

Roman SZAFRAN

e-mail: roman.szafran@pwr.wroc.pl

Zakład Inżynierii Chemicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Metodyka projektowania mikroaparatury *lab-on-a-chip* do badań przepływów w naczyniach włosowatych guzów nowotworowych

Wstęp

Mikrosystemy LOC (*Lab-On-a-Chip*) są coraz częściej wykorzystywane w biotechnologii, inżynierii chemicznej i bioprosesowej. Obecnie istnieje pilna potrzeba standaryzacji i unifikacji procesu projektowania i wytwarzania mikroukładów oraz jego dostosowania do wymogów produkcji seryjnej poprzez automatyzację oraz opracowanie narzędzi projektowania procesowego. Szansę na to stwarzają metody bezpośrednio DLP (*Direct Laser Prototyping*), korzystające z dobrze znanych narzędzi CAD do projektowania mikrostruktur. Gruntowna wiedza i doświadczenie specjalistów z inżynierii chemicznej i procesowej z obszaru mechaniki płynów, wymiany ciepła i masy, reakcji chemicznych, biotechnologii oraz projektowania i przenoszenia skali predestynuje ich do odegrania kluczowej roli w rozwoju nowej dziedziny nauki – mikroinżynierii chemicznej [Chow, 2002].

Coraz częściej pojawiają się doniesienia na temat wykorzystania LOC w inżynierii biomedycznej, w doświadczeniach biochemicznych związanych z neowaskularyzacją i rozwojem chorób nowotworowych. Na poziomie komórkowym najczęściej są to symulacje związane z badaniem komórek śródbłonna, które tworzą naczynia krwionośne.

Khan i Sefton [2011] opracowali mikrosystem, w którym badano wpływ odkształceń związanych z naprężeniami ścinającymi i zaburzeniami przepływu krwi na fenotyp komórek śródbłonna. Związane jest to ze wzmoczoną aktywnością komórek (identyfikowaną poprzez wzrost konkretnych czynników) podczas tych zjawisk. Cechy i fenotyp śródbłonna są istotne podczas takich procesów jak angiogeneza, czy przyjmowanie przez organizm przeszczepu i dlatego znalazły się w strefie zainteresowań badaczy. Dla potrzeb eksperymentu, przy użyciu fotolitografii, zbudowano mikrosystem, gdzie PDMS opłaszczono kulturą komórkową. Wykazano w nim, że zgodnie z założeniem wpływ wyżej wymienionych czynników jest związany z cechami komórek.

Jeong i in. [2011] przeprowadzili symulację migracji komórek śródbłonna przez sztucznie utworzoną macierz zewnątrzkomórkową w trójwymiarowym układzie LOC. Jest to zjawisko zachodzące podczas fizjologicznych i patofizjologicznych procesów takich jak angiogeneza, metastaza guza nowotworowego, czy gojenie się ran. Mikroukładzenie preparowano techniką miękkiej litografii. Sztuczne mikrokanaly opłaszczano mieszaniną kolagenu i kwasu hialuronowego. Po opłaszczeniu, przeprowadzono na jego powierzchni hodowlę ludzkich komórek śródbłonna pochodzących z żyły pępowinowej HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Dzięki temu zaindukowano proces proliferacji komórek, ich kielkowanie i migrację. Nie zaobserwowano jednak wzrostu naczyń (angiogenezy). Tak skonstruowany, trójwymiarowy system może służyć jako idealne pole dla badań rozwoju i ruchu komórek.

Układy LOC można też z powodzeniem wykorzystywać do badań nad komórkami nowotworowymi. Chaw i in. [2007] zbudowali chip z mikrokanalami pokrytymi matrycelem (polimer stworzony z białek i żelatyny) i opłaszczonymi komórkami HMVEC. Następnie przez układ przepuszczano komórki nowotworowe pochodzące z ludzkich linii raka piersi, wątroby i szyjki macicy. Przeprowadzono wizualizację mikroskopową zachodzących w mikrosystemie procesów. Badano oddziaływanie pojedynczych komórek nowotworowych z komórkami śródbłonna wyścielającymi sztuczne naczynia. Układ umożliwiał obserwację transmigracji, deformacji i adhezji tych komórek.

