



Roman SZAFRAN

Metodyka projektowania mikroaparatów lab on a chip do badań przepływów w naczyniach włosowatych guzów nowotworowych

e-mail: roman.szafran@pwr.wroc.pl
Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny,
ul. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław, tel. 71 320 38 13

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. W porównaniu do technik fotolitograficznych i miękkiej litografii, sposób fabrykacji mikroukładu LOC 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, po odpowiedniej modyfikacji, zbudowany układ LOC może służyć jako środowisko badań nad uwalnianiem CTC z tkanek guza i procesem metastazy.

Wstęp

Coraz częściej wykorzystuje się układy 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 O.F. i Sefton M.V. opracowali mikrosystem, w którym badano wpływ odkształceń związanych z naprężeniami ścinającymi i zaburzeniami przepływu krwi na fenotyp komórek śródbłonna [Khan O.F., Sefton M.V., 2011]. Związane jest to ze wzmożoną 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, dlatego też znalazły się w strefie zainteresowań badaczy.

Układy LOC można z powodzeniem wykorzystywać do badań nad komórkami nowotworowymi. Chaw i współpracownicy 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. Przeprowadzano wizualizację mikroskopową zachodzących w mikrosystemie procesów. Badano oddziaływanie pojedynczych komórek nowotworowych z komórkami śródbłonna wysięlającymi substancje naczyniowe. Układ umożliwiał obserwację transmigracji, deformacji i adhezji tych komórek [Chaw K.C. i in., 2007]. 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 T. i in., 2011].

Dotychczasowe badania prowadzone były w układach LOC wytwarzanych metodami litograficznymi, nie prowadzono badań nad zastosowaniem metody bezpośredniego grawerowania laserowego (DLP) do konstrukcji mikroaparatów biomedycznych do badań nad neowaskularyzacją. Metoda DLP, bliżej opisana w artykule [Szafran R., 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 w/w strukturze oraz fabrykacja zaprojektowanego systemu z wykorzystaniem metody DLP.

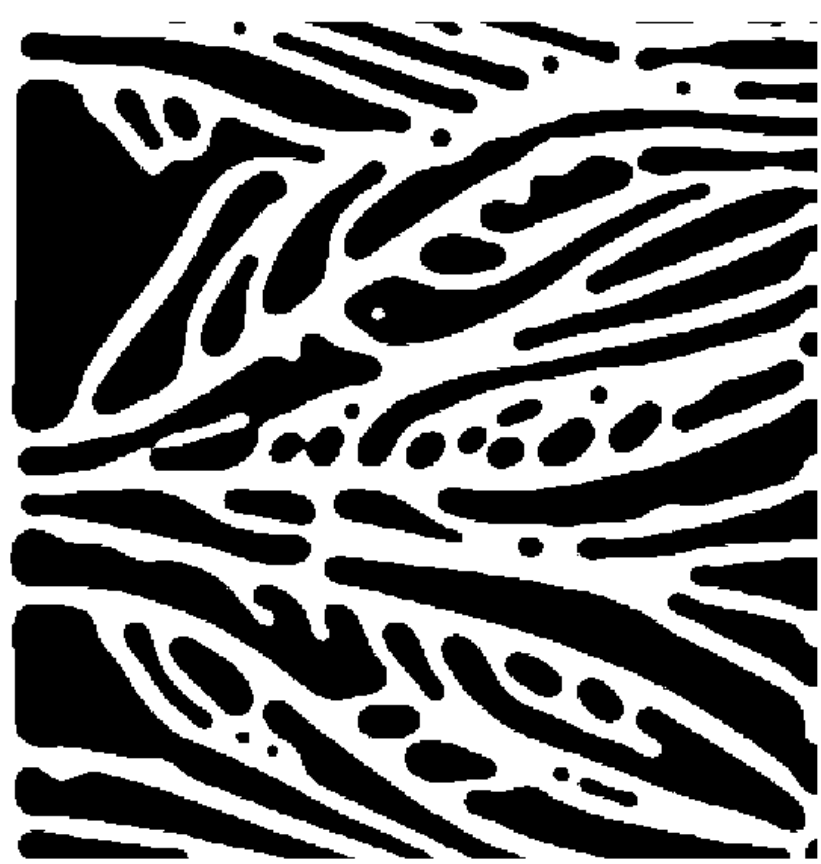
Modelowanie matematyczne procesu angiogenezy nowotworowej

