

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2023

Tereza Konečná



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

MODELOVÁNÍ MEMBRÁN V MIKROFLUIDNÍM ČIPU

MEMBRANE MODELING IN MICROFLUIDIC CHIP

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Konečná

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1762/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Tereza Konečná**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Tereza Venerová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Modelování membrán v mikrofluidním čipu

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat rešerši na téma design a aplikace mikrofluidních chipů. Zaměřit se na druhy chipů vhodné pro modelování membrán.
2. Osvojit si techniku přípravy mikrofluidních čipů, na základě rešerše vybrat vhodný modelový fosfolipid a vytvořit z něj v chipu modelovou membránu.
3. Na základě výsledků vyhodnotit vhodnost vybraného fosfolipidu pro tvorbu modelových membrán, eventuálně navrhnout řešení problémů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Tereza Konečná
studentka

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na mikrofluidní čipy vhodné pro modelaci fosfolipidových membrán, jejich design a možné aplikace. Zároveň poskytuje bližší specifikaci vybraných technik tvorby membrán na čipu. Experimentální část se zabývá výrobou čipů z polydimethylsiloxanu, optimalizací v rámci napouštění roztoků do čipu a samotnou tvorbou membrán uvnitř mikrofluidních kanálků pomocí zvoleného modelového fosfolipidu – asolectinu. Celý průběh modelace membrán byl vizualizován s využitím fluorescenční mikroskopie. V závěru práce je vyhodnocena úspěšnost zhotovené metody včetně vhodnosti asolectinu pro tvorbu modelových membrán a navržena řešení stávajících problémů.

ABSTRACT

This work focuses on microfluidic chips suitable for modeling phospholipid membranes, their design, and possible applications. It also provides a more detailed specification of selected techniques for creating membranes on a chip. The experimental part deals with the production of chips from polydimethylsiloxane, the optimization of infusing of solutions into the chip, and the formation of membranes inside microfluidic channels using the selected model phospholipid – asolectin. The entire process of membrane modeling was visualized using optical and fluorescence microscopy. In conclusion, the success of the developed method is evaluated, including the suitability of asolectin for the formation of model membranes, and solutions to existing problems are proposed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrofluidní čip, PDMS, fosfolipidová membrána, asolectin

KEYWORDS

Microfluidic chip, PDMS, phospholipid membrane, asolectin

KONEČNÁ, Tereza. Modelování membrán v mikrofluidním čipu. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/148937>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Tereza Venerová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování
Chtěla bych poděkovat paní Ing. Tereze Venerové, PhD. za odborné vedení celé práce, cenné rady a klidný přístup. Děkuji také Bc. Kateřině Haluzové za výpomoc v rámci experimentální části a bližší seznámení s řešenou problematikou. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za veškerou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Mikrofluidika.....	7
2.1.1	Tok kapalin	7
2.1.2	Tlakové ztráty	8
2.1.3	Povrchové napětí.....	9
2.2	Buněčná membrána	9
2.2.1	Struktura a složení.....	9
2.2.2	Transport látek	10
2.3	Fosfolipidy	12
2.3.1	Asolectin	13
2.4	Optická mikroskopie.....	13
2.4.1	Světelný mikroskop	13
2.4.2	Světlé pole.....	14
2.4.3	Fluorescenční mikroskopie	14
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	16
3.1	Planární lipidové membrány na čipu	16
3.2	Lipidové vezikuly na čipu	17
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1	Použité chemikálie.....	20
4.2	Přístroje a pomůcky	20
4.3	Metody.....	21
4.3.1	Výroba mikrofluidního čipu	21
4.3.2	Příprava zásobního roztoku pufu	22
4.3.3	Příprava lipidových roztoků asolectinu	22
4.3.4	Lepení a napouštění hadičky.....	22
4.3.5	Ověření tvorby membrán v čipu pod fluorescenčním mikroskopem.....	23
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
5.1	Výroba PDMS čipů.....	24
5.1.1	Skladovatelnost slepených čipů	24
5.1.2	Ověření kvality slepených čipů pod fluorescenčním mikroskopem.....	25
5.2	Těsnění hadičky při napouštění	26
5.3	Modelování membrán v čipu pod fluorescenčním mikroskopem	28
5.4	Stávající komplikace během měření.....	30
5.5	Řešení problémů	32
6	ZÁVĚR	34
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	35
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	39