Sposób przemieszczania się i adhezję komórek nowotworowych badano też w innym mikrosystemie wykonanym metodami fotolitograficznymi. W ramach badań określono wpływ geometrii układu na przepływy komórek czerniaka w sztucznie utworzonych naczyniach.

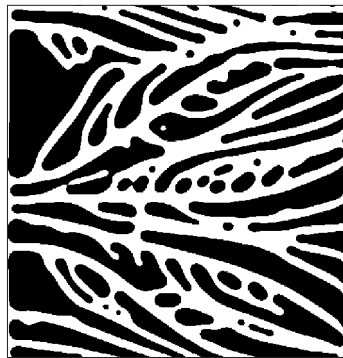
Dzięki badaniom udowodniono, że ma ona wpływ na adhezję komórkową [Ishikawa i in., 2011].

Dotychczasowe badania prowadzone były w układach LOC wytwarzanych metodami litograficznymi, a nie prowadzono badań nad zastosowaniem metody bezpośredniego grawerowania laserowego (DLP) do konstrukcji mikroaparatury biomedycznych do badań nad neowaskularyzacją. Metoda DLP szerzej opisana w pracy [Szafran, 2013] umożliwia bezpośrednie przeniesienie projektowanej struktury ze środowiska graficznego oprogramowania CAD na materiał konstrukcyjny chipa, najczęściej PDMS, w którym grawerowane są mikrokanaly. Ułatwia to wykorzystanie metod numerycznych (symulacji komputerowych) w projektowaniu układu kanałów, a następnie przeniesienie opracowanej struktury do środowiska CAD, skąd jest ona eksportowana do stacji grawerującej i przenoszona za pomocą wiązki laserowej na materiał konstrukcyjny chipa.

Celem badań było opracowanie struktury kanałów odpowiadającej strukturze naczyń włosowatych guza nowotworowego, następnie opracowanie układu LOC do badań przepływów w tej strukturze oraz fabrykacja zaprojektowanego systemu z wykorzystaniem metody DLP.

Modelowanie matematyczne procesu angiogenezy nowotworowej

W badaniach zdecydowano się na użycie do celów projektowych modelowej sieci naczyń krwionośnych. Strukturę naczyń włosowatych, na podstawie której wykonano projekt, uzyskano z modelu opracowanego przez Travasso i in. [2011]. Jest to wieloskalowy model pól fazowych (*multi-scale phase-field model*). Łączy on zalety opisów fizyki ośrodków ciągłych z możliwością śledzenia ruchu pojedynczych komórek śródbłonna posiadających wypustki. Wykorzystano go do charakterystyki dynamiki wzrostu i oddziaływania pomiędzy strukturą komórek nowotworowych a tworzącymi się naczyniami włosowatymi. Model pola fazowego śledzi pozycję kapilar, a parametry w nim użyte (takie jak skala proliferacji, szybkość komórek i stała dyfuzji) mogą być odniesione do wartości mierzonych doświadczalnie. Do modelu wprowadzono składnik losowy, którym ujęto wewnątrzkomórkową regulację genów odpowiedzialną za aktywację wypustkowego fenotypu komórki śródbłonna. Model uwzględniał także zjawisko anastomoz, czyli łączenia się szybko rosnących naczyń w jedno. Strukturę 2D naczyń włosowatych guza nowotworowego wykorzystaną w dalszych etapach badań przedstawiono na rys. 1.

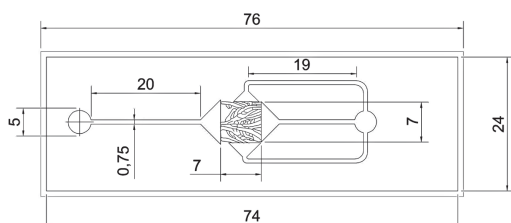


Rys. 1. Modelowa struktura naczyń włosowatych guza nowotworowego. [Travasso i in., 2011]

