

**INŻYNIERIA KOMÓRKOWA W SYSTEMACH  
LAB-ON-A-CHIP**

**CELL ENGINEERING IN LAB-ON-CHIP SYSTEMS**

**Ewelina Tomecka\*, Katarzyna Tokarska,  
Elżbieta Jastrzębska, Michał Chudy, Zbigniew Brzózka**

*Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Instytut Biotechnologii,  
Zakład Mikrobioanalityki,  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
\*e-mail: etomecka@ch.pw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Parametry wpływające na proliferację komórek w mikrosystemach przepływowych
2. Mikrosystemy przepływowe do dwuwymiarowej (2D) hodowli komórek
3. Mikrosystemy przepływowe do trójwymiarowej (3D) hodowli komórek

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Ewelina Tomecka** w roku 2011 ukończyła studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie doktorantka w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Zainteresowania naukowe autorki dotyczą trójwymiarowej hodowli komórek mięśnia sercowego oraz komórek macierzystych w mikrosystemach przepływowych.

**Mgr inż. Katarzyna Tokarska** w roku 2013 ukończyła studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie doktorantka w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych jest wykorzystanie nanotechnologii w badaniach efektywności terapii fotodynamicznej w mikrosystemach przepływowych.

**Dr inż. Elżbieta Jastrzębska** w roku 2008 ukończyła studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W 2012 r. uzyskała stopień naukowy doktora nauk chemicznych. Obecnie pracownik Wydziału Chemicznego PW na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Jej zainteresowania badawcze dotyczą mikrosystemów przepływowych w inżynierii komórkowej.

**Dr hab. inż. Michał Chudy**, prof. PW w roku 1997 ukończył studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2001, a doktora habilitowanego w 2010r. Obecnie pracownik Wydziału Chemicznego PW na stanowisku profesora PW w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Zainteresowania naukowe autora dotyczą konstrukcji mikrosystemów przepływowych stosowanych w bioanalityce i diagnostyce medycznej.

**Prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka** w roku 1977 ukończył studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1982, a doktora habilitowanego w 1991r. W roku 1998 uzyskał tytuł profesora nauk chemicznych. Obecnie kieruje grupą badawczą sensorów chemicznych (*Chemical Sensors Research Group – CSRG*) oraz Pracownią Miniaturowych Systemów Chemicznych. Od roku 2008 pełni również funkcję dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Zainteresowania naukowe autora dotyczą miniaturowych systemów analitycznych (*lab-on-a-chip*) do monitorowania bioanalitów.

## ABSTRACT

*Lab-on-a-chip* systems are promising tools in the field of cell engineering. Microfluidic systems are integrated microlaboratories consisting of many microstructures such as microchannels and microchambers, which can be used for cell analysis and cell culture. Appropriately designed geometry of the chip allows to mimic *in vivo* conditions. Microsystems enables continuous culture medium perfusion. During cell culture, regulation of the flow rate of medium is possible, which allows to control conditions of the cultivation.

In this paper we present a review of microfluidics systems which are used in cell engineering. We describe methods of microsystems fabrication, parameters which influence cell proliferation in microscale and examples of microsystems for cell analysis and cell culturing. Microfluidic systems for maintaining cell culture are mainly fabricated of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and glass, non-toxic materials for cells. The most commonly used method for fabrication of PDMS microsystems is photolithography and replica molding techniques. Cell culture in microsystems can be carried out in two ways: as a two-dimensional (2D) cell culture and three-dimensional (3D) cell culture. In two-dimensional culture cells grow as a monolayer on a flat surface of microchambers or microchannels. Microsystems for two-dimensional cell culture are widely described in the literature. They are mainly used for: (i) cell proliferation after exposure to external stimuli, (ii) testing the activity of cytotoxic drugs, (iii) interactions and cell migration and (iv) the evaluation of procedures applicable in tumor therapy e. g. photodynamic therapy. However, two-dimensional cell culture do not mimic fully *in vivo* conditions. In living organisms cells grow spatially creating three-dimensional structures like tissues. Therefore, nowadays microsystems for 3D cell culture are being developed intensively. Three-dimensional cell culture in microfluidic systems can be achieved in three ways: by the design of suitable geometry and topography of microchannels, by the use of hydrogels or by spheroids formation. Three-dimensional cell culture in microfluidic systems are much better experimental *in vitro* models than cell culture in traditional culture vessels. It is the main reason why microsystems should be still improved, as to become widely used research tools in cellular engineering.

Keywords: cell engineering, microfluidic systems, two-dimensional (2D) cell culture, three-dimensional (3D) cell culture

Słowa kluczowe: inżynieria komórkowa, mikrosystemy przepływowe, dwuwymiarowa (2D) hodowla komórkowa, trójwymiarowa (3D) hodowla komórkowa

---

---

## WPROWADZENIE

Inżynieria komórkowa jest jedną z najprężniej rozwijających się interdyscyplinarnych dziedzin nauk technicznych. Łączy w sobie biologię komórki, syntezę biomateriałów i metody inżynierii materiałowej. Jednym z celów inżynierii komórkowej jest tworzenie modeli tkankowych, naśladujących specyfikę żywego organizmu. Narzędziem coraz częściej wykorzystywanym do tego celu, są mikroukłady przepływowe zwane również systemami *lab-on-a-chip* (LOC). Systemy te pełnią funkcję zintegrowanego mikrolaboratorium na płycie, umożliwiającego przeprowadzenie kompleksowej analizy w mikrostrukturach rzędu 10–100  $\mu\text{m}$ . Składają się one z wielu upakowanych w niewielkiej przestrzeni elementów, odpowiedzialnych za poszczególne etapy prowadzonego procesu oraz transport reagentów. Odpowiednio zaprojektowana geometria mikroukładu umożliwia prowadzenie badań w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*. Jest to niewątpliwą zaletą mikrosystemów przepływowych wykorzystywanych w badaniach biologicznych.

### 1. PARAMETRY WPŁYWAJĄCE NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK W MIKROSYSTEMACH PRZEPIYWOWYCH

W literaturze prezentowanych jest szereg mikrosystemów wykorzystywanych w takich dziedzinach nauki jak chemia [1, 2] czy elektronika [3]. Niemniej jednak, w ostatnich latach coraz więcej grup badawczych skupia się na opracowywaniu mikroukładów wykorzystywanych w inżynierii komórkowej [4]. Największą korzyścią wynikającą z opracowywania urządzeń mikroprzepływowych, jest zdolność tworzenia i kontrolowania specyficznego mikrośrodowiska wzrostu komórek. Klasyczne metody hodowli i analizy komórek posiadają wiele ograniczeń, które nie pozwalają na pełną kontrolę wzrostu, różnicowania czy stymulacji komórek. Zastosowanie systemów *lab-on-a-chip* pozwala na udoskonalenie tych metod. Do zalet mikrosystemów należą między innymi: możliwość wytworzenia mikrostruktur odpowiadających wymiarom komórek, szybka wymiana ciepła i efektywny transport masy, możliwość analizy wpływu bodźców zewnętrznych na komórki oraz prowadzenia badań w warunkach dynamicznych [4].

Komórki w naturalnym środowisku poddawane są działaniu wielu czynników biochemicznych, fizycznych i fizykochemicznych. Czynniki te wpływają na proliferację, wzrost i funkcje komórek. Zastosowanie mikrosystemów przepływowych umożliwia zaprojektowanie geometrii mikrostruktur w taki sposób, aby odzwierciedlały one warunki *in vivo* [5]. Ponadto, pozwalają one na obserwację wzrostu komórek oraz analizę wpływu oddziałujących na nie bodźców zewnętrznych w czasie rzeczywistym.