W badaniach zdecydowano się na użycie do celów projektowych modelowej sieci naczyń krwionośnych. Strukturę naczyń włosowatych, na podstawie której wykonano projekt, uzyskano z opracowanego przez Travasso i współpracowników [Travasso R.D.M. i in., 2011] modelu. 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 komórek śródbłonna.

Model uwzględniał także zjawisko anastomozy, czyli łączenia się szybko rosnących naczyń w jedno. Wykorzystaną na dalszych etapach badań strukturę 2D naczyń włosowatych guza nowotworowego przedstawiono na rysunku 1.

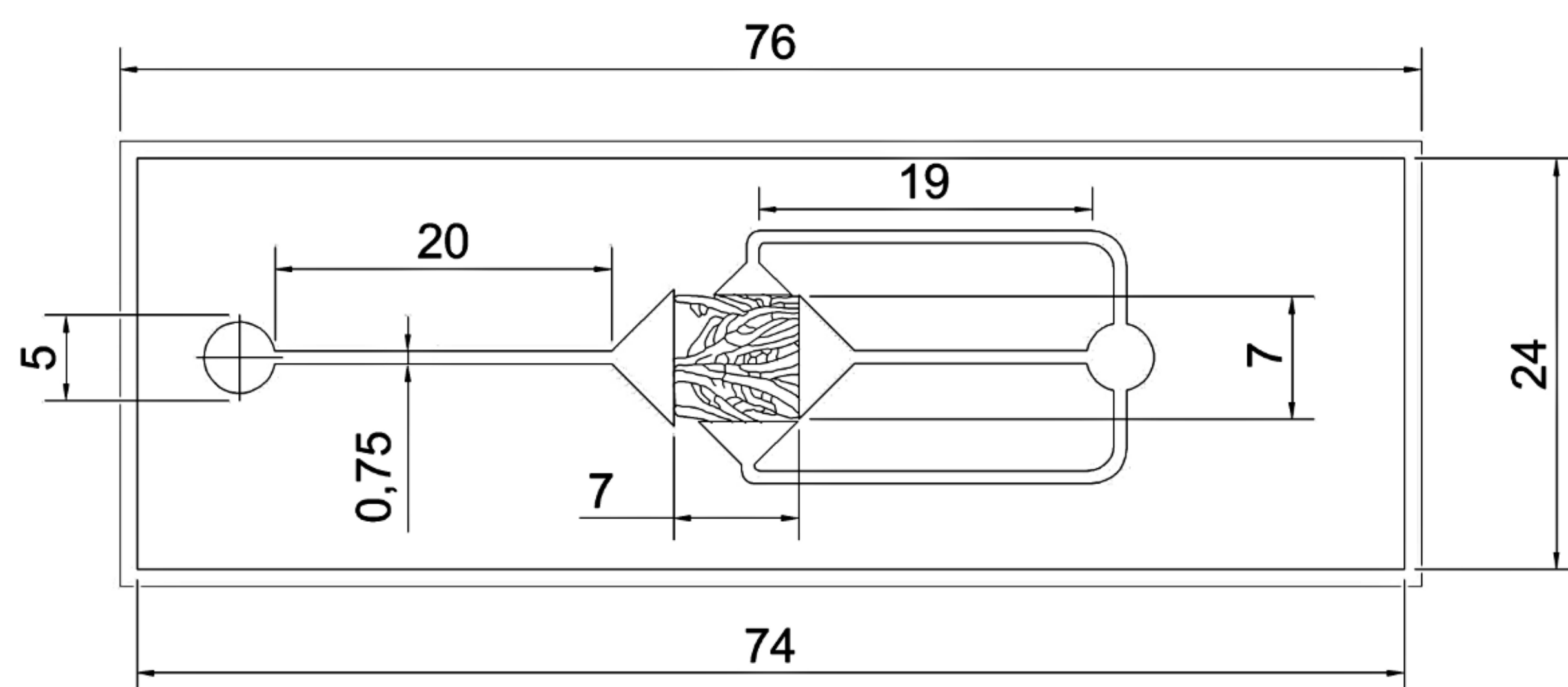
Metodyka projektowania i fabrykacji

W pierwszej kolejności, na podstawie struktury przedstawionej na rysunku 1, stworzono wektorową mapę kanałów w programie Autodesk AutoCAD, 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 rysunku 2. Zaprojektowaną strukturę wyeksportowano do środowiska pracy stacji grawerującej. Zgodnie z opracowaną procedurą, zaprezentowaną w artykule [Szafran R., 2013], strukturę przenoszono na materiał kompozytowy otrzymany przez naniesienie PDMS na folię poliestrową.



Rys. 1. Modelowa struktura naczyń włosowatych guza nowotworowego.

