

**ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΠΛΑΚΙΔΙΑ ΠΟΛΥ(ΜΕΘΑΚΡΥΛΙΚΟΥ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑ) ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ  
ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΜΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ**

**Α. Κανιούρα<sup>1</sup>, Π. Πέτρου<sup>1</sup>, Δ. Κλέτσας<sup>2</sup>, Α. Τσερέπη<sup>3</sup>, Ε. Γογγολίδης<sup>3</sup>, Μ. Χατζηχρηστίδη<sup>4</sup>,  
Σ. Κακαμπάκος<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας,  
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αγία Παρασκευή, Ελλάδα

<sup>2</sup>Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αγία Παρασκευή, Ελλάδα

<sup>3</sup>Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αγία Παρασκευή, Ελλάδα

<sup>4</sup>Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη,  
Ζωγράφου, Ελλάδα

(\* [skakab@rrp.demokritos.gr](mailto:skakab@rrp.demokritos.gr))

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Πολλές από τις κυτταρικές λειτουργίες όπως η προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση κ.ά., επηρεάζονται άμεσα από το μικροπεριβάλλον των κυττάρων και ιδιαίτερα από τη μικρο/νανοδόμηση των υποστρωμάτων στα οποία καλλιεργούνται. Η μικρο/νανοδόμηση των υποστρωμάτων επιτυγχάνεται με πολλές τεχνικές μεταξύ των οποίων η εγχάραξη με πλάσμα αερίων είναι από τις πλέον υποσχόμενες. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και αξιολόγηση μικρο/νανοδομημένων μέσω εγχάραξης με πλάσμα οξυγόνου πλακιδίων πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) ως προς την επίδρασή τους στην προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη μορφολογία φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με μη κατεργασμένες επιφάνειες PMMA. Η εγχάραξη των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε με πλάσμα οξυγόνου υπό σταθερό δυναμικό αυτοπόλωσης (-100 V) για διαφορετικούς χρόνους κατεργασίας (5-20 min). Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση ήταν φυσιολογικοί ινοβλάστες δέρματος και καρκινικά κύτταρα δέρματος A431. Βρέθηκε ότι οι νανοδομημένες επιφάνειες που παρασκευάστηκαν με 10λεπτη κατεργασία με πλάσμα επηρέασαν αρνητικά τόσο την προσκόλληση όσο και τον πολλαπλασιασμό και τη μορφολογία των φυσιολογικών ινοβλαστών οδηγώντας σε περίπου 50% μείωση του αριθμού των προσκολλημένων στην επιφάνεια κυττάρων μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας σε σύγκριση με τη 1 ημέρα. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα προσκολλούνταν πολύ καλύτερα στις νανοδομημένες επιφάνειες σε σχέση με τις μη κατεργασμένες (~5 φορές), διατηρούσαν αναλλοίωτη τη μορφολογία τους και πολλαπλασιάζονταν σχεδόν ανεμπόδιστα. Βάσει αυτών, οι επιφάνειες που παρασκευάστηκαν με 10λεπτη κατεργασία πλάσματος επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση πειραμάτων συγκαλλιέργειας καρκινικών/φυσιολογικών κυττάρων σε αναλογία 1/50 με στόχο τη μελέτη εμπλουτισμού καρκινικών κυττάρων από μίγματα με φυσιολογικά. Βρέθηκε ότι στις νανοδομημένες επιφάνειες ο εμπλουτισμός των καρκινικών έναντι των φυσιολογικών κυττάρων ήταν κατά ~4 φορές υψηλότερος, σε σύγκριση με εκείνον που παρατηρήθηκε στις μη κατεργασμένες επιφάνειες. Συμπερασματικά, οι νανοδομημένες με πλάσμα οξυγόνου επιφάνειες μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για τον εμπλουτισμό καρκινικών κυττάρων από μίγματα με φυσιολογικά, με σημαντικές εφαρμογές στην εξατομικευμένη θεραπεία.