Metodyka projektowania i fabrykacji

Na podstawie struktury przedstawionej na rys. 1 w pierwszej kolejności stworzono wektorową mapę kanałów w programie *Autodesk Au-*

toCAD, którą następnie uzupełniono o sieć kanałów doprowadzających oraz odprowadzających płyn ze struktury sieci naczyń włosowatych. Kanały doprowadzające i odprowadzające miały połączenie z portami umieszczonymi w płytce nakrywkowej chipa, umożliwiającymi przyłączenie kapilar zasilających mikrochip. Strukturę kanałów układu LOC przedstawiono na rys. 2. Zaprojektowaną strukturę wyeksportowano do środowiska pracy stacji grawerującej. Zgodnie z opracowaną procedurą, zaprezentowaną w pracy [Szafran, 2013], strukturę przenoszono na materiał kompozytowy otrzymany przez naniesienie PDMS na folię poliestrową.



Rys. 2. Budowa mikrochipa

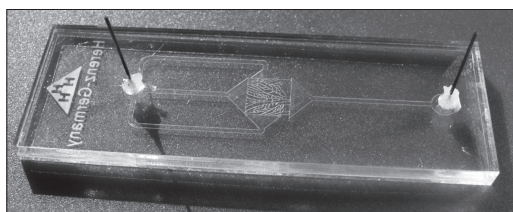
Folia poliestrowa stanowiła podłoże dla warstwy PDMS o grubości 100 μm , w którym grawerowano strukturę kanałów, umożliwiając jednocześnie pełne zachowanie geometrii wygrawerowanej struktury przy przenoszeniu na nowe podłoże. Zoptymalizowane parametry pracy stacji grawerującej wykorzystywane w procesie grawerowania były następujące: moc: 3 W, szybkość przesuwu głowicy laserowej: 1 mm/s, częstotliwość impulsu: 1000 PPI, nadmuch boczny na miejsce grawerowane.

Zgodnie z opracowaną procedurą [Szafran, 2013] po grawerowaniu struktura była trzykrotnie myta w izopropanolu, w myjce ultradźwiękowej, każdorazowo przez okres 1 minuty. Po wysuszeniu w warunkach pokojowych, powierzchnia PDMS była naświetlana lampą UV o długości fali 185 nm i 253,7 nm przez okres 1 min, po czym niezwłocznie łączona z nowym podłożem – mikroskopowym szkiełkiem podstawowym. Po dociśnięciu warstw przez okres 10 minut zdejmowano warstwę wierzchnią – folię poliestrową, pozostawiając warstwę wygrawerowanego PDMS trwale przyłączoną do powierzchni szkła.

Następnie płytkę nakrywkową wykonaną z PMMA z wyciętymi otworami na wprowadzenie kapilar zasilających, naświetlano pod lampą UV wraz z warstwą PDMS przez okres 1 min, po czym elementy łączono, dociskano i pozostawiano na okres 1 h w celu trwałego złączenia. Ostatnią czynnością było wklejenie stalowych kapilar pełniących rolę portów przyłączeniowych dla polipropylenowych kapilar doprowadzających płyn do układu.

Wyniki badań doświadczalnych

Na rys. 3 przedstawiono opracowany układ LOC do badań przepływu płynu w sieci naczyń włosowatych guzów nowotworowych.



Rys. 3. Układ LOC skonstruowany do badań przepływów płynów w sieci naczyń włosowatych guzów nowotworowych

Montaż mikrosystemu pozwolił na sprawdzenie przepustowości całego układu i drożności pojedynczych kanałów. W tym celu do układu wprowadzano błękit metylenowy, który pozwalał na dokładne uwidocznienie wszystkich mikrokanalów (Rys. 4). Niektóre elementy struktury, w szczególności odgałęzienia kanałów nie zawsze były prawidłowo połączone z resztą struktury, w efekcie tworzyły się nieciągłości przepływu.

Po obserwacji mikroskopowej wykonano korektę projektu w *Auto-Cadzie*. Polegała ona na delikatnym przeciąganiu polilinii poza miejsce skrzyżowania kanałów, a w efekcie po korekcie uzyskano prawidłową strukturę kanałów (Rys. 4).