Wykonane mikroukłady

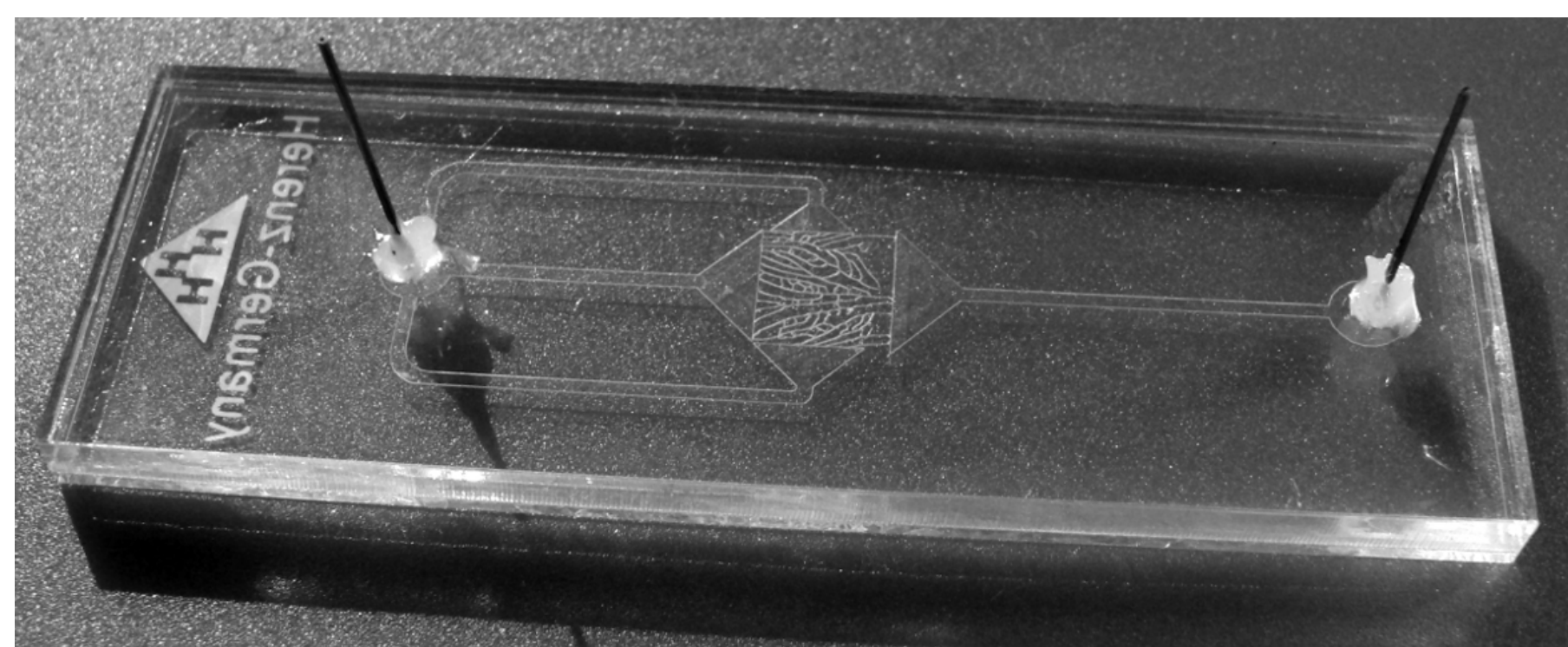


Rys. 2. Budowa mikrochipa.

Folia poliestrowa stanowiła podłoże dla warstwy PDMS o grubości 100µm - 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: moc 3W, szybkość przesuwu głowicy laserowej 1 mm/s, częstotliwość impulsu 1000 PPI, nadmuch boczny na miejsce grawerowane. Zgodnie z opracowaną procedurą [Szafran R., 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 185nm i 253,7nm przez okres 1 min, po czym niezwłocznie łączona z nowym podłożem – mikroskopowym szkiełkiem podstawowym. Po docięnięciu 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 1h w celu trwałego złączenia. Ostatnią czynnością było wklejenie stalowych kapilar pełniących rolę portów przyłączeniowych dla polipropylenowych kapilar doprowadzających płyny do układu.

Wyniki badań doświadczalnych

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



Rys. 3. Skonstruowany układ LOC do badań przepływów płynów w sieci naczyń włosowatych guzów nowotworowych.



Rys. 4. Struktura mikrokanalów po wprowadzeniu korekty do projektu, na skutek obserwowanych nieciągłości struktury.

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 – rysunek 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 AutoCadzie. Polegała ona na delikatnym przeciąganiu polilinii poza miejsce skrzyżowania kanałów, w efekcie po korekcie uzyskano prawidłową strukturę kanałów – rysunek 4. Tak skonstruowany system był w dalszej kolejności poddawany badaniom przepływów, co zostanie szczegółowo omówione w kolejnym artykule [Szafran R., Tomczak T., 2013].