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται ραγδαία αύξηση της χρήσης της μικρο- και νανο-τεχνολογίας στην κυτταρική βιολογία και γενικότερα στις επιστήμες υγείας, προκειμένου να αναλυθούν οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των κυττάρων με επιφάνειες που λειτουργούν ως υπόστρωμα για την καλλιέργειά τους. Κύρια προϋπόθεση για την υλοποίηση των εφαρμογών αυτών αποτελεί η κατανόηση της επίδρασης του σχήματος και της διάστασης των νανοδομών στα

κύτταρα<sup>[1]</sup>. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί μικρο/νανοδομημένες επιφάνειες που έχουν κατασκευαστεί με διάφορες τεχνικές όπως η οπτική λιθογραφία, η λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων, η αποανάμειξη πολυμερών, η ηλεκτρική περιστροφή και η εγχάραξη με πλάσμα<sup>[2,3]</sup> για τον σχηματισμό τυχαίων ή καθορισμένων δομών (π.χ. κολώνες, αυλάκια, κρατήρες), στις οποίες έχει μελετηθεί η συμπεριφορά τόσο φυσιολογικών όσο και καρκινικών κυττάρων<sup>[4,5]</sup>.

Οι νανοδομημένες επιφάνειες θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα μέσο για τον εμπλουτισμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά από τα φυσιολογικά κύτταρα όταν καλλιεργούνται στο ίδιο υπόστρωμα<sup>[6-8]</sup>. Προς αυτή την κατεύθυνση, ενώ υπάρχει πληθώρα μελετών που εστιάζει στη χρήση νανοδομημένων επιφανειών τροποποιημένων με ειδικά δεσμευτικά μόρια έναντι καρκινικών κυττάρων (όπως αντισώματα ή απταμερή) ως υποστρωμάτων για την επιλεκτική δέσμευση και ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από μίγματα με κύτταρα του αίματος<sup>[9,10]</sup>, υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες σχετικά για τον εμπλουτισμό καρκινικών κυττάρων από μίγματα με φυσιολογικά σε νανοδομημένα υποστρώματα χωρίς τη χρήση ειδικών δεσμευτικών μορίων<sup>[11-13]</sup>. Τέτοιες επιφάνειες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για τον εμπλουτισμό και την απομόνωση καρκινικών κυττάρων από βιοψίες στερεών όγκων ώστε να χρησιμοποιηθούν σε σχήματα εξειδικευμένης θεραπείας<sup>[14]</sup>.

Τα τελευταία χρόνια η ομάδα μας έχει κατασκευάσει επιφάνειες με εγχάραξη πολυμερών σε πλάσμα οξυγόνου, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ελεγχόμενη χημεία και τοπογραφία που ευνοεί την προσκόλληση πρωτεϊνών και κυττάρων<sup>[15-17]</sup>. Με καλλιέργεια αθανатоποιημένων ινοβλαστών ποντικού 3T3 και ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος σε αυτές τις επιφάνειες διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά των δύο τύπων κυττάρων τόσο ως προς την προσκόλληση όσο και ως προς τον πολλαπλασιασμό<sup>[17]</sup>. Με βάση αυτά τα δεδομένα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων δέρματος A431 και φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος σε επίπεδα και κατεργασμένα με πλάσμα οξυγόνου πλακίδια PMMA, με απώτερο στόχο τη διερεύνηση επίτευξης εμπλουτισμού των καρκινικών κυττάρων, με χρήση των επιφανειών αυτών, όταν καλλιεργούνται σε μίγματα με φυσιολογικά.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### Τροποποίηση επιφανειών PMMA με πλάσμα οξυγόνου και χαρακτηρισμός τους:

Πλακίδια PMMA πάχους 2 mm (IRPEN, Ισπανία) υπέστησαν κατεργασία με πλάσμα οξυγόνου σε αντιδραστήρα πλάσματος (MET system, Alcatel-Adixen) υπό τις ακόλουθες συνθήκες: πίεση 0.75 Pa, ισχύς 1800 Watt, ροή οξυγόνου 100 sccm, θερμοκρασία ηλεκτροδίου 15°C και δυναμικό αυτοπόλωσης -100 V. Ο χρόνος κατεργασίας των δειγμάτων ήταν 5, 10, 15 και 20 min. Οι επιφάνειες που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς την τραχύτητά τους με Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (JSM- 7401F SEM, JEOL, Europe). Τα δείγματα παρατηρήθηκαν υπό γωνία 45° και το ύψος των δομών υπολογίστηκε διαιρώντας το ύψος που προσδιορίστηκε από τις εικόνες με το ημίτονο της γωνίας. Οι επιφάνειες χαρακτηρίστηκαν ως προς την υδροφιλικότητά τους με μέτρηση της γωνίας επαφής (Digidrop, GBX).

### Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια κυττάρων:

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί ινοβλάστες δέρματος (Coriell Cell Repositories, Νιου Τζέρσεϋ, ΗΠΑ) και καρκινικά κύτταρα δέρματος A431 (ATCC, Βιρτζίνια, ΗΠΑ). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες με θρεπτικό υλικό (DMEM, Biochrom, Γερμανία), στο οποίο είχε προστεθεί 10% (ο/ο) εμβρυϊκός ορός βοός, 2 mM L-γλουταμίνη και 1% (ο/ο) πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, σε κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% CO<sub>2</sub> και κορεσμένη με υγρασία ατμόσφαιρα. Όταν το 80-90% του πυθμένα της φλάσκας καλύφθηκε από κύτταρα, τα προσκολλημένα κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη-EDTA (Biochrom, Γερμανία) και προσδιορίστηκε ο πληθυσμός τους με αιματοκυτταρόμετρο. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε

διάλυμα συγκέντρωσης 15000 κύτταρα/mL σε θρεπτικό υλικό και 200 μl αυτού του διαλύματος προστέθηκαν στις αποστειρωμένες με UV επιφάνειες PMMA στις οποίες είχε τοποθετηθεί ανοιχτού πυθμένα ελαστομερής μάσκα 12 φρεατίων (μ-slide, ibidi, Γερμανία). Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων για 1 και 3 ημέρες. Για τις συγκαλλιέργειες παρασκευάστηκε μίγμα καρκινικών/φυσιολογικών κυττάρων σε αναλογία 1/50 διατηρώντας την συγκέντρωση των φυσιολογικών κυττάρων στα 15000 κύτταρα/mL και ακολούθησε καλλιέργεια στις υπό εξέταση επιφάνειες όπως παραπάνω.

#### Καταμέτρηση του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων σε μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες και παρατήρηση της μορφολογίας τους:

Μετά την καλλιέργεια, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με PBS για την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων, και τα προσκολλημένα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με επώαση με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (Appllichem, Μέριλαντ, ΗΠΑ) 4% (β/ο) σε PBS για 15 min. Ακολούθησε έκπλυση των επιφανειών με PBS 3 φορές επί 2 min και επώαση με διάλυμα 0.1% (ο/ο) Triton X-100 επί 10 min. Μετά από έκπλυση με PBS, οι επιφάνειες επώασθησαν με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας (5% (β/ο) βόειος οραλβουμίνη σε PBS 100 mM, pH 7,4). Έπειτα, τα κύτταρα επώασθησαν με διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού κατά των κυτταροκερατινών 8,18 (anti-CK 8,18, Acris, Ολλανδία) συγκέντρωσης 2 μg/ml σε διάλυμα αποκλεισμού επί 1,5 h και ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με μίγμα διαλύματος φαλλοϊδίνης επισημασμένης με την φθορίζουσα ουσία Atto 488 (Sigma Aldrich, Γερμανία) συγκέντρωσης 100 nM, για χρώση του κυτταροσκελετού όλων των κυττάρων, και αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού επισημασμένο με την φθορίζουσα CF-594 (Biotium, Καλιφόρνια, ΗΠΑ) συγκέντρωσης 5 μg/ml σε διάλυμα αποκλεισμού, για 1 h. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS επί 2 min και χρώση του πυρήνα των κυττάρων μέσω επώασης με διάλυμα DAPI (Sigma Aldrich, Γερμανία) συγκέντρωσης 150 ng/mL σε PBS για 10 λεπτά. Τέλος, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με PBS, τοποθετήθηκε μία σταγόνα p-φαινυλενοδιαμίνης για προστασία των φθορίζοντων ουσιών από αποχρωματισμό (bleaching), καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Χρησιμοποιώντας ειδικά ζεύγη φίλτρων διέγερσης/εκπομπής για τις φθορίζουσες ουσίες (365/420 nm για το DAPI, 493/520 nm για τη φθορίζουσα Atto 488 και 598/615 nm για τη φθορίζουσα CF 594) ελήφθησαν φωτογραφίες για την ίδια περιοχή κάθε επιφάνειας οι οποίες συνδυάστηκαν μέσω του λογισμικού Image Pro Plus v 6.0.