Istotnym zagadnieniem w prowadzeniu hodowli komórek jest stres hydrodynamiczny (ang. *shear stress*). Komórki proliferujące w mikrosystemach przepływowych poddawane są ciągłemu działaniu przepływu reagentów. Naprężenia ścinające

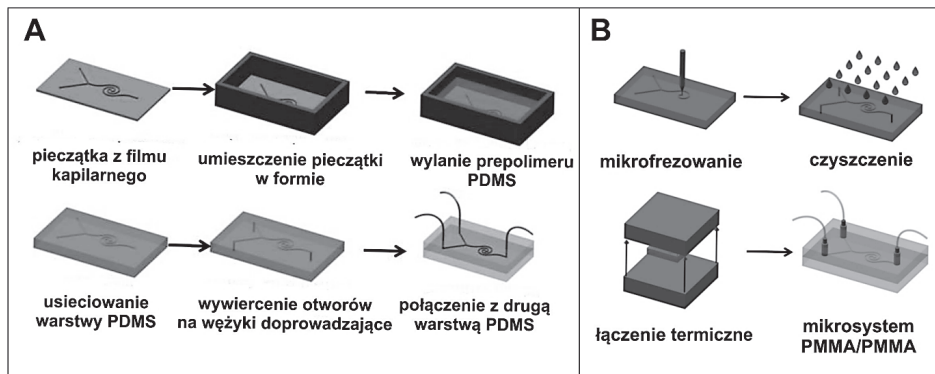
mogą powodować zmiany przepuszczalności, fragmentację a nawet przerwanie błony komórkowej. Wpływa to na morfologię oraz proliferację komórek [6]. Jednocześnie, naprężenia ścinające w pewnym stopniu naśladują przepływ płynów występujący w warunkach *in vivo*. W związku z tym, w zależności od rodzaju badanych komórek przepływ reagentów może działać stymulująco na wzrost komórek lub wywoływać niekorzystny dla nich stres hydrodynamiczny. Systemy *lab-on-a-chip* są dobrym rozwiązaniem, umożliwiającym badanie wpływu wartości naprężeń ścinających na morfologię oraz żywotność komórek.

Kolejnym parametrem, wpływającym na hodowlę komórek w mikroskali, jest skuteczna objętość hodowli (ang. *Effective Culture Volume*, ECV). Jest ona wskaźnikiem zdolności komórki do kontroli jej mikrośrodowiska w trakcie wzrostu. Skuteczna objętość hodowli jest funkcją wielkości transportu masy wzdłuż każdej osi mikrokanału, efektów dyfuzji i konwekcji oraz stopnia adsorpcji białek na powierzchni [7]. Wysoki stosunek powierzchni do objętości hodowli (ang. *Surface-Area-to-Volume ratio*, SAV) pozwala na efektywniejsze dostarczanie substancji odżywczych i tlenu do komórek [4]. Ponadto, umożliwia zwiększoną wymianę gazową między wnętrzem mikroukładu a środowiskiem zewnętrznym. Należy podkreślić również, że wartość SAV w mikrosystemach jest zbliżona do wartości uzyskiwanych w warunkach *in vivo*.

Prowadzenie badań z materiałem biologicznym, wymaga zachowania sterylnych warunków hodowli oraz ciągłego monitorowania fizjologii komórek. W związku z tym, podczas projektowania mikrosystemu istotny jest dobór odpowiednich materiałów konstrukcyjnych. Materiały te powinny być przede wszystkim nietoksyczne dla komórek, umożliwiające wymianę gazową z otoczeniem, stabilne w trakcie sterylizacji oraz proste w obróbce. Do materiałów najczęściej wykorzystywanych do wytwarzania mikrosystemów *lab-on-a-chip* w inżynierii komórkowej zalicza się szkło oraz materiały polimerowe – poli(dimetylosiloksan) – PDMS [8], poli(metakrylan metylu) – PMMA oraz poliwęglan – PC [9]. W celu uzyskania innych właściwości powierzchni, na której wzrastają komórki, materiały konstrukcyjne mogą być modyfikowane [10]. W tym celu stosowane są białka występujące w naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej, na przykład kolagen, fibronektyna, witronektyna.

Szkło, ze względu na hydrofilowy charakter powierzchni, jest najczęściej wykorzystywanym materiałem do wytwarzania mikrosystemów przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych. Ponadto, transparentność szkła w szerokim zakresie fal promieniowania umożliwia integrację z optycznymi metodami detekcji. Najczęściej wykorzystywanymi metodami obróbki szkła jest fotolitografia, mokre trawienie w kwasie fluorowodorowym czy reaktywne trawienie jonowe (ang. *Reactive Ion Etching*, RIE). W celu uszczelnienia uzyskanych mikrowzorów, płytki szklane łączy się na przykład z PDMS po aktywacji ich powierzchni za pomocą plazmy tlenowej. Zastosowanie przepuszczalnego dla gazów PDMS jest konieczne, ze względu na możliwość dyfuzji tlenu, niezbędnego do prawidłowego wzrostu komórek.

Mikrostruktury w polimerach wykonuje się przy użyciu metod replikacyjnych oraz metod ich bezpośredniej obróbki [11]. Na szczególne zainteresowanie wśród materiałów polimerowych zasługuje PDMS. Posiada on szereg cennych właściwości takich jak: biokompatybilność, przenikalność dla gazów, elastyczność czy nieprzepuszczalność dla wody. Wykazuje on również stabilność w szerokim zakresie temperatur. PDMS cechuje się skrajnie wysoką hydrofobowością, co wyklucza jego zastosowanie jako powierzchni przeznaczonej do wzrostu komórek adherentnych. Jednak z powodzeniem wykorzystywany jest do hodowli sferoidów [12]. Najczęściej wykorzystywaną metodą wytwarzania elementów mikroukładów w PDMS jest zastosowanie metod replikacyjnych. Na rysunku 1A przedstawiono schemat wytwarzania mikrostruktur w PDMS. Metoda ta wymaga przygotowania pieczętki odwzieraającej strukturę mikrosystemu. Pieczętka wykonywana jest zazwyczaj metodą fotolitografii. Po wytworzeniu pieczętki następuje etap wylania mieszaniny nieusieciowanego prepolimeru z odczynnikami sieciującym na gotową matrycę. Pod wpływem podwyższonej temperatury (ok. 70–80°C) dochodzi do jego usieciowania, a utwardzoną warstwę polimeru oddziela się od pieczętki. W wyniku tej procedury w usieciowanym elastomerze odwzorowywana jest sieć mikrokanalów o dobrze zdefiniowanych wymiarach. Po wywierceniu otworów wlotowych i wylotowych uzyskaną strukturę uszczelnia się łącząc ją z inną płytką. Najczęściej elementy wykonane z PDMS łączy się ze szkłem lub kolejną warstwą polimeru, rzadziej natomiast z ceramiką i krzemem.



Rysunek 1. Schemat wytwarzania mikrosystemu z PDMS metodą replikacyjną (A); schemat wytwarzania mikrosystemu z PMMA metodą mikrofrezowania (B)

Figure 1. Scheme of PDMS microsystem fabrication by replica molding technique (A); scheme of PMMA microsystem fabrication by micromilling technique (B)

PMMA jest kolejnym materiałem polimerowym, który również może stanowić jeden z elementów konstrukcyjnych mikroukładu do hodowli komórek. Do obróbki PMMA stosowana jest metoda mikrofrezowania (Rys. 1B). Polega ona na stopniowym usuwaniu warstw polimeru z powierzchni materiału za pomocą obracającego się mikrofrezu. Technologie wytwarzania coraz bardziej precyzyjnych narzędzi

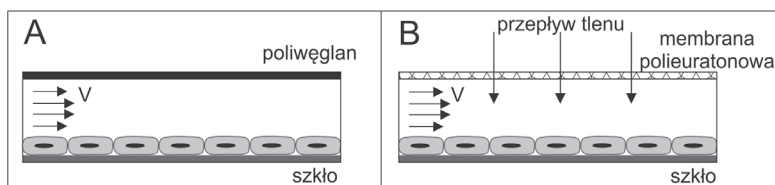
o wymiarach rzędu kilkudziesięciu mikrometrów, pozwalają na bezpośrednie wykonanie mikrosystemów przepływowych. Zaletą mikrofrezowania, w stosunku do metod replikacyjnych, jest możliwość otrzymania struktur 3D, natomiast jej wadą jest niska wydajność oraz rozdzielczość.

Początkowo mikrosystemy wykorzystywane były do manipulacji oraz badania adhezji i migracji komórek. Obecnie, mikroukłady o bardziej skomplikowanych strukturach stosowane są między innymi do przeprowadzenia testów toksyczności związków. Możliwe jest również zaprojektowanie urządzeń symulujących metabolizm całego organizmu, tzw. *organ-on-a-chip*. Przewagą tego typu rozwiązań nad konwencjonalnymi metodami hodowli komórek jest przede wszystkim prowadzenie badań w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*.