Rys. 4. Struktura mikrokanalów po wprowadzeniu korekty do projektu z powodu obserwowanych nieciągłości struktury

Tak skonstruowany system był w dalszej kolejności poddawany badaniom przepływów, co zostanie szczegółowo omówione w pracy [Szafran i Tomczak, 2013].

Wnioski

W pracy zaprezentowano nową metodykę projektowania mikrosystemów z wykorzystaniem zoptymalizowanej metody bezpośredniego grawerowania laserowego DLP. Metoda ta została wykorzystana do przygotowania oryginalnego układu LOC, który do tej pory nie został opisany w literaturze.

Przeprowadzone eksperymenty zakończono zbudowaniem kompletnego i funkcjonalnego mikroukładu, będącego dwuwymiarowym modelem naczyń włosowatych guza nowotworowego.

Sposób fabrykacji mikroukładu LOC w porównaniu do technik fotolitograficznych i miękkiej litografii jest zdecydowanie prostszy i szybszy. Nie wymaga preparacji matrycy czy fotomaski, jak również pomieszczeń *clean room*. Umożliwia to wprowadzanie szybkich poprawek do projektu, bądź łatwe tworzenie całkiem nowych struktur. W prosty sposób można zwiększać, bądź zmniejszać średnice kanałów lub komór.

Porównując dotychczasowe osiągnięcia na polu budowy chipów symulujących naczynia krwionośne można stwierdzić, że opracowana mikrostruktura naczyń włosowatych prezentuje dużo większe możliwości. Jej geometria odwzorowuje układ naczyniowy dużo wierniej, a sposób fabrykacji umożliwia stworzenie dowolnie wybranej struktury, niezależnie od narządu, nowotworu, czy nawet organizmu.

Ponadto zbudowany układ LOC po odpowiedniej modyfikacji może służyć jako środowisko badań nad uwalnianiem CTC z tkanek guza i procesem metastazy.

LITERATURA

- Chaw K.C., Manimaran M., Tay E.H., Swaminathan S., 2007. Multi-step microfluidic device for studying cancer metastasis. *Lab on a Chip*, 7, 1041-1047. DOI: 10.1039/b707399m
- Chow A.W. 2002. Lab-on-a-Chip: Opportunities for chemical engineering. *AIChE J.*, 48, nr 8, 1590-1595. DOI: 10.1002/aic.690480802
- Ishikawa T., Fujiwara H., Matsuki N., Yoshimoto T., Imai Y., Ueno H., Yamaguchi T., 2011. Asymmetry of blood flow and cancer cell adhesion in a microchannel with symmetric bifurcation and confluence. *Biomed. Microdevices*, 13, nr 1, 159-167. DOI: 10.1007/s10544-010-9481-7
- Jeong G.S., Kwon G.H., Kang A.R., Jung B.Y., Park Y., Chung S., Lee S-H., 2011. Microfluidic assay of endothelial cell migration in 3D interpenetrating polymer semi-network HA-Collagen hydrogel. *Biomed. Microdevices*, 13, nr 4, 717-723. DOI: 10.1007/s10544-011-9541-7
- Khan O.F., Sefton M.V., 2011. Endothelial cell behaviour within a microfluidic mimic of the flow channels of a modular tissue engineered construct. *Biomed. Microdevices*, 13, 69-87. DOI: 10.1007/s10544-010-9472-8
- Szafran R., 2013. Fabrykacja mikroaparatury metodą bezpośredniego grawerowania laserowego DLP. *Inż. Ap. Chem.*, 52, nr, 5, 475-476
- Szafran R., Tomczak T., 2013. Wykorzystanie metody lattice-Boltzmann do symulacji mikroprzepływów w kanałach układów lab on a chip. *Inż. Ap. Chem.*, 52, nr 6 (w druku)
- Travasso R.D.M., Poiré E.C., Castro M., Rodriguez-Manzanique J.C., Hernández-Machado A., 2011. Tumor angiogenesis and vascular patterning: A mathematical model. *PLoS ONE*, 6, nr 5, e19989. DOI: 10.1371/journal.pone.0019989

Badania były finansowane w ramach grantu badawczego Narodowego Centrum Nauki nr N N501 042140.