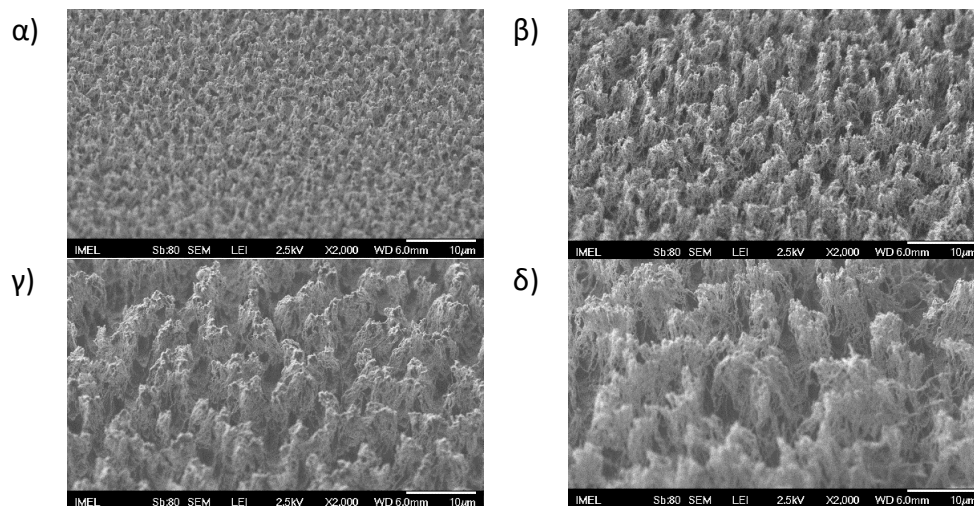
#### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

##### Χαρακτηρισμός μικρο/νανοδομημένων επιφανειών:

Οι επιφάνειες PPMA που κατασκευάστηκαν με κατεργασία σε πλάσμα οξυγόνου χαρακτηρίστηκαν ως προς την τραχύτητά τους μέσω εικόνων SEM (Σχ. 1). Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του χρόνου κατεργασίας σχηματίζονται νανοκολώνες αυξανόμενου ύψους. Αναλυτικά, το ύψος των κολόνων αυξάνεται από τα 2,7 στα 5,4, 9,0 και 13 μm μετά από χρόνο κατεργασίας 5, 10, 15 και 20 min, αντίστοιχα, ενώ το πλάτος τους είναι της τάξης των νανομέτρων. Επιπλέον, παρατηρείται σύνθετη τοπογραφία, η οποία συνδυάζει ιεραρχικές δομές της τάξεως των μικρομέτρων με δομές της τάξεως των νανομέτρων.

Όσον αφορά την υδροφιλικότητα των επιφανειών, είναι γνωστό ότι η κατεργασία με πλάσμα αυξάνει την υδροφιλικότητά τους ενώ με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται σταδιακή επαναφορά της γωνίας επαφής σε τιμές που προσεγγίζουν αυτή της μη κατεργασμένης επιφάνειας (γήρανση), η οποία στην περίπτωση του PMMA είναι 67°. Πράγματι αμέσως μετά την κατεργασία με πλάσμα οξυγόνου, η γωνία επαφής όλων των επιφανειών ήταν περίπου 0° και διατηρήθηκε σε τιμές <10° για διάστημα 1 μήνα. Δεδομένου ότι από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό, ότι η προσκόλληση των κυττάρων δεν ευνοείται σε υπερυδροφίλες επιφάνειες (γωνίες επαφής <20°)<sup>[18]</sup>, πραγματοποιήθηκε θερμική ανόπτηση των κατεργασμένων με πλάσμα πλακιδίων, η οποία έχει

δειχθεί ότι επιταχύνει τη γήρανση των κατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών<sup>[16]</sup>. Για τον σκοπό αυτό, τα πλακίδια αμέσως μετά την κατεργασία τους στο πλάσμα υποβλήθηκαν σε θέρμανση στους 110°C επί 1 ώρα. Ακολούθησε μέτρηση της γωνίας επαφής και βρέθηκε ότι ανεξαρτήτως του χρόνου κατεργασίας στο πλάσμα, η γωνία επαφής σταγόνας νερού ήταν σχεδόν ίδια με αυτή του ακατέργαστου PMMA. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή η χρησιμοποίηση των κατεργασμένων πλακιδίων ως υποστρωμάτων για καλλιέργεια κυττάρων αμέσως μετά την κατεργασία με πλάσμα.