## 2. MIKROSYSTEMY PRZEPLYWOWE DO DWUWYMIAROWEJ (2D) HODOWLI KOMÓREK

Zastosowanie systemów *lab-on-a-chip* umożliwia prowadzenie badań w mikrośrodkowisku bardziej zbliżonym do warunków *in vivo* niż w przypadku stosowania płytek 96-dołkowych [13]. Mikroukłady zawierają w swej geometrii miejsca przeznaczone do dokowania i wzrostu komórek (mikrokomory hodowlane), mikrokanaly doprowadzające komórki oraz sieć mikrostruktur umożliwiających ciągłe dostarczanie substancji odżywczych i badanych związków. W literaturze prezentowanych jest szereg mikrosystemów, do dwuwymiarowej (ang. *two-dimensional* – 2D) hodowli komórek oraz ich analizy (tzw. *microsystems for cellomics*) [14]. Podobnie jak w konwencjonalnie stosowanych metodach, w mikrosystemach komórki ulegają adhezji do powierzchni materiałów konstrukcyjnych. Niemniej jednak są one hodowane w warunkach dynamicznych (przepływ substancji). Dwuwymiarowa hodowla komórek prowadzona w systemach *lab-on-a-chip* stosowana jest m.in. do badania proliferacji komórek po działaniu bodźców zewnętrznych, badania cytotoksyczności leków podawanych pojedynczo lub w terapii wielolekowej, badania interakcji i migracji komórek oraz testowania procedur stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych np. terapii fotodynamicznej (ang. *Photodynamic Therapy*, PDT) [14–17].

Jednym z pierwszych doniesień literaturowych na temat analizy proliferacji komórek w mikroskali była praca Tillea [18]. Badania prowadzono w mikroukładach wykonanych z poliwęglanu oraz ze szkła. W jednym z mikroukładów płytkę z poliwęglanu zastąpiono przepuszczalną dla gazów membraną poliuretanową (Rys. 2). Następnie, zbadano jak dostęp tlenu oraz naprężenia ścinające (przepływ wprowadzanych substancji w zakresie od 0,06 do 4,18 ml/min) wpływają na wzrost komórek pierwotnych hepatocytów hodowanych w monowarstwie z fibroblastami 3T3-J2.



Rysunek 2. Schemat mikrokanalu do badania żywotności hepatocytów. Mikroukład wykonany ze szkła i poliwęglanu (A) oraz ze szkła i przepuszczalnej dla gazów membrany polieuratonowej (B) [18]  
 Figure 2. Scheme of microchannel for hepatocyte viability test. Microsystem was fabricated of glass and polycarbonate (A) and of glass and gas-permeable polyurethane membrane (B) [18]

Zaobserwowano znaczący spadek żywotności komórek oraz syntezy mocznika i albuminy przez hepatocyty w mikroukładzie z ograniczonym dostępem tlenu. Ponadto wykazano, że niższe wartości naprężenia ścinającego ( $0,01$  do  $0,33$  dyn/cm<sup>2</sup>) wpływają stymulująco na proliferację hepatocytów. Prezentowane wyniki potwierdzają możliwość stosowania przepływowych mikrosystemów do analizy podstawowych funkcji komórek, jak również do badania ich żywotności po działaniu czynnikami zewnętrznymi.

Hodowle prowadzone w mikrosystemach przepływowych typu *lab-on-a-chip* mają przewagę nad hodowlami statycznymi nie tylko ze względu na redukcję zużywanych reagentów i materiału biologicznego, ale również dzięki możliwości bieżącego sterowania stężeniami i dozowaniem badanych substancji. Do prowadzenia testów cytotoksyczności związków, badania chemotaksji oraz migracji komórek wykorzystywane są często tzw. generatory gradientów stężeń (ang. *Concentration Gradient Generator*, CGG), w których możliwe jest wygenerowanie, w jednym etapie analizy, kilku stężeń wprowadzanych do mikroukładu roztworów. Do najprostszych generatorów należą mikrokanaly w kształcie litery T lub Y [19]. Zasada działania CGG polega na tym, że roztwory płynące w dwóch kanałach wprowadzających, łączą się w jeden, gdzie na drodze dyfuzji następuje ich wymieszanie. Sterowanie gradientem może odbywać się poprzez odpowiednio zaprojektowaną sieć kanałów, której liczba wlotów i wylotów determinuje liczbę otrzymanych stężeń używanego do badań czynnika. Dodatkowe wloty i mikrokanaly umożliwiają uzyskanie bardziej złożonych profili przepływu. Systemy *lab-on-a-chip* zintegrowane z generatorem gradientu stężeń stosowane są przede wszystkim do oznaczania cytotoksyczności związków biologicznie czynnych oraz analizy ich wpływu na proliferację komórek rosnących w postaci monowarstwy. Siyan opracował mikrosystem, wykonany z PDMS oraz ze szkła, do analizy oporności komórek nowotworu płuc (SK-MES-1) na działanie leku przeciwnowotworowego VP-16 [20]. Mikrosystem składał się z CGG, w którym z dwóch roztworów o różnym stężeniu uzyskiwano na wylotach mikrokanalów osiem stężeń badanego związku. Generator połączony był z macierzą  $8 \times 3$  mikrokomór hodowlanych. W mikroukładzie o takiej geometrii zbadano zależność pomiędzy ekspresją białka GRP78 (ang. *Glucose Regulator Protein*) a opornością komórek po działaniu leku. W tym celu, komórki induk-



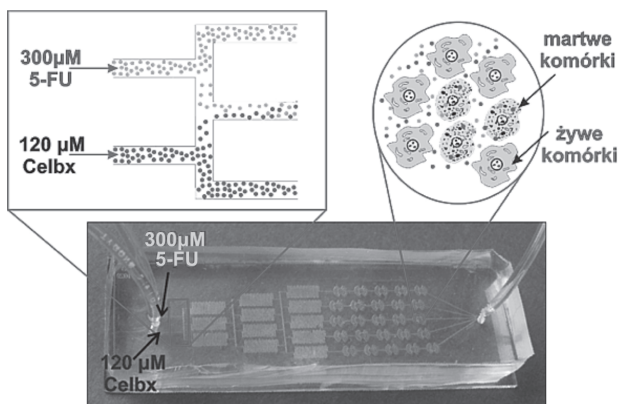
wano jonoforem wapnia A23187 o różnym stężeniu (0–6  $\mu\text{M}$ ), wprowadzonym do mikroukładu. Następnie, komórki inkubowano z 30  $\mu\text{M}$  VP-16. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno ekspresja białek, jak i żywotność komórek wzrasta wraz ze zwiększającym się stężeniem A23187. Autorzy pracy udowodnili, że białko GRP78 odgrywa znaczącą rolę w oporności chemicznej na działanie VP-16 w komórkach nowotworu płuc.

Z kolei Wang opisał mikrosystem, posiadający 576 mikrokomór hodowlanych, który wykorzystano do badania toksycznego działania takich związków jak: digitonina, saponina,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  oraz akroleina [21]. Mikrosystem wykonany w PDMS, zawierał w swej geometrii mikrokanaly łączące się ze sobą prostopadłe. Przeznaczone były one do wprowadzania komórek oraz badanych związków. Miejsca przecięcia dwóch mikrokanalów tworzyły matrycę mikrokomór, w których hodowano komórki oraz prowadzono analizę cytotoksyczności związków. W jednym mikrosystemie jednocześnie badano żywotność komórek adherentnych BALB/3T3, HeLa oraz komórek śródbłonna po ekspozycji na działanie dwóch stężeń każdego ze związków (określonych jako wysokie i niskie stężenie). Niewątpliwą zaletą opracowanego mikrosystemu przepływowego była możliwość jednoczesnego przeprowadzenia w nim badań przesiewowych kilku związków, z wykorzystaniem różnych typów komórek.