LITERATURA

- Chaw K.C., Manimaran M., Tay E.H., Swaminathan S., 2007. Multi-step microfluidic device for studying cancer metastasis. *Lab Chip*, 7, 1041-1047.
- Ishikawa T., Fujiwara H., Matsuki N., Yoshimoto T., Imai Y., Ueno H., Yamaguchi T., 2011. Assymetry of blood flow and cancer cell adhesion in a microchannel with symmetric bifurcation and confluence. *Biomed Microdevices*, 13, 159-167.
- 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, 717-723.
- 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.
- Szafran R., 2013. Fabrykacja mikroaparatów metodą bezpośredniego grawerowania laserowego DLP, *XXI Ogólnopolska Konferencja Inżynierii Chemicznej i Procesowej Szczecin/Kołobrzeg, 2-6 września 2013*.
- Szafran R., Tomczak T., 2013. Wykorzystanie metody lattice-Boltzmann do symulacji mikroprzepływów w kanałach układów lab on a chip, *XXI Ogólnopolska Konferencja Inżynierii Chemicznej i Procesowej Szczecin/Kołobrzeg, 2-6 września 2013*.
- Travasso R.D.M., Poiré E.C., Castro M., Rodriguez-Manzanique J.C., A. Hernández-Machado, 2011. Tumor angiogenesis and vascular patterning: a mathematical model. *PLoS ONE*, 6(5), e19989.
- Chow A.W. 2002. Lab-on-a-Chip: Opportunities for Chemical Engineering, *AIChE Journal*, 48, 8, 1590-1595.

PODZIĘKOWANIA

Badania zostały sfinansowane w ramach grantu badawczego NCN N N501 042140.