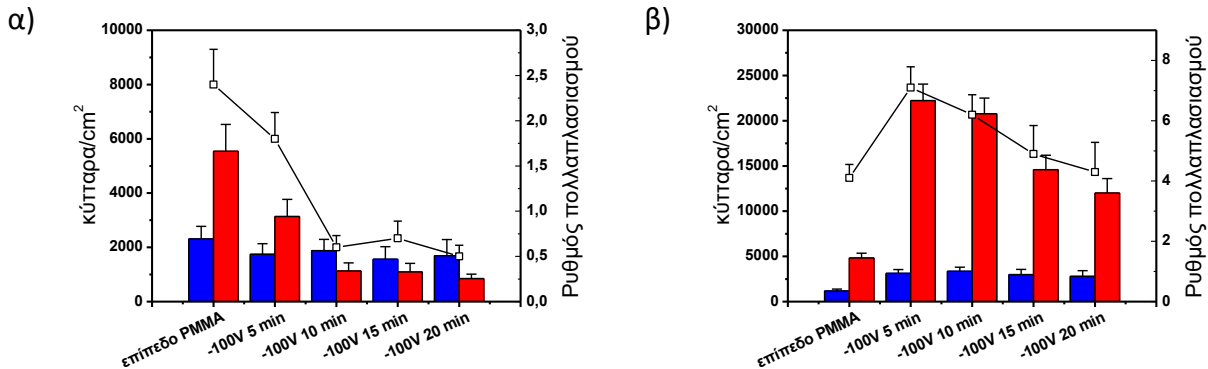


**Σχήμα 1.** Εικόνες SEM από πλακίδια PMMA που έχουν υποστεί κατεργασία με πλάσμα  $O_2$  σε δυναμικό -100 V για: α) 5, β) 10, γ) 15 και δ) 20 min. Όλες οι εικόνες έχουν ληφθεί υπό γωνία 45° και μεγέθυνση 2000.

#### Προσκόλληση και ανάπτυξη φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες:

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση της τοπογραφίας των πλακιδίων PMMA στην προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό φυσιολογικοί ινοβλάστες δέρματος και καρκινικά κύτταρα δέρματος A431 (15000 κύτταρα/mL) καλλιεργήθηκαν σε επίπεδα πλακίδια PMMA καθώς και σε πλακίδια κατεργασμένα με πλάσμα οξυγόνου με δυναμικό -100 V επί 5, 10, 15 και 20 min, για 1 και 3 ημέρες. Στο Σχ. 2 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των ινοβλαστών δέρματος (Σχ. 2α) και των καρκινικών κυττάρων A431 (Σχ. 2β) ανά μονάδα επιφάνειας μετά από 1 και 3 ημέρες καλλιέργειας. Από το Σχ. 2α προκύπτει, ότι μετά από 1 ημέρα καλλιέργειας το ποσοστό των ινοβλαστών δέρματος που προσκολλήθηκε στα επίπεδα πλακίδια PMMA ως προς τον ολικό αριθμό των κυττάρων ήταν ~43%, ενώ στις τραχείες επιφάνειες, το ποσοστό αυτό κυμαίνονταν από 30-35%. Μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας, ο αριθμός των προσκολλημένων ινοβλαστών δέρματος αυξήθηκε κατά 2,4 και 1,8 φορές στις επίπεδες επιφάνειες και στις επιφάνειες που είχαν κατεργαστεί με δυναμικό -100 V επί 5 min, αντίστοιχα, σε σχέση με τη 1 ημέρα καλλιέργειας. Αντίθετα, στα πλακίδια που είχαν υποστεί κατεργασία με πλάσμα με δυναμικό -100 V για χρόνους 10, 15 και 20 min παρατηρείται μείωση του αριθμού των προσκολλημένων ινοβλαστών κατά 30 έως 50%, μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας συγκριτικά με τη 1 ημέρα. Όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα A431, διαπιστώθηκε ότι μετά από 1 ημέρα καλλιέργειας στα επίπεδα πλακίδια PMMA προσκολλήθηκε το 22% των κυττάρων. Στα κατεργασμένα με πλάσμα οξυγόνου πλακίδια PMMA με δυναμικό -100 V επί 5 και 10 min, προσκολλήθηκε το 58 και 63% των κυττάρων αντίστοιχα, ενώ στα πλακίδια που είχαν κατεργαστεί για 15 και 20 min, το ποσοστό δέσμευσης ήταν 52 και 55%, αντίστοιχα. Μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας, στα επίπεδα πλακίδια τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν 4 φορές συγκριτικά με τη 1 ημέρα καλλιέργειας, ενώ στα κατεργασμένα με δυναμικό -100 V για 5 και 10 min πλακίδια, ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων ήταν 7 και 6 φορές μεγαλύτερος, αντίστοιχα, σε σχέση με τη 1 ημέρα καλλιέργειας. Τέλος στα πλακίδια που είχαν κατεργαστεί για 15 και 20 min, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ήταν ~4,5. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν τα πλακίδια που είχαν κατεργαστεί με