W opisanym powyżej mikrosystemie analizowano działanie pojedynczego związku, jednakże systemy *lab-on-a-chip* z powodzeniem mogą być wykorzystane również do przeprowadzenia badań terapii wielolekowej. W zespole Brzózki opracowano mikrosystem, w którym zbadano cytotoksyczność 5-fluorouracylu (5-FU) oraz celekoksibu (ang. *celecoxib*, Celbx) inkubowanych z komórkami pojedynczo i w kombinacji [22]. Mikroukład wykonano z PDMS (techniką fotolitografii i metodą odlewu) oraz ze szkła (techniką fotolitografii i mokrego trawienia). W szkle wykonano macierz  $5 \times 5$  mikrokomór hodowlanych (o średnicy 1 mm). Z kolei w płytce PDMS znajdowała się sieć mikrokanalów zaprojektowana w ten sposób, aby struktury wielokanałowe pokrywały się z mikrokomorami wytworzonymi w płytce szklanej. Ponadto, geometria mikrosystemu zawierała generator gradientu stężeń, dzięki któremu możliwe było uzyskanie pięciu różnych stężeń badanego związku (Rys. 3).

W wytworzonym mikrosystemie badano żywotność komórek nowotworowych (A549, HT-29) oraz prawidłowych (BALB/3T3) po ekspozycji na działanie pojedynczych związków o stężeniu 0–300  $\mu\text{M}$  5-FU oraz 0–120  $\mu\text{M}$  Celbx. Mikrosystem wykorzystano również do oceny terapii wielolekowej, w tym celu przez generator gradientu stężeń wprowadzono jednocześnie 300  $\mu\text{M}$  5-FU oraz 120  $\mu\text{M}$  Celbx. Dzięki obecności CGG, w komorach hodowlanych uzyskano kombinację pięciu różnych stężeń obydwu związków. Po 24 h i 48 h inkubacji określano żywotność komórek z wykorzystaniem barwienia różnicowego znacznikami fluorescencyjnymi: kalceiną-AM (barwiącą komórki żywe na zielono) i jodkiem propidyny (barwiącym komórki martwe na czerwono). W celu weryfikacji przydatności systemu *lab-on-a-chip* do testów cytotoksyczności przeprowadzono analizę porównawczą

wyników uzyskanych w mikro i makroskali. Uzyskano nieznaczne rozbieżności pomiędzy żywotnością w obydwu modelach. Wynikać one mogły z różnych warunków prowadzenia doświadczeń: dla mikroukładu (warunki przepływowe) oraz dla płytek 96-dółkowych (warunki statyczne).



Rysunek 3. Mikroukład (PDMS/szkło) wykorzystany do testów cytotoksyczności 5-FU oraz Celbx [22]  
Figure 3. Microsystem (PDMS/glass) for cytotoxicity tests of 5-FU and Celbx [22]

Hodowle 2D prowadzone w mikrosystemach posłużyły do badania cytotoksyczności różnego typu związków przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych, podawanych w roztworze czy w formie nanocząstek. Oprócz analizy biologicznej aktywności związków systemy *lab-on-a-chip* z powodzeniem zostały zastosowane do badania procedur przeciwnowotworowych, np. terapii fotodynamicznej (PDT). Lou zaprojektował i wykonał mikroprzepływową platformę do oceny skuteczności PDT z wykorzystaniem różnych czynników, między innymi stężenia fotouczulacza, dawki promieniowania, poziomu natlenienia, rodzaju komórek oraz czasu inkubacji [23]. Mikrosystem zawierał trzy warstwy: (1) gazową – umożliwiającą kontrolowanie poziomu tlenu (2) hodowlaną – przeznaczoną do hodowli komórek oraz (3) wykorzystywaną do naświetlania – zbudowaną z odpowiednich filtrów pozwalających na kontrolę dostarczanej dawki promieniowania. Fotocytotoksyczność komórek glejaka C6 analizowano po działaniu błękitem metylenowym oraz naświetleniu światłem o długości fali 635 nm. Geometria mikrosystemu pozwoliła na jednoczesną analizę skuteczności PDT w 324 różnych warunkach.

Z kolei w zespole Brzózki opracowano mikrosystem nie tylko do analizy skuteczności PDT dla różnych stężeń fotouczulacza, ale również z wykorzystaniem kokultur komórkowych [24]. Mikrosystem, zawierał mikrokanaly w kształcie litery V, na których umieszczono pary komór hodowlanych. Każda para połączona była ze sobą mikrokanalami poprzecznymi o różnej długości – kanały poprzeczne miały umożliwiać dyfuzję medium hodowlanego oraz migrację komórek. Na końcu struktury w kształcie litery V umieszczona została wspólna mikrokomora do uzyskania kokultury. Dwa otwory wlotowe umożliwiły jednoczesne wprowadza-

nie komórek prawidłowych (MRC5) i nowotworowych (A549) płuc, w ten sposób aby nie uległy one wymieszaniu. W takim mikrosystemie przeprowadzono PDT z wykorzystaniem kwasu 5-aminolewulinowego jako fotosensybilatora. Zaobserwowano, że obecność komórek nowotworowych po PDT obniża żywotność komórek prawidłowych, wzrastających w tym samym mikrośrodowisku. Można to tłumaczyć faktem, iż komórki nowotworowe uwalniają sygnały śmierci (np. czynnik TNF $\alpha$ ), które dyfundują do komórek prawidłowych znajdujących się w bliskim sąsiedztwie. Z wykorzystaniem tego mikroukładu wykazano, że systemy *lab-on-a-chip* mogą być stosowane zarówno do oceny żywotności komórek jak i badania ich podstawowych funkcji i mechanizmów.

Szczegółowa analiza specyficznych interakcji na poziomie komórka – komórka oraz badanie kokultury komórkowych jest ważnym elementem badań podstawowych. Zjawisko migracji komórek jest podstawą wielu procesów fizjologicznych i odgrywa kluczową rolę w zrozumieniu wielu mechanizmów (np. przerzutów nowotworu, przebudowy tkanek, angiogenezy czy gojeniu się ran). Konwencjonalne metody hodowli posiadają wiele ograniczeń w tego typu badaniach. Oparte są one głównie na testach prowadzonych w warunkach statycznych, z ograniczoną kontrolą precyzyjnego umieszczenia komórek oraz stymulacji bodźcami zewnętrznymi. Systemy *lab-on-a-chip* są rozwiązaniem, pozwalającym na precyzyjne umieszczenie kilku typów komórek w jednym układzie, a następnie obserwację ich wzajemnych interakcji. Najprostszym rozwiązaniem stosowanym w mikrosystemach przepływowych jest zastosowanie kilku równoległych kanałów, do których wprowadzone są badane komórki. Na przykład, Nie opracował mikroukład, wykonany w PDMS, w którym przeprowadzono badanie migracji komórek po działaniu trypsyny [25]. W tym celu, do mikrokanalu (połączonego z trzema kanałami wlotowymi) wprowadzono komórki adherentne NIH-3T3. Następnie, po 48 h do jednego z mikrokanalów wlotowych wprowadzano roztwór trypsyny. Powodowało to uszkodzenie komórek oraz ich wypłukiwanie z mikroukładu. Pozostała część komórek, rosnących w monowarstwie pozostawała nienaruszona. W kolejnym etapie eksperymentu badano jak różne czynniki (epidermalny czynnik wzrostu – EGF, cytochalazyna D (CD) i falloidyna) wpływają na migrację komórek. W trakcie badań wykazano, że EGF najbardziej pobudza komórki do proliferacji i migracji wzdłuż mikrokanalu.

W innym mikrosystemie, wykonanym ze szkła i PDMS, zbadano interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi (B16 – komórki czerniaka) i komórkami układu odpornościowego (WT oraz IRF-8 KO - komórki śledziony) [26]. W strukturze mikrosystemu wyróżnić można było trzy mikrokanaly ułożone równolegle, połączone ze sobą mikrokanalikami (o szerokości 12  $\mu$ m) służącymi do migracji komórek. Do kanałów bocznych wprowadzano komórki: do jednego mikrokanalu komórki nowotworowe, do drugiego komórki odpornościowe (WT lub IRF-8 KO). Następnie, przez kolejne siedem dni, badano migrację komórek odpornościowych wzdłuż mikrokanalików poprzecznych. Zaobserwowano przemieszczanie się komórek śledziony WT oraz silne interakcje z komórkami nowotworowymi B16.

W przeciwieństwie do nich, komórki odpornościowe IRF-8 KO słabo oddziaływały z komórkami czerniaka.

