω από την περιοχή επαφής.
- ✓ Συγκριτικά με τη συνθήκη ολίσθησης, η πλαστική παραμόρφωση της κολλώδης κατάστασης πρέπει να είναι μικρότερη διότι η επιφάνεια επαφής περιορίζεται από την ισχυρή πρόσφυση.



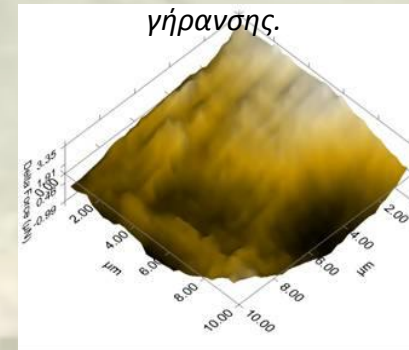
Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS) Φυσική & Τεχνητή Γήρανση



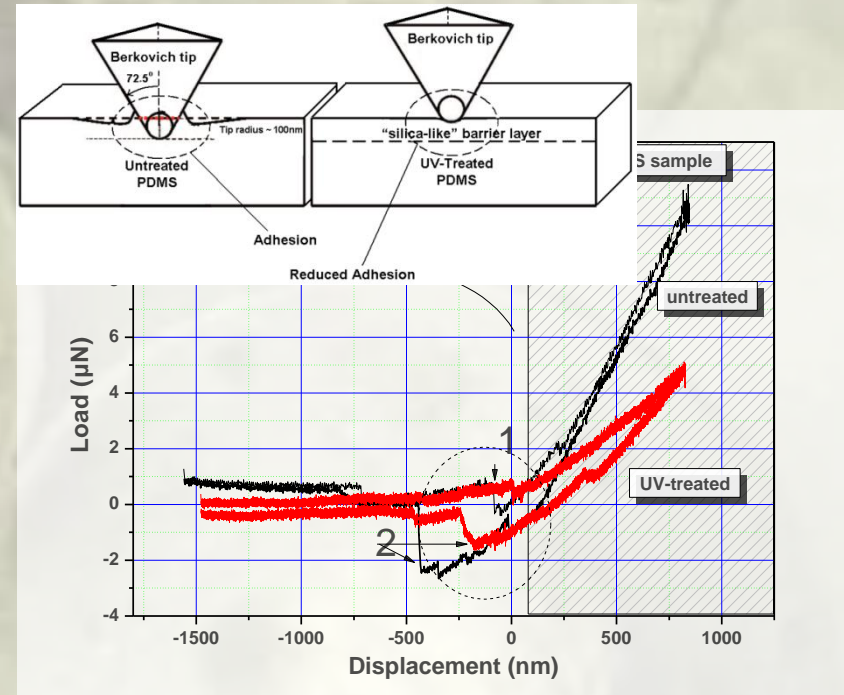
Εικόνα SPM από δείγμα PDMS
(μέση τραχύτητα 200nm)



Επιφανειακές ρωγμές
(κρατήρες) μετά από 6 μήνες
γήρανσης.



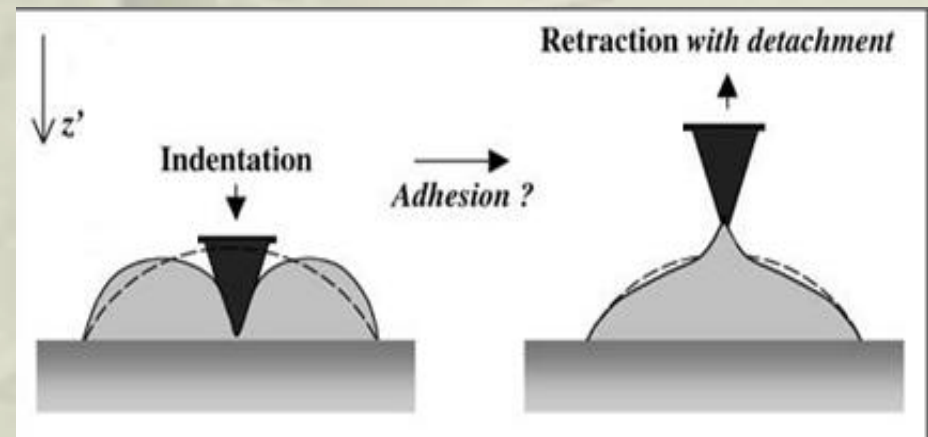
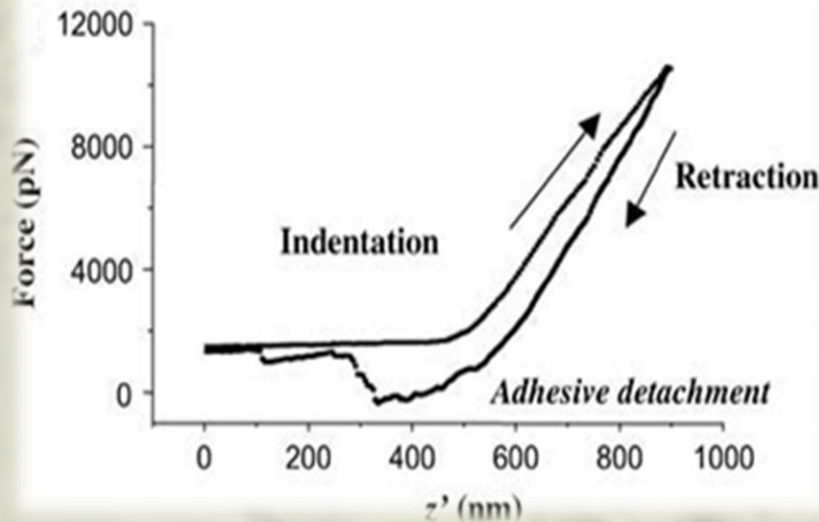
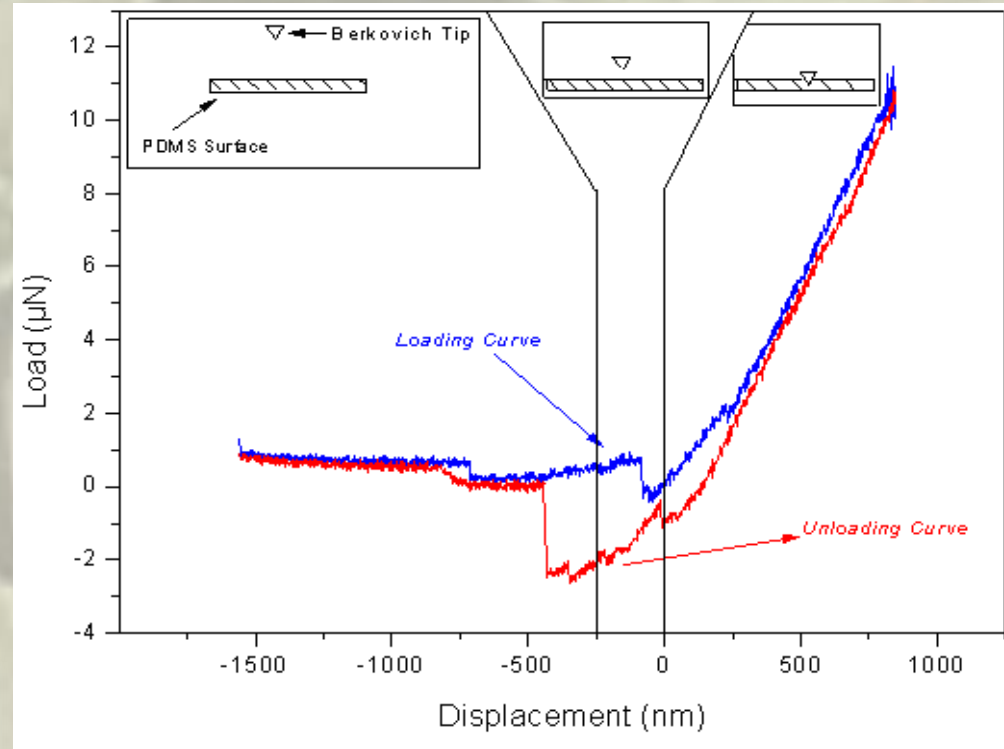
- ✓ Μηχανισμός αποικοδόμησης: *υδρόλυση* μέσω των επιφανειακών ρωγμών που σχηματίζονται λόγω της ακτινοβολίας.
- ✓ Τεχνητά γηρασμένα δείγματα δημιουργούν μια στοιβάδα πυριτίας στην επιφάνεια. Μελέτη με FT-IR.
- ✓ Με αύξηση του χρόνου παραμονής στη μέγιστη επιβαλλόμενη δύναμη μειώνεται το σφάλμα μέτρησης της H και του E .
- ✓ Μείωση στην δύναμη πρόσφυσης λόγω της γήρανσης.



Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)

Εκτός από τη χρονοεξαρτημένη συμπεριφορά των μαλακών βιοϋλικών και την εξάρτηση από το ρυθμό εφαρμογής φορτίου, παρατηρούνται και **αλληλοεπιδράσεις** (ελκτικές και απωστικές δυνάμεις) **ανάμεσα στην ακίδα μέτρησης** νανομηχανικών ιδιοτήτων καθώς αυτή πλησιάζει την **επιφάνεια του υλικού**.

Όμοια συμπεριφορά κατά τη μέτρηση των μηχανικών ιδιοτήτων παρατηρήθηκε σε **ιστούς και κύτταρα**.

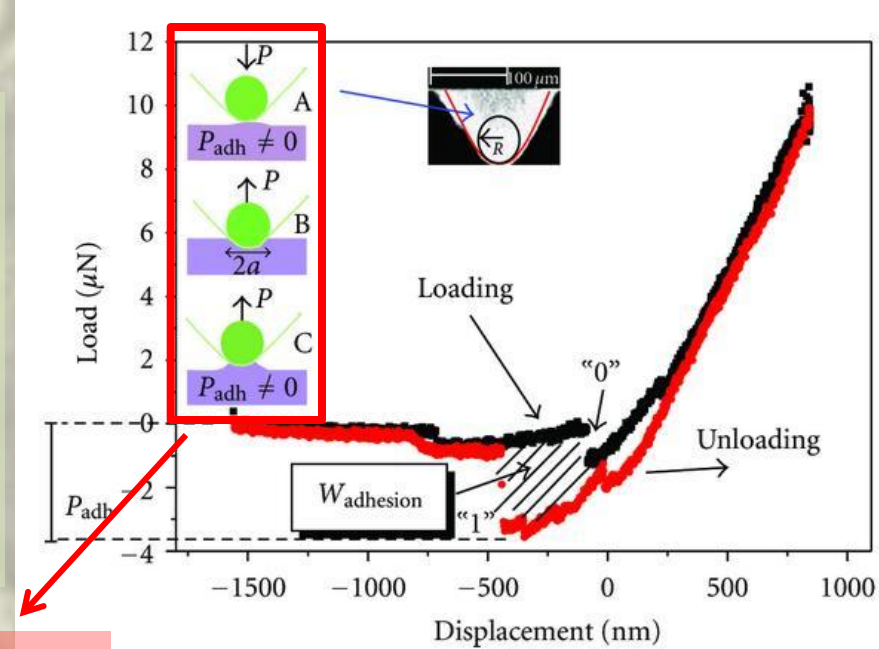


Τυπική καμπύλη φόρτισης αποφόρτισης κατά τη μέτρηση νανομηχανικών ιδιοτήτων σε ένα ανθρώπινο ερυθροκύτταρο.

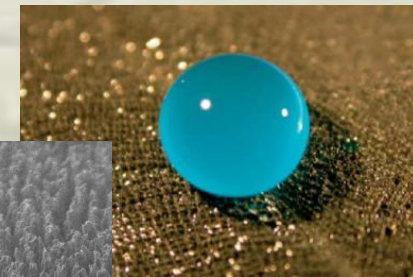
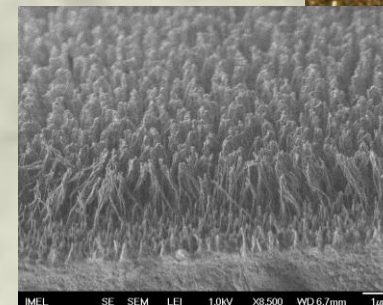
Έργο της Πρόσφυσης – Αλληλεπίδραση Ακίδας-Επιφάνειας

Από την αλληλεπίδραση υπολογίζονται:

- ✓ Ηλεκτροστατικές δυνάμεις
- ✓ Υδροφιλικότητα/Υδροφοβικότητα
- ✓ Μηδενικό φορτίο και πλαστική παραμόρφωση



- Παρόλο που **δεν έχει εφαρμοσθεί φορτίο** στο δείγμα, παρατηρείται μια αλληλεπίδραση μεταξύ ακίδας και δείγματος
- Όταν η ακίδα απομακρύνεται από το δείγμα, η έλξη λόγω πρόσφυσης παραμορφώνει το μαλακό πολυμερές κατά μήκος της κίνησης της ακίδας και προκαλεί μια **αρνητική διείδυση**.



Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)

Η **πρόσφυση** αυξάνει την απαιτούμενη ενέργεια κατά τη διείδυση.



Επηρεάζονται οι μετρούμενες τιμές του μέτρου ελαστικότητας E , της σκληρότητας H και της ακαμψίας S .



Πρόσφυση κατά τη νανοσκληρομέτρηση δεν παρατηρείται στα μέταλλα, αλλά είναι **ιδιαίτερα σημαντική** για τα πολυμερή και τα βιολογικά υλικά, επηρεάζοντας σημαντικά την επιλογή του εφαρμοζόμενου φορτίου.

Γενικά απαιτούνται μικρά φορτία για να φτάσουμε μεγάλα βάθη διείδυσης, καθώς η πρόσφυση επηρεάζει σημαντικά το φορτίο.

Επομένως, η πρόσφυση επηρεάζει τις μετρούμενες τιμές ελαστικότητας.

Επομένως γνωρίζοντας τις αλληλοεπιδράσεις ακίδας-υλικού, τις εξαρτήσεις από το χρόνο και το ρυθμό φόρτισης των νανομηχανικών ιδιοτήτων των πολυμερών (όπως PDMS, PA) μπορούν να πραγματοποιηθούν:

✓ Μετρήσεις με μεγαλύτερη ακρίβεια σε ιστούς και κύτταρα

✓ Σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Νέο Πειραματικό πρωτόκολλο

Σύνθετα Βιολογικά Υλικά Σιλικόνης (PDMS)

Γενικά τα μαλακά σύνθετα βιοϋλικά πέρα από τις χρήσεις τους στην αποκατάσταση οστών, ιστών κλπ χρησιμοποιούνται ως **υποστρώματα** για την καλλιέργεια των κυττάρων. Με επιφανειακή χημική τροποποίηση ή πρόσφυση, μπορούν να εμπλουτιστούν με ένζυμα, πρωτεΐνες, RNA, DNA και μεταφραστικούς παράγοντες για καλλιέργεια κυττάρων ή ανάπτυξη.

Τοποθετώντας τα κύτταρα πάνω σε πολυμερικά υλικά (συνθετικά ή φυσικά) μπορεί να προσδιοριστούν οι μηχανικές ιδιότητες των κυττάρων, αρκεί να είναι γνωστές οι μηχανικές ιδιότητες του υποστρώματος.

Material	Origin	Elastic Modulus, E [kPa]
Polyacrylamide (PA)	Synthetic	0.1–100
PDMS	Synthetic	10–1000
Collagen	Natural	0.001–1
Fibronectin	Natural	0.001–1
Matrigel	Natural	<1
Alginate	Natural	0.1–150
Hyaluronic acid (HA)	Natural	0.1–150

Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών

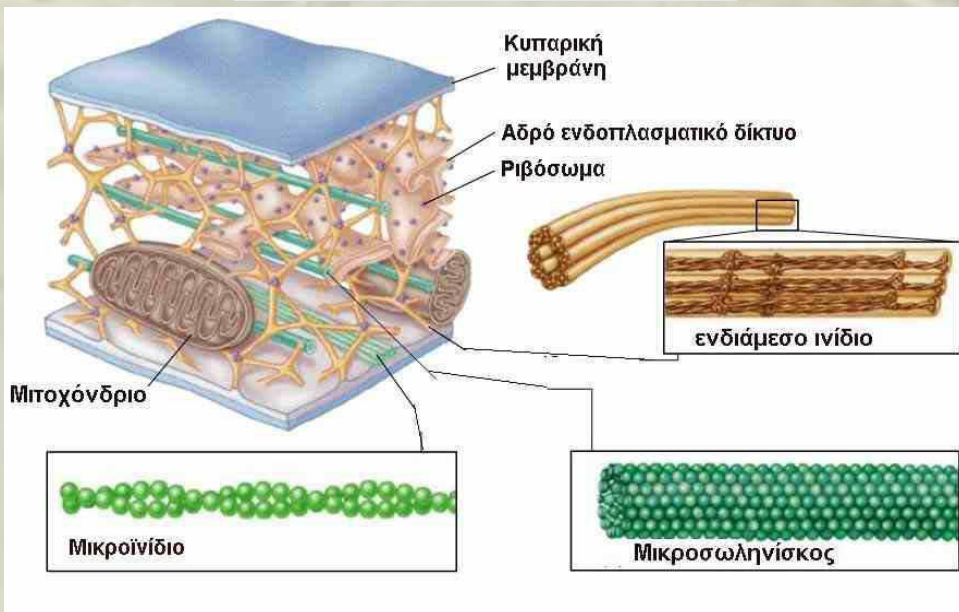
- 1) Δομή κυττάρων & Μηχανικές ιδιότητες
- 2) Μηχανικός Έλεγχος: Εξέλιξη μεθόδων μέτρησης και απεικόνισης
- 3) Δυσκολίες μέτρησης μηχανικών ιδιοτήτων βιολογικών υλικών
- 4) Τρόποι νανομηχανικών μετρήσεων κυττάρων
Επίδραση υποστρωμάτων στις μηχανικές ιδιότητες των βιολογικών υλικών
- 5) Παθογόνοι και μη παθογόνοι ιστοί και κύτταρα

Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών

Οι μηχανικές ιδιότητες των κυττάρων όπως η ελαστικότητα και η ακαμψία της πλασματικής μεμβράνης τους είναι άμεσα συνδεδεμένες με την **κυτταροσκελετική τους οργάνωση** και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σωστή κυτταρική λειτουργία, επιβίωση ή/και διαφοροποίηση.

Η ελαστικότητα του κυττάρου καθορίζεται από τη δομή του κυτταροσκελετού. Ο κυτταροσκελετός αποτελεί το εσωτερικό δίκτυο υποστυλωμάτων του κυττάρου που προσδίδει τη σταθερότητα της μορφής του.

Δομή κυτταροσκελετού



Η μεταφορά, η ενζυματική δραστηριότητα, η προσκόλληση και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων εξυπηρετούνται από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες.

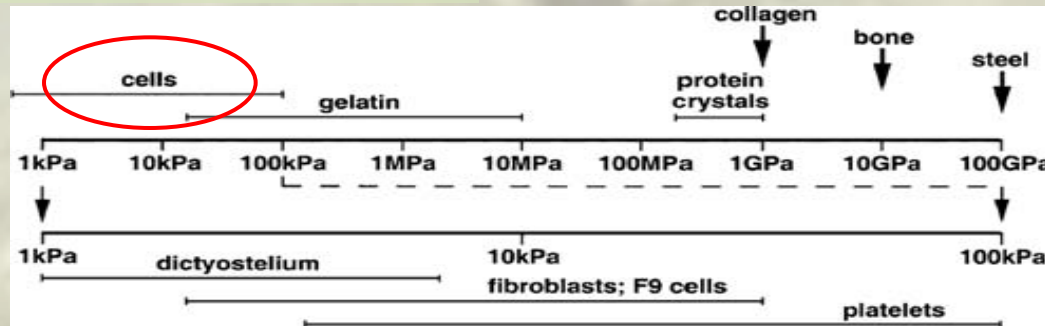
Τα νημάτια του μικροσκελετού έρχονται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη μέσω των μεμβρανικών πρωτεϊνών

Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών

Η παραμόρφωση των κυττάρων επηρεάζεται από τα μηχανικά και χημικά φαινόμενα που αναπτύσσονται μέσα σε ένα κύτταρο και καθορίζεται από:

- ✓ αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων
- ✓ του κυττάρου με την εξωκυτταρική μήτρα (π.χ. αίμα ή υδατικά διαλύματα).

Για την κατανόηση της μηχανικής απόκρισης των κυττάρων σε φυσικά φορτία είναι απαραίτητο να ερευνηθεί η μετάδοση και η διασπορά των μηχανικών σημάτων και πως τελικά μετατρέπονται σε βιολογικές και χημικές αποκρίσεις.

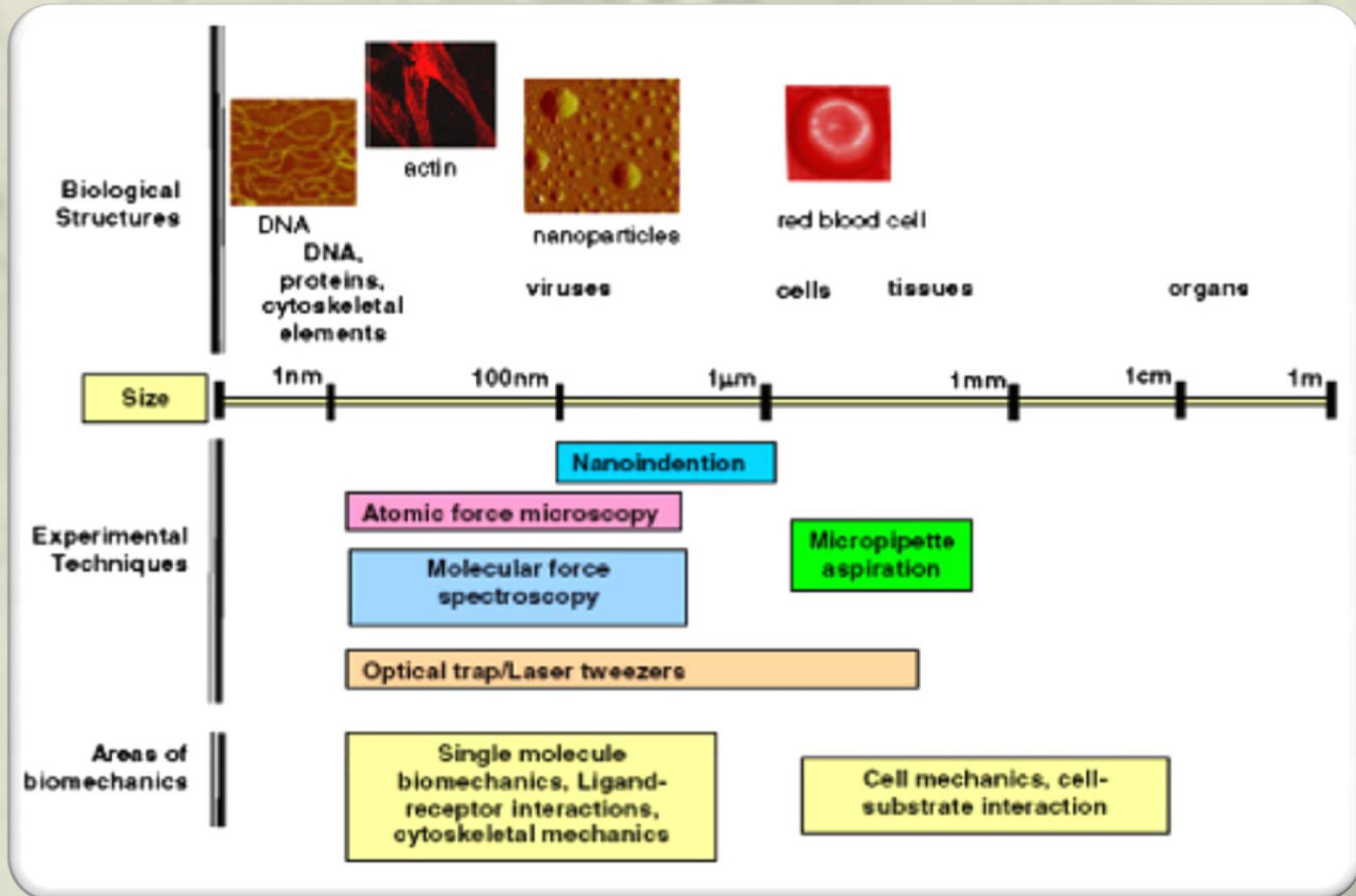


**Εξέλιξη της Νανοτεχνολογίας
(Νανοσκληρομέτρηση)**

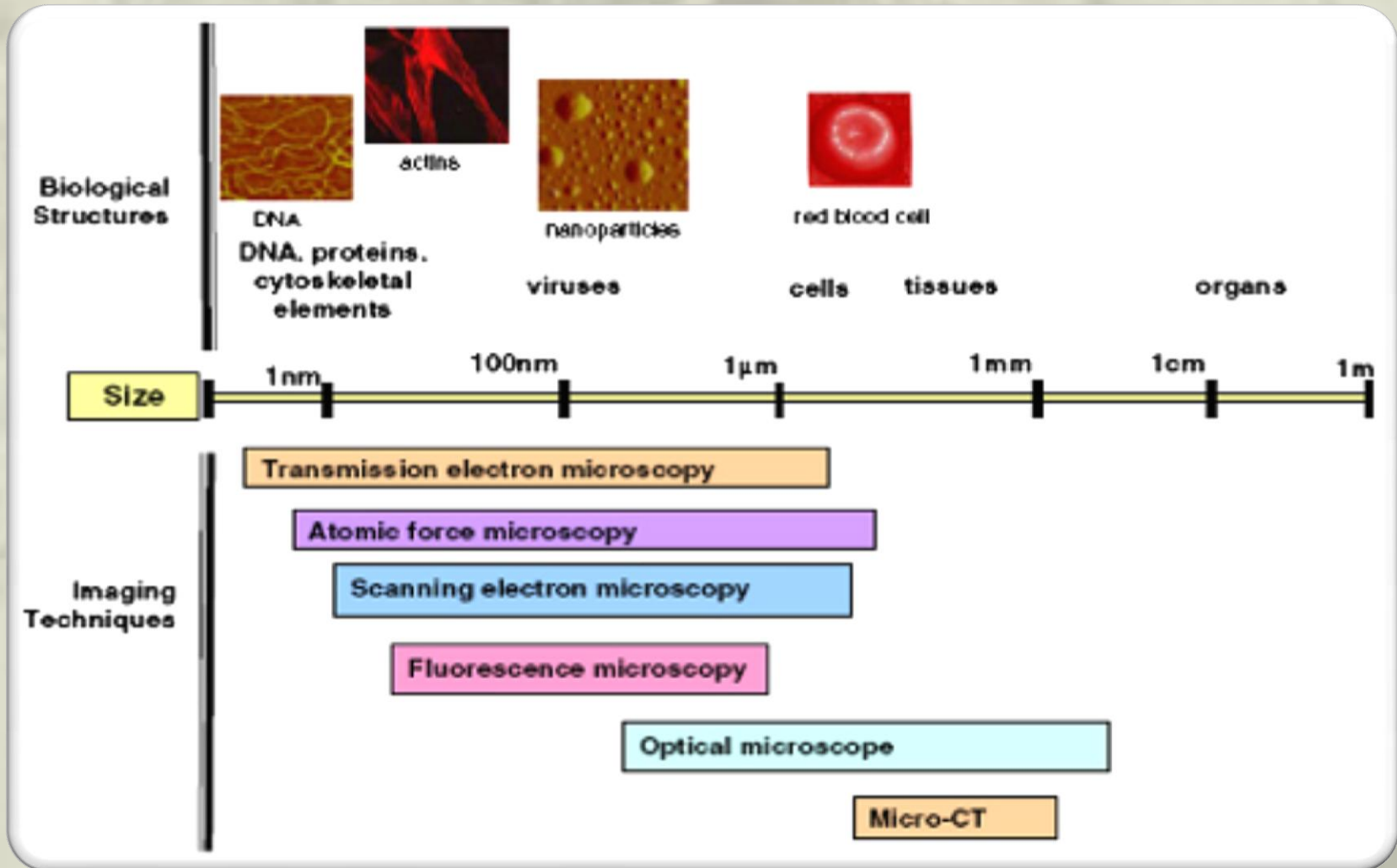


- ✓ Μηχανικό έλεγχο και χειρισμό ξεχωριστών κυττάρων και βιομορίων
- ✓ Εφαρμογή της δοκιμής στο φυσιολογικό περιβάλλον των κυττάρων.

Πειραματικές τεχνικές για τη διεξαγωγή μηχανικών δοκιμών σε ξεχωριστά κύτταρα και βιομόρια



Τεχνικές απεικόνισης που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση φυσικών, βιολογικών και βιοχημικών μεταβολών στις βιολογικές δομές

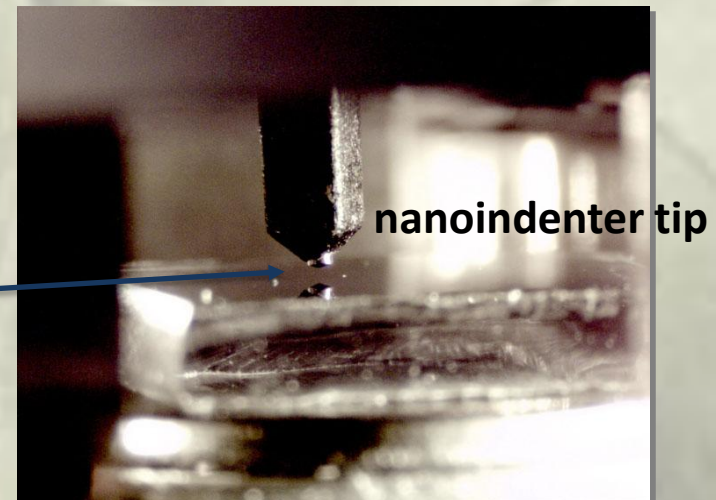
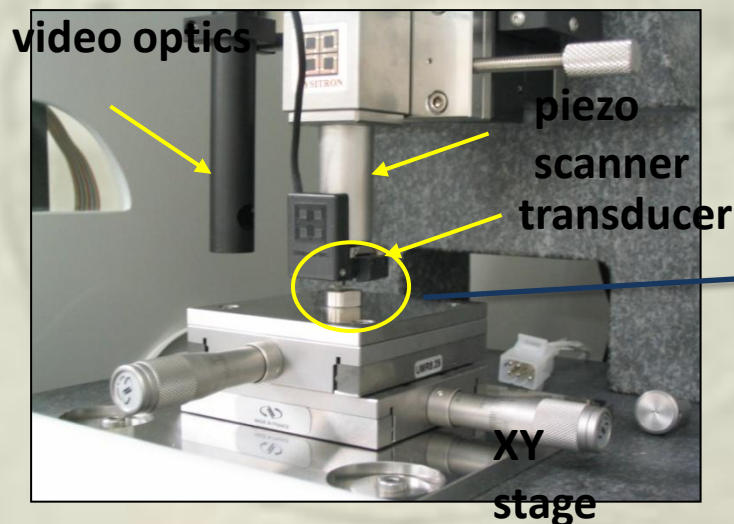


Δυσκολίες μέτρησης μηχανικών ιδιοτήτων των βιολογικών υλικών

- ✓ Ατέλειες της ακίδας του συστήματος μέτρησης
- ✓ Πρόσφυση μεταξύ της ακίδας και του δείγματος
- ✓ Τραχύτητα επιφάνειας δείγματος
- ✓ Υδατικό περιβάλλον μαλακών ιστών
- ✓ Ιξωδοελαστικότητα μαλακής ύλης
- ✓ Απαιτείται διαφορετική βαθμονόμηση της ακίδας και ανάπτυξη εξειδικευμένου πειραματικού πρωτοκόλλου



Διάταξη Νανοσκληρομέτρησης



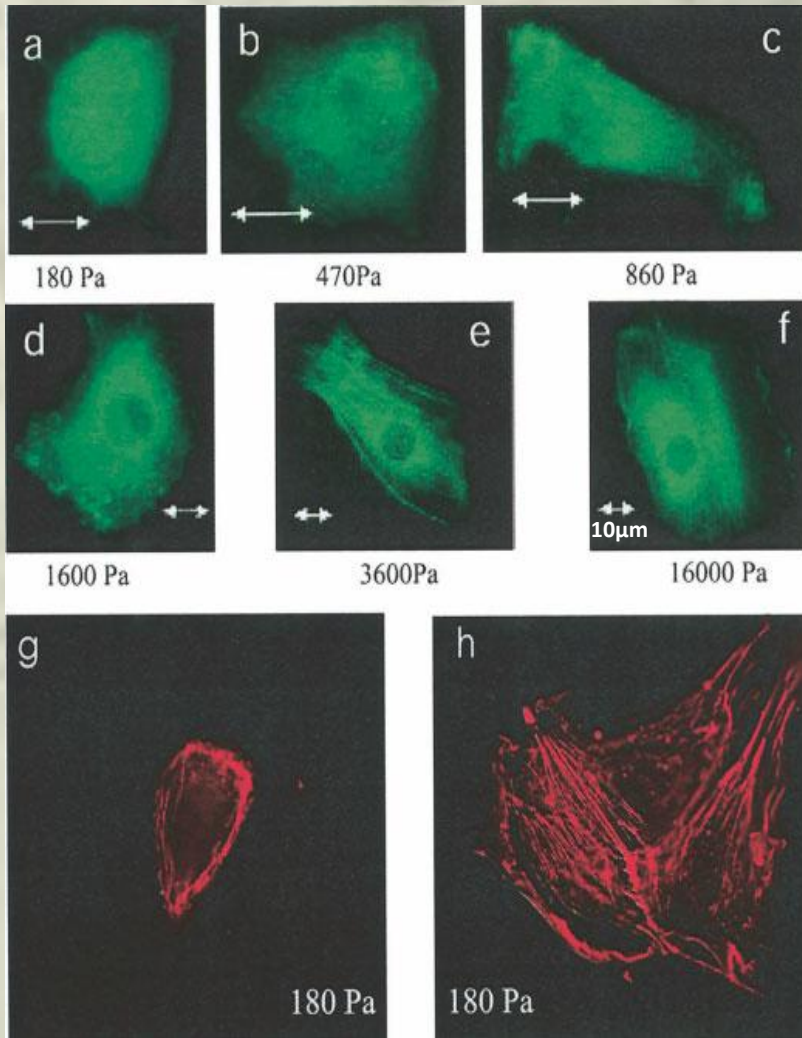
Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης ακίδας-κυττάρου σε διαφορετικές συνθήκες (ex vivo & cytospun)



Μετρίεται μεγαλύτερη ακαμψία του κυττάρου, λόγω της επίδρασης του υποστρώματος.

(a,b) Μετρήσεις στο κέντρο του κύτταρου (ακολουθείται το πρότυπο του Hertz).
(c,d) Μετρήσεις απομακρυσμένες από το κέντρο του κυττάρου (επίδραση του υποστρώματος και το πρότυπο του Hertz είναι ανακριβές).

Επίδραση του υποστρώματος στις μηχανικές ιδιότητες ακτινικών
κυτταροσκελετικών ινοβλαστών



NIH 3T3 ινοβλαστοί τοποθετημένοι σε gel πολυακρυλαμιδίου (PA). Παρατηρείται μεταβολή στην ακαμψία των ινοβλαστών. Στα μαλακότερα υλικά οι ινοβλαστοί δεν παρουσιάζουν τάσεις σε σύγκριση με τα σκληρότερα υλικά

NIH 3T3 ινοβλαστοί σε μαλακά gel με προσθήκη χημικών

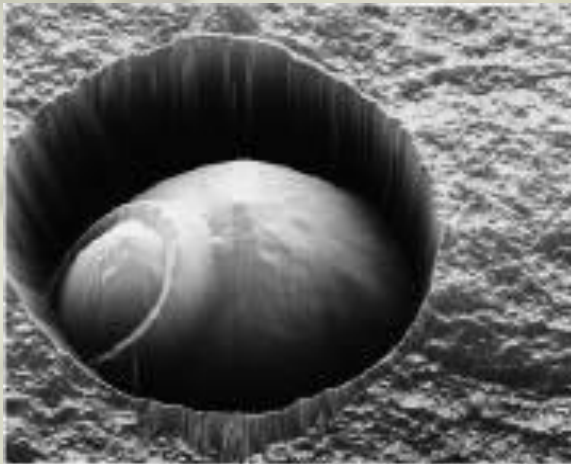
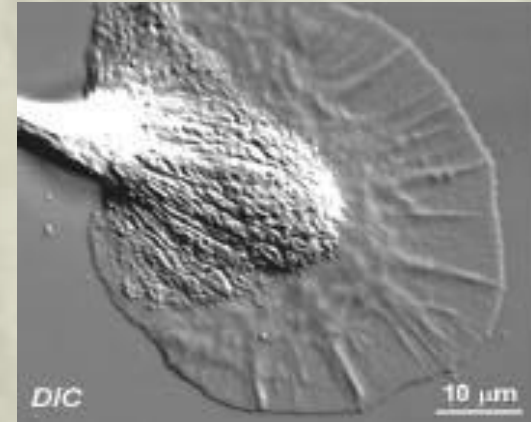
Τρόποι μέτρησης κυττάρων

Τοποθέτηση δείγματος

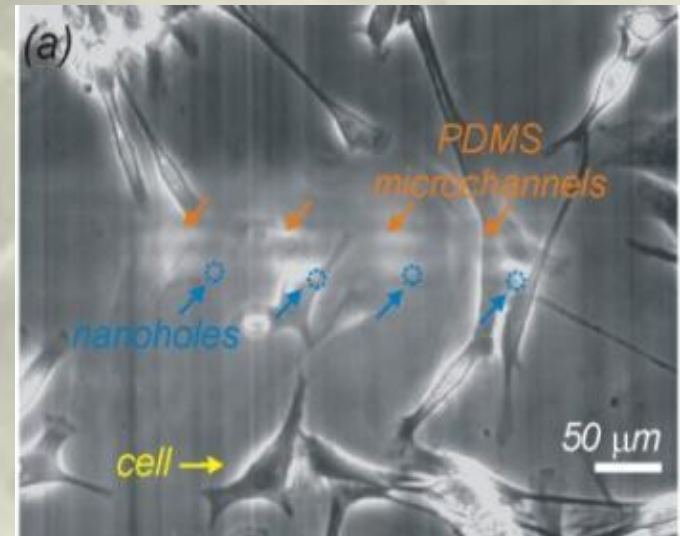
O-ring



Καλλιέργεια κυττάρων πάνω σε πολυμερική μήτρα



Εγκλωβισμός κυττάρων μέσα σε μεμβράνες για να διατηρούν τα κύτταρα σταθερό σχήμα, να πραγματοποιηθεί μέτρηση μηχανικών ιδιοτήτων και να γίνει απεικόνιση των κυττάρων



Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών

Sample type	Elastic modulus (kPa)
Cell	
Living cells	1–100
Rat liver macrophage	1–10
Lung carcinoma cell	13–150
Human platelet	1–50
Embryonic carcinoma cell	3.8
Vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cell	2.5
Chicken cardiocyte	5–200
Endothelial cell	2 (at cell centre)
Fibroblast-like cell	2.23 (at cell centre)
Organelle	
Nuclear region of rat atrial myocytes	500–670
Secretory granules from rat mast cells	37–4300
Stress fibres	200
‘Stable’ edge of a fibroblast	12
Leading edge of a fibroblast	3–5
Pseudo-nucleus of a platelet	4
Cortex of a platelet	50

Παθολόγοι και μη παθολόγοι ιστοί και κύτταρα

Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις οι μηχανικές κυτταρικές ιδιότητες μεταβάλλονται. Ο συσχετισμός αυτών των μεταβολών με αλλαγές των κυτταροσκελετικών χαρακτηριστικών παραμένει ακόμα ασαφής.

Διαφοροποιήσεις μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων έχουν αναφερθεί για:

- ✓ Αγγειακές παθήσεις
- ✓ Παθήσεις των νεφρών
 - ✓ Alzheimer
- ✓ Διαβητικές παθήσεις
- ✓ Καρδιακές παθήσεις.

Η απώλεια ελαστικότητας των ιστών προέρχεται από την ακαμψία της κυτταρικής μήτρας και όχι από τα κύτταρα.

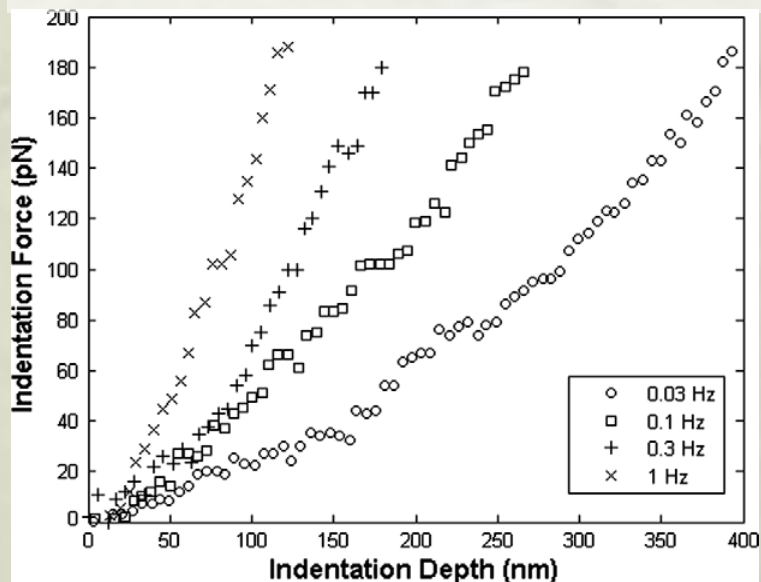
Μέχρι σήμερα λίγες μελέτες έχουν αναφερθεί σε μετρήσεις για την ακαμψία των καρκινικών κυττάρων, η οποία βρέθηκε διαφορετική από των κανονικών κυττάρων. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η κινητικότητα και η διάδοση των καρκινικών κυττάρων μπορεί να ελεγχθεί με εφαρμογή εξωτερικών δυνάμεων.

Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών

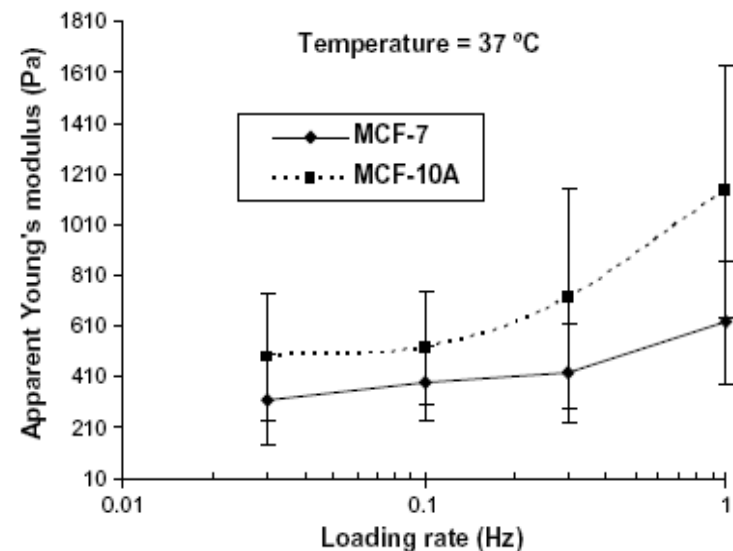
- ✓ Τα μεταστατικά κύτταρα είναι 80% μαλακότερα από τα καλοήθη με διασπορά 6 φορές μικρότερη από αυτή των κανονικών κυττάρων
- ✓ Τα παθογόνα κύτταρα μπορούν να παραμορφωθούν πιο εύκολα και να μεταναστεύσουν σε άλλες περιοχές μέσω της περιβάλλουσας μήτρας του ιστού και μικρών τριχοειδών αγγείων.

Είδος	Μέτρο Ελαστικότητας (kPa)	Ακαμψία (kPa)
Καρκινικά κύτταρα	$0,38 \pm 0,20$	$0,53 \pm 0,10$
Καλοήθη κύτταρα	$2,53 \pm 1,30$	$1,97 \pm 0,70$

Καμπύλες φόρτισης συναρτήσεσι του βάθους διείδυσης για καλοήθη κύτταρα MCF-10A σε διαφορετικού ρυθμούς εφαρμογής φορτίου.



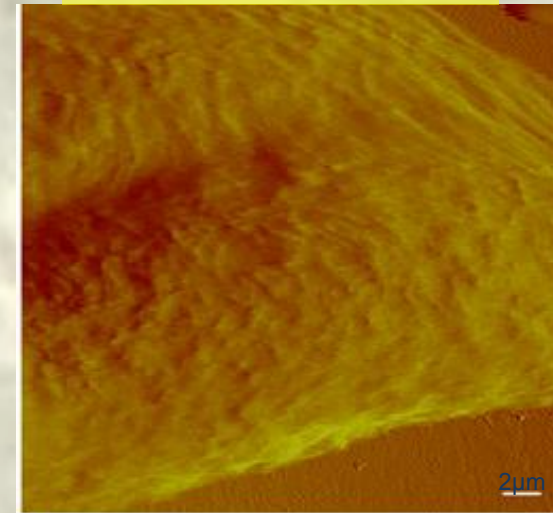
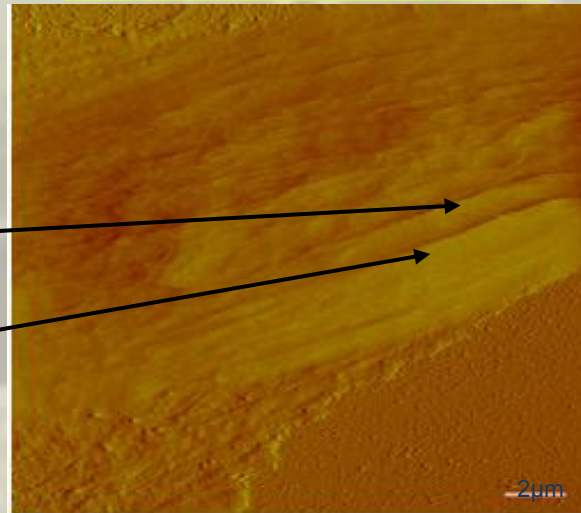
Μέτρου ελαστικότητας συναρτήσεσι του ρυθμού φόρτισης για τους ιστούς MCF-10A (καλοήθης) και MCF-7 (παθογόνος, καρκινικός) στους 37°C.



Νανομηχανικές ιδιότητες κυττάρων και ιστών
Συγκριτικές εικόνες AFM από καλοήθεις και καρκινικό κύτταρο

MCF-10A καλοήθεις κύτταρο

MCF-7 καρκινικό κύτταρο



Stress fibers

συγκρατούν τη δομή του κυττάρου και προσδίδουν τις μηχανικές ιδιότητες τους



Case no.	Age/sex	Cytological diagnosis of pleural fluid	Stiffness(kPa): Tumour	Stiffness(kPa): Normal
1	52/ Female	Positive for m.m. cells	0,56 0,09	2,10 0,79
2	60/ Female	Positive for m.m. cells	0,52 0,12	2,05 0,87
3	49/ Female	Positive for m.m. cells	0,50 0,08	1,93 0,50
4	40/ Male	Negative for m.cells	—	1,86 0,50
5	47/ Male	Negative for m.cells	—	1,75 0,61
6	92/ Female	Negative for m.cells	—	2,09 0,98

**Διαφορετικές περιπτώσεις ασθενών:
 κυττολογική διάγνωση σε σύγκριση με
 τις μηχανικές ιδιότητες**

Where **m.m.**= metastatic malignant and **m.**= malignant.

Συμπεράσματα

Βιοϋλικά

Χρησιμοποιούνται σε ιατρικές διατάξεις/συσκευές, που προορίζονται να αλληλεπιδράσουν με τα βιολογικά συστήματα.

- Πολλές εφαρμογές
- Όλες οι κατηγορίες των υλικών
- Παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιότητες
 - ✓ Μη τοξικό χαρακτήρα
 - ✓ Αντίσταση στη διάβρωση
 - ✓ Βιοσυμβατότητα.
- Αυξημένη ερευνητική δραστηριότητα που στοχεύει στην ανάπτυξη βιοϋλικών που:
 - ✓ Απομακρύνονται από τον οργανισμό
 - ✓ Αποικοδομούνται μέσω βιολογικών διεργασιών
 - ✓ Απορροφούνται χωρίς να εμφανίζεται τοξικότητα.

Κατηγορίες βιοϋλικών

- Νανοσωματίδια (ανόργανοι πυρήνες 15-150nm): χρησιμοποιούνται στη διάγνωση και καταπολέμηση ασθενειών μέσω μεταφοράς φαρμάκων
 - Επιδέχονται επιφανειακή μορφοποίηση
 - Γίνονται άορατα ως προς το ανοσοποιητικό σύστημα
 - Παρουσιάζουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, φαρμακοκινητική και μη τοξική συμπεριφορά για να χρησιμοποιηθούν *in vivo*.

Συμπεράσματα

- Νανοκάψουλες-Μικροκάψουλες (οργανικές σφαίρες): μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντίστοιχα με τα νανοσωματίδια, καθώς επίσης για τη σύνθεση 2D και 3D δομών.
- Ικριώματα (3D δομές): χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια κυττάρων και την ανάπτυξη ιστών (αναγεννητική μηχανική) και πρέπει να παρουσιάζουν: Βιοσυμβατότητα, να παρέχουν θρεπτικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του ιστού και του αγγειακού συστήματος, μηχανική στήριξη και να είναι βιοαποικοδομήσιμα.

Η σωστή ανάπτυξη βιοϋλικών και συστημάτων απαιτεί την ανάπτυξη **μαθηματικών μοντέλων** που θα προσδιορίζουν την αποικοδόμηση του βιοϋλικού και την επίδραση του με το βιολογικό περιβάλλον.

Η ανάπτυξη όμως βιοϋλικών που προορίζονται για αποκατάσταση ιστών, πρέπει να παρουσιάζουν μηχανική στήριξη, άρα απαιτείται η μελέτη των **νανομηχανικών ιδιοτήτων** τους.

Συμπεράσματα

- **Νανοσκληρομέτρηση** (προσδιορίζεται H , E και S): επιτυχής μέθοδος μέτρησης για βιοϋλικά και βιολογικά υλικά (κύτταρα, ιστοί) λόγω της ευαισθησίας της. Μπορεί να προσδιορίσει:
 - ✓ **Επιφανειακές ιδιότητες**: αλληλεπιδράσεις ακίδας-επιφάνειας, προσδιορίζει υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα επιφανειών
 - ✓ **Μηδενικό φορτίο** και πλαστική παραμόρφωση
 - ✓ Πραγματοποιείται παράλληλα **τοπογραφική ανάλυση** της επιφάνειας
 - ✓ Μελετάται η **αντοχή των υλικών**.

Για τη μελέτη των βιολογικών υλικών λόγω της ευαισθησίας τους και της μαλακής συμπεριφοράς τους απαιτείται η ανάπτυξη **πειραματικού πρωτοκόλλου**.

- **Νανοσκληρομέτρηση βιολογικών υλικών**: προσδιορίζονται κυρίως
 - ✓ Ακαμψία (S) και μέτρο ελαστικότητας (E)
 - ✓ Τοπογραφία επιφάνειας
 - ✓ Μεταβολή της κυτταροσκελετικής μεμβράνης
 - ✓ Διαφοροποιήσεις των μηχανικών ιδιοτήτων μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυτταρικών καλλιιεργειών και ιστών
 - ✓ Μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων βιολογικών υλικών που παρουσιάζουν παθογένεια.

Ευχαριστούμε