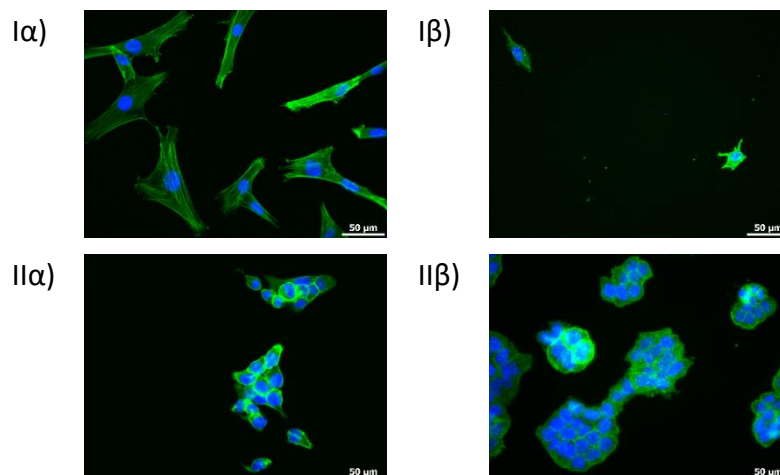
δυναμικό -100 V επί 10 min για περαιτέρω πειράματα, καθώς ευνοούσαν την προσκόλληση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ ανέστειλαν την ανάπτυξη των φυσιολογικών σε σχέση με τις επίπεδες.



**Σχήμα 2.** Μέσος αριθμός προσκολλημένων α) φυσιολογικών ινοβλαστών και β) καρκινικών κυττάρων A431, ανά μονάδα επιφάνειας, σε επίπεδα και κατεργασμένα με πλάσμα O<sub>2</sub> πλακίδια PMMA μετά από 1 (μπλε στήλες) και 3 (κόκκινες στήλες) ημέρες καλλιέργειας. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στον μέσο όρο 5 μετρήσεων ±SD.

#### Επίδραση της τοπογραφίας στη μορφολογία φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων:

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της τοπογραφίας των τραχειών επιφανειών που επιλέχθηκαν (-100 V, 10 min) στη μορφολογία των δύο ειδών κυττάρων σε σύγκριση με τις επίπεδες.



**Σχήμα 3.** Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού I) φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος και II) καρκινικών κυττάρων A431 που έχουν καλλιεργηθεί σε: α) επίπεδες και β) κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες PMMA (πράσινο χρώμα: κυτταροσκελετός, μπλε χρώμα: πυρήνας). Το μήκος της μπάρας είναι 50 μm.

Στο σχήμα 3 παρέχονται φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος (Σχήμα 3I) και καρκινικών κυττάρων A431 (Σχήμα 3II) έπειτα από καλλιέργεια επί 3 ημέρες. Παρατηρείται ότι οι ινοβλάστες δέρματος παραμορφώθηκαν και συρρικνώθηκαν στις τραχείες επιφάνειες ενώ δεν επηρεάστηκε η μορφολογία των καρκινικών.