Badania migracji i interakcji komórek adherentnych w mikroskali potwierdzają możliwość wykorzystania systemów *lab-on-a-chip* jako narzędzi stosowanych do prowadzenia badań *in vitro*. Służyc mogą one do analizy wzajemnych oddziaływań między komórkami nowotworowymi i prawidłowymi. Ponadto, mikrosystemy z powodzeniem wykorzystywane są do badania żywotności komórek rosnących w monowarstwie po ich ekspozycji dowolnymi związkami biologicznie czynnymi. Ze względu na szereg zalet stanowić mogą one alternatywne narzędzia do prowadzenia wielu typów badań biologicznych. Niemniej jednak zastosowanie komórek rosnących w monowarstwie (2D) nie jest idealnym odzwierciedleniem trójwymiarowego (ang. *three-dimensional*, 3D) wzrostu komórek w warunkach *in vivo*. W związku z tym, coraz częściej opracowywane są mikroukłady umożliwiające prowadzenie hodowli 3D w systemach *lab-on-a-chip*.

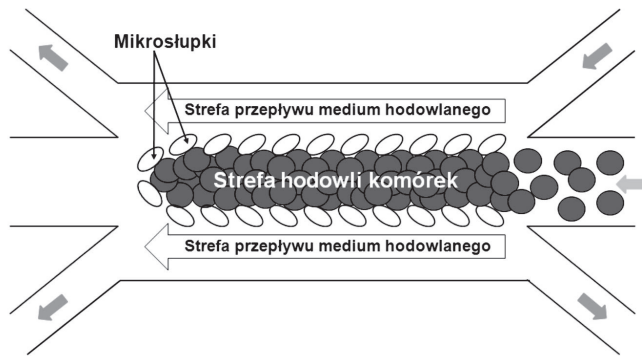
### 3. MIROSYSTEMY PRZEPŁYWOWE DO TRÓJWYMIAROWEJ (3D) HODOWLI KOMÓREK

Tradycyjne hodowle komórkowe *in vitro*, opierające się na wzroście komórek w monowarstwie (2D), nie odzwierciedlają w pełni warunków panujących w środowisku *in vivo*. W organizmach żywych komórki otoczone są skomplikowaną siecią włókien białkowych tak zwaną macierzą zewnątrzkomórkową ECM (ang. *Extracellular Matrix*), która zespala komórki ze sobą, tym samym umożliwiając im tworzenie trójwymiarowych struktur (tkanek) [27]. W takim środowisku komórki zorganizowane są w sposób zapewniający im komunikację i wzajemne oddziaływanie. Ponadto, komórki zaopatrywane są w sposób ciągły przez płyny ustrojowe w świeże składniki pokarmowe, podczas gdy warunkach *in vitro* medium hodowlane dostarczane i usuwane jest okresowo. W związku z tym istnieje potrzeba stworzenia modeli doświadczalnych *in vitro* odzwierciedlających, możliwie najdokładniej, warunki panujące w żywym organizmie.

Warunki podobne do *in vivo* można osiągnąć w mikrosystemach przepływowych. Umożliwiają one kontrolę mikrośrodowiska komórkowego poprzez odpowiednią topografię mikrokanałów, a także zapewniają stały przepływ medium hodowlanego [28]. Dodatkowo w mikrosystemach możliwe jest osiągnięcie przestrzennego wzrostu komórek. Trójwymiarowe hodowle komórkowe w mikroukładach przepływowych można osiągnąć na kilka sposobów. Jednym z nich jest zastosowanie odpowiedniej geometrii i topografii mikrokanałów. Najczęściej spotykane projekty tego typu mikroukładów opierają się na wykorzystaniu tak zwanych mikrosłupków (ang. *micropillars*). Są to trójwymiarowe mikrostruktury o podstawie elipsy, rombu, kwadratu czy trójkąta, rozmieszczone i zorientowane w mikrokanale w odpowiedni sposób. Ich średni to kilkadziesiąt mikrometrów [29]. Mikrosłupki stosowane są w mikroukładach wykonanych głównie z poli(dimetylosiloksanu)

(PDMS) za pomocą techniki głębokiego reaktywnego trawienia jonowego – DRIE (ang. *Deep Reactive Ion Etching*) oraz metody replikacyjnej [30].

Wykorzystanie mikrosłupków w celu uzyskania trójwymiarowej hodowli komórek przedstawiono w kilku pracach [31–33]. W każdej z nich opisano mikrosystem przepływowy, którego główny mikrokanal (długość = 1 cm, szerokość = 600  $\mu\text{m}$ , wysokość = 100  $\mu\text{m}$ ) został podzielony przez system dwóch rzędów eliptycznych mikrosłupków na trzy równe strefy (o szerokości 200  $\mu\text{m}$ ). Mikrosłupki o wymiarach 30  $\times$  50  $\mu\text{m}$ , oddalone od siebie o 20  $\mu\text{m}$  wyznaczały strefę wzrostu komórek (w centrum kanału) oraz dwie strefy przepływu medium hodowlanego (Rys. 4). Odległości pomiędzy mikrosłupkami były wystarczające, aby stworzyć barierę pomiędzy strefą rosnących komórek a przepływającym medium, a jednocześnie zapewniały swobodną dyfuzję medium do komórek podczas hodowli. Komórki wprowadzano do mikroukładu środkowym kanałem za pomocą pompy strzykawkowej. Obecność mikrosłupków zapewniała lokowanie się komórek tylko w centralnej części mikrokanalu. Przestrzenną hodowlę komórek, w zaprojektowanym mikroukładzie, udało się osiągnąć gdy gęstość zawiesiny wprowadzanych komórek mieściła się w zakresie  $1,5\text{--}10\cdot 10^6$  komórek/ml [31]. Takie gęstości zawiesiny komórkowej pozwalały „upakowywać” komórki warstwowo (jedna obok drugiej oraz jedna nad i pod drugą) tylko w centralnej części mikrokanalu, ograniczonej przez mikrosłupki. Komórki ułożone w ten sposób tworzyły trójwarstwową, przestrzenną strukturę. Nieprzypadkowe było również ustawienie mikrosłupków pod pewnym kątem do osi podłużnej mikrokanalu, co dodatkowo zwiększało wydajność unieruchomienia komórek w jego środkowej części. Zastosowanie zawiesiny komórkowej o gęstości mniejszej niż  $1,5\cdot 10^6$  komórek/ml pozwalało jedynie na ułożenie komórek obok siebie w postaci monowarstwy.



Rysunek 4. Schemat mikrokanalu z systemem dwóch rzędów eliptycznych mikrosłupków, wyznaczających strefę hodowli komórek oraz dwie strefy przepływu medium hodowlanego [31]

Figure 4. Scheme of the microchannel with two rows of elliptical micropillars, which define the zone of cell growth and two zones of culture medium flow [31]

W tego typu mikroukładach z powodzeniem przeprowadzono hodowlę, w warunkach przepływowych, komórek nowotworowych linii HepG2 [31], MFC7,

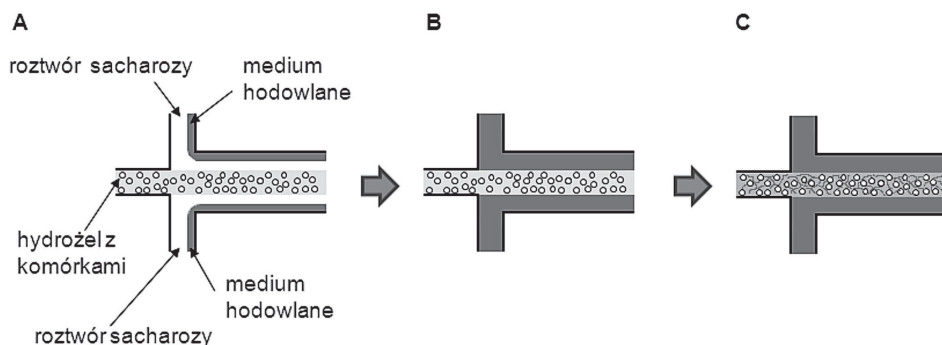
hepatocytów, szczurzych mezynchymalnych komórek macierzystych ze szpiku kostnego (rBMSCs), mysich mioblastów linii C2C12 [33]. Komórki hodowano przez 3 do 7 dni. Zbadano również wpływ szybkości przepływu zawiesiny komórek podczas wysiewania na ich żywotność [31]. Badania wykazały, że przy szybkościach przepływu 0,02 i 0,05 ml/h, komórki wykazywały ponad 80% żywotność. Natomiast przepływ o wartości 0,1 ml/h zapewniał tylko około 60% żywotność komórek. Zatem, do hodowli wybrano wartość przepływu medium wynoszącą 0,05 ml/h.

W pracy Anene-Nzeli [33] oprócz zastosowania mikrosłupków, umożliwiających przeprowadzenie trójwymiarowej hodowli komórek, dodatkowo zmodyfikowano powierzchnię mikrokanalów za pomocą równoległych w stosunku do siebie mikrorowków (ang. *microgrooves*). Miały one zapewnić odpowiednią organizację komórek. Jest to szczególnie istotne podczas hodowli komórek mięśniowych (mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych czy gładkich) lub nerwowych, które w tkankach żywych organizmów układają się równoległe w stosunku do siebie tworząc włókna. Orientacja komórek determinuje sygnalizację między nimi. Losowe ułożenie komórek względem siebie zaburza ich komunikację i oddziaływanie, wyniku czego tracą swój fenotyp i funkcje. Opisywany mikroukład wykonano w PDMS za pomocą techniki DRIE i metody replikacyjnej. Głębokość stosownych mikrorowków wynosiła około 225 nm a odległości pomiędzy nimi około 2  $\mu\text{m}$ . W tak zaprojektowanym mikroukładzie przeprowadzono 6-dniową trójwymiarową hodowlę mysich mioblastów linii C2C12 w trzech różnych konfiguracjach: 1) mikrorowki zorientowane równoległe względem kierunku przepływu medium, 2) mikrorowki zorientowane prostopadle do kierunku przepływu medium i 3) powierzchnia bez mikrorowków. Celem badań było sprawdzenie wpływu orientacji mikrorowków względem kierunku przepływu medium na orientację hodowanych komórek. Obserwacje wykazały, że komórki uporządkowały się zgodnie z rozmieszczeniem mikrorowków w pierwszym przypadku w 78%, w drugim przypadku 53%. W przypadku powierzchni bez mikrorowków około 20% komórek było prawidłowo ułożonych. Z tego wynika, że obecność mikrorowków wpływa na orientację komórek, co z kolei pozwala dokładniej odzwierciedlić warunki *in vivo* określonych rodzajów komórek. Jednak projektowanie i wytwarzanie tego typu mikrostruktur wiąże się z wysokimi kosztami produkcji oraz wykorzystywaniem skomplikowanych i czasochłonnych technik.

Innym sposobem na uzyskanie trójwymiarowych hodowli komórkowych w mikrosystemach, niewymagającym stosowania skomplikowanych geometrii mikrokanalów, jest wykorzystanie hydrożeli. Hydrożele to klasa wysokouwodnionych hydrofilowych polimerów pochodzenia naturalnego lub syntetycznego [34]. Pod wpływem różnych czynników zewnętrznych płynna postać hydrożelu ulega żelowaniu tworząc trójwymiarową sieć włókien o określonej średnicy i wielkości porów, strukturalnie podobną do macierzy zewnątrzkomórkowej. W zależności od rodzaju hydrożelu jego żelowanie mogą powodować takie czynniki jak: określona temperatura, promieniowanie o określonej długości fali, czy obecność określonych

związków chemicznych [35]. Przed procesem żelowania zawiesina komórek zostaje zmieszana z płynnym hydrożelem (pre-hydrożelem). Następnie, tak przygotowaną mieszaninę poddaje się działaniu czynnika żelującego, w wyniku czego płynna postać hydrożelu ulega zestaleniu, a komórki enkapsulacji w jego wnętrzu. Zaletą stosowania hydrożeli jest ich transparentność, umożliwiającą obserwacje rosnących w nich komórek, podobieństwo w strukturze do ECM, dobra dyfuzja składników odżywczych oraz jednorodne rozmieszczenie komórek w całej objętości hydrożelu [36].

W mikrosystemach przepływowych hydrożele są często stosowanym rozwiązaniem w celu uzyskania trójwymiarowej hodowli komórek. Przykład zastosowania w mikroukładzie jonowrażliwego hydrożelu przedstawiono w pracy Kima [37]. Wykorzystany hydrożel (*Puramatrix*), będący mieszaniną samoorganizujących się syntetycznych peptydów, ulega żelowaniu w obecności jonów soli (zawartych w medium hodowlanym) [38]. W wyniku tego łańcuchy peptydowe tworzą sieć nanowłókien o średnicy 10 nm i wielkości porów 50–200 nm. Zastosowana geometria kanałów umożliwiała ogniskowanie hydrodynamiczne mieszaniny płynnego hydrożelu i komórek w centralnej części głównego mikrokanalu (długość = 2 mm i szerokość = 900  $\mu\text{m}$ ), a następnie żelowanie w wyniku przepływu medium hodowlanego [37]. Mikroukład wykonano w poli(dimetylosioksanie) (PDMS) za pomocą techniki fotolitografii i metody replikacyjnej. Warstwę PDMS z otrzymaną strukturą mikrokanalów połączono ze szkiełkiem mikroskopowym z wykorzystaniem plazmy tlenowej. Do mikroukładu wprowadzano jednocześnie za pomocą pomp strzykawkowych: mieszaninę płynnego hydrożelu i zawiesiny komórek (1:1), 10% roztwór sacharozy oraz medium hodowlane (wartości przepływów kolejno: 0,167; 3; 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Roztwór sacharozy pełnił dwie role: ogniskował hydrodynamicznie mieszaninę hydrożelu i komórek w środku głównego mikrokanalu oraz izolował w pierwszym etapie dwa strumienie medium hodowlanego (zwierającego żelujące sole) od mieszaniny hydrożelu i komórek (Rys. 5A). Gdy mikrokanal na całej długości został wypełniony hydrożelem, wyłączono przepływ roztworu sacharozy, natomiast przepływ medium hodowlanego zwiększono do 1,3  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Rys. 5B). W momencie gdy oba strumienie medium hodowlanego dotarły do mieszaniny hydrożelu i komórek, przepływ mieszaniny hydrożelu z komórkami został wyłączony. W wyniku dyfuzji medium do wnętrza hydrożelu uległ on zżelowaniu, a komórki enkapsulacji w jego wnętrzu (Rys. 5C). W zaprojektowanym mikroukładzie prowadzono 3-dniową hodowlę hepatocytów linii nowotworowej HepG2 w warunkach przepływowych (wartość przepływu medium wynosiła 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Wykazano również, że wartość przepływu roztworu sacharozy, podczas wprowadzania hydrożelu do mikroukładu, nie powinna być większa niż 6,7  $\mu\text{l}/\text{min}$ , ponieważ wpływa to negatywnie na żywotność hodowanych komórek.



Rysunek 5. Schemat procesu tworzenia się strefy hydrożelu (wraz zamkniętymi w jego wnętrzu komórkami) w centrum głównego mikrokanalu: wszystkie płyny wprowadzane są do mikroukładu jednocześnie, roztwór sacharozy ogniskuje hydrodynamicznie mieszaninę hydrożelu i komórek oraz izoluje ją od medium hodowlanego (A); przepływ roztworu sacharozy zostaje wyłączony, oba strumienie medium hodowlanego docierają do mieszaniny hydrożelu i komórek (B); żelowanie hydrożelu w wyniku dyfuzji medium (C) [37]

Figure 5. Scheme of hydrogel zone formation (with cells encapsulated inside) in the middle of the main microchannel: all liquids are introduced into the microdevice simultaneously, sucrose solution hydrodynamically focuses the hydrogel-cells mixture and isolates the mixture of culture medium (A); the flow of sucrose solution is turned off, both streams of culture medium start to be in contact with hydrogel-cells mixture (B); gelation of hydrogel by culture medium diffusion (C) [37]

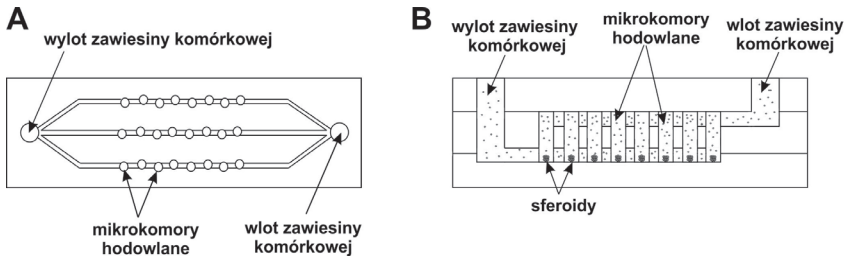
Kolejnym typem przestrzennej hodowli komórek w mikroukładach przepływowych są sferoidy. Są one jednymi z pierwszych modeli *in vitro* umożliwiającymi przestrzenny kontakt komórek [39]. Powstają one z agregatów komórkowych podczas hodowli w zawieszynie lub nieadhezyjnym środowisku [40]. Brak lub ograniczona adhezja do podłoża sprawia, że komórki wykazują zwiększoną tendencję do tworzenia skupisk, przekształcających się w miarę upływu czasu w trójwymiarowe wielokomórkowe twory. Za tworzenie się agregatów komórkowych odpowiadają zlokalizowane w błonie komórkowej cząsteczki adhezyjne – CAMs (ang. *Cell Adhesion Molecules*) [41]. Cząsteczki adhezyjne zwane również adhezynami, to glikoproteiny stanowiące integralną część błony komórkowej, które biorą udział w tworzeniu kontaktów i połączeń międzykomórkowych.

Z powodu ograniczonej dyfuzji (na głębokość około 150-200  $\mu\text{m}$  [40]) składników odżywczych do wnętrza sferoidów, składają się one z komórek o zróżnicowanym fenotypie [42]. Centralną część sferoidu stanowią komórki objęte zmianami martwiczymi. W pobliżu obszarów centralnych występują komórki w fazie spoczynkowej. Zewnętrzną warstwę (3-5 warstw) stanowią komórki proliferujące. Charakterystyczna morfologia sferoidów sprawia, że są one szeroko stosowane jako model nieunaczynionego guza nowotworowego w ocenie skuteczności działania leków przeciwnowotworowych i radioterapii [40].

Sferoidy można otrzymać różnymi, dokładnie opisanymi, metodami [40]. Zastosowanie mikrosystemów generujących samoorganizację komórek do sferoidów jest jedną z nowszych technik. Przykłady mikroukładów umożliwiającą



cych tworzenie sferoidów są szeroko opisywane w literaturze [43–45]. W zespole Brzózki trwające od kilku lat badania nad tym zagadnieniem zaowocowały kilkoma projektami tego typu mikroukładów. Jeden z zaprojektowanych [46] mikrosystemów pozwolił uformować sferoidy o średnicy do około 300  $\mu\text{m}$  i prowadzić ich hodowlę przez 15 dni. Hodowlę prowadzono w 24 przepływowych mikrokomorach o cylindrycznym kształcie zapewniających bardzo niskie naprężenia ścinające  $< 0,001 \text{ dyn/cm}^2$  (uznawane za nieszkodliwe dla komórek ssaczych) podczas wymiany medium hodowlanego. Mikroukład o geometrii kanałów i rozmieszczeniu mikrokomór, przedstawiony na Rysunku 6A, składał się z trzech warstw. Każda z warstw, zawierająca poszczególne elementy geometrii, została wykonana w PDMS za pomocą techniki fotolitografii i metody replikacyjnej. Trójwarstwowa struktura mikroukładu pozwoliła stworzyć przestrzenną strukturę kanałów tzn. uzyskać kanały na różnych wysokościach (Rys. 6B).



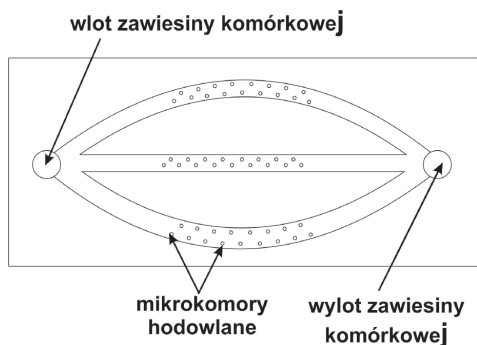
Rysunek 6. Schemat geometrii mikrosystemu przepływowego do formowania i hodowli sferoidów (A); schemat przekroju poprzecznego zaprojektowanego mikroukładu (B) [46]

Figure 6. Scheme of the geometry of the microfluidic system for spheroids formation and culture (A); scheme of cross-section of the designed microsystem (B) [46]

Badania nad uformowaniem i hodowlą sferoidów w zaprojektowanym mikroukładzie wykonano na adherentnych komórkach nowotworu okrężnicy linii HT-29. Hydrofobowe właściwości poli(dimetylosiloksanu) pozwoliły zapobiec adhezji komórek do powierzchni mikrokanalów/mikrokomór, tam samym sprzyjając tworzeniu się agregatów/sferoidów. Formowanie sferoidów w mikroukładzie odbywało się w czterech etapach: (1) wysianie komórek, (2) agregacja komórek, (3) wymycie niezagregowanych komórek, (4) uformowanie zwartej sferoidy. Na początku zawiesinę komórek o gęstości  $10^6$  komórek/ml wprowadzono do mikroukładu za pomocą pompy strzykawkowej z prędkością przepływu 24  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Agregację komórek zaobserwowano po 16 godzinach hodowli. Po tym czasie niezagregowane komórki wymyły z mikrokomór. Średni wymiar uzyskanych sferoidów w 8 dniu hodowli wynosił  $140 \pm 10 \mu\text{m}$ , w 15 dniu hodowli  $270 \pm 50 \mu\text{m}$ . Grubość warstwy komórek proliferujących wynosiła  $60 \pm 10 \mu\text{m}$ , co odpowiadało 4–5 warstwom komórek.

W drugim z zaprojektowanych mikroukładów [47] trójwymiarową strukturę mikrokanalów uzyskano dzięki zastosowaniu techniki mikrofrezowania. Pozwoliło to uproszczyć proces wytwarzania mikroukładu poprzez wyeliminowanie wielowar-

stwowej struktury oraz skomplikowanego procesu wzajemnego pozycjonowania poszczególnych elementów geometrii (mikrokanalów i mikrokomór) zawartych w każdej z warstw. Mikroukład wykonano w PDMS z zastosowaniem procesu podwójnego odlewu i termicznego starzenia (metoda ta dokładnie opisana w pracy [47]). Mikroukład składał się z trzech kanałów o szerokości 1 mm i głębokości 50  $\mu\text{m}$  (Rys. 7). Każdy mikrokanal zawierał 15 cylindrycznych mikrokomór o średnicy 200  $\mu\text{m}$  i głębokości 150  $\mu\text{m}$ . Zaprojektowana geometria zapewniała niskie naprężenia ścinające 0,0013  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  podczas przepływu medium z prędkością 4,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Głębokość kanałów była wystarczająca aby zapobiec wymywaniu agregatów podczas wymiany medium.



Rysunek 7. Schemat geometrii mikrosystemu przepływowego do formowania i hodowli sferoidów [47]

Figure 7. Scheme of the geometry of the microfluidic system for spheroids formation and culture [47]

Badania nad uformowaniem i hodowlą sferoidów w zaprojektowanym mikroukładzie wykonano również na adherentnych komórkach nowotworu okrężnicy linii HT-29. Hydrofobowe właściwości PDMS zwiększono poprzez modyfikację jego powierzchni za pomocą poli(alkoholu winylowego) (PVA), co sprzyjało wzajemnej adhezji komórek. Powstawanie sferoidów przebiegało tak samo jak we wcześniej opisywanym mikrosystemie. Zaprojektowany mikrosystem przepływowy umożliwił uformowanie sferoidów oraz ich 4 tygodniową hodowlę. Zaobserwowano trzy fazy wzrostu: faza I (0–3 dni) to agregacja komórek, tworzenie sferoidu i powolny wzrost biomasy, faza II (3–10 dni) to intensywna proliferacja i wzrost objętości biomasy a faza III (po 10 dniach) to spadek tempa proliferacji aż do zatrzymania wzrostu sferoidów, stała objętość biomasy. Podczas drugiej fazy wzrostu zbadano cytotoksyczność 5-fluorouracylu o stężeniach w zakresie 0,3–5 mM w stosunku do otrzymanych sferoidów. Dla małych stężeń leku (0,3 i 0,5 mM) zaobserwowano zahamowanie wzrostu sferoidów. Większe stężenia (1, 2 i 5 mM) spowodowały śmierć komórek i ich odłączanie się od sferoidów, co skutkowało zmniejszeniem ich średnicy. Zjawisko to wykorzystano jako wskaźnik cytotoksyczności badanego związku. Tak przeprowadzona hodowla sferoidów posłużyła jako dobry model komórkowy w ocenie skuteczności działania leku przeciwnowotworowego.

Przestrzenne hodowle komórkowe w mikrosystemach przepływowych stanowią dużo lepszy model doświadczalny *in vitro* niż hodowle w tradycyjnych naczyniach hodowlanych. Pomimo tego trzeba włożyć jeszcze wiele pracy w udoskonalenie konstrukcji mikrosystemów aby mogły one stać się powszechnie stosowanym narzędziem badawczym inżynierii komórkowej.

## PODSUMOWANIE

Mikrosystemy przepływowe są obiecującym narzędziem badawczym inżynierii komórkowej. W porównaniu do tradycyjnych hodowli komórkowych pozwalają one odwzorować warunki *in vivo*. Przede wszystkim zapewniają stały w czasie przepływ medium hodowlanego, które dostarcza świeże składniki pokarmowe niezbędne do wzrostu komórek, jak również usuwa z ich otoczenia powstające podczas hodowli toksyczne metabolity. Warunki przepływowe zapewniają stałość i powtarzalność warunków hodowli, co skutkuje zmniejszeniem przypadkowości w badaniach naukowych. Dodatkowo podczas hodowli możliwa jest regulacja wartości przepływu medium, co pozwala sterować warunkami hodowli. Co najważniejsze, w mikroukładach możliwe jest osiągnięcie przestrzennej hodowli komórek. W takim środowisku komórki zorganizowane są w sposób zapewniający im komunikację i wzajemne oddziaływanie. Dzięki temu hodowla komórkowa w mikrosystemach przepływowych stanowi dużo lepszy model doświadczalny niż tradycyjne hodowle. Ponadto, wykorzystanie systemów *lab-on-a-chip* do badań może w przyszłości ograniczyć lub całkowicie wyeliminować testy na zwierzętach.

## PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca była finansowana z funduszy przeznaczonych na badania statutowe w Politechnice Warszawskiej.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, *Nature*, 2006, **442**, 374.
- [2] Q. Tu, L. Pang, Y. Zhang, M. Yuan, J. Wang, D. Wang, W. Liu, *Chin. J. Chem.*, 2013, **31**, 304.
- [3] K. Takahata, *Micro Electronic and Mechanical Systems*, InTech, Rijeka, Croatia 2009.
- [4] E.W.K. Young, D.J. Beebe, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1036.
- [5] J.T. Borenstein, H. Terai, K.R. King, E.J. Weinberg, M.R. Kaazempur-Mofrad, J.P. Vacanti, *Biomed. Microdevices*, 2002, **4**, 167.
- [6] X. Zhang, P. Jones, S.J. Haswell, *Chem. Eng. J.*, 2008, **135**, 82.
- [7] G.M. Walker, H.C. Zeringue, D.J. Beebe, *Lab Chip*, 2004, **4**, 91.
- [8] K. Ziółkowska, E. Jędrych, R. Kwapiszewski, J. Łopacińska, M. Skolimowski, M. Chudy, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2010, **145**, 533.

- [9] B. Altmann, T. Steinberg, S. Giselbrecht, E. Gottwald, P. Tomakidi, M. Bächle-Haas, R.J. Kohal, *Biomaterials*, 2011, **32**, 8947.
- [10] J.L. Wang, K.F. Ren, H. Chang, F. Jia, B.C. Li, Y. Ji, J. Ji, *Macromol. Biosci.*, 2013, **13**, 483.
- [11] E. Sollier, C. Murray, P. Maoddi, D. Di Carlo, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3752.
- [12] H. Ota, R. Yamamoto, K. Deguchi, Y. Tanaka, Y. Kazoe, Y. Sato, N. Miki, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2010, **147**, 359.
- [13] H. Andersson, A.B. Berg, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2003, **92**, 315.
- [14] P. Neuzil, S. Giselbrecht, K. Lange, T. J. Huang, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, **11**, 620.
- [15] D. Wlodkowic, J.M. Cooper, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 556.
- [16] G.A. Cooksey, C.G. Sip, A. Folch, *Lab Chip*, 2009, **7**, 417.
- [17] E. Jędrych, Z. Pawlicka, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **683**, 149.
- [18] A.W. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M.L. Yarmush, M. Toner, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **73**, 379.
- [19] A. Kamholz, B.H. Weigl, B.A. Finlayson, P. Yager, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 5340.
- [20] W. Siyan, Y. Feng, Z. Lichuan, W. Jiarui, W. Yingyan, J. Li, L. Bingcheng, W. Qi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **49**, 806.
- [21] Z. Wang, H. Kim, M. Marquez, T. Thorsen, *Lab Chip*, 2007, **276**, 1425.
- [22] E. Jastrzębska, S. Flis, A. Rakowska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Mikrochim. Acta.*, 2013, **180**, 895.
- [23] X. Lou, G. Kim, H.K. Yoon, Y. Koo Lee, R. Kopelman, E. Yoon, *Lab Chip*, 2014, **14**, 892.
- [24] E. Jastrzębska (Jędrych), I. Grabowska-Jadach, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Biomicrofluidics*, 2012, **6**, 044116-1.
- [25] F. Nie, M. Yamada, J. Kobayashi, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4017.
- [26] L. Businaro, A. Ninno, G. Schiavoni, V. Lucarini, G. Ciasca, A. Gerardino, F. Belardelli, L. Gabriele, F. Mattei, *Lab Chip*, 2013, **13**, 229.
- [27] G. Fuller, D. Shields, *Podstawy molekularne biologii komórki*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000.
- [28] N. Annabi, S. Selimowić, J. P. A. Cox, J. Ribas, M. A. Bakooshli, D. Heintze, A. S. Weiss, D. Crokek, A. Khademhosseini, *Lab Chip*, 2013, **13**, 3569
- [29] M.S. Kim, H. Hwang, Y. Choi, J. Park, *Open Biotechnol. J.*, 2008, **2**, 224.
- [30] H. Sato, Y. Houshi, S. Shoji, *Microsyst. Technol.*, 2004, **10**, 440.
- [31] Y.C. Toh, C. Zhang, J. Zhang, Y.M. Khong, S. Chang, V.D. Samper, D. van Noort, D.W. Huttmacher, H. Yu, *Lab Chip*, 2007, **7**, 302.
- [32] Y.C. Toh, T.C. Lim, D. Tai, G. Xiao, D. van Noort, H. Yu, *Lab on Chip*, 2009, **9**, 2026.
- [33] C.G. Anene-Nzelu, K.Y. Peh, A. Fraiszudeen, Y.H. Kuan, S.H. Ng, Y.C. Toh, H.L. Leo, H. Yu, *Lab Chip*, 2013, **13**, 4124.
- [34] J.L. Drury, D.J. Mooney, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4337.
- [35] Y. Qiu, K. Park, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2001, **53**, 321.
- [36] B.P. Chan, K.W. Leong, *Eur. Spine. J.*, 2008, **17**, S467.
- [37] M.S. Kim, J.H. Yeon, J. Park, *Biomed. Microdevices*, 2007, **9**, 25.
- [38] A.O. Abu-Yousif, I. Rizvi, C.L. Evans, J.P. Celli, T. Hasan, *J. Vis. Exp.*, 2009, **34**, e1692, 1.
- [39] S. Stokłosowa, *Hodowla komórek i tkanek*, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2004.
- [40] R. Lin, H. Chang, *Biotechnol. J.*, 2008, **3**, 1172.
- [41] M. Mantur, J. Wojsztel, *Pol. Merk. Lek.*, XXIV, 2008, **140**, 177.
- [42] K. Urbańska, J. Sokołowska, *Życie Wet.*, 2012, **88/10**, 827.
- [43] Y. Torisawa, A. Takagi, Y. Nashimoto, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Biomaterials*, 2007, **28**, 559.
- [44] B. Patara, Y.H. Chen, C.C. Peng, S.C. Lin, C.H. Lee, Y.C. Tung, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 054114-1.
- [45] C-Y. Fu, S.Y. Tseng, S.M. Yang, L. Hsu, C.H. Liu, H.Y. Chang, *Biofabrication*, 2014, **6**, 015009-1.

- 
- [46] K. Ziółkowska, R. Kwapiszewski, A. Stelmachowska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2012, **173**, 908.
- [47] K. Ziółkowska, A. Stelmachowska, R. Kwapiszewski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **40**, 68.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 maja 2015