1 ÚVOD

Buněčná membrána představuje velice důležitou komponentu většiny buněk a buněčných organel. Její význam spočívá zejména ve specifickém transportu látek a komunikaci s extracelulárním prostředím prostřednictvím různě vázaných proteinů a sacharidů. U živočišných buněk tvoří nejsvrchnější obal, který kromě výše zmíněných funkcí udává buňce tvar a chrání ji před nepříznivými vnějšími vlivy. Pro studium buněčných membrán např. z hlediska komunikačních a transportních mechanismů jsou živé buňky nevyhovující. Důvodem je vysoká komplexnost buněčného systému a náročná kultivace. Výzkum se proto zaměřil na vývoj zjednodušených umělých modelů buněčných membrán, které obsahují pouze fosfolipidovou dvouvrstvu. Absence široké škály membránových složek poskytla preciznější analýzu a lepší porozumění zkoumaných jevů. V současné době nacházejí největší uplatnění umělé membránové lipozomy jako nosiče léčiv a genů, jelikož umožňují spolehlivou enkapsulaci dané látky a její transport skrz cizorodou membránu do cytoplazmy buněk.

Mikrofluidní technologie s sebou přináší pokrok v oblasti automatizace a miniaturizace chemických procesů. Díky matematicky definované dynamice tekutin uvnitř mikrofluidních kanálků je možné dosáhnout kontroly nad průběhem reakcí, a umožnit tak řízenou modelaci fosfolipidových struktur.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikrofluidika

Mikrofluidiku můžeme chápat buď jako vědu studující chování tekutin v měřítku mikro až nanometrů nebo jako technologii výroby mikrofluidních zařízení obsahujících kanálky a komůrky, kterými proudí tekutiny [1].

Klíčovým konceptem mikrofluidní technologie je integrovat do jednoduchého mikrosystému operace, které běžně vyžadují celou laboratoř [1]. Práce v tomto měřítku má několik zjevných výhod, např. umožňuje přesnou analýzu vzorku v místě zavedení a účinné rychlejší reakce díky specifické dynamice tekutin, čímž se výrazně minimalizuje chemické plýtvání [2].

Typickým mikrofluidním zařízením je mikrofluidní čip, který je tvořen sítí mikrokanálek leptaných nebo lisovaných do materiálu jako je sklo, křemík nebo polydimethylsiloxan (PDMS) [3]. Design sítě mikrokanálek je precizně propracován, aby splňoval požadované vlastnosti čipu (lab-on-a-chip, detekce patogenů, elektroforéza, analýza DNA atd.) [1]. Na obou koncích mikrokanálek se nacházejí otvory proražené čipem představující vstupy a výstupy jakožto rozhraní mezi makro a mikrosvětlem. Právě těmito otvory jsou tekutiny vstříkovány a odváděny z mikrofluidního čipu prostřednictvím např. připojených hadiček či adaptérů injekčních stříkaček [3]. Pro přesné řízení toku tekutin uvnitř mikrokanálek jsou zapotřebí specifické systémy. Tyto prvky mohou být zabudované buď uvnitř čipu v podobě různých ventilů, nebo mimo něj [1]. V případě externích aktivních systémů se používají regulátory tlaku, injekční nebo peristaltické pumpy. Pasivním způsobem lze pro řízení toku využít např. hydrostatický tlak [3].

Z pohledu vědy mikrofluidika akademicky spadá do podoboru mechaniky tekutin. Ve srovnání s klasickou hydromechanikou jsou však délkové stupnice v mikrofluidních systémech výrazně menší a za těchto podmínek je fyzika tekutin odlišná od chování ve větších systémech [4].

2.1.1 Tok kapalin

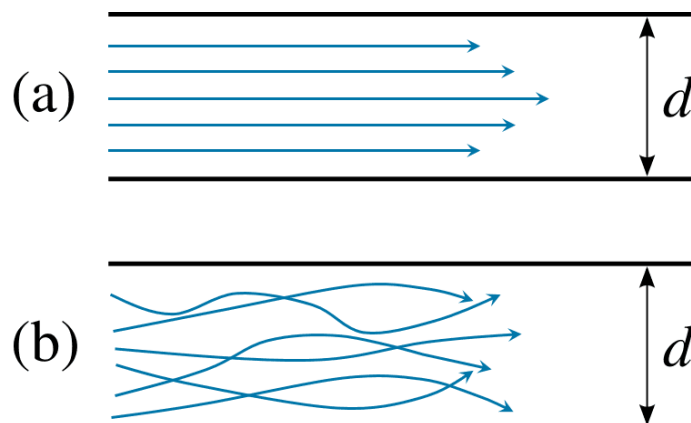
Mikrofluidní toky mohou být prvním příkladem odlišného chování kapalin, jelikož jsou obvykle přísně laminární, zatímco v makroskopických systémech převažuje proudění turbulentní [4]. Charakter proudění udává Reynoldsovo číslo. Značí se R_e a jedná se o bezrozměrnou veličinu. Je závislé jak na vlastnostech proudící kapaliny, tak na rozměru kanálku a rychlosti proudění.

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

kde ρ představuje hustotu kapaliny, d průměr kanálku, v rychlost proudění kapaliny a η je dynamická viskozita kapaliny.

Pokud je hodnota R_e menší než 2300, bude v kanálku docházet k laminárnímu proudění. Tento typ toku se označuje také jako proudnicové proudění, protože je charakterizováno neprotínajícími se proudnicemi (Obrázek 1a) [5]. Tekutina se pohybuje hladce a ve vrstvách.

Při kontaktu s vodorovným povrchem je stacionární, ale všechny ostatní vrstvy po sobě kloužou. Naproti tomu, pokud hodnota Re přesáhne 4000, bude tekutina v kanálku podléhat nepravidelným fluktuacím a míchání a tento druh toku je označován jako proudění turbulentní (Obrázek 1b) [6]. V mikrofluidice nabývá Re řádově jednotek až maximálně stovek, proto zde uvažujeme pouze laminární proudění [7].



Obrázek 1: Laminární (a) a turbulentní (b) proudění v uzavřeném kanálu [5]

2.1.2 Tlakové ztráty

Malé rozměry typické pro mikrofluidní systémy mají také vliv na působení tlaku, jelikož při průchodu tekutin v mikrokanálcích dochází k nárůstu tlakové ztráty. Navier-Stokesova rovnice vychází ze zákona zachování hybnosti, hmoty a energie a slouží k popisu laminárního proudění nestlačitelné newtonské kapaliny. Její odvození lze získat ze silové bilance působící na kapalinu uvnitř mikrokanálku [8, 9].

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

kde \vec{F}_m je silové působení vnějších hmotnostních sil, \vec{F}_p je silové působení tlakových sil, \vec{F}_t je silové působení třecích sil a \vec{F}_s je silové působení setrvačných sil.

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

kde ρ je hustota, v je rychlost, t je čas, p je tlak, μ je kinetická viskozita a f je součet objemových sil. V případě válcových mikrokanálek se vyvíjí parabolické proudění a vztah mezi tlakem a průtokem je popsán Hagen-Poiseuilleovou rovnicí [10].

$$\Delta P = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot r^4} Q = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{r^4} v, \quad (4)$$

kde ΔP je pokles tlaku mezi dvěma konci kanálku, L je celková délka kanálku, Q je objemový průtok, r je poloměr kanálku a v je průměrná rychlost proudění.

2.1.3 Povrchové napětí

Zatímco pro makroskopické fluidní systémy není tento jev příliš významný, v mikrofluidice jsou účinky povrchového napětí nezanedbatelné [4]. V rozmezí mikro až nanometrů, se síla povrchového napětí stane dominantní nad většinou ostatních sil, jako jsou síly založené na tlaku nebo hmotnosti [11]. Působení povrchového napětí lze využít jako alternativu pro řízení průtoku tekutin v kanálcích mikrofluidních zařízení namísto různých magnetických, mechanických či pneumatických systémů. Často je však nutné nejprve upravit povrchové vlastnosti kanálků, např. z pohledu smáčení povrchu, aby se snížil vysoký poměr povrchu k objemu zařízení [12].

Podle popisu Laplaceova zákona způsobuje povrchové napětí přetlak v kapičkách a bublinkách a souvisí se zakřivením rozhraní [13, 14].

$$p_L = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right), \quad (5)$$

kde p_L charakterizuje Laplaceův tlak (přetlak), γ je mezifázové napětí a R_1 a R_2 jsou hlavní poloměry zakřivení povrchu v určitém bodě.

Když mikrokanálkem proudí kapalina, vodní povrch vytvoří zakřivené rozhraní kapalina/plyn a vlivem volné povrchové energie se vyvolá pokles tlaku. Konkávní strana rozhraní má vždy tlak větší než strana konvexní. Tato charakteristika povrchového napětí a zakřivení na rozhraních umožňuje řízení průtoku v mikrofluidních zařízeních [15]. Mezi další faktory, které mohou ovlivnit řízení průtoku s využitím povrchového napětí, jsou teplota, elektrické pole nebo přítomnost povrchově aktivních látek [13, 14, 16].

2.2 Buněčná membrána

Buněčné membrány obklopují nejen každou buňku, ale také mnohé buněčné organely [17]. Vytvářejí stabilní bariéru mezi dvěma vodnými prostředími a jsou specifické s ohledem na sloučeniny, které propouštějí. Mají podobnou základní strukturu, ať už se jedná o jakýkoliv typ buňky. Skutečné složení lipidů a proteinů se však u nich drasticky liší v závislosti na dané funkci membrány. Díky této variaci ve složení a organizaci mají různé typy buněk svou specifickou strukturu a tvar, mohou komunikovat s jinými buňkami a transportovat určité ionty a molekuly přes membránu [18].

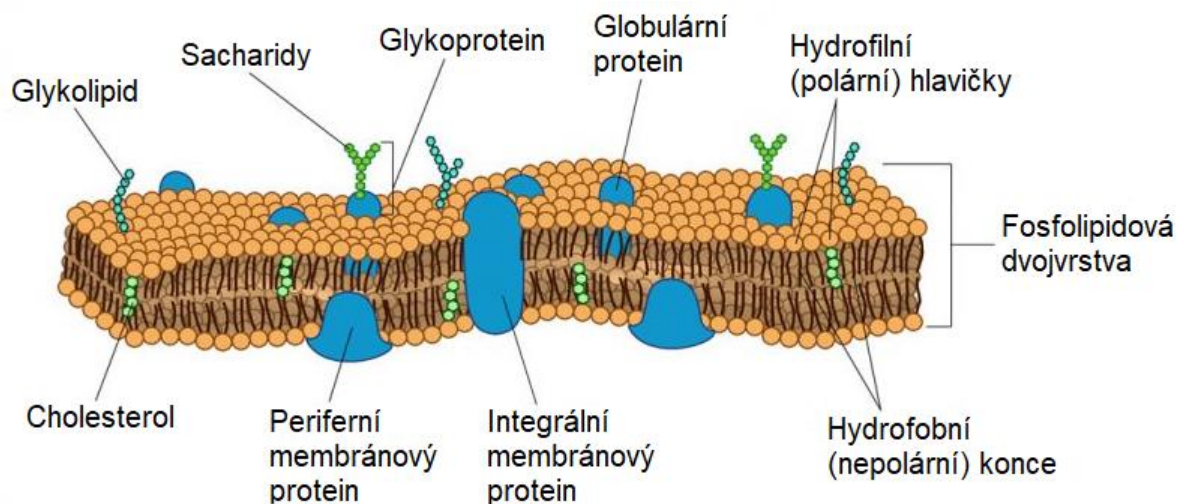
2.2.1 Struktura a složení

Základní strukturu buněčné membrány tvoří lipidová dvojvrstva obohacená o specializované molekuly proteinů a extracelulárně exponované sacharidové řetězce [17]. Existují tři typy membránových lipidů: fosfolipidy, cholesterol a glykolipidy. Fosfolipidy obsahují hydrofilní (polární) hlavičku a hydrofobní (nepolární) řetězec z uhlovodíků [17]. Působením hydrofobního efektu a van der Waalsových interakcí jsou molekuly fosfolipidů ve vodném prostředí samovolně uspořádány do dvojvrstvy s hydrofobními konci orientovanými dovnitř a hydrofilními hlavičkami vně [19]. Mezi molekulami fosfolipidů je vložen cholesterol, který je zodpovědný za udržování mechanické stability jinak tekuté membrány [17]. Glykolipidy obsahují připojené cukerné řetězce a společně s glykoproteiny se v podobě mediátorů

buněčných interakcí podílejí na intercelulární (mezibuněčné) komunikaci. Jejich zastoupení v cytoplazmatické membráně se pohybuje okolo 2–10 % z celkového množství lipidů. Nejhojněji se vyskytují v nervové tkáni [19].

Molekuly membránových proteinů se rozlišují podle prostorového uspořádání vůči membráně. Membránové proteiny procházející celou lipidickou dvojvrstvou se nazývají integrální a slouží jako transmembránové kanály pro přenos iontů přes membránu. Periferní membránové proteiny se nacházejí volně na membránovém povrchu a do lipidické dvojvrstvy nijak nezasahují. Zbylé proteiny pak bývají zasazeny jen do vnější nebo vnitřní poloviny membrány. Význam membránových proteinů spočívá zejména v transportu molekul přes buněčnou membránu nebo v intercelulární komunikaci v podobě receptorů, díky kterým buňky reagují na vazbu signálních molekul (např. hormonů) z vnějšího prostředí [17].

Na některé membránové proteiny jsou navázány polysacharidové či oligosacharidové řetězce, díky kterým se z nich stávají glykoproteiny. Povrch buněčné membrány bývá také pokrytý membránovými sacharidy v podobě buněčného sacharidového povlaku, který se nazývá glykokalyx. Oligosacharidové a polysacharidové řetězce vytvářejí buňce určitou povrchovou specifitu a zabezpečují rozpoznávání a adhezi různých buněčných typů [17].



Obrázek 2: Složení a struktura buněčné membrány [21]

2.2.2 Transport látek

Kromě udržování celistvosti buňky a intercelulární komunikace mají buněčné membrány význam také v selektivním transportu molekul [17]. Fosfolipidová dvojvrstva je díky své semipermeabilitě nepropustná pro většinu ve vodě rozpustných molekul, iontů a samotné vody. Na druhou stranu však umožňuje esenciálním molekulám (jako jsou ionty, glukóza, aminokyseliny a lipidy) snadno vstupovat do buňky, udržovat metabolické meziproducty uvnitř buňky a vylučovat odpadní sloučeniny do extracelulárního prostředí [19].

Pohyb prakticky všech molekul a iontů přes buněčnou membránu je zprostředkován selektivními transmembránovými proteiny. Transmembránové proteiny rozlišujeme do tří tříd: adenosintrifosfátem (ATP) poháněné pumpy, transportéry a kanálové proteiny [19]. Pomocí buněčné membrány může buňka také přijímat makromolekuly z vnějšího okolí prostřednictvím různých typů cytóz [17].

2.2.2.1 Primární aktivní transport

ATP poháněné pumpy využívají energii hydrolýzy ATP k pohybu iontů nebo malých molekul přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu nebo elektrickému potenciálu. Tento proces, označovaný jako aktivní transport, je příkladem spřažených chemických reakcí doprovázených cyklem konformačních změn [19]. Aktivní transport probíhá za spotřeby chemické energie, proto je spojen s hydrolýzou ATP, která energii uvolňuje [17, 19]. Příkladem takového transportu je sodno-draselná pumpa, která slouží k vyloučení sodných iontů z buňky a k antiportu draslíku do buňky (typické pro nervovou tkáň) [17].

2.2.2.2 Sekundární aktivní transport

Kotransport neboli sekundární aktivní transport je zprostředkováný proteinovými kotransportéry, které spojují pohyb jednoho typu iontu/molekuly proti jejich koncentračnímu gradientu s pohybem jednoho nebo více různých iontů ve směru jejich koncentračního gradientu. Stejně jako ATP pumpy se kotransportéry účastní spřažených reakcí, ve kterých je energeticky nepříznivá reakce spojena s energeticky příznivou reakcí. Na rozdíl od ATP pump však využívají energii uloženou v elektrochemickém gradientu [19]. Příkladem můžeme navázat na výsledek sodno-draselné pumpy, díky kterému máme vysokou koncentraci sodných iontů v extracelulárním prostoru. Pokud je cesta skrz membránu otevřená, sodné ionty se budou pohybovat dolů po svém koncentračním gradientu a navrátí se do nitra buňky. Kontransportér využije energii tohoto gradientu k pohonu transportu molekul glukózy z buňky [20].

2.2.2.3 Usnadněná difúze

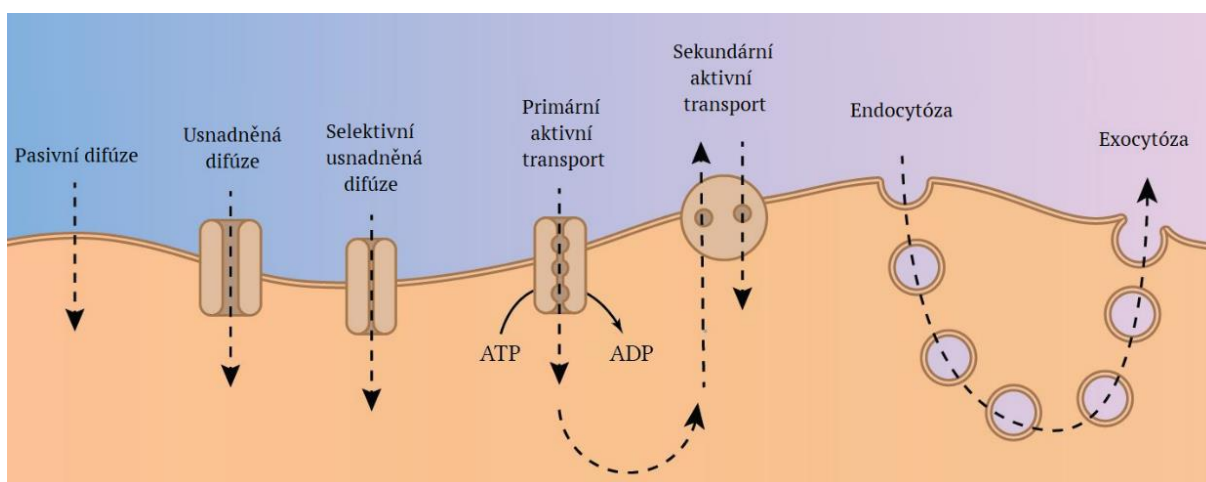
Kanálové proteiny tvoří hydrofilní dráhy, kterými se mohou hydrofilní látky (jako voda, ionty, glukosa nebo některé aminokyseliny) velice rychle přenést přes membránu, aniž by se dostaly do kontaktu s hydrofobním vnitřkem membrány. Takovýto proteinem podporovaný transport probíhá ve směru koncentračního gradientu a bývá označován jako usnadněná difúze [19]. Některé iontové kanály jsou otevřené téměř neustále (negované kanály), nicméně většina se otevírá pouze v reakci na specifické chemické nebo elektrické signály (hradlové kanály) [19].

2.2.2.4 Pasivní difúze

Plyny (jako je kyslík a oxid uhličitý), a malé, nenabité polární molekuly (např. močovina a ethanol), se mohou snadno pohybovat přes buněčnou membránu pasivní (volnou) difúzí bez pomoci transportních proteinů. Nicméně i tento druh transportu bývá často urychlován specifickými proteiny, protože rychlost pasivní difúze obvykle není dostatečně vyhovující buněčným potřebám [19]. Tento proces probíhá spontánně, bez spotřeby chemické energie a po směru koncentračního gradientu [17, 19]. Relativní rychlost difúze jakékoli látky přes čistou fosfolipidovou dvojvrstvu je úměrná jejímu koncentračnímu gradientu napříč vrstvou a její hydrofobnosti a velikosti. Nabité molekuly jsou také ovlivňovány elektrickým potenciálem napříč membránou. Elektrický potenciál existuje ve většině buněčných membrán a je výsledkem malé nerovnováhy v koncentraci kladně a záporně nabitých iontů na obou stranách membrány [19].

2.2.2.5 Cytózy

Cytózy rozdělujeme na několik druhů podle velikosti přijímaného materiálu, směru nebo způsobu přenosu. Proces, během kterého invaginovaná buněčná membrána uzavře včleněný materiál do endocytického vaku (endosomu) se nazývá endocytóza. Pokud jsou přijímané molekuly velmi malé, používá se spíše termín pinocytóza (buněčné pití) a při trávení částic ve velikosti např. bakterií se uplatňuje fagocytóza (pohlcování). Opačným procesem k endocytóze je exocytóza, kdy endosomy splynou s buněčným povrchem a vylučují produkty zpracované buňkou do extracelulárního prostředí. Dalším možným typem cytózy je transcytóza, během které dochází k přenosu látek pomocí váčků z jedné strany ploché buňky na druhou za pomoci membránového proteinu, který se postupně odlučuje a vrací k povrchu [17].

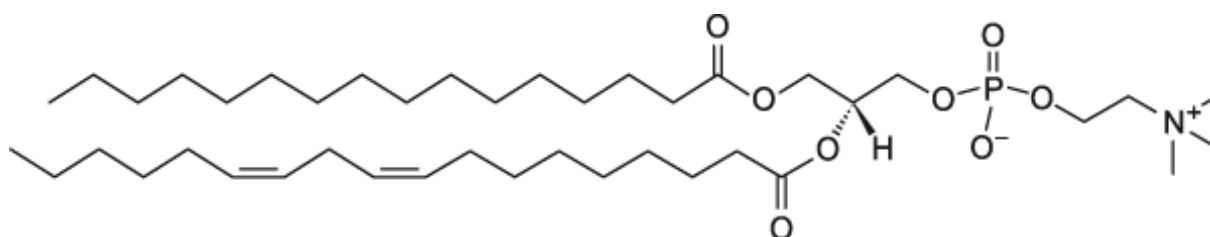


Obrázek 3: Příklady transportů molekul přes buněčnou membránu [22]

2.3 Fosfolipidy

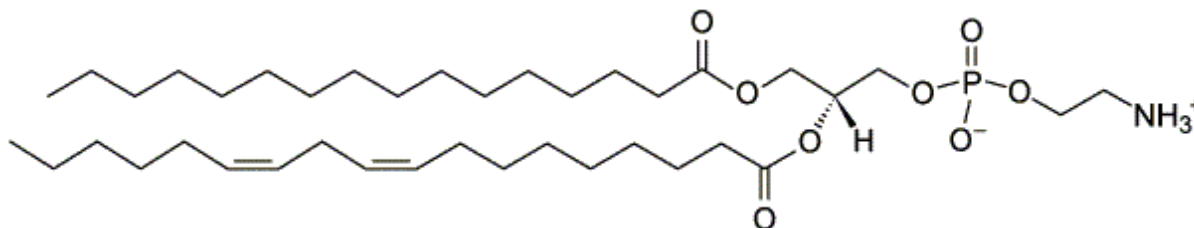
Fosfolipidy neboli glycerolfosfolipidy představují nejrozšířenější třídu membránových lipidů. Jedná se o deriváty kyseliny fosfatidové (glycerol-3-fosfát) a jejich typická molekula sestává z hydrofobního konce složeného ze dvou mastných acylových řetězců esterifikovaných na dvou hydroxylových skupinách glycerolfosfátu a polární hlavičky připojené k fosfátové skupině. Mastné acylové řetězce se mohou lišit počtem uhlíků (obvykle 16 nebo 18) a stupněm nasycení [19].

Podle typu substituentu navázaného na glycerolfosfát rozdělujeme fosfolipidy na: fosfatidylcholiny, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylinositoly, fosfatidylseriny a plazmalogeny. Nejhojnějšími zástupci fosfolipidů jsou fosfatidylcholiny (lecitiny). Jejich polární hlavičku tvoří cholin, kladně nabitá kvartérní dusíková báze obsahující alkohol esterifikovaný na záporně nabitý fosfát [19].



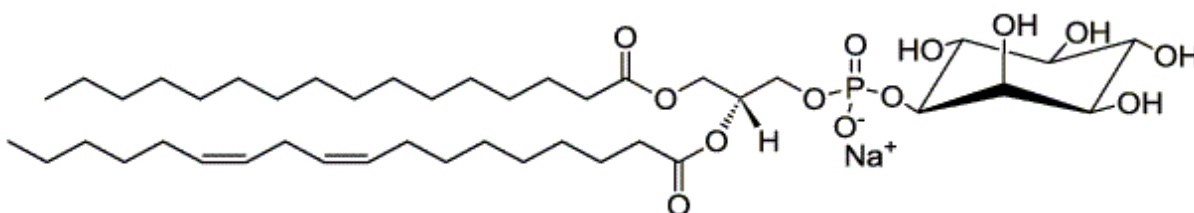
Obrázek 4: Struktura fosfatidylcholinu [23]

Fosfatidylethanolaminy (kefaliny) mají podobné vlastnosti jako fosfatidylcholinu a jejich hlavní skupinu tvoří ethanolamin esterově vázaný na fosfát [24].



Obrázek 5: Struktura fosfatidylethanolaminu [25]

Fosfatidylinositoly obsahují cukerný alkohol inositol [24].



Obrázek 6: Struktura fosfatidylinositolu [26]

U fosfatidylserinů je na glycerolfosfát navázaná aminokyselina serinu a u plazmogenů je jeden z mastných acylových řetězců nahrazen etherově vázaným vyšším nenasyceným alkoholem [19, 24]. Plazmalogeny se svými vlastnostmi podobají lecitinům a kefalínům a vyskytují se zejména v mitochondriálních membránách [24].

2.3.1 Asolectin

Asolectin představuje směs fosfolipidů extrahovaných ze sójových bobů s přibližným složením 25 % fosfatidylcholinu, 25 % kefalínu, 25 % fosfatidylinositolu a minoritním podílem dalších fosfolipidů. Většinu přítomných mastných kyselin tvoří nenasycené (až 62 %), zbytek řetězců je nasycených nebo mononenasycených [27]. Asolectin nachází uplatnění při syntéze funkčních membránových proteinů nebo lipidových dvojvrstev pro studium transportních procesů [28].

2.4 Optická mikroskopie

Optickou (světelnou) mikroskopii lze charakterizovat jako měřicí techniku umožňující pozorovat objekty, které nejsou lidským okem viditelné (pod 0,25 mm). Rozlišovací schopnost světelné mikroskopie se udává okolo 0,25 μm , je tedy 1000krát větší než u lidského oka [29]. Takto vysoké zvětšení nám umožňuje odhalit strukturu a složení daného vzorku nebo pozorovat procesy v mikroskopickém světě, např. difúzi látek přes buněčnou membránu [30]. Maximálního zvětšení, kterého lze u některých speciálních světelných mikroskopů dosáhnout, je 2000 [29].

2.4.1 Světelný mikroskop

Světelné mikroskopy se skládají ze tří optických soustav: osvětlovací soustavy (kondenzoru), objektivu a okuláru. Osvětlovací soustava slouží k osvětlení vzorku, které nejčastěji probíhá

proti směru pozorování (v takovémto případě musí být prosvětlovaný vzorek částečně průhledný) [29]. V současnosti se u většiny mikroskopů používají umělé světelné zdroje, jako jsou žárovky, světelné diody (LED) nebo lasery. Světlo ze zdroje se shromažďuje pomocí kondenzorové čočky a před zaostřením na vzorek se ještě opticky tvaruje a filtruje, což je zásadní pro dosažení vysokého rozlišení a kontrastu [30].

Objektiv a okulár jsou součástí zobrazovacího systému, který shromažďuje světlo po interakci se vzorkem a vytváří pozorovatelný obraz. Objektiv je tvořen soustavou čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, dohromady však fungují jako spojná čočka zachycující většinu světla ze vzorku. Mezi ohniskem okuláru a okulem je poté promítán výsledný obraz, který je převrácený, skutečný a zvětšený. Čočka okuláru má stejné složení jako objektiv. Přenáší shromážděné světlo do oka pozorovatele nebo do kamerového systému a vytváří obraz zdánlivý, přímý a zvětšený [29, 30].

Zobrazovací systém může mimo jiné obsahovat i prvky jako apertury a filtry propouštějící jen určité části světla ze vzorku. Tím umožňují vyčlenění zajímavých vlastností vzorku, které by při zobrazování veškerého světla zůstaly skryté [30].

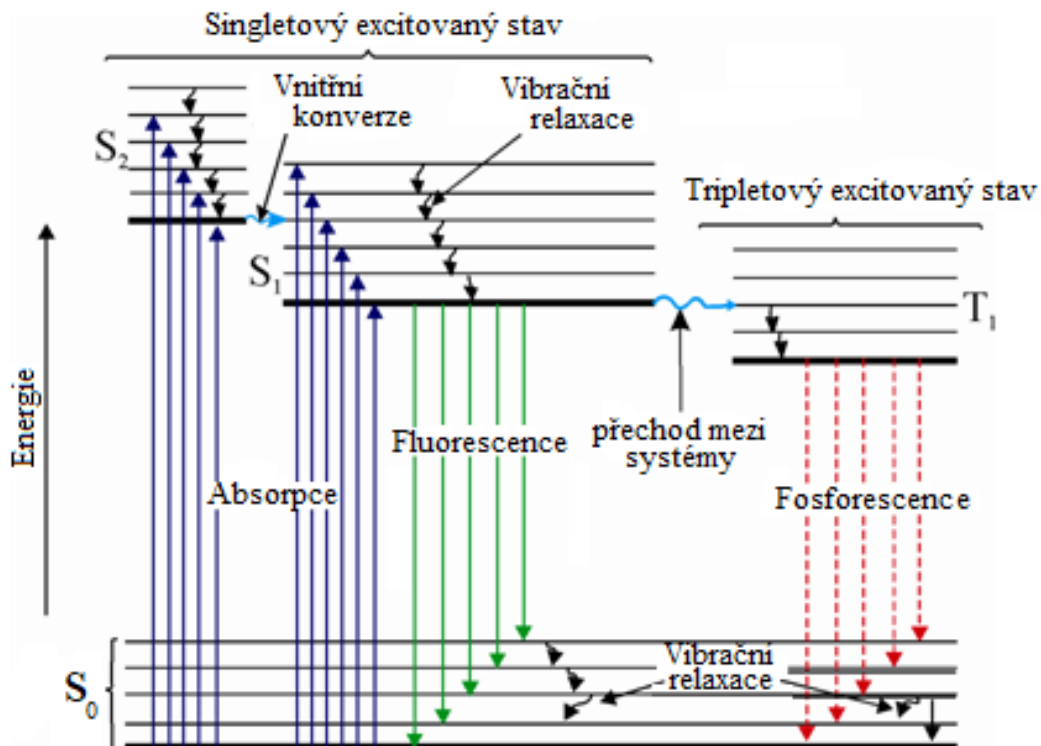
2.4.2 Světlé pole

Světlé pole představuje první vyvinutou a nejjednodušší formu světelné mikroskopie [30]. Při této metodě je světlo procházející pozorovaným vzorkem (nebo od něj odražené) shromažďováno mezi soustavou dvou spojných čoček, které vytváří obraz skutečný, zvětšený a převrácený. Pozorovaný objekt má tmavé obrysy a nachází se ve světlém poli [29]. Zvětšení světlého pole je bohužel omezeno na 1300 x, a proto není vhodné pro zobrazování vysoce transparentních vzorků [30].

2.4.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie také spadá do metod světelné mikroskopie a používá se k zobrazení fluoreskujících vzorků [30]. Jev, při kterém látka po absorpci světla o kratší vlnové délce emituje záření o delší vlnové délce, se nazývá luminiscence a probíhá v elektronovém obalu jednotlivých atomů [29, 30]. Když elektron absorbuje foton, zvýší se jeho energie a "přeskočí" do orbitalu s vyšší energií. Tento excitovaný stav ale není stabilní, elektron svou energii vzápětí ztrácí a vrátí se zpět na původní energetickou hladinu. Během procesu deexcitace dochází k emisi elektromagnetického záření, které odpovídá rozdílu energie elektronových hladin [29, 31].

Luminiscenci rozdělujeme podle doby trvání na fluorescenci a fosforescenci. Fluorescenci je možné pozorovat během buzení, po vypnutí zdroje záření však ihned vymizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s). Naproti tomu fosforescence přetrvává i po odstranění zdroje záření, protože má delší dobu dohasínání (