#### Συγκαλλιέργεια καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων στα πλακίδια PMMA:

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκαλλιέργεια φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων στις τραχείες και στις επίπεδες επιφάνειες. Η αρχική αναλογία καρκινικών προς φυσιολογικά κύτταρα ήταν 1/50 και οι χρόνοι καλλιέργειας 1 και 3 ημέρες. Διαπιστώθηκε ότι στις τραχείες επιφάνειες επετεύχθη εμπλουτισμός των καρκινικών κυττάρων 5.5 και 47.3 φορές, μετά από 1 και 3 ημέρες καλλιέργειας, αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές εμπλουτισμού για τις επίπεδες επιφάνειες ήταν 0.8 και 14.6 φορές, αντίστοιχα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τραχείες επιφάνειες PMMA που κατασκευάστηκαν μέσω εγχάραξης με πλάσμα οξυγόνου με δυναμικό -100 V επί 10 min ανέστειλαν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος και επηρέασαν σημαντικά τη μορφολογία τους ενώ δεν επηρέασαν τα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, με χρήση αυτών των επιφανειών επετεύχθη 4 φορές μεγαλύτερος εμπλουτισμός των καρκινικών κυττάρων όταν βρίσκονται σε μίγμα με φυσιολογικά, σε σύγκριση με τις επίπεδες.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «Ανάπτυξη των ερευνητικών δραστηριοτήτων του ΙΠΡΕΤΕΑ στο πλαίσιο της εθνικής στρατηγικής έρευνας και τεχνολογίας για την έξυπνη εξειδίκευση» (MIS 5002559) που εντάσσεται στη «Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ε.Ε.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A.V. Singh, R. Patil, D. K. Thombre, W.N. Gade. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101 (2013) 3019-3032.
- [2] A. Tserepi, E. Gogolides, A. Bourkoulas, A. Kanioura, G. Kokkoris, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos. *Plasma Chem. Plasma Proc.* 36 (2016) 107-120.
- [3] H.J. Yoon, M. Kozminsky, S. Nagrath. *ACS Nano* 3 (2014) 1995-2017.
- [4] K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazoni, M. Liley, L. Ploux. *Acta Biomater.* 6 (2010) 3824-3846.
- [5] S. Di Cio, J.E. Gautrot. *Acta Biomater.* 30 (2016) 26-48.
- [6] D. D. Ning, B. Duong, G. Thomas, Y. Qiao, L.Y. Ma, Q. Wen, M. Su. *Langmuir* 32 (2016) 2718-2723.
- [7] M. Islam, A. Sajid, M.A.I. Mahmood, M.M. Bellah, P.B. Allen, Y.T. Kim, S.M. Iqbal S M. *Nanotechnology* 26 (2015) 225101.
- [8] N. Koufaki, A. Ranella, K.E. Aifantis, M. Barberoglou, S. Psycharakis, C. Fotakis, E. Stratakis. *Biofabrication* 3 (2011) 045004.
- [9] S. Nagrath, L.V. Sequist, S. Maheswaran, D.W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M.R. Smith, E.L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U.J. Balis, R.G. Tompkins, D.A. Haber, M. Toner. *Nature* 450 (2007) 1235-1210.
- [10] Y.F. Huang, H.T. Chang, W.H. Tan. *Anal. Chem.* 80 (2008) 567-572.
- [11] K.W. Kwon, S.S. Choi, S.H. Lee, B. Kim, S.N. Lee, M.C. Park, P. Kim, S.Y. Hwang, K.Y. Suh. *Lab Chip* 7 (2007) 1461-1468.
- [12] Y. Wan, M. Winter, B. Delalat, J.E. Hardingham, P.K. Grover, J. Wrin, N.H. Voelcker, T.J. Price, B. Thierry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 20828-20836.
- [13] W.Q. Chen, S.N. Weng, F. Zhang, S. Allen, X. Li, L.W. Bao, R.H.W. Lam, J.A. Macoska, S.D. Merajver, J.P. Fu. *ACS Nano* 7 (2013) 566-575.
- [14] I. Turin, R. Schiavo, M. Maestri, O. Luinetti, B. Dal Bello, M. Paulli, P. Dionigi, M. Roccio, A. Spinillo, F. Ferulli, M. Tanzi, R. Maccario, D. Montagna, P. Pedrazzoli. *Med. Sci.* 2 (2014) 70-81.
- [15] K. Tsougeni, G. Koukouvinos, P.S. Petrou, A. Tserepi, S.E. Kakabakos, E. Gogolides. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2757-2764.
- [16] K. Tsougeni, P.S. Petrou, K. Awsuik, M.M. Marzec, N. Ioannidis, V. Petrouleas, A. Tserepi, S.E. Kakabakos, E. Gogolides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 14670-14681.
- [17] A. Bourkoulas, V. Constantoudis, D. Kontziampasis, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, A. Tserepi, E. Gogolides. *E. J. Phys. D* 49 (2016) 30.
- [18] T.J. Ko, E. Kim, S. Nagashima, K.H. Oh, K.R. Lee, S. Kim S, M.W. Moon. *Soft Matter* 9 (2013) 8705-8711.