

mgr inż. **Rafał Szczypiński**

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcza, PAN

AUTOREFERAT

Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Moduł mikroprzepływowy do pomiarów cytometrycznych**”

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie układu mikroprzepływowego do zastosowań w cytometrii przepływowej, z możliwością wykorzystania w urządzeniach przeznaczonych do użytkowania w miejscu poza specjalistycznym laboratorium analitycznym (ang. point-of-care, POC).

Cytometria przepływowa jest to jedna z technik analitycznych i najszybszych metod służących do diagnozowania klinicznego. Opiera się ona na pomiarach fizycznych i/lub chemicznych właściwości oraz zliczaniu obiektów: komórek lub cząstek mikroskopowej wielkości. Pomiary prowadzi się podczas przepływu przez mikrokanal obiektów zawieszonych w strumieniu płynu. Zwykle identyfikacji podlegają komórki/cząstki o średnicy w zakresie od 1 do 30 mikrometrów oraz stężeniu $5 \cdot 10^5/\text{ml}$ do $5 \cdot 10^6/\text{ml}$ w buforowym roztworze zawiesiny. W obszarze detekcji optycznej, są one naświetlane zogniskowaną wiązką światła. Najczęściej stosowanym źródłem światła jest laser (np. laser argonowy, o monochromatycznej wiązce światła o długości fali 458 nm, 488 nm lub 514 nm oraz mocy $5 \div 75$ mW). Światło laserowe ulega częściowo rozproszeniu na analizowanych komórkach/cząsteczkach, a częściowo jest przez nie pochłaniane.

Rozpraszanie światła jest zależne od wewnętrznej struktury komórki, jej rozmiarów i kształtu. Analiza światła rozproszonego odbywa się w dwóch zakresach:

1. FSC (ang. *Forward Scatter*), zgodnie z kierunkiem padania wiązki laserowej pod kątem nieprzekraczającym 10° (klasyfikacja komórek pod względem ich wielkości - natężenie światła rozproszonego jest proporcjonalne do rozmiaru obiektu rozpraszającego).
2. SSC (ang. *Side Scatter*), pod kątem 90° do kierunku padania wiązki światła laserowego (komórki klasyfikuje się pod względem ich wielkości, kształtu oraz wewnętrznej ziarnistości).

Absorpcja (pochłanianie) światła o określonej długości fali jest możliwe dzięki skoniugowanym z komórkami/mikrocząstkami (poddawanymi analizie) fluorochromami. Są to substancje, które w wyniku absorpcji energii świetlnej o określonej długości fali

– powodującej ich wzbudzenie, emitują światło o większej długości fali (przesunięcie stokesowskie). Stosowane są fluorochromy pojedyncze (np. izotiocyjanian fluoresceiny, fikoerytryna, allofikocyjanina) oraz tandemy, będące kompleksami dwóch fluorescencyjnych związków chemicznych (np. seria PE-Alexa fluor, APC-Cy5.5). Światło fluorescencyjne pozwala na uzyskanie informacji ilościowych i jakościowych o komórkach wyznakowanych różnymi fluorochromami – szczegółowa identyfikacja komórek - fenotypowanie.

Obie wiązki: światło rozproszone i fluorescencyjne, są rejestrowane przez detektory (fotodiody, fotopowielacze), których sygnały wyjściowe są następnie wzmacniane [1]. Ponieważ w zawiesinie komórek poddawanej analizie znajdują się populacje wyznakowane różnymi fluorochromami, zawiesina ta jest źródłem fluorescencji o różnych długościach fali. W konsekwencji sygnały pochodzące od różnych komórek mogą się wzajemnie nakładać. Dlatego też, w celu poprawienia selektywności pomiaru stosuje się układ kilku zwierciadeł dichroicznych oraz filtrów optycznych.

Technikę analityczną, jaką jest cytometria przepływowa stosuje się między innymi w:

- badaniach krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji,
- diagnostyce i terapii nowotworów, w tym również w badaniach oporności wielolekowej podczas chemioterapii,
- diagnostyce chorób autoimmunizacyjnych, do których zaliczyć można reumatoidalne zapalenie stawów, zespół Sjögrena, cukrzycę typu I, zapalenie tęczówki oraz autoimmunologiczne zapalenie wątroby,
- badaniach stanu układu immunologicznego np. subpopulacji limfocytów u pacjentów znajdujących się po przeszczepie,
- ocenie efektywności terapii odczulającej (alergologia),
- badaniach weterynaryjnych i epidemiologicznych,
- badaniach komórek roślinnych i grzybów.

Są to jedynie wybrane przykłady, jednakże zauważyć można, że cytometria przepływowa ma bardzo szeroki zakres zastosowań. Badania z wykorzystaniem tej techniki analitycznej są prowadzone w specjalnie do tego przystosowanych laboratoriach. Problem braku możliwości szybkiego transportu aparatury pomiarowej mógłby zostać rozwiązany przez opracowanie urządzenia analitycznego, którego transport nie sprawiłby problemu, a jego wykorzystanie byłoby możliwe niemal w dowolnym miejscu.

W ostatnim okresie osiągnięto ogromny postęp w zakresie miniaturyzacji urządzeń pomiarowych, w tym analitycznych. Konstruowane mikroukłady elektro-mechaniczne tzw.

czyipy MEMS (ang. *micro electro-mechanical systems*) zawierają zintegrowane elementy, służące do wykonywania rozmaitych funkcji, jak: wstępne przygotowanie analizowanego medium, przeprowadzanie reakcji chemicznych np. w mikroreaktorach, separacja składników i detekcja. Głównymi zaletami zminiaturyzowanych urządzeń analitycznych są między innymi użycie do analizy próbek oraz reagentów i odczynników pomocniczych, o małej objętości, i w których podczas procesu analitycznego powstają niewielkie ilości odpadów. Istotny jest również aspekt finansowy towarzyszący konstruowaniu analitycznych urządzeń mikroprzepływowych – do materiałów, z których się je wykonuje należą między innymi: polimery, tworzywa sztuczne czy szkło oraz krzem. Jednak za główną zaletę należy uznać możliwość równoległego działania kilku jednostek i ich integracji z innymi podobnymi urządzeniami, tworząc tzw. hybrydowe konstrukcje *lab-on-a-chip*, charakteryzujące się łatwością ich przenoszenia i użycia w miejscu pobrania próbki, na przykład przy łóżku pacjenta (ang. *point-of-care*), czy też w warunkach polowych [2].

Analiza stanu wiedzy w zakresie mikroukładów analitycznych, jakie mogłyby posłużyć do budowy urządzenia przeznaczonego do badań cytometrycznych pozwala na sformułowanie następujących tez rozprawy doktorskiej:

- 1. Możliwe jest wykonanie układu mikroprzepływowego z poli(dimetylosiloksanu) pozwalającego na hydrodynamiczne ogniskowanie płynów w kanale centralnym struktury.**
- 2. Układ mikroprzepływowy wykonany z PDMS, w połączeniu z układem detekcji optycznej, umożliwia wykrywanie komórek znakowanych fluorescencyjnie.**

Na podstawie przeprowadzonej analizy literatury dotyczącej cytometrii przepływowej, rozwiązań konstrukcyjnych układów mikroprzepływowych oraz dostępu do odpowiednich technik laboratoryjnych, opracowano moduł mikrocytometru, którego integralną częścią jest układ mikroprzepływowy wykonany z poli(dimetylosiloksanu).

Wybór poli(dimetylosiloksanu) jako materiału konstrukcyjnego

Materiałem, jaki zdecydowano się wybrać do budowy modułu mikroprzepływowego był poli(dimetylosiloksan) – PDMS (Sylgard 184, Dow Corning). Pod uwagę wzięto własności jakimi charakteryzują się polisiloksany. W porównaniu z polimerami winylowymi (zawierającymi atomy węgla w głównym łańcuchu polimerowym), substancje te posiadają wiele cech korzystnych. Ich łańcuchy są giętkie, co przekłada się na niższe temperatury topnienia oraz przetwórstwa. W temperaturze pokojowej polisiloksany są lepкими cieczami,

natomiast uzyskane po ich usieciowaniu materiały posiadają właściwości elastyczne. Do produkcji tego rodzaju związków chemicznych używa się surowców takich jak krzemionka, metan oraz chlor. Utylizacja materiałów polisiloksanowych nie jest groźna dla środowiska naturalnego, gdyż do głównych produktów ich spalania należą para wodna, tlenek węgla(IV) i tlenek krzemu(IV). PDMS posiada również inną, niezwykle użyteczną właściwość – jest optycznie transparentny. Dzięki temu możliwe jest jego wykorzystanie do budowy układów mikroprzepływowych, w których stosowana jest detekcja optyczna. Z punktu widzenia medycyny najważniejszą zaletą PDMS jest obojętność względem płynów fizjologicznych, określana mianem biokompatybilności [3]. Jest to jedna z głównych przesłanek podjęcia prac badawczych dotyczących zastosowania tego materiału do konstrukcji układów mikroprzepływowych. Ponadto technologie dostępne w IBIB PAN we współpracy z Instytutem Technologii Elektronowej w Warszawie zapewniały możliwość wytworzenia zaprojektowanego układu mikroprzepływowego.

Projekt oraz konstrukcja modułu cytometru

Opracowany moduł cytometru mikroprzepływowego składa się ze struktury mikroprzepływowej wykonanej z PDMS oraz specjalistycznego uchwytu zawierającego przyłącza mikroprzepływowe i optoelektroniczne. Pierwszy z elementów - struktura mikroprzepływowa składa się z dwóch płytek PDMS: płaskiej płytki, oraz płytki z mikrokanałami i otworami doprowadzającymi/odprowadzającymi odpowiednie płyny stosowane podczas badań analitu. Płytki z PDMS wykonano metodą fotolitografii miękkiej (ang. *soft lithography*) z wykorzystaniem zaprojektowanej matrycy zawierającej odpowiedni negatywowy wzór struktury mikrokanałów, wykonany z żywicy fotoutwardzalnej SU-8 na podłożu krzemowym.

Opracowana przez autora procedura wytwarzania modułu cytometru składa się z kilku zasadniczych etapów:

1. Sporządzenie prepolimeru (PDMS monomer oraz jego czynnik sieciujący mieszane są w stosunku wagowym 10:1, a następnie odpowietrzane).
2. Wykonanie odlewu bloków z PDMS o ściśle określonej grubości na matrycach zawierających negatywy struktur mikrokanałów.
3. Sieciowanie w temperaturze 60 °C przez dwie godziny.
4. Demontaż usieciowanych bloków PDMS i wycięcie z uzyskanych bloków płytek o określonych wymiarach oraz wlotów i wylotów za pomocą lasera.

5. Łączenie płytek poprzedzone aktywacją powierzchni obu płytek przy użyciu plazmy tlenowej i następnie wygrzewanie w temperaturze 80 °C przez dwie godziny.

Podczas prowadzenia badań nad zastosowaniem PDMS jako materiału konstrukcyjnego napotkano problem w postaci skurczu materiałowego, zależnego od temperatury sieciowania prepolimeru. W projekcie matrycy zawierającej negatyw mikrokanałów wprowadzono korektę wymiarów uwzględniającą opisane wyżej zjawisko skurczu dla temperatury sieciowania 60 °C. Parametry obydwu procesów – zarówno sieciowania, jak również łączenia płytek, dobierane były eksperymentalnie (optymalizacja techniki). Następnie sprawdzano szczelność połączeń wytworzonych z PDMS struktur mikroprzepływowych [4].

Badania modułu mikrofluidycznego

Do analizy ogniskowania hydrodynamicznego w kanale centralnym wykorzystano, model matematyczny Euler-Euler opisujący przepływ mieszaniny wielofazowej zawarty w module *Mixture model, laminar* pakietu symulacyjnego COMSOL (wersja 3.5a) [2, 5, 6].

Z przeprowadzonych z wykorzystaniem programu COMSOL symulacji wynika, że szerokość zogniskowanego strumienia cieczy stanowi 25% szerokości kanału, co jest wartością porównywalną z uzyskanymi wynikami badań (27%) przeprowadzonych z wykorzystaniem modułu mikroprzepływowego.

Wybór fotodetektora oraz kąta detekcji fluorescencji

W ramach rozprawy przeprowadzono badania porównawcze dwóch fotodetektorów – fotopowielacza lampowego (EMI 9558 QB) oraz fotodiody lawinowej (BPYP 59). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najlepsze wyniki pomiarów uzyskano przy użyciu fotopowielacza, przy ustawieniu prostopadłym światłowodu detekcyjnego względem toru optycznego wiązki światła wzbudzającego. W tym przypadku wykrywalność fluoresceinianu sodu ma wartość 0,002 µg/ml, w porównaniu do układu, w którym jako fotodetektor użyto fotodiodę lawinową (0,07 µg/ml). Z tego względu podczas dalszych badań, natężenie fluorescencji mierzono w układzie, w którym światłowód detekcyjny prowadzący do fotodetektora jest pod kątem prostym względem toru wiązki światła wzbudzającego (niższa wartość granicy wykrywalności w porównaniu z ułożeniem współbieżnym).

Wstępne badania oraz centrowanie i kalibrację układu wykonywano z wykorzystaniem roztworu fluoresceinianu sodu (SF). Badania porównano z wynikami uzyskanymi metodą referencyjną z wykorzystaniem spektrofotometru mikropłytkowego

SYNERGY HT, w której uzyskano zbliżoną czułość oraz 10-krotne obniżenie granicy wykrywalności.

Badania na fantomach komórek

W badaniach modułu mikroprzepływowego składającego się ze struktury mikroprzepływowej wykonanej z PDMS oraz specjalistycznego uchwytu zawierającego przyłącza mikroprzepływowe i optoelektroniczne [6], wykorzystano fantomy komórek w postaci zawiesiny 7 rodzajów polistyrenowych kalibracyjnych kulek fluorescencyjnych BD FACS firmy Becton Dickinson (BD) o średnicy ok. 6 μm . Anodowany uchwyt wykonany z duraluminium zabezpieczał układ przed wpływem światła zewnętrznego. Skolimowana wiązka światła wzbudzającego diody laserowej była prostopadła do płaszczyzny kanału centralnego czipu PDMS, a światłowód detekcyjny - prostopadły do wiązki światła wzbudzającego, a jego oś wzdlużna leżała w płaszczyźnie równoległej do płaszczyzny zawierającej strukturę mikrokanałów. Przekrój kanału centralnego miał następujące wymiary 60 μm x 60 μm .

Podczas badań prowadzonych z wykorzystaniem zawiesiny kulek kalibracyjnych BD FACS, poruszających się z szybkością przepływu objętościowego 5 $\mu\text{l/min}$, jako źródła światła wzbudzającego użyto diody laserowej emitującej promieniowanie o długości fali 488 nm oraz filtrem optycznym wzbudzenia 485/20 nm (Biotek) i filtrem emisji 530/25 nm (Biotek).

Badania materiału biologicznego

W końcowej części badań dotyczących możliwości wykorzystania opracowanego układu mikroprzepływowego do zastosowań cytometrycznych, wykorzystano materiał biologiczny w postaci komórek linii nowotworowej ludzkiego wątrobiaka C3A genetycznie modyfikowanej w kierunku ekspresji białka wzmocnionej zielonej fluorescencji EGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*) o średnicy komórek ok. 24 μm .

W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem komórek C3A produkujących zielone białko fluorescencyjne EGFP użyto modułu mikroprzepływowego o konfiguracji takiej samej jak w przypadku badań kulek BD FACS. Jako źródło światła wzbudzającego użyto diody laserowej emitującej promieniowanie o długości fali 450 nm. Zawiesinę komórek C3A dozowano za pomocą pompy perystaltycznej (ISMATEC ISM597D) z szybkością przepływu objętościowego 5 $\mu\text{l/min}$. Pomiędzy światłowodem detekcyjnym UV-VIS o średnicy rdzenia 125 μm i fotodetektorem umieszczono filtr optyczny emisji 530/25 nm (Biotek).

W celu wzmocnienia sygnału z fotodetektora zastosowano wzmacniacz prądowy (typ 428, wzmocnienie 10^4). W badaniach akwizycję danych prowadzono za pośrednictwem karty akwizycji danych (DAQ 7) firmy National Instruments, z wykorzystaniem aplikacji LabVIEW.

Podsumowanie

Opracowano od podstaw technikę wykonywania struktur PDMS o ściśle określonej grubości, w tym między innymi dokonano doboru odpowiednich parametrów procesu sieciowania poli(dimetylosiloksanu) oraz łączenia struktur, wykorzystującego aktywację plazmową powierzchni struktur PDMS.

W opracowanym module mikrofluidycznym wprowadzono rozwiązanie, w którym oś układu detekcji fluorescencji jest w płaszczyźnie prostopadłej względem toru optycznego wiązki światła wzbudzającego – zastosowanie takiego rozwiązania umożliwiło jednoznaczne i łatwe pozycjonowanie chipu PDMS w uchwycie mikroprzepływowym. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwości ogniskowania hydrodynamicznego płynu w kanale centralnym. Zgodnie z oczekiwaniami, wraz ze zwiększeniem natężenia przepływu płynu osłonowego (przy stałym natężeniu przepływu płynu centralnego), zmniejsza się szerokość zogniskowanego strumienia cieczy.

Zatem wykazano słuszność pierwszej tezy: **możliwe jest wykonanie układu mikroprzepływowego z poli(dimetylosiloksanu) pozwalającego na hydrodynamiczne ogniskowanie płynów w kanale centralnym struktury.**

Przeprowadzono badania porównawcze z wykorzystaniem spektroskopu UV-VIS Synergy HT Biotek, w którym na płytce 96-dołkowej analizowano komórki C3A produkujące białko EGFP. Uzyskana wartość względnego natężenia fluorescencji (F/F_0) mieściła się w zakresie $2,7 \div 6,8$. Natomiast w przypadku badań z wykorzystaniem opracowanego cytometru, stosunek ten wynosił od 1,8 do 4,2. Zatem można stwierdzić, że wyniki uzyskane z wykorzystaniem komercyjnego spektrofotometru mikropłytkowego UV-VIS i opracowanego mikrochipu są zbliżone.

Czułość przyrządu wynosi $3 \cdot 10^{-3}$ RFU/1000 komórek, natomiast wyznaczone progi wykrywalności oraz oznaczalności dla komórek C3A, produkujących białko EGFP są równe odpowiednio $23 \cdot 10^3$ komórki/ml oraz $69 \cdot 10^3$ komórek/ml. Błąd względny określenia liczby komórek w badanej próbce jest poniżej 13% (badania referencyjne przeprowadzone z wykorzystaniem komercyjnego cytometru przepływowego BD FACS Canto II firmy Becton Dickinson).

Uzyskane wyniki badań są porównywalne z doniesieniami literaturowymi. Prace przeprowadzone przez autora z wykorzystaniem kalibracyjnych kulek znakowanych fluorescencyjnie BD FACS oraz modyfikowanych genetycznie komórek C3A ludzkiego wątrobiaka produkujących białko EGFP (przygotowanych w Pracowni Inżynierii Tkankowej IBIB PAN) wykazały, że skonstruowany układ mikrofluidyczny może pełnić funkcję cytometru. Ponadto na podstawie sporządzonej krzywej kalibracji możliwe jest określenie liczby komórek wyznakowanych fluorochromem EGFP, jaka znajduje się w badanej próbce.

Zatem wykazano słuszność drugiej tezy, zakładającej, że: **układ mikroprzepływowy wykonany z PDMS, w połączeniu z układem detekcji optycznej, umożliwia wykrywanie komórek znakowanych fluorescencyjnie.**

Opracowany moduł mikroprzepływowy w postaci czipu wykonanego z PDMS wraz z uchwytem zawierającym przyłącza mikrofluidyczne i światłowodowe wykorzystano między innymi podczas prac badawczych realizowanych, wspólnie z Zespołem z Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, w ramach projektu badawczego *Mikro- i Nano-Systemy w Chemii i Diagnostyce Biomedycznej MNS-DIAG* (POIG.01.03.01-00-014/08-00). Wyniki badań posłużyły do opracowania układu detekcji optoelektronicznej opartego na fotopowielaczu krzemowym (SiPM), który został opisany w rozprawie doktorskiej pt. „*Zastosowanie krzemowych fotopowielaczy do detekcji światła fluorescencyjnego w układach mikroprzepływowych*” dr inż. Łukasza Mika. Zostały przeprowadzone wstępne badania z wykorzystaniem opracowanego układu mikroprzepływowego wykonanego z PDMS współpracującego z optoelektronicznym układem detekcji opartym na fotopowielaczu krzemowym [7, 8, 9]. Biorąc pod uwagę powstałe opracowanie zminiaturyzowanego modułu mikrofluidycznego (IBIB PAN) oraz układu detekcji optycznej (AGH), dalsze prace badawcze można ukierunkować na integrację obu układów oraz rozszerzone ich badania aplikacyjne, które pozwoliłyby na wykorzystanie takiego urządzenia jako przenośny cytometr do badań w warunkach pozalaboratoryjnych.

Literatura

1. R. Szczypiński, J. Grzelka, E. Jabłońska-Kugler, A. Baraniecka, J. Lesiński, J. Łysko, R. Grodecki, D.G. Pijanowska, P. Grabiec: *Mikrocytometr przepływowy wykonany z PDMS z układem detekcji optycznej*. Elektronika 6, 2010, s. 24-27. (MNiSW 6 pkt)
2. R. Szczypiński, E. Jabłońska-Kugler, A. Baraniecka, D.G. Pijanowska: *Miniaturyzacja cieczowego cytometru przepływowego*. Elektronika 3, 2010, s. 120-125. (MNiSW 6 pkt)
3. R. Szczypiński, D.G. Pijanowska: *Technologia i zastosowanie poli(dimetylosiloksanu) – PDMS w mikroukładach analitycznych*. Elektronika 11, 2008, s. 249-253. (MNiSW 6 pkt)

4. A. Baraniecka, M. Górka, M. Zaborowski, P. Prokaryn, **R. Szczypiński**, K. Skwara, D. Szmigiel, A. Sierakowski, M. Nieprzecki, W. Milczarek, J.M. Łysko, D.G. Pijanowska, P. Grabiec: *Mikroprzepływowe immunoczuJNIKI z detekcją amperometryczną*. Elektronika 12, 2009, s. 100-106. (MNiSW 6 pkt)
5. **R. Szczypiński**, J. Grzelka, A. Baraniecka, M. Górka, J. Lesiński, J. Łysko, R. Grodecki, D.G. Pijanowska, P. Grabiec: *Microfluidic Preconcentrator and Microfluidic chip for bacterial cells detection*. Optica Applicata Vol. XLI, No 2, 2011, s. 395-401. (MNiSW 15 pkt)
6. J. Grzelka, **R. Szczypiński**, D.G. Pijanowska, R. Grodecki, J. Lesiński, P. Grabiec, J. Łysko: *Optoelectronic bacteria cells detection system*. Optica Applicata Vol. XLI, No 2, 2011, s. 403-408. (MNiSW 15 pkt)
7. **R. Szczypiński**, Ł. Mik, J. Kruk, M. Baszczyk, P. Dorosz, S. Głab, D.G. Pijanowska, W. Kucewicz: *Fluorescence detection in microfluidics systems*. Electrical Review Vol. 88, No 10b, 2012, s. 88-91. (MNiSW 15 pkt)
8. Ł. Mik, **R. Szczypiński**, J. Kruk, M. Baszczyk, P. Dorosz, S. Głab, D.G. Pijanowska, W. Kucewicz: *Microflow Measurements of Antibodies Fluorescence Using Silicon Photomultipliers*. IEEE Transactions on Medical Imaging (w recenzji).
9. M. Baszczyk, P. Dorosz, S. Głab, Ł. Mik, W. Kucewicz, D.G. Pijanowska, **R. Szczypinski**, *Low Intensity Fluorescence Light Measurements Using Silicon Photomultiplier with Dedicated Front-end ASIC*, Conference: 60th IEEE Nuclear Science Symposium (NSS) / Medical Imaging Conference (MIC) / 20th International Workshop on Room-Temperature Semiconductor X-ray and Gamma-ray Detectors Location: Seoul, SOUTH KOREA Date: OCT 27-NOV 02, 2013, IEEE NUCLEAR SCIENCE SYMPOSIUM AND MEDICAL IMAGING CONFERENCE (NSS/MIC 2013), pages 1-3. DOI: 10.1109/NSSMIC.2013.6829205. (MNiSW 10 pkt)

Radosław Szczypiński