

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2021

Kateřina Haluzová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MIKROFLUIDNÍ MODELY BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

MICROFLUIDIC MODELS OF CELL MEMBRANES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Haluzová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1633/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kateřina Haluzová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

Název bakalářské práce:

Mikrofluidní modely buněčných membrán

Zadání bakalářské práce:

1. Provést rešerši na téma mikrofluidní modely buněčných membrán, jejich smysl a význam, zejména v oblasti nosičů léčiv nebo studia transportu přes tyto membrány.
2. Na základě rešerše navrhnout základní experimenty spočívající v přípravě mikrofluidních čipů vhodných pro konstrukci modelových membrán a ověření jejich funkčnosti. Zároveň navrhnout a ověřit vhodnou experimentální techniku pro studium těchto modelů. Brát v úvahu realizovatelnost v podmínkách FCH, popř. celého VUT.
3. Zhodnotit experimentální zkušenosti a vytýčit další směr bádání v dané oblasti.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kateřina Haluzová
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se věnuje mikrofluidním modelům buněčných membrán, jejich různým typům, výrobě a využití. Současně shrnuje základní materiály pro výrobu mikrofluidních čipů. Experimentální část se zabývá optimalizací výroby čipu z polydimethylsiloxanu vhodného pro konstrukci volně zavěšených buněčných membrán. Byl vypracován pracovní postup přípravy, který zahrnuje odlévání na křemíkové destičce, odstranění bublin z PDMS, jeho následné vytvrzení při 80 °C po dobu 1 h, slepení pomocí plazmatického opracování, vyžihání na 150 °C po dobu 30 min a skladování. Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, že připravené čipy jsou pevné a těsní.

ABSTRACT

This work deals with artificial cellular membrane models, their various types, production and usage. It also summarises basic materials for production of microfluidic chips. Experimental part is focused on optimization of production of polydimethylsiloxane chip suitable for free-standing lipid bilayers. A preparation workflow was developed which includes casting on a silicon wafer, removing bubbles from the PDMS, curing it at 80 °C for 1 h, plasma bonding, annealing at 150 °C for 30 min and storage. Using fluorescence microscopy, the prepared chips were found to be strong and sealed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrofluidní čip, PDMS, modelové buněčné membrány

KEYWORDS

Microfluidic chip, PDMS, artificial cell membranes

HALUZOVÁ, Kateřina. *Mikrofluidní modely buněčných membrán*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131357>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou/bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová/bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové/bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za vedení celé práce, jeho klidný přístup a nadhled nad věc. Dále děkuji paní Ing. Alžbětě Gjevik, která mě s problematikou seznámila a pomohla, když jsem v praktické části nevěděla, jak pokračovat. Děkuji také své rodině a přátelům, kteří mě plně podporovali a pomáhali. Nejvíce však děkuji paní Ing. Tereze Venerové, PhD., která mě podržela, když bylo potřeba, a pomohla mi doladit a ucelit podobu experimentů i práce samotné.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Buněčná membrána.....	8
2.1.1	Složení a struktura	8
2.1.2	Přenos molekul přes membránu	9
2.2	Mikrofluidika	11
2.2.1	Proudění kapalin	11
2.2.2	Tlak.....	12
2.3	Detekce membrán	12
2.3.1	Světlé pole	12
2.3.2	Fluorescenční mikroskopie.....	12
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	14
3.1	Materiály pro mikročip	14
3.1.1	Anorganické materiály	14
3.1.2	Polymery.....	15
3.2	Materiály na přípravu modelových membrán	15
3.3	Příprava a modely buněčných membrán na mikrofluidních zařízeních.....	16
3.3.1	Základní metody přípravy	16
3.3.2	Membrána na pevné podložce	17
3.3.3	Vázaná lipidová membrána (tBLMs)	17
3.3.4	Volně zavěšená membrána	18
3.4	Pozorování struktur v mikrofluidním čipu.....	18
3.4.1	Různé struktury a metody	18
3.4.2	Umělé buněčné membrány	19
3.5	Využití mikrofluidiky a mikrofluidních membrán	19
3.5.1	Mikrofluidika v analytice	19
3.5.2	Pozorování průchodu látek přes membránu	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1	Použité chemikálie	21
4.2	Přístroje a pomůcky	21
4.3	Metody	22
4.3.1	Příprava mikrofluidního čipu.....	22

4.3.2	Ověření pevnosti čipu pod fluorescenčním mikroskopem	23
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
5.1	Odlévání a vyřezání PDMS	24
5.2	Lepení čipu.....	24
5.2.1	Testování vhodné délky ošetření plazmou	25
5.2.2	Testování doby žihání oplazmovaných čipů	25
5.2.3	Testování možnosti ošetření plazmou jen jedné části čipu.....	25
5.2.4	Problémy během lepení	25
5.3	Ověření pevnosti čipů pomocí fluorescenční mikroskopie.....	26
5.3.1	Ověření pevnosti čipů ošetřených plazmou po různou dobu.....	26
5.3.2	Ověření pevnosti čipů s jednou částí ošetřenou plazmou.....	27
5.3.3	Časová závislost pevnosti čipů	31
5.3.4	Problémy během přípravy čipu a pozorování pod mikroskopem.....	31
6	ZÁVĚR	32
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	33
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	37

1 ÚVOD

Buňka je základní složkou organismů. Její chování je ovlivňováno mnoha vnějšími i vnitřními faktory jako je pH, koncentrace látek nebo teplota prostředí. Na interakci buňky s okolím se podílí buněčná membrána. Skládá se z mnoha různých částí – od základních lipidů po složité receptory a kanálky. Fungování jednotlivých složek membrány je na živé buňce náročné pozorovat, proto je snaha vytvářet zjednodušené modely buněčných membrán. Díky tomu je možné lépe porozumět interakcím buněk s okolím a na základě toho např. přizpůsobit vlastnosti nosičů léčiv, aby efektivněji fungovaly.

Mikrofluidika a mikrofluidní čipy poskytují ideální prostředí pro tvorbu takovýchto umělých struktur. Díky svým vlastnostem, které jsou matematicky definovatelné, je možné předvídat chování látek uvnitř mikrofluidních kanálků. Zároveň je možné si zvolit, kolik složek bude do membránového modelu vloženo, a předejít tak jejich vzájemnému ovlivňování.

Tato práce se zabývá rešerší modelů buněčných membrán na různých typech mikrofluidních čipů, jejich výrobě, využití a možnostech pozorování. Jedná se o membrány na pevné podložce, vázané lipidové membrány a membrány volně zavěšené. V experimentální části je rozebrán a optimalizován postup výroby mikrofluidního čipu z polydimethylsiloxanu, který je vhodný pro tvorbu a pozorování právě volně zavěšených membrán.

2 TEORETICKÁ ČÁST

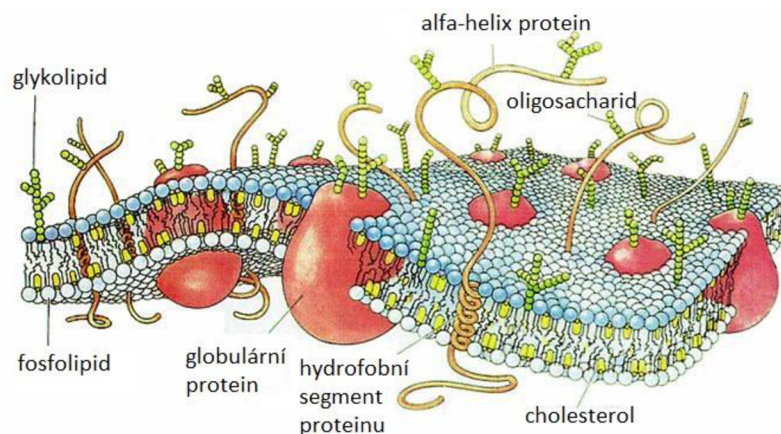
2.1 Buněčná membrána

Buňky jsou od okolního prostředí oddělené systémem cytoplazmatických membrán [1]. Jejich stavba se liší v závislosti na typu buňky – prokaryotická a eukaryotická. Prokaryotická buňka je jednodušší a menší než eukaryotická. Liší se hlavně v uložení a složení genetické informace, typu organel a vnitřnímu rozdělení buňky. Zatímco u prokaryot je membrána pouze jako obal, u eukaryot rozděluje buňku na více jednotlivých částí. Takové uspořádání umožňuje mimo jiné oddělení složitých metabolických drah, aby byly lépe regulovatelné. Prokaryotickými organismy (prokaryota) jsou např. bakterie a sinice. Mezi eukaryotické organismy (eukaryota) se řadí např. rostliny a živočichové.

2.1.1 Složení a struktura

Buněčná membrána se skládá hlavně z fosfolipidů a proteinů, jejichž poměr se liší podle místa na membráně a její umístění v buňce. Fosfolipidy jsou tvořené hydrofilní hlavičkou z cholinu, fosfátu a glycerolu a hydrofobními konci z mastných kyselin [2]. Díky tomu dochází ve vodném prostředí k samovolnému uspořádání molekul do dvojvrstevných membrán, kde hlavičky jsou na vnější straně a konce uvnitř. Tloušťka takového útvaru se pohybuje v rozmezí 3,5-4,0 nm [3]. Toto uspořádání umožňuje vysokou fluiditu a flexibilitu membrány, kde jednotlivé molekuly lipidů mohou cestovat po celé ploše membrány. Aby se zabránilo přílišnému prohnutí nebo odcestování všech fosfolipidů z jednoho místa na druhé, obsahuje membrána i rovnoměrně rozmístěné molekuly cholesterolu. Hydroxylová skupina je umístěna mezi hydrofilními hlavičkami a steroidní tělo je uvnitř membrány [2]. Jeho relativně široká planární struktura působí jako deska a brání tak fosfolipidům v pohybu za ohraničený prostor.

Na vnější monovrstvě membrány se nacházejí také glykolipidy [2]. Jejich hlavička obsahuje mimo glycerol i jednu a více molekul sacharidů a jimi tvořená vrstva se nazývá glykokalyx. Jejich funkce spočívá v komunikaci s okolním prostředím. Umožňují rozpoznávání buněk mezi sebou nebo chrání membránu, a tím i buňku, před okolním prostředím (nízké pH apod.).



Obrázek 1: *Struktura cytoplazmatické membrány [4]*

Mimo cholesterol a glykolipidy jsou v membráně obsaženy i proteiny. Obecně je lze rozdělit do tří kategorií. První jsou proteiny na povrchu membrány, druhou proteiny částečně vnořené a třetí jsou transmembránové proteiny, procházející skrze obě vrstvy fosfolipidů. Stejně jako fosfolipidy se mohou pohybovat. Dále je možné je rozřadit podle jejich funkce. Existují proteiny transportní (přechod látek přes membránu), katalytické (místo pro enzymově katalyzované reakce) a receptorové (specifická vazba látek, vysílání signálů). Díky této strukturní komplexnosti je složité připravit stabilní membránu z fosfolipidů a následně do ní vložit například iontové kanály nebo glykolipidy.

2.1.2 Přenos molekul přes membránu

Existuje několik typů průchodu jednotlivých molekul i větších struktur přes buněčnou membránu. Na základě několika faktorů (např. spotřeba energie, směr transportu [5]) je můžeme rozdělit na tři hlavní části – volná difuze, specifický průnik a cytóza [6]. Význam tohoto jevu spočívá v dopravě živin jako jsou sacharidy nebo aminokyseliny do buněk a následné vyloučení produktů, odpadních nebo pro buňku škodlivých látek. Do této skupiny odpadních látek spadá například CO_2 . Podmínkou pro veškerý transport molekul je schopnost rozpustit se ve vodě.

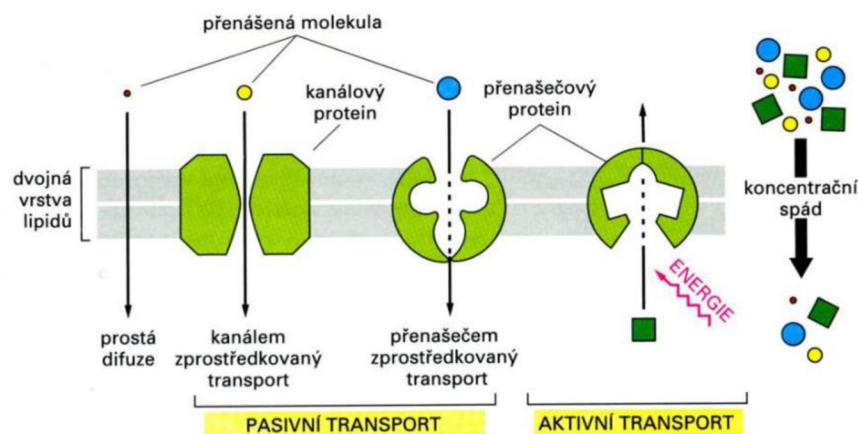
2.1.2.1 Volná difuze

Jako volná difuze se označuje děj, kdy molekuly procházejí přímo přes buněčnou membránu [6]. Kvůli povaze lipidů v ní se jedná pouze o hydrofobní molekuly (plyny jako O_2 , N_2) nebo o malé nenabitě polární látky (např. voda, glycerol, močovina). Probíhá pouze ve směru koncentračního gradientu. Její rychlost je ovlivněna hlavně teplotou, plochou membrány a propustností membrány pro konkrétní látky [5].

2.1.2.2 Specifický průnik

Molekuly, které nesplňují podmínky pro volnou difuzi, se do buněk dostávají pomocí membránových transportních proteinů [6]. Do této kategorie spadají např. ionty. Transportní proteiny se dělí na několik druhů podle své funkce. Kanálové či iontové proteiny tvoří úzké hydrofilní kanálky, které vedou skrz stěnu membrány. Umožňují tak volnou difuzi ve vodě rozpuštěným anorganickým iontům. Přenašečové proteiny naopak fungují na základě změny své konformace a přenášejí tak některé anorganické ionty a malé organické molekuly.

Na základě koncentračního gradientu a potřeby energie se přenos molekul dále rozděluje na pasivní a aktivní [6]. Během pasivního průchodu nedochází ke využití energie, protože ionty samovolně proudí z místa s větší koncentrací do místa s koncentrací menší čili po koncentračním gradientu. U aktivního průniku se naopak molekuly dostávají proti koncentračnímu gradientu, k čemuž je nutné energii dodat. Do této kategorie spadá primárně a sekundárně aktivní zprostředkovaný transport.



Obrázek 2: Porovnání prosté difuze a specifického průniku [6]

Primární transport látek využívá energii ve formě ATP na přenašečovém proteinu, který tvoří iontovou pumpu (např. Na^+/K^+ pumpa) [6]. Je ovlivňován transportní rychlostí těchto proteinů a jejich počtem na membráně. Sekundárně aktivní transport je sám o sobě pasivní, ale je spřažen s průnikem aktivním. Pokud dva druhy molekul prochází stejným směrem, jedná se o symport. V případě, kdy jeden druh jde dovnitř a druhý ven z buňky, jde o antiport. Těch se v organismech vyskytuje více (např. výměna Na^+/H^+ v ledvinách, $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ve svalech).

Iontové kanály tedy fungují na principu volné difuze, jsou však iontově selektivní [6]. Z toho vyplývá, že jimi mohou proudit jen vybrané ionty. Další regulace průchodu molekul ovlivňuje schopnost kanálů se otevírat a uzavírat. Kanály, které jsou stále otevřené, se nazývají póry [5]. Jejich průchodnost a selektivita je dána průměrem, tvarem a charakterem elektrického náboje na jeho povrchu. Dále se v buněčné membráně vyskytují kanály řízené ligandem [6]. Jejich průchodnost ovlivňuje navázání malé molekuly na kanálový protein. Kanály řízené napětím jsou ovládány velikostí membránového potenciálu. Pokud se kanál otevře, začnou jím procházet ionty a změna jejich množství na obou stranách membrány způsobí změnu potenciálu. To může vést k uzavření kanálu, ale i k otevření jiných.

2.1.2.3 Cytóza

Pokud se jedná o přenos větších shluků molekul, které tvoří makromolekuly nebo velké molekulární komplexy, vyvinuly si buňky mechanismus nazývaný se cytóza [6]. Rozlišuje se fagocytóza (tuhé částice), pinocytóza (tzv. buněčné pití), endocytóza (průnik látek do buňky) a exocytóza (vyložení látek ven). Pro transport těchto struktur se z plazmatické membrány vytvářejí útvary, které se nazývají vezikuly. Membrána obalí část molekul určených k přepravě lipidovou dvojvrstvou, kterou následně od sebe oddělí a vzniká tak dutý, kulovitý útvar s volně se pohyujícími molekulami uvnitř.

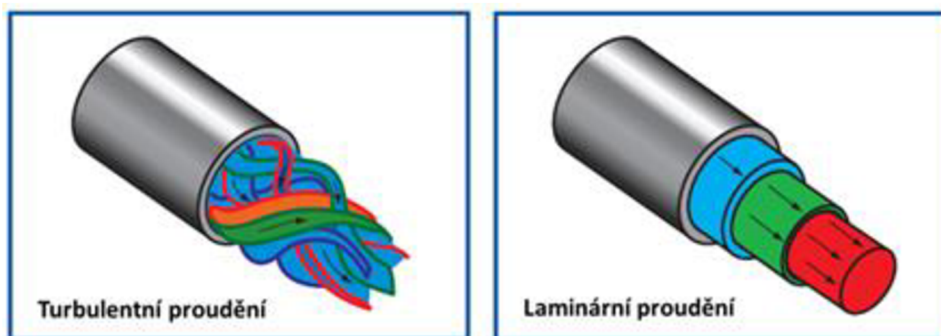
2.2 Mikrofluidika

Mikrofluidika se zabývá systémy malých kanálků, kterými proudí kapalina. Tyto kanálky musí mít alespoň v jednom směru maximální rozměr několika desítek mikrometrů [7]. Na obor samotný se lze dívat jako na oblast vědy, která studuje chování kapalin v mikrokanálcích, ale i jako část technologií vyrábějící mikrofluidní zařízení typu *laboratoře na čipu (lab-on-a-chip)*.

Mikrofluidní čipy jsou díky své malé velikosti levnější na výrobu a snadněji se přenášejí a aplikují i v prostředí mimo laboratoř. Potřebné množství roztoku pro provedení chemických reakcí a jiných různých procesů uvnitř čipu je velmi malé, což je činí výhodné např. pro analytické využití [8]. Další výhodou je možnost rozdělení chemických reakcí na jednotlivé mezikroky ve více mikroreaktorech a díky tomu jejich lepší kontrola.

2.2.1 Proudění kapalin

Pohyb kapalin převážně jedním směrem se nazývá proudění, kde jsou trajektorie pohybu molekul vyznačovány proudnicemi. Během pohybu kapaliny určitým směrem o určité rychlosti může docházet ke vzniku vírů a část kapaliny se může vracet. Takové proudění se nazývá turbulentní. Dochází při něm k promíchání jednotlivých vrstev a molekul, které tak mohou ztrácet rychlost. Pokud však víry nevznikají a proudnice molekul jsou k sobě rovnoběžné, jedná se o proudění laminární, které je v mikrofluidních zařízeních preferované.



Obrázek 3: Druhy proudění [9]

K rozlišení těchto proudění se využívá Reynoldsovo číslo (R_e), které je bezrozměrné. Čím je Reynoldsovo číslo menší, tím je proudění laminárnější. Obecně platí, že je-li Reynoldsovo číslo menší než 2300, tak se jedná o proudění čistě laminární. Díky velikosti kanálků v mikrofluidních čipech jde vždy o tento případ [10], [11], [12].

$$R_e = \frac{\rho \cdot l \cdot v}{\eta}, \quad (1)$$

kde ρ je hustota kapaliny, l délka mikrofluidního kanálku, v průměrná rychlost proudění kapaliny a η viskozita kapaliny.

2.2.2 Tlak

Navier – Stokesova rovnice popisuje proudění nestlačitelné newtonské kapaliny a zároveň se využívá pro popsání laminárního proudění v kanálcích, kde vlivem jejich velikosti dochází ke ztrátám tlaku [10], [13].

$$\vec{F}_m + \vec{F}_p + \vec{F}_t = \vec{F}_s, \quad (2)$$

kde \vec{F}_m je silové působení vnějších hmotnostních sil, \vec{F}_p silové působení tlakových sil, \vec{F}_t silové působení třecích sil a \vec{F}_s je silové působení setrvačných sil, z čehož je odvozena následující rovnice:

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + \vec{f}, \quad (3)$$

kde ρ je hustota, v je rychlost, t je čas, p je tlak, μ je kinetická viskozita a f je součet objemových sil.

2.3 Detekce membrán

2.3.1 Světelné pole

Jedná se o zobrazovací metodu optické mikroskopie, která dokáže v porovnání s lidským okem až 1000krát lépe rozlišit pozorovaný objekt a rozpoznat dva body ve vzdálenosti 0,15 μm [11].

Přístroj, který využívá světelné pole se nazývá světelný mikroskop [14]. Skládá se z mechanické a optické části [11]. Mechanická část je tvořena stativem a stolem, který slouží k přichycení vzorku [14]. První optická část, kondenzor, zaostřuje světlo k osvětlení vzorku [11]. Objektiv je tvořen soustavou čoček, která soustřeďuje světlo rozptýlené vzorkem a zvětšuje skutečný, ale převrácený obraz. Třetí část tvoří okulár, který je tvořen soustavou čoček, které zobrazují zvětšený zdánlivý, přímý obraz.

Světelné pole funguje na základě světla, které projde vzorkem nebo je od něj odraženo [15]. Následně prochází čočkami objektivu, kde se sestavuje skutečný, převrácený a zvětšený obraz. Ten je poté možné pozorovat v okuláru.

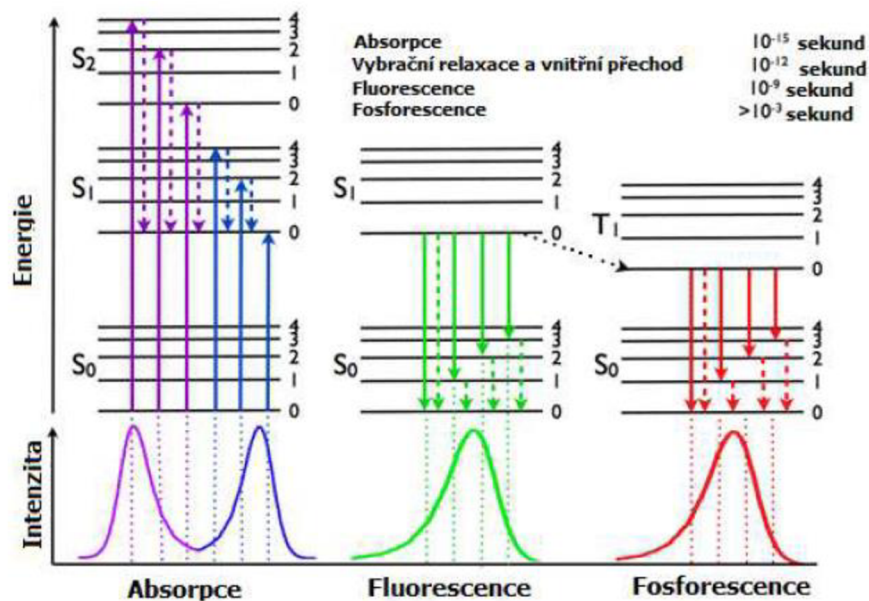
2.3.2 Fluorescenční mikroskopie

Pokud se optika světelného mikroskopu přizpůsobí fluorescenci, je možné pozorovat rozložení jednotlivých molekul ve vzorku [14]. Tyto molekuly je však nutné předem označit fluorescenční sondou. Díky vysoké specifitě se fluorescenční mikroskopie používá ke zkoumání vzorků v biologii nebo medicíně.

2.3.2.1 Fluorescence

Jev, při kterém díky absorpci energie atomem dochází k excitaci elektronů do vyšších hladin a jejich následnému vrácení do původní vrstvy za emise kvanta elektromagnetického záření, se nazývá luminiscence [16]. Dělí se na základě doby trvání, a to na fosforescenci a fluorescenci.

Fosforescence má dobu dohasínání řádově delší než fluorescence a může trvat až několik sekund. Fluorescence trvá okolo 10^{-8} s a je ji proto možné pozorovat pouze po dobu dodávání energie elektronům v atomu. Tento rozdíl je důsledkem toho, že fluorescence probíhá ze singletového a fosforescence z tripletového stavu. Oba jevy se standardně zaznamenávají v Jablónského diagramu.



Obrázek 4: Jablónského diagram zobrazující fluorescenci a fosforescenci [11]

2.3.2.2 Fluorofory

Fluorescence se vyskytuje u molekul s aromatickými uhlovodíky nebo heterocykly [16]. Takové struktury se označují jako fluorofory a dělí se na vlastní a nevlastní [11]. Vlastní fluorescence se přirozeně vyskytuje v buňce díky proteinům nebo třeba chlorofylu. Nevlastní fluorescence je vnášena pomocí přidání fluoroforů do vzorku, který sám o sobě tyto vlastnosti nemá. Na základě vazby těchto molekul na vzorek se rozlišují fluorescenční značky a sondy. Značky se váží kovalentně a jsou používány v imunologii nebo histologii. Naopak fluorescenční sondy se váží nekovalentně a je možné je aplikovat pro analýzu membránového potenciálu.

2.3.2.3 Fluorescenční mikroskop

Mikroskop pro fluorescenční zobrazení obsahuje řadu filtrů a využívá speciální osvětlení k vytváření obrazu vzorku [14]. Zdrojem jasného světla je nejčastěji rtuťová nebo xenonová výbojka, která poskytuje úzký pás vlnových délek. Ty procházejí iluminátorem a čočkami a způsobují excitaci elektronů ve fluorescenčních sondách. Aby bylo dosaženo vysokého kontrastu, jsou objektivové čočky i iluminátor umístěny na stejné straně vzorku. Fluorescenční filtry izolují a upravují excitační a emisní vlnové délky. Dělí se na tři druhy – excitační filtr, dichroické zrcadlo a emisní filtr. Excitační filtr selektivně propouští krátký pás vlnových délek vhodný pro excitaci elektronů. Dichroické zrcátko odráží krátké excitační vlnové délky na vzorek a dlouhé emisní vlnové délky do okuláru. Emisní filtr propouští záření emitované vzorkem a zachycuje zbytkové vlnové délky.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Materiály pro mikročip

3.1.1 Anorganické materiály

Pro výběr materiálu na výrobu čipu se uplatňuje několik faktorů. Mimo dostupnost, cenu nebo metody zpracování to jsou i fyzikální a chemické vlastnosti jako je např. pružnost, průhlednost nebo toxicita.

Sklo bylo díky známým postupům výroby jedním z prvních materiálů, které byly používány pro výrobu mikrofluidních čipů. V roce 1996 skupina *Harrison a spol.* [17]. připravila skleněný čip pro elektroforézu proteinů.



Obrázek 5: Skleněný mikrofluidní čip [7]

Největší výhodou je optická transparentnost, která umožňuje pozorovat, co se v procesu děje. Jedná se o amorfni látku, která má stálé fyzikální i chemické vlastnosti a s mnoha látkami za běžných podmínek nereaguje. Je také neporézní a nevstřebává roztoky z kanálek. Díky tomu lze čipy po ukončení experimentu umýt a použít znovu, aniž by došlo ke kontaminaci dalších procesů látkami z předchozích reakcí. Na druhou stranu však nedochází ani k výměně plynů mezi vnitřním a vnějším prostředím a materiál tak není vhodný pro dlouhodobé pěstování buněčných kultur [12], [18].

Tavený oxid křemičitý je vysoce čistá forma skla, která se ale špatně formuje do požadovaných přesných tvarů a vyžaduje velmi vysoké teploty nebo použití nebezpečných chemikálií při výrobě [19]. Pokud se však použije nanokompozit složený z amorfniho práškového skla, polymerů (hydroxyethylmethakrylát, tetraethylenglykoldiakrylát) a fenoxymethanolu, je možné jej zpracovat pomocí stereolitografické 3D tiskárny s rozlišením několika desítek mikrometrů. Tento nanokompozit je velmi vhodný pro tvorbu mikrofluidních čipů, protože není porézní, nevykazuje bobtnání a je odolný vůči mnoha chemikáliím (např. kyseliny, hydroxidy, alkoholy).

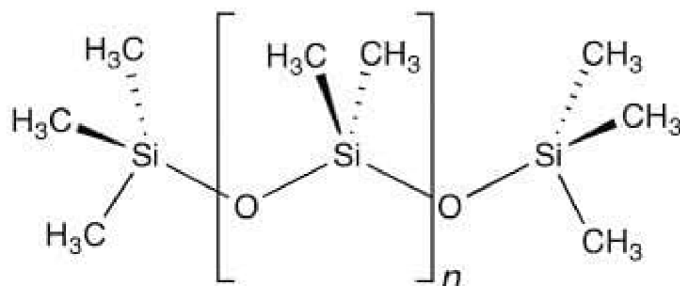
Vedle skla se také používal silikon. Je sice také transparentní a na rozdíl od skla i elastický, ale není ideální pro manipulaci s nebezpečnými chemikáliemi [20] a reaguje s kyslíkem a vodou [21].

Další variantou anorganického materiálu je keramika [21]. Je odolná vůči vysokým teplotám, korozi a chemicky inertní, což ji činí vhodným materiálem k biologickým aplikacím.

3.1.2 Polymery

Mezi nejvyužívanější materiály v dnešní době patří různé druhy polymerů [20]. Polystyren je opticky transparentní a biokompatibilní, ale náročný na výrobu. Polykarbonátové čipy se využívají jako elektrochemické biosenzory nebo pro PCR. Jsou velmi tepelně odolné, ale na druhou stranu reagují s organickými rozpouštědly. Polymethylmethakrylát (PMMA) je využíváný pro jednorázové čipy např. pro elektroforézu.

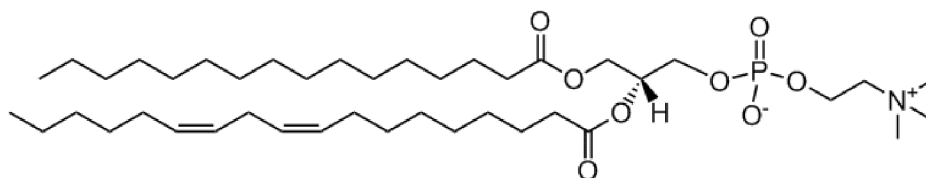
Nejčastěji se však využívá polydimethylsiloxan (PDMS). Díky vazbě mezi křemíkem a kyslíkem je velmi chemicky i termicky stabilní [22]. Je levný a čipy jsou velmi jednoduché na výrobu za pár hodin ve velkém množství. Jsou však křehké a snadno se poškodí. Jejich povrch je hydrofobní, ale pokud se ošetří plazmou, stává se hydrofilním a voda se na něm může zachycovat. Díky biokompatibilitě lze v PDMS čípech pěstovat buňky nebo vytvářet fosfolipidové membrány. Stěny jsou však porézní a materiál má tak tendenci nasávat roztoky z mikrokanálek. Čipy je proto dobré před použitím na několik hodin vložit do deionizované vody, aby se stěny zaplnily a následně neodebíraly roztok z probíhajícího procesu. Toto ošetření je kvůli odpařování účinné na několik hodin až dnů, potom hrozí např. u fosfolipidových membrán příliš velké klesnutí hladiny roztoku a její narušení. Zároveň jsou proto pouze na jedno použití, což ale vzhledem k jednoduché a rychlé výrobě není velkou překážkou.



Obrázek 6: Molekula PDMS [23]

3.2 Materiály na přípravu modelových membrán

Lecithin je jiný název používaný pro fosfolipid fosfatidylcholin [24]. Komerčně dostupný lecithin se vyrábí ze sójových bobů nebo žloutku slepičích vajec [25], [26]. Skládá se z fosfatidylcholinu (19-21 %), fosfatidylethanolaminu (8-20 %), inositolfosfatidů (20-21 %), dalších fosfolipidů (5-11 %), sójového oleje (33-35 %), sterolů (2-5 %) a sacharidů (5 %) [24]. Jedná se o základní složku buněčných membrán a je proto vhodný i pro tvorbu základního modelu membrány na mikrofluidním čipu [11].



Obrázek 7: Struktura fosfatidylcholinu [25]

Asolectin tvoří směs lecithinu, kefalínu a fosfatidylinositolu, které se zde nacházejí ve stejném poměru [27]. Dalšími složkami jsou mastné kyseliny. Díky nižšímu obsahu lecithinu a příměsi dalších fosfolipidů a nečistot je možné, že membrána vytvořená

na mikročipu bude složitější, a tudíž složením i vlastnostmi trochu blíže buněčným membránám, ale zároveň i méně stabilní než membrána pouze z lecithinu.

DPhPC (1,2-difytanoyl-*sn*-glycer-3-fosfocholin) je lipid používaný pro výzkum elektrofyziologických měření na membráně [28]. Typicky se jedná o signál asociovaný s vodivostí iontových kanálků v řádu 10^{-12} ampér. Předpoklad pro úspěšné měření je vysoký elektrický odpor lipidu. Membrány s obsahem DPhPC mají tedy vhodné elektrické vlastnosti a nízkou propustnost iontů a vody.

3.3 Příprava a modely buněčných membrán na mikrofluidních zařízeních

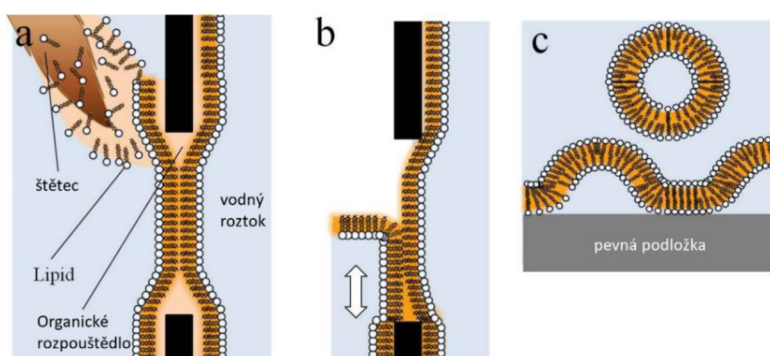
Od prvního pokusu připravit fosfolipidovou membránu na mikrofluidním čipu bylo vyvinuto mnoho technik, které umožňují tvorbu několika druhů membrán včetně zakomponování dalších součástí jako iontové kanály nebo integrované proteiny. Mezi standardní způsoby přípravy patří roztírání, skládání a rozbíjení vezikul [29].

3.3.1 Základní metody přípravy

Při roztírací technice se experimentální komora rozdělí na dvě části hydrofobní nejčastěji teflonovou přepážkou s otvorem o průměru 50-200 μm [29]. Obě části se zaplní vodným roztokem a následně je na obě strany přepážky nanese vrstva z rozpuštěných lipidů. K tomu se využívá tenký štětec se sobolími chlupy nebo skleněná tyčinka. Vzniknou tak dvě monovrstvy, které se přirozeným působením van der Waalsových sil přiblíží těsně k sobě a v otvoru vytvoří dvojrstvu. Nevýhodou této metody je však přítomnost organického rozpouštědla i po ukončení procesu spojování, která může ovlivnit tloušťku membrány.

Technika skládání však umožňuje, aby se rozpouštědlo během vytváření monovrstvy na rozhraní roztok-vzduch vypařilo [29]. Zvýšením hladiny vodného roztoku dojde v otvoru přepážky ke složení dvou monovrstev a vznikne tak membrána.

Metoda rozbíjení vezikul se využívá hlavně pro tvorbu membrán přichycených k pevné podložce [29]. Vezikul je kulovitý útvar, který vzniká v roztocích s velmi vysokým obsahem lipidů. Proces začíná vytvořením těchto struktur v roztoku, které se následně vloží na rovnou podpůrnou plochu. Tam se přirozeně díky rozdílným nábojům na desce a na lipidech rozbijí. Membrány vyrobené tímto způsobem jsou však nehomogenní, často nepokryjí celý povrch podložky a pokud jsou vezikuly příliš blízko sebe nebo na sobě, dochází ke vzniku mnohovrstevných oblastí.



Obrázek 8: a) membrána připravovaná roztíráním; b) membrána připravovaná skládáním; c) membrána připravovaná rozbíjením vezikul [29]

3.3.2 Membrána na pevné podložce

Pro přípravu membrán na pevné podložce lze využít i jiných metod. Technika Langmuir-Blodgettové spočívá v přemístění monovrstvy z povrchu vodného roztoku na hydrofilní substrát jeho tažením vzhůru z roztoku [30]. K vytvoření fosfolipidové dvojvrstvy se pak využívá Langmuir-Schaeferova metoda, kdy se substrát s monovrstvou ponoří do roztoku s druhou monovrstvou na hladině. Mezi nejčastěji používané substráty patří tavený oxid křemičitý nebo borosilikátové sklo. Oba mají hydrofilní povrch a jsou hladké. Nevýhodou takto připravených fosfolipidových membrán je, že do nich nelze implementovat transmembránové proteiny a provádět na nich další výzkum. Způsobuje to úvodní část procesu, kdy je monovrstva s potenciálními proteiny uvnitř uložena na hladině roztoku na rozhraní vzduch-kapalina. Proteiny jsou tak v kontaktu se vzduchem a mohou nenávratně denaturovat.

Metoda *lift-off* se také používá pro tvorbu membrány na podložce [31]. Připraví se roztok s lipidy rozpuštěnými v chloroformu, ve kterém se vytvářejí unilamelární vezikuly. Ty jsou následně upraveny na stejnou velikost a ve zkumavce vysušeny dusíkem. Následně jsou hydratovány roztokem HEPES a intenzivním mícháním zahuštěny na koncentraci 2 mM. Po několika dalších úpravách jako je mražení a vystavení vysokému tlaku je roztok naředěn fosfátovým pufrům. Malé množství tohoto roztoku pak je nakapáno na silikonový substrát s parylenovou vrstvou, která jej střídavě zakrývá. Parylen se poté mechanicky odstraní a v mezerách, kde nebyl, vznikla dvojvrstva lipidů.

3.3.3 Vázaná lipidová membrána (tBLMs)

Membrány, které se v angličtině nazývají *tethered bilayer lipid membranes* (tBLMs), řeší problém předchozího modelu membrány, kdy do nich nebylo možné zavádět transmembránové proteiny. Použitím kotvicích lipidů (telechelů) dochází k vytvoření vrstvy mezi pevnou podložkou a membránou [15]. To snižuje pravděpodobnost denaturace proteinu kvůli jeho tření o podložku. Telechely se skládají z amfifilní části, která s membránou, distanční jednotky udržující prostor mezi membránou a podložkou, a substrátově specifickou hlavičku založenou na thiolech, disulfidech nebo třeba zlatu a stříbru.

První fází přípravy je nasazení telechelických lipidů na podložku za vytvoření kovalentních vazeb [15]. Následně jsou přivedeny vezikuly, které se rozprostřou a navážou na spodní vrstvu membrány amfifilní část telechelů.

Předpokládá se, že vezikuly, ze kterých vzniká membrána, mohou obsahovat v sobě zakomponované proteinové jednotky, jež pak bude možné dále zkoumat [15]. Nevýhoda takto vytvořené konstrukce ale spočívá ve velmi omezené implementaci velkých proteinových struktur. Zároveň neexistuje jednotná technika pro výrobu uvázaných membrán a jejich produkce se liší laboratoř od laboratoře.

Význam tBLMs je tedy v možnosti studia rekonstrukce a funkčnosti transmembránových proteinů, a dokonce i signálních molekul [15]. Zatím však bylo vyvinuto málo modelů, které by zohledňovaly jevy na intracelulární straně.

3.3.4 Volně zavěšená membrána

Dalším typem jsou volně zavěšené membrány. Mezi kritéria vzniku takové membrány a její následné použití patří vysoká stabilita membrány s dobou života vyšší než 3 hodiny nebo možnost rekonstituce membránových proteinů.

Jednou z variant jejich tvorby je využití mikrofluidních čipů z PDMS s dvěma kanálky, které se kolmo kříží, a se zabudovaným oknem z nitridu křemičitého mezi nimi [32]. Jedním kanálkem se napustí roztok elektrolytu a druhým roztok lipidů v *n*-dekanu za samovolného vzniku dvojvrstvy na nitridovém okénku. Přestože PDMS má v *n*-dekanu tendenci bobtnat, týmu *Górzny a spol.* [32]. se úspěšně podařilo připravit membránu, aniž by způsobili trvalé poškození na PDMS čipu. Přítomnost membrány byla následně ověřena pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie.

Skupina *Ota a spol.* [33] vyrobila mikrofluidní čip z PDMS umožňující tvorbu hned několika membrán najednou. Na jejich modelu jsou čtyři rovnoběžné kanálky s postranními komůrkami o rozměru $17 \times 19 \mu\text{m}$. Těmito kanálky se pumpuje první fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4. Poté se dovnitř vnese roztok lipidů rozpuštěných v hexadekanu o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, a nakonec se systém propláchne opět fosfátovým pufrem. Tento postup zajistí vnik dvou monovrstev na rozhraních pufr₁-hexadekan a hexadekan-pufr₂. Jak druhý pufr vytlačuje roztok hexadekanu, dochází na hranici kanálků a komůrek ke spojování obou monovrstev do jedné dvojvrstvy. Úspěšný vznik membrán je následně kontrolován vizuálně pomocí fluorescenčního značení některých lipidů. Tento model čipu i membrány byl cíleně vyroben pro zkoumání membránového transportu nenabitých molekul, které je možné opticky pozorovat. Zároveň je možné zavádět membránové proteiny jako jsou iontové kanály nebo receptory, a opticky zjišťovat jejich funkce.

3.4 Pozorování struktur v mikrofluidním čipu

3.4.1 Různé struktury a metody

Skupina *Linbo Liu a spol.* [34] vytvořila mikrofluidní čip, ve kterém pozorovala přítomnost manganistanových aniontů. Hydrogel tvořený bovinním sérovým albuminem (BSA) a glutaraldehydem (GA) byl v čipu rozdělen na kapičky, které byly po jedné uchyceny do samostatných komůrek. Čip naplněný roztokem o pH 3 obsahující manganistan byl poté ozářen laserem o vlnové délce 488 nm a pozorován pod fluorescenčním mikroskopem. Bylo zjištěno, že čím vyšší je koncentrace manganistanu, tím rychlejší je doba vyhasínání fluoroforu.

Mikrofluidní čip pro detekci bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* byl vyroben skupinou *Feng Tian a spol.* [35]. Čip obsahuje nanomembránu tvořenou oxidem hlinitým a protilátkami, na které se dané bakterie zachytí. Pomocí elektrochemického biosenzoru byly pozorovány změny v impedanci roztoků elektrolytu. Pokud se na membráně nezachytily žádné bakterie, elektrolyt mohl membránou volně procházet a hodnota impedance byla nízká. V případě, že se bakterie zachytily, tak blokovaly průchod elektrolytu a hodnota impedance se zvýšila. Takovýmto způsobem bylo možné detekovat přítomnost bakterií v roztoku v rozsahu $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ až $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Mikrofluidní systém pro snímání teploty nádorových buněk byl vyvinut skupinou *Xuefei a spol.* [36]. Nádorové buňky byly uchyceny v kanálcích PDMS čipu. Ten se skládal

z tenkého Ti/Pt filmu na skleněném podkladu, izolace z Si₃N₄ a PDMS kostry s kanálky. Ti/Pt vrstva fungovala jako termosenzor založený na elektrodách. Po provedení kalibrace měření odporu ve známém intervalu teplot, bylo možné naměřený odpor Pt elektrody přepočítat na teplotu. Rozlišení takového termosenzoru bylo 0,008 °C. Díky tomu, že buňky jsou umístěny na PDMS čipu v kanálcích nad senzorem, je možné snímat jejich teplotu v reálném čase a při reakci na různé podněty.

3.4.2 Umělé buněčné membrány

Jako vhodná technika pro měření modelů buněčných membrán na mikrofluidním čipu se ukázala optická a fluorescenční mikroskopie [11], [33]. Skupina *Ota a spol.* [33] tak pozorovala vznik uměle vytvořených membrán na čipu. Pomocí značení texaské červení vložené do lipidové membrány bylo možné pozorovat jejich přítomnost pomocí transmise světla a fluorescence sondy. Pokud membrána na rozhraní kanálku a komůrky vznikla, sonda ozářená laserem emitovala červené záření. Když k vytvoření membrány nedošlo, zůstala komůrka černá. Detailnější popis mikrofluidního čipu a mechanismus vzniku membrán je popsán v kapitole 3.3.4.

3.5 Využití mikrofluidiky a mikrofluidních membrán

3.5.1 Mikrofluidika v analytice

Analytická chemie používá mikrofluidní zařízení v kombinaci s mikrooptickými prvky pro detekci a automatizaci bioanalytických procesů [37]. Mezi největší přednosti mikroelektromechanických systémů (MEMS) patří malé potřebné množství látek (femtolitry) nebo levná výrobní cena. Kombinací s optickým systémem pro detekci vlnových délek a fluorescenčním značením protilátek je například možné po osvětlení laserem oddělit jednotlivé buňky produkující protilátky od neaktivních a dále je zkoumat.

Skupina *Yan Man a spol.* [37] využila mikrofluidního systému pro kolorimetrickou detekci bakterie *Salmonella typhimurium* v čerstvě nakrájené zelenině. Za pomoci thiolovaných polystyrenových mikrokuliček, zlatých nanočástic, mikrofluidního čipu a aplikace na telefon je možné odhalit bakterie při nízké koncentraci $6,0 \cdot 10^1 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ za dobu 45 minut. V přítomnosti bakterií zlaté nanočástice agregují a dochází k barevné změně.

Týmu okolo *Natàlii Sándeze* [39] se podařilo vyvinout mikrofluidní čip vhodný pro stanovení kyselosti vína a moštu. Pomocí optické detekce, založené na LED diodě a křemíkové fotodiodě, pozorovali modré zbarvení bromthymolové modři, která v přítomnosti kyselých složek vína slábně. Zařízení dokáže detekovat kyselinu vinnou až do obsahu $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ s detekčním limitem $0,004 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.5.2 Pozorování průchodu látek přes membránu

Jednou z variant transportu látek skrze membránu jsou iontové kanály. Ca²⁺ kanál byl implementován do dvojvrstvy vytvořené na mikropipetě a byla pozorována jeho aktivita [40]. Stimulace byla provedena pomocí nukleotidů a inositol-1,4,5-trifosfátu a inhibice rutheniovou červení. Dále bylo zjištěno, že sodné ionty mají vliv na zvýšení aktivity těchto kanálů.

Upravená lipidová dvojvrstva byla také použita pro model vnitřní mitochondriální membrány, kde se nachází cytochromy a další enzymy pro získávání energie [40]. Pro pozorování přenosu elektronů byla zvolena interakce mezi Cytochromem c a Cytochrom c peroxidázou, kde se pomocí elektrod měřila oxidace a redukce obou molekul. Bylo zjištěno, že rychlost přenosu na takto vytvořeném systému je o pět až šest řádů nižší než jeho standardní rychlost v mitochondrii.

Skupina *Yu Zhang a spol.* [41] sestavila na membráně vytvořené na rozhraní kapiček dvou roztoků funkční kanály pro chloridové anionty. Průchod Cl^- byl pozorován pomocí interakce aniontů s fluorescenční sondou 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinum (SPQ). SPQ je citlivý na přítomnost halogenových skupin v roztoku a nedokáže projít skrz membránu. Díky tomu bylo možné pozorovat snižující se intenzitu záření fluoroforu se zvyšující se koncentrací transportovaných Cl^- iontů na druhou stranu membrány.

Pozorování průchodu molekul přes volně zavěšenou membránu pozorovala skupina *Ota a spol.* [33]. Popis mikrofluidního čipu a vznik membrány je popsán v kapitole 3.3.4 a metoda pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu v kapitole 3.4.2. Pro vytvoření nanopórů v membráně byl do prvního pufru přidán monomer α -hemolysinu a 10 M roztok kalceinu. Protein α -hemolysin se začlenil do následně vytvořené membrány. Tento proces bylo možné pozorovat díky tomu, že fluorescenční barvivo, uzavřené v komůrce, začalo přes vzniklé proteinové nanopóry difundovat. Jeho koncentrace v komůrce, a tím pádem i intenzita jeho fluorescence, začala rychle klesat. To bylo pozorováno pomocí fluorescenční mikroskopie.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Polydimethylsiloxan, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, ELCHEMCo, šarže: 0008885206

Isopropylalkohol, C₃H₈O, CAS: 67-64-1, lach:ner, čistota p.a.

Aceton, C₃H₆O, CAS: 67-64-1, PENTA čistota p.a.

Fluorescenční sonda ATTO 488, Sigma, šarže: BCBV8900, čistota pro fluorescenci

Deionizovaná voda

4.2 Přístroje a pomůcky

Předvážky – Scaltec SPB 52

Ultrazvuková čistička – Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H

Přístroj na oplazmování – CEPLANT RPS50+

Invertní mikroskop – Olympus IX71

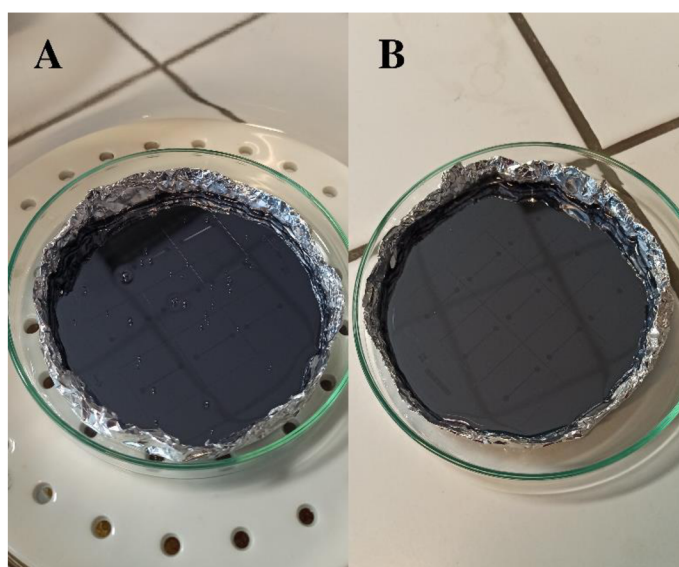
Lampa – X-Cite 120Q

Kamera – Olympus XM10

4.3 Metody

4.3.1 Příprava mikrofluidního čipu

Výroba mikrofluidního čipu se skládá ze tří částí – odlévání, slepení a zapojení. Křemíková forma se strukturou kanálek, vyrobená v předchozí práci [11], byla umyta deionizovanou vodou, vyfoukána stlačeným vzduchem do sucha a vložena do Petriho misky vyložené třemi vrstvami alobalu. Následně byl v kádince smísen polydimethylsiloxan a síťovací činidlo v poměru 10:1. Potřebné množství bylo odváženo na předvážkách. Směs byla míchána skleněnou tyčinkou po dobu 2 min a následně sonifikována po dobu 7 min, aby bylo z roztoku odstraněno maximální možné množství bublin. Pro sonifikaci byla použita ultrazvuková čistička. Poté byla směs nalita na formu. Bylo použito takové množství, aby bylo dosaženo optimální tloušťky vrstvy (přibližně 2 mm). Petriho miska byla poté umístěna do exsikátoru a byla zapnuta vývěva. Vytvořený podtlak odstranil bublinky v PDMS, které zbyly i po ošetření ultrazvukem nebo vznikly naléváním na formu, jak je uvedeno na obrázku č. 9.



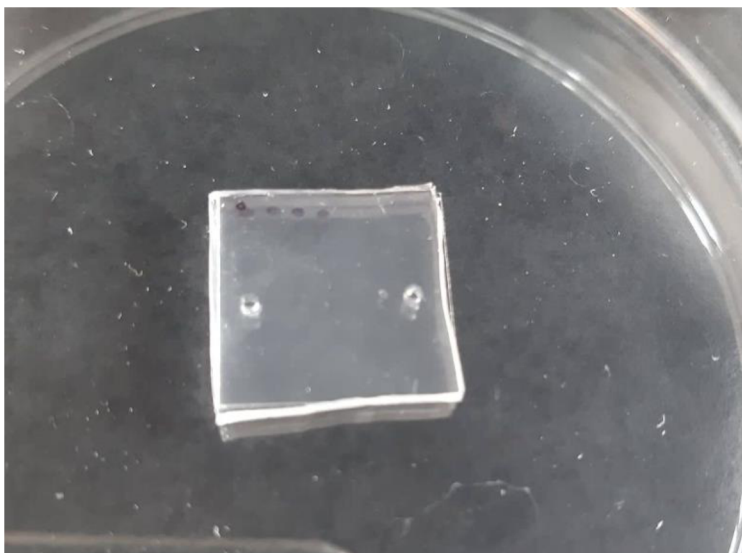
Obrázek 9: PDMS na křemíkové destičce před odstraněním bublin v exsikátoru (A); PDMS po odstranění bublin (B)

V dalším kroku byla Petriho miska umístěna do sušárny po dobu 1 h a při teplotě 80 °C. Vytvrzené PDMS bylo ochlazené na laboratorní teplotu a skalpelem rozřezáno na jednotlivé základy pro čipy (celkem 9 ks v jednom odlitku). Ve vzniklé části čipu z PDMS byl vyvrtán přívodní a odvodní otvor pro konektory o průměru 0,25 mm.

PDMS část byla očištěna pomocí sonifikace v isopropylalkoholu a skleněné krycí skličko bylo očištěno v acetonu. Obě části byly zvlášť ošetřeny plazmou na přístroji CEPLANT RPS50+. PDMS bylo umístěno na držák přístroje a bylo na něj položeno nové krycí skličko, aby se PDMS nepřilepilo k přístroji. Toto skličko bylo odstraněno po nastavení vzdálenosti horní plochy PDMS od plazmové hlavičky na 1,5 mm. Na zařízení bylo nastaveno napětí 7,1 V. Tato hodnota odpovídá času 10 s, kdy držák se vzorkem projíždí pod plazmovou hlavičkou tam a zpět do výchozí polohy, a kdy plazma působí na povrch vzorku. Po skončení

procesu bylo PDMS umístěno do Petriho misky. Krycí skličko bylo ošetřeno obdobně jako PDMS, ale po ukončení oplazmování bylo přiloženo na již ošetřenou PDMS část čipu.

Poloslepené čipy byly vyžihány v předem vyhřáté sušárně na 150 °C na 25 min, poté byly ochlazeny na pokojovou teplotu. Hotové, slepené čipy byly umístěny do nádoby s deionizovanou vodou.



Obrázek 10: Kompletní mikrofluidní čip z PDMS a podložního sklička ošetřených plazmou po dobu 40 s bez vad

4.3.2 Ověření pevnosti čipu pod fluorescenčním mikroskopem

Čip byl vyjmut z nádoby s deionizovanou vodou, osušen a vložen do čisté Petriho misky podložené černým papírem, aby byla vidět struktura kanálků. Fluorescenční sonda ATTO 488 byla nasáta do injekční stříkačky a přes předem vyvrtaný přívodní otvor o velikosti 0,25 mm vpravena dovnitř kanálků. Po osušení přebytků roztoku okolo přívodního otvoru byl takto upravený čip vložen do kovového držáku pro fluorescenční mikroskop.

Pro pozorování vnitřní struktury čipu byly zvoleny dvě metody – pomocí transmise a fluorescenčního záření. Obě měření byla provedena na invertním mikroskopu Olympus IX71.

Pro transmisí nebyl potřeba žádný filtr, proto byla na voliči zvolena poloha č.6, která jej neobsahuje. Na objektiv s šedesátinásobným zvětšením byly umístěny dvě kapky deionizované vody. Kovový držák s čipem byl položen na posuvný stolek mikroskopu tak, aby kanálky byly přímo nad objektivem. Po nastavení vhodné vzdálenosti čipu od objektivu byly nalezeny kanálky a pomocí černobílé kamery Olympus XM10 vytvořeny digitální snímky vždy struktura stěny mezi kanálky, jeden ze čtyř kanálků a pokud byl objeven tak i defekt v polymeru nebo bublina v kanálku.

Pro pozorování fluorescenčního záření sondy byl na voliči nastaven filtr na poloze č. 1 pro 365 nm. Po zakrytí čipu před parazitickým světlem a jeho ozáření xenonovou lampou X-Cite 120Q byly vytvořeny snímky vnitřní struktury čipu ve stejných polohách kanálků jako u transmise.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Odlévání a vyřezání PDMS

Během odlévání PDMS (viz kapitola 4.3.1) došlo k několika potížím a úpravám původního postupu práce [11].

Při vykládání Petriho misky alobalem bylo zjištěno, že jsou potřeba alespoň čtyři vrstvy nízkogramážního alobalu nebo dvě vrstvy o vysoké gramáži. Alobal s nízkou gramáží měl tendenci se trhat a nedokázal zabránit podtékání PDMS pod křemíkovou destičku, případně zabránit úniku PDMS mezi jeho jednotlivé vrstvy. Docházelo tedy ke ztrátám a celková manipulace během odlévání byla náročná kvůli křehkosti alobalu. Podtékání PDMS pod destičku je nežádoucí i z toho důvodu, že ji po vytvrzení pevně obaluje z obou stran a je obtížné polymer později odstranit tak, aby destička zůstala nepoškozena. Při neopatrné manipulaci se křehká destička může poškrábat, popraskat nebo úplně zlomit, a je tudíž dále nepoužitelná pro další odlévání.

Po smíchání PDMS se síťovacím činidlem byl do postupu výroby čipu zařazen nový krok. Kvůli efektivnějšímu odstranění bublin, které vznikly během mísení uvedených složek, byl vzniklý velmi viskózní roztok v kádince sonifikován po dobu 7 min. Po odstranění více jak 95 % bublin byl téměř čirý roztok nalit na křemíkovou destičku a vložen do exsikátoru. Pomocí podtlaku byly odstraněny i poslední bubliny. Pokud by k těmto dvěma krokům nedošlo, bubliny by v PDMS zůstaly a narušily strukturu kanálků, takže by nebylo možné v nich vytvářet umělé buněčné membrány. Pravděpodobně by také hustota bublin znemožnila pozorovat dění v kanálcích, protože by díky nim PDMS nebylo čiré a průhledné.

Bylo ověřeno, že teplota 80 °C po dobu 1 h je dostačující pro vytvrzení polymeru. Následné sloupnutí PDMS proběhlo bez komplikací.

Bylo však zjištěno, že vyřezávání jednotlivých polymerních částí čipů skalpelem musí probíhat mimo křemíkovou destičku, a to na Petriho misce, podložené černým papírem. Černý papír umožňuje lepší viditelnost odlitých kanálků pouhým okem bez nutnosti použití zvětšovací lupy. Pokud se části vyřezávaly přímo na destičce, došlo k jejímu poškrábání a stržení struktury kanálků vytvořených pomocí měkké litografie. Na opakované odlévání byla tedy nepoužitelná.

Vyřezávání přívodních a odvodních otvorů o velikosti 0,25 mm je náročné z důvodu nutnosti se trefit na plochu o průměru 1,5 mm přes silnou vrstvu polymeru. Jeho tloušťka zkresluje pohled na spodní stranu, kde je struktura kanálků. Dalším problémem je odstranění zbytků PDMS z vyřezaných otvorů. Tím, jak jsou otvory úzké, tak se zbytky PDMS zasekávají uprostřed těchto otvorů a jdou špatně vytáhnout. Některé zbytky také prochází celým PDMS a končí na spodní straně čipu, kde můžou narušit samotné kanálky.

5.2 Lepení čipu

Pro lepení vytvrzeného PDMS a krycího sklíčka byl použit přístroj CEPLANT RPS50+. Protože dříve nebyl optimalizován postup pro lepení na tomto zařízení, bylo vyzkoušeno několik variant – časy oplazmování 10 s, 20 s, 30 s a 40 s a ošetření obou částí čipu nebo jen sklíčka nebo jen polymeru.

Tyto časové intervaly byly zvoleny na základě předchozí práce [11], kde se však využívalo jiného přístroje - Diener NANO Plasma cleaner. Pro ošetření částí čipů plazmou byl potřeba tlak 0,5 mbar a specifické složení plynů – 70 % kyslíku a 30 % argonu. Protože však přístroj CEPLANT RPS50+ nepotřebuje k ošetření plazmou podtlak a zvládá to v normální atmosféře, je jeho účinnost oplazmování násobně větší než u přístroje Diener NANO Plasma cleaner. Při atmosférickém tlaku vzniká více radikálů, které umožňují efektivnější spojení krycího sklíčka a polymeru. Na základě tohoto faktu bylo předpokládáno, že pro úspěšné slepení krycího sklíčka a PDMS stačí kratší doba ošetření plazmou nebo ošetření jen jedné části čipu.

5.2.1 Testování vhodné délky ošetření plazmou

Bylo zvoleno napětí 7,1 V, které odpovídá době 10 s oplazmování. Pro dosažení delších časů byl cyklus 10 s několikrát opakován.

Při oplazmování obou částí čipu bylo zjištěno, že čas 10 s ani 20 s není dostačující pro samotné slepení, pokud se PDMS a sklíčko na sebe jen položí a lehce přitlačí. U delších časů ošetření plazmou došlo ke vzniku slabé vazby mezi PDMS a sklíčkem – po přiložení oplazmovaného sklíčka na oplazmované PDMS se obě části neoddelily, i když byla zvedána jen jedna z částí.

5.2.2 Testování doby žihání oplazmovaných čipů

Oplazmované čipy byly následně vloženy do sušárny vyhřáté na 150 °C. Bylo zjištěno, že optimální čas na ošetření spoje teplem je 25 min. Testování pevnosti bylo provedeno na vzorku s dobou oplazmování 10 s. Bylo předpokládáno, že nejméně ošetřený čip bude potřebovat nejvíce času na vznik pevného spoje. Při ukončení žihání po 15 a 20 minutách se kraje čipu stále odlepovaly od krycího sklíčka, spoj tedy stále nebyl ideální. Čas 25 min však zajistil dostatečnou pevnost u všech vzorků.

5.2.3 Testování možnosti ošetření plazmou jen jedné části čipu

Pro zjednodušení lepení čipů pomocí ošetření jejich povrchu plazmou bylo vyzkoušeno, jestli pro úspěšné slepení stačí oplazmovat jen krycí sklíčko nebo jen vytvrzené PDMS. Pro krycí sklíčko byly zvoleny časy oplazmování 10 s, 20 s, 40 s a pro PDMS 20 s a 40 s.

Po přiložení oplazmované části čipu na neopplazmovanou část došlo u všech vzorků k pevnému spoji, který byl následně vyžihán v sušárně vyhřáté na 150 °C po dobu 25 min. Ochlazené čipy byly následně pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem, kde bylo ověřeno, zda spoje pevně drží a nepodtékají.

5.2.4 Problémy během lepení

Vzorky pro oplazmování se na přístroj upevňují pomocí oboustranné lepicí pásky, aby se během posuvu částí přístroje nebo nastavování vzdálenosti nepohnuly. Krycí sklíčko určené k ošetření plazmou je vhodnější umístit jen na okraj této pásky. Pokud se na ni položí celou plochou, je velmi pravděpodobné, že se během oplazmování pevně přilepí k pásce. Potom jde obtížně odlepit a velmi rychle se láme.

Během nastavování vzdálenosti PDMS od plazmové hlavice je nutné se nejdříve dostat na úroveň 0,0 mm, kdy se obě části viditelně dotýkají. Poté je možné postupně zvětšovat

vzdálenost až na 1,5 mm. Během tohoto kroku došlo k přilepení PDMS k plazmové hlavici. Aby nedošlo k poškození, bylo u dalších čipů mezi PDMS a přístroj vloženo čisté krycí sklíčko, které bylo po nastavení vhodné vzdálenosti odstraněno.

Toto krycí sklíčko, které mělo zabránit přilepení PDMS k plazmě, při oddělování přilnulo k PDMS a šlo obtížně oddělat. Při neopatrné manipulaci by se mohlo tlakem zlomit a poškodit tak polymer pod ním.

Očištěné krycí sklíčko, které tvoří spodní část čipu a uzavírá kanálek, je nutné pokládat na PDMS z jedné strany pod úhlem, který se postupně zmenšuje. Kdyby se pokládalo vodorovně, došlo by ke vzniku velkých vzduchových bublin uzavřených mezi slepenými okraji čipu jako je vidět na obrázku č. 11. Při pokládání pod úhlem je šance vzniku bublin i jejich velikosti menší. Pokud dojde k jejich vytvoření v oblasti struktury kanálek, je čip nepoužitelný pro další pozorování. V takovém případě kanálky nedokáží udržet vstříkované roztoky, čip netěsní a umělé buněčné membrány by s velmi vysokou pravděpodobností nevznikly.



Obrázek 11: Slepený PDMS čip s viditelnou strukturou kanálek v Petriho misce podložený černým papírem. V levé části čipu se nachází světlá šedá skvrna, která je tvořena vzduchovou bublinou uzavřenou mezi krycím sklíčkem a polymerem.

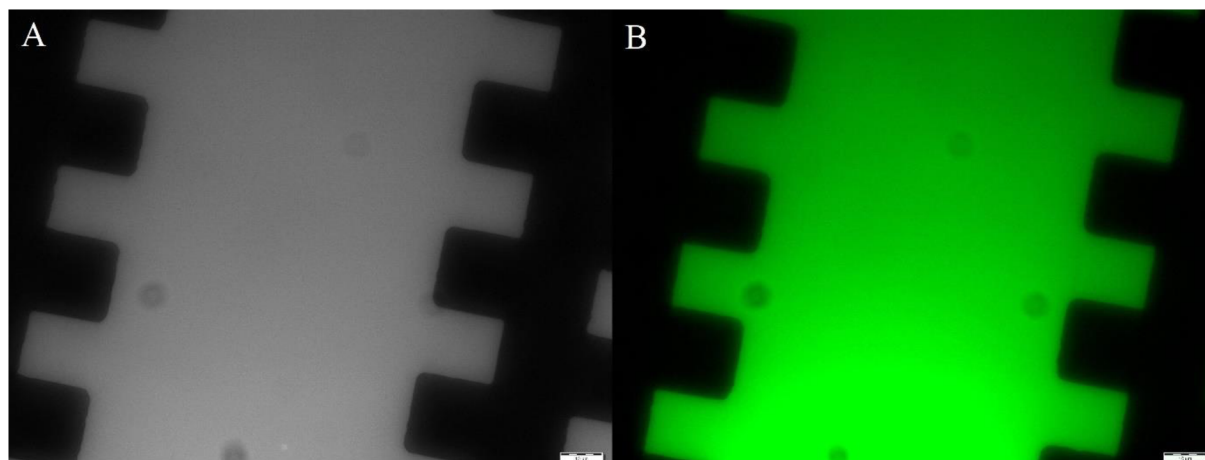
5.3 Ověření pevnosti čipů pomocí fluorescenční mikroskopie

Pro ověření pevnosti čipů byly zvoleny vzorky vyrobené třemi metodami. První se zabývala optimalizací vhodné doby oplazmování obou částí čipu (sklíčka i polymeru) v časových intervalech po 10 s, 20 s, 30 s a 40 s. Druhá metoda ověřovala, zda pro úspěšné slepení stačí plazmou ošetřit jen sklíčko v intervalech 10 s, 20 s a 40 s nebo jen polymer v intervalech 20 s a 40 s. Třetím způsobem bylo měření časové závislosti pevnosti čipu v řádu několika dní až týdnů od slepení.

5.3.1 Ověření pevnosti čipů ošetřených plazmou po různé době

Pro pozorování pod fluorescenčním mikroskopem byl jako první vybrán čip, který měl ošetřeny obě části plazmou po dobu 20 s. Pozorování pod mikroskopem pomocí transmise ukázalo

hladké, rovné stěny všech čtyř kanálků i komůrek v nich. Nebyly v nich vidět žádné bublinky ani defekty v polymeru. Při zobrazení pomocí fluorescence sondy bylo zjištěno, že roztok správně zatekl do všech kanálků i komůrek a pro naplnění čipu tudíž stačí stříkačka s jehlou.



Obrázek 12: Struktura kanálku čipu s oběma částmi ošetřenými plazmou po dobu 20 s pod fluorescenčním mikroskopem při šedesátinásobném zvětšení – černobílá (A), v pseudobarvě (B); uvedené měřítko má rozměr 10 μm

Na základě snímků na obrázku č. 12 bylo usouzeno, že oplazmování krycího sklíčka i polymeru po dobu 20 s je dostačující pro vytvoření pevného spoje. Fluorescenční sonda na snímku B září jasně pouze v kanálku. Struktura komůrek je jasně a zřetelně viditelná. Díky tomu, že tento čip pevně drží a nepodtéká, bylo předpokládáno, že čipy s oběma částmi ošetřenými plazmou po dobu delší, než je 20 s, budou také v pořádku. Byly proto ponechány v nádobě s deionizovanou vodou a byla na nich měřená časová závislost pevnosti spoje v týdenních intervalech popsána v kapitole 5.3.3.

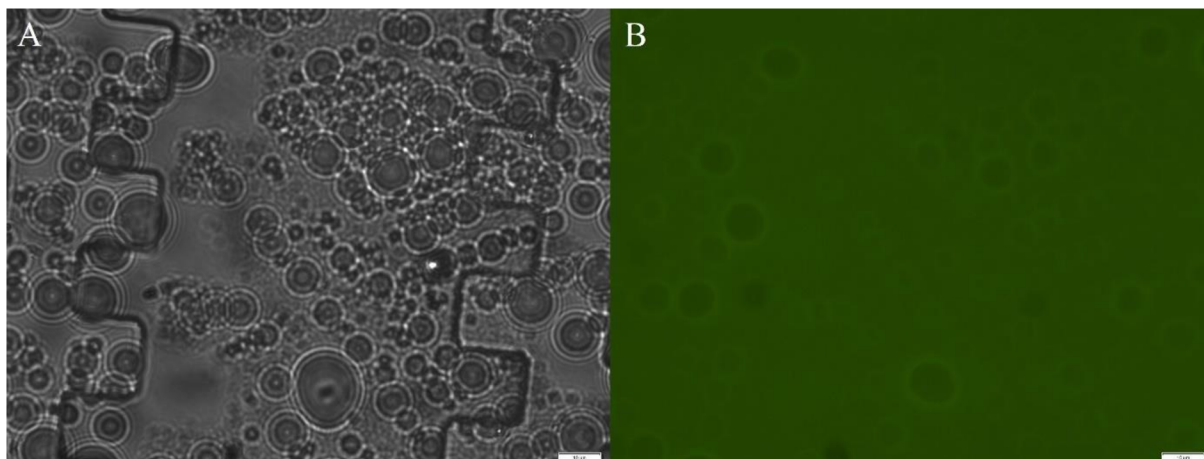
5.3.2 Ověření pevnosti čipů s jednou částí ošetřenou plazmou

5.3.2.1 Pozorování čipu s oplazmovaným krycím sklíčkem po dobu 10 s

Při pozorování čipu, který měl po dobu 10 s oplazmované pouze krycí sklíčko bylo zjištěno, že přestože obě části fyzicky drží u sebe, netěsně natolik, aby udržely roztok v kanálkách. Obrázek č. 13 na snímku A zobrazuje strukturu jednoho z kanálků viditelnou díky transmisi světla. Kanálek i komůrky je možné rozlišit od stěny PDMS, ale jsou překryty shluky kulatých bublin, které znemožňují efektivní zaostření. Bubliny se nacházejí nejen v oblasti kanálku, ale i v místech, kde by stěna tvořená polymerem měla pevně vázat na krycí sklíčko.

Na snímku B je zobrazení pomocí pozorování fluorescenční sondy. Strukturu kanálků a komůrek nelze vůbec rozlišit od stěny. Tmavá místa jsou tvořena vzduchovými bublinami, které fluorescenční sondu neobsahují.

Kvůli bublinám v oblasti spoje mezi PDMS a krycím sklíčkem na snímku A a nemožností rozlišit strukturu kanálku na snímku B bylo usouzeno, že čip netěsní. Ošetření pouze podložního sklíčka plazmou po dobu 10 s proto není dostačující pro vytvoření pevného spoje mezi oběma částmi čipu.



Obrázek 13: Struktura kanálku čipu s krycím sklíčkem ošetřeným plazmou po dobu 10 s pod fluorescenčním mikroskopem při šedesátinásobném zvětšení – transmise (A), fluorescenční zobrazení v pseudobarvě (B); uvedené měřítko má rozměr 10 µm

5.3.2.2 Pozorování čipu s oplazmovaným krycím sklíčkem po dobu 20 s

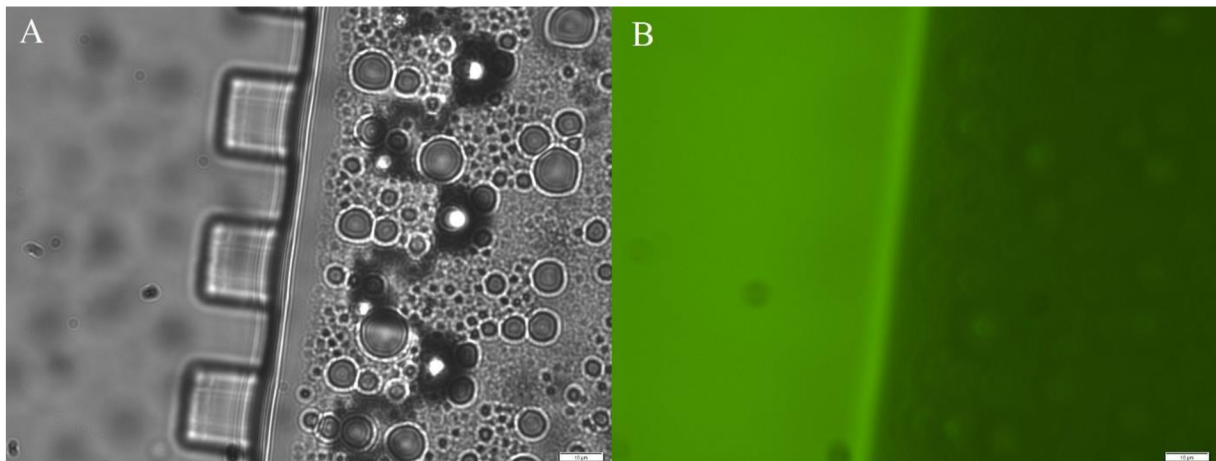
Jako další byl testován čip, kde bylo krycí sklíčko ošetřeno plazmou po dobu 20 s. Po vyjmutí z deionizované vody a osušení se však čip rozpadnul. Těsně předtím, než se tak stalo, byla pozorována velká vzduchová kapsa mezi sklíčkem a polymerem, která zabírala velkou část uprostřed čipu. Krycí sklíčko tak přiléhalo k příliš malé ploše PDMS na to, aby dokázalo déle udržet kanálky uzavřené. Ke vzniku vzduchové kapsy došlo pravděpodobně během kompletace čipu, kdy sklíčko nebylo přikládáno pod dostatečně malým úhlem a část vzduchu nestihla uniknout.

Kvůli odlepení krycího sklíčka nebylo možné čip ani naplnit fluorescenční sondou, ani pozorovat pod mikroskopem. Díky samovolnému úplnému zničení čipu bylo proto vyhodnoceno, že ani oplazmování krycího sklíčka po dobu 20 s není dostačující.

5.3.2.3 Pozorování čipu s oplazmovaným krycím sklíčkem po dobu 40 s

Čip s krycím sklíčkem ošetřeným plazmou po dobu 40 s byl naplněn fluorescenční sondou a zkoumán pod fluorescenčním mikroskopem. Na obrázku č. 14, snímku A je možné pozorovat stěnu tvořenou PDMS mezi dvěma kanálky. Levý kanálek je dobře viditelný, bez rušivých elementů. Pravý kanálek je však plný bublin, které začínají už v půlce stěny mezi kanálky.

Na snímku B je viditelné čisté rozhraní mezi jasnější a slabší fluorescencí sondy. Strukturu kanálků nelze rozlišit. Je to způsobeno vzduchovou bublinou, která mohla vzniknout během přikládání čerstvě oplazmovaného krycího sklíčka na polymer a díky slabému spoji se mohla zvětšit během žihání v sušárně. Fluorescenční sonda zcela vytlačila vzduch z levého kanálku a jen částečně z pravého, kde zůstaly malé bubliny. Jasnější záře v levém kanálku je pravděpodobně způsobena větší mezerou mezi krycím sklíčkem a polymerem než u pravého kanálku. Kanálek tak obsahuje více fluorescenční sondy, která ve větší vrstvě jasněji září. Kvůli vzniku vzduchové bubliny a vytvoření bublinek v kanálku po napuštění fluorescenční sondou bylo usouzeno, že oplazmování krycího sklíčka po dobu 40 s také není dostačující.



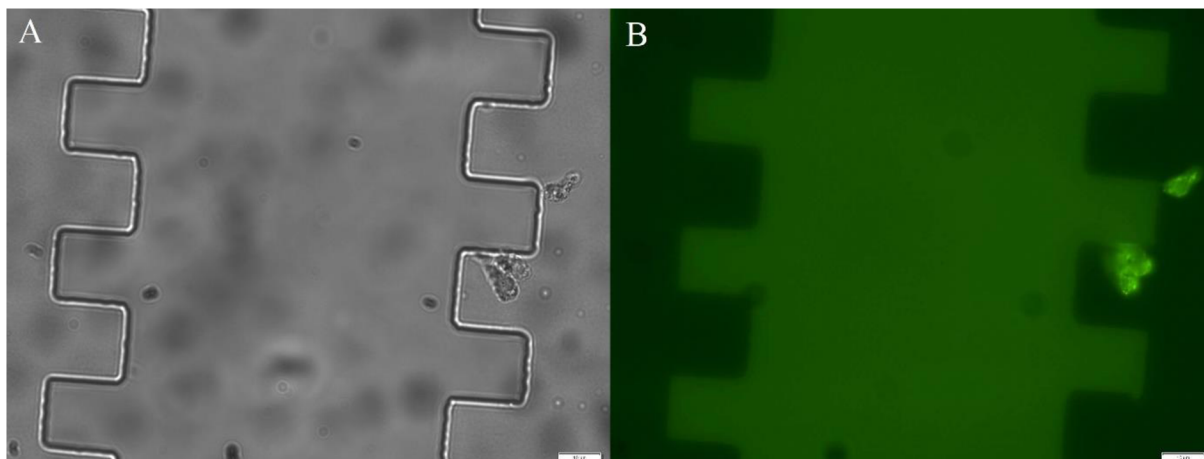
Obrázek 14: Struktura stěny mezi kanálky čipu s krycím sklíčkem ošetřeným plazmou po dobu 40 s pod fluorescenčním mikroskopem při šedesátinásobném zvětšení – transmise (A), fluorescenční zobrazení v pseudobarvě (B); uvedené měřítko má rozměr 10 μm

5.3.2.4 Pozorování čipu s oplazmovaným PDMS po dobu 20 s

U transmisního zobrazení čipu s PDMS ošetřeným plazmou po dobu 20 s je na obrázku č. 15, snímku A možné pozorovat jasnou strukturu kanálků a komůrek. Nejsou v něm obsaženy žádné bubliny, které by rušily pozorování. Na pravé stěně kanálku u prostřední komůrky jsou však viditelné dva tmavší defekty v polymeru. K jejich vzniku pravděpodobně došlo během odlévání na křemíkové destičce. Mohla na ní zbyť smítka, která se odlila a poté odpadla. Další variantou je možné popraskání vytvrzeného polymeru během sloupávání z destičky, kdy uvolněná část polymeru zůstala přichycená na destičce.

Při fluorescenčním zobrazení na snímku B je struktura kanálků také zřetelně vidět. Defekty, zpozorované na snímku A, zde září jasněji než jeho okolí. Na základě toho bylo usouzeno, že se jedná o dutiny, které se naplnily větším množstvím fluorescenční sondy. Ta ve větší vrstvě září jasněji než v okolí.

Vznik defektů však negativně ovlivňuje jen nejbližší komůrky. V ostatních neporušených komůrkách by membrány vznikaly bez problémů a defekty by na ně neměly žádný vliv. Na základě jasné viditelnosti kanálků bez bublin bylo vyhodnoceno, že ošetření polymeru plazmou po dobu 20 s je dostačující pro vznik pevné spoje, a tudíž i vhodného čipu.

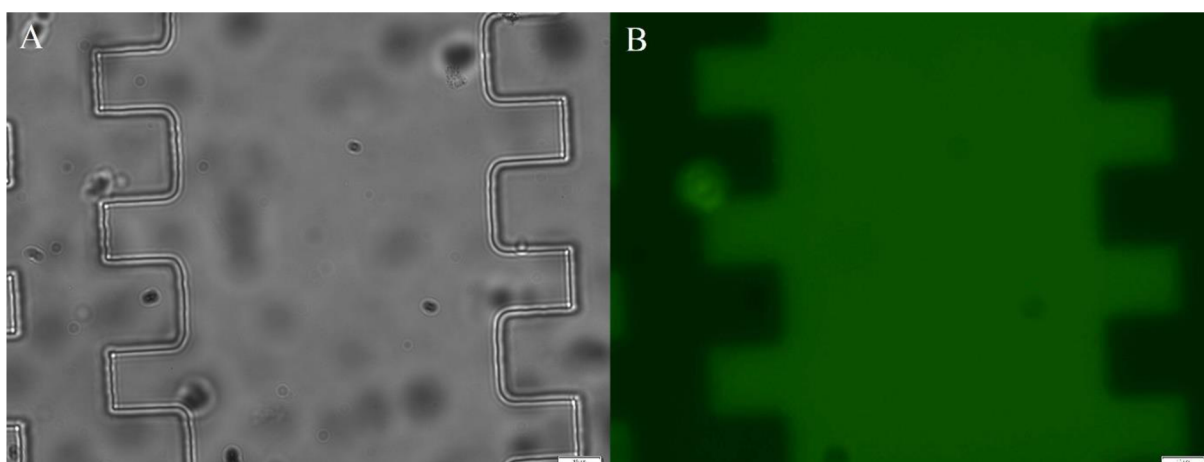


Obrázek 15: Struktura kanálku s defektem na čipu s PDMS ošetřeným plazmou po dobu 20 s pod fluorescenčním mikroskopem při šedesátinásobném zvětšení – transmise (A), fluorescenční zobrazení v pseudobarvě (B); uvedená měřítko má rozměr 10 μm

5.3.2.5 Pozorování čipu s oplazmovaným PDMS po dobu 40 s

Při pozorování čipu s oplazmovaným polymerem po dobu 40 s bylo objeveno několik nečistot. Obrázek č. 16, snímek A ukazuje mimo světlešedé fleky, které jsou patrné i u předchozích čipů, i dva tmavší. Může se jednat o smítka prachu. Pokud by se smítka v kanálcích nacházela ve větším množství a ve více čipech, bylo by vhodné zvážit výrobu čipů v čistých prostorech laboratoře. Dále je na levé stěně kanálku viditelný defekt v polymeru.

Na snímku B je možné pozorovat zřetelnou strukturu kanálků a komůrek. Nalevo je však jasněji zářící místo, které odpovídá poloze defektu viditelného na snímku A. Kvůli kulatému tvaru se však s největší pravděpodobností jedná o dutinu vzniklou díky vzduchové bublině. Tato mikrobublina pravděpodobně zůstala i po odstraňování bublin z čerstvě nalitého polymeru v exsikátoru. Při plnění kanálků byl vzduch vytlačen fluorescenční sondou ve větší vrstvě, než je v kanálku, a proto září jasněji. Protože je struktura kanálků jasně viditelná a defekt vznikl pravděpodobně během odlévání, a ne během lepení, bylo vyhodnoceno, že oplazmování pouze polymeru po dobu 40 s je vhodné pro tvorbu pevného čipu.



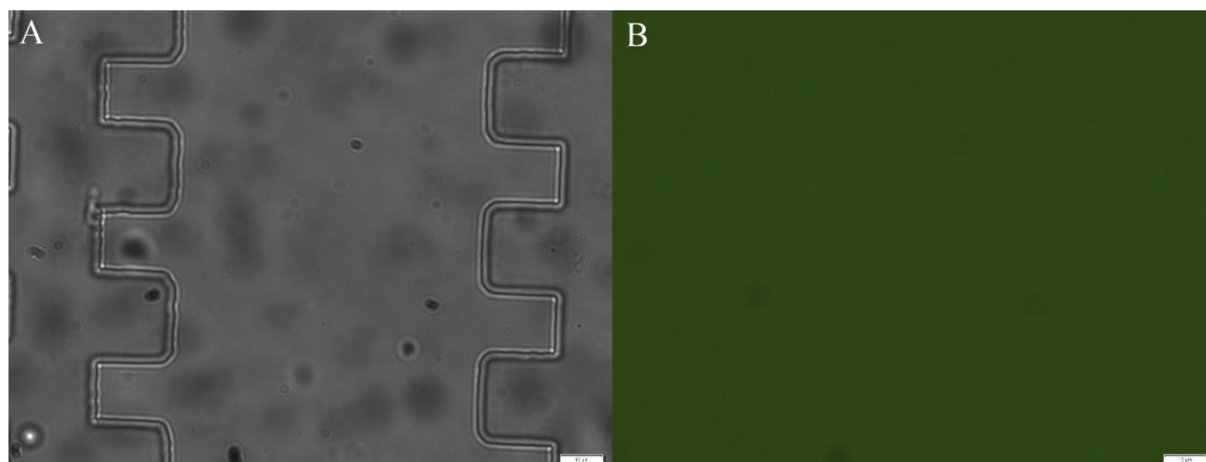
Obrázek 16: Struktura kanálku s defektem na čipu s PDMS ošetřeným plazmou po dobu 40 s pod fluorescenčním mikroskopem při šedesátinásobném zvětšení – transmise (A), fluorescenční zobrazení v pseudobarvě (B); uvedená měřítko má rozměr 10 μm

5.3.3 Časová závislost pevnosti čipů

Pro měření časové závislosti pevnosti čipů byly zvoleny čipy s oplazmovaným krycím sklíčkem i polymerem po dobu 20 s a 30 s. Od slepení až po pozorování pod mikroskopem byly oba čipy po celou dobu skladovány v superčisté vodě.

Čip ošetřený plazmou po dobu 20 s byl pozorován pod mikroskopem osmý den po slepení. Nevykazoval známky poškození a nepodtékal. Podrobnější stav čipu je popsán v kapitole 5.3.1.

Čip ošetřený plazmou po dobu 30 s byl pod mikroskopem pozorován patnáctý den po slepení. Na obrázku č. 17, snímku A, je vidět struktura kanálků i komůrek. Nejsou v ní viditelné žádné defekty ani bubliny. Na snímku B je však patrné, že fluorescenční sonda zatekla i mimo kanálky a svítí na celé pozorované oblasti. To se mohlo stát pouze v případě, že spoj mezi sklíčkem a PDMS v čase patnácti dnů nevydržel a povolil. Maximální doba, kdy je čip po slepení pevný a použitelný, je kratší než patnáct dní.



Obrázek 17: Struktura kanálku čipu s oběma částmi ošetřenými plazmou po dobu 30 s pod fluorescenčním mikroskopem při šedesátinásobném zvětšení – transmise (A), fluorescenční zobrazení v pseudobarvě (B); uvedené měřítko má rozměr 10 μm

5.3.4 Problémy během přípravy čipu a pozorování pod mikroskopem

Při nabírání roztoku fluorescenční sondy do plastové stříkačky s jehlou je třeba dávat pozor, aby se do ní nedostaly bublinky vzduchu. Pokud by se spolu s roztokem dostaly do čipu, znemožnily by dobré pozorování struktury kanálků.

Také je nutné dávat pozor, aby se úzká, ostrá jehla nedostala mimo přívodní otvor o velikosti 0,25 mm. Poškodila by polymer v okolí otvoru a mohla by vytvořit praskliny, kterými by roztok při plnění čipu unikal.

Osušení čipů po vyjmutí ze superčisté vody se nesmí provádět klasickou buničinou nebo ubrouskem. Zanechaly by na povrchu sklíčka i polymeru vlákna, která by rušila pozorování pod mikroskopem. Při neopatrném otírání by se smítka mohla dostat i do vnitřní struktury čipu a mohla by snížit průchodnost kanálků. Obdobně to platí i pro osušení přebytků fluorescenční sondy po naplnění čipu.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provést optimalizaci výroby mikrofluidního čipu vhodného pro tvorbu umělých buněčných membrán. Podle zadání byla vypracována rešerše v oblasti mikrofluidních modelů buněčných membrán a byly popsány různé metody jejich výroby a využití. V rámci toho byly vyhledány i některé modely mikrofluidních čipů vhodné pro tvorbu těchto membrán a materiály, ze kterých se čipy vyrábí. Na základě těchto poznatků byly vyrobeny a pozorovány mikrofluidní čipy z polydimethylsiloxanu.

Během experimentální části došlo k několika problémům, které však byly úspěšně vyřešeny a jsou blíže rozepsány u jednotlivých kapitol. Také díky nim byl optimalizován postup výroby polymerového čipu v rámci laboratoří FCH VUT. Jako první se smíchá PDMS a síťovací činidlo v poměru 10:1 a je provedena sonifikace po dobu 7 min. Po nalití na křemíkovou destičku v Petriho misce se následně celý systém vloží do exsikátoru, kde se odstraní zbylé bublinky. Vytvrzení polymeru probíhá v sušárně vyhřáté na 80 °C po dobu 1 h. Čipy, ochlazené na laboratorní teplotu, se vyřezají a skladují v čisté Petriho misce. Před ošetřením plazmou se PDMS čistí sonifikací v isopropanolu. Samotné oplazmování krycího sklíčka i polymeru probíhá při napětí 7,1 V po dobu 40 s. Spleené čipy se poté skladují v superčisté vodě v uzavřené nádobě. Pokud je třeba ověřit pevnost čipu, tak se injekční stříkačkou s jehlou do čipu vpraví fluorescenční sonda a čip se pozoruje pomocí transmise a fluorescenčního zobrazení na fluorescenčním mikroskopu.

Další možná optimalizace výroby tohoto typu čipu spočívají ve zjištění, zda je nutné plazmou ošetřovat i PDMS i krycí sklíčko po dobu 40 s. Slibné se zdají i varianty ošetření pouze PDMS po dobu 20 s a 40 s. Možným experimentem pro tuto otázku je vyrobit několik čipů od každé varianty a ověřit jejich pevnost v čase. Nejvhodnějším čipem poté bude ten, který vydrží pevný nejdéle. Také je třeba najít vhodný postup pro připevnění konektorů k otvorům v čipu.

Budoucí využití čipu spočívá ve výrobě umělých buněčných membrán ve struktuře kanálků a komůrek. Pokud budou úspěšně vytvořeny, tak bude možné sledovat jejich stabilitu v různých prostředích. Také do nich pravděpodobně bude možné vložit kanálky a pozorovat, jak jimi procházejí různé látky. Těmito experimenty se bude zabývat navazující diplomová práce.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BENEŠOVÁ, Marika. *Odmaturuj! z biologie. 2.*, přeprac. vyd. Brno: Didaktis, 2013. Odmaturuj! ISBN 978-80-7358-231-9.
- [2] ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS a P. WALTER. *The Lipid Bilayer. Molecular Biology of the Cell 4th edition* [online]. 2002 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
- [3] *Biochemie: Základní kurz. 3. vydání.* Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-7184-936-7.
- [4] *Chemists create artificial cell membrane.* Kurzweil [online]. [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://www.kurzweilai.net/chemists-create-artificial-cell-membrane>
- [5] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie.* Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4
- [6] HRSTKA, Miroslav. *Biologie.* Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017, 135 s.
- [7] *Microfluidics and microfluidic devices: a review* [online]. Elveflow. [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/>
- [8] TESAŘ, Václav. *Mikrofluidika.* Automa: odborný časopis pro automatizační techniku. Praha, 1994, 2008(10), 6-9. ISSN 1210-9592
- [9] *Průtokoměr Dr. Eddy s indikací laminárního proudění.* Svoboda.cz [online] [cit. 2020-04-14]. Dostupné z: <https://www.jansvoboda.cz/Prutokomer-Dr-Eddy-c38701>
- [10] HOLMES, DP. *Confined Fluid Flow: Microfluidics and Capillarity* [online]. [cit.2020-04-14]. Dostupné z: http://www.bu.edu/moss/files/2015/08/Sapienza2015_Microfluidics.pdf
- [11] VARGOVÁ, A. *Pokročilé membránové systémy.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..
- [12] OBRÁTIL, V. *Využití mikrofluidních systémů pro studium živočišných buněk* [online]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. [cit. 2020-04-14]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/otzh0/?so=ka>

- [13] ABRAHÁM, M. *Mikrofluidika*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 45 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Pavel Rudolf, Ph.D..
- [14] MURPHY, Douglas B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York: Wiley-Liss, 2001. ISBN 0-471-25391-X.
- [15] REBAUD, S., O. MANITI, AP. GIRARD-EGROT. *Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations*. *Biochimie*. 2014, 107, 135–42.
- [16] PELC, P. Studium doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 72 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.
- [17] JED HARRISON, D, K. FLURI, N. CHIEM, T. TANG a Z. FAN. *Micromachining chemical and biochemical analysis and reaction systems on glass substrates*. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1996, 33(1), 105–9.
- [18] SOLANSKÝ, Pavel. Využití mikrofluidiky v metabolickém inženýrství [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/kx0ac/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Zbyněk PROKOP.
- [19] KOTZ, F., K. ARNOLD, W. BAUER, D. SCHILD, N. KELLER a SACHSENHEIMER K, et al. *Three-dimensional printing of transparent fused silica glass*. *Nature*. 2017, 544(7650), 337–9.
- [20] MALÝ, Jan. *Biosensory a mikrofluidní systémy* [online]. Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: https://moodle.fzp.ujep.cz/pluginfile.php/10217/mod_resource/content/1/F6_Biosensory%20a%20mikrofluidn%C3%AD%20syst%C3%A9my.pdf
- [21] LIEW L-A., W. ZHANG, L. AN, S. SHAH, R. LUO a Y. LIU, et al. *Ceramic MEMS - New materials, innovative processing and future applications*. *American Ceramic Society Bulletin*. 2001, 80, 25–30.
- [22] WOLF MP., GB. SALIEB-BEUGELAAR a P. HUNZIKER. *PDMS with designer functionalities—Properties, modifications strategies, and applications*. *Progress in Polymer Science*. 2018, 83, 97–134.

- [23] TEAM E. *PDMS: A review*. Elveflow [online]. 2021 [cit. 2021-06-30]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-polydimethylsiloxane-pdms-and-microfluidics/>
- [24] SCHOLFIELD CR. *Composition of soybean lecithin*. J Am Oil Chem Soc. 1981, 58(10), 889–92.
- [25] *Soy PC (95%)* [online]. Avanti Polar Lipids. [cit. 2020-12-26]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/441601>
- [26] *Egg PC (95%)* [online]. Avanti Polar Lipids. [cit. 2020-12-26]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/131601>
- [27] *Soy Phospholipids 11145* [online]. Sigma-Aldrich. [cit. 2020-12-27]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/11145>
- [28] KARA S., S. AFONIN, O. BABII, AN. TKACHENKO, IV. KOMAROV a AS. ULRICH. *Diphytanoyl lipids as model systems for studying membrane-active peptides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2017, 1859(10), 1828–37.
- [29] KONGSUPHOL P., KB. FANG a Z. DING. *Lipid bilayer technologies in ion channel recordings and their potential in drug screening assay*. Sensors and Actuators B: Chemical. 2013, 185, 530–42.
- [30] CASTELLANA ET. a PS. CREMER. *Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design*. Surface Science Reports. 2006, 61(10), 429–44.
- [31] ORTH RN., J. KAMEOKA, WR. ZIPFEL, B. ILIC, WW. WEBB a TG. CLARK, et al. *Creating Biological Membranes on the Micron Scale: Forming Patterned Lipid Bilayers Using a Polymer Lift-Off Technique*. Biophysical Journal. 2003, 85(5), 3066–73.
- [32] GÓRZNY MŁ., NL. OPARA, VA. GUZENKO, VJ. CADARSO, H. SCHIFT a XD. LI, et al. *Microfabricated silicon chip as lipid membrane sample holder for serial protein crystallography*. Micro and Nano Engineering. 2019, 3, 31–6.
- [33] OTA S., H. SUZUKI a S. TAKEUCHI. *Microfluidic lipid membrane formation on microchamber arrays*. Lab Chip. 2011, 11(15), 2485–7.
- [34] LIU L., G. LI, N. XIANG, X. HUANG a K. SHIBA. *Microfluidic Production of Autofluorescent BSA Hydrogel Microspheres and Their Sequential Trapping for Fluorescence-Based On-Chip Permanganate Sensing*. Sensors. 2020, 20(20), 5886.

- [35] LIAO Z., J. WANG, P. ZHANG, Y. ZHANG, Y. MIAO a S. GAO, et al. *Recent advances in microfluidic chip integrated electronic biosensors for multiplexed detection*. Biosensors and Bioelectronics. 2018, 121, 272–80.
- [36] ZHAO X., W. GAO, J. YIN, W. FAN, Z. WANG a K. HU, et al. *A high-precision thermometry microfluidic chip for real-time monitoring of the physiological process of live tumour cells*. Talanta. 2021, 226, 122101.
- [37] YANG H. a MAM. GIJS. *Micro-optics for microfluidic analytical applications*. Chem Soc Rev. 2018, 47(4), 1391–458.
- [38] MAN Y., M. BAN, A. LI, X. JIN, Y. DU a L. PAN. *A microfluidic colorimetric biosensor for in-field detection of Salmonella in fresh-cut vegetables using thiolated polystyrene microspheres, hose-based microvalve and smartphone imaging APP*. Food Chemistry. [online] 2021, 354, 129578 [cit. 2021-06-19]. ISSN 0308-8146. Dostupné z :<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621005847?via%3Dihub>
- [39] SÁNDEZ N., A. CALVO-LÓPEZ, SSMP. VIDIGAL, AOSS. RANGEL a J. ALONSO-CHAMARRO. *Automated analytical microsystem for the spectrophotometric monitoring of titratable acidity in white, rosé and red wines*. Analytica Chimica Acta. 2019, 1091, 50–8.
- [40] TIEN HT. a AL. OTTOVA. *The lipid bilayer concept and its experimental realization: from soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes*. Journal of Membrane Science. 2001, 189(1), 83–117.
- [41] ZHANG Y., H. BRACKEN, C. WOOLHEAD a M. ZAGNONI. *Functionalisation of human chloride intracellular ion channels in microfluidic droplet-interface-bilayers*. Biosensors and Bioelectronics. 2020, 150, 111920.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
DPhPC	1,2-difytanoyl- <i>sn</i> -glycer-3-fosfocholin
GA	glutaraldehyd
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina
MEMS	mikroelektomechanické systémy
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDMS	polydimethylsiloxan
PMMA	polymethylmethakrylát
SPQ	6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinum
tBLMs	vázaná lipidová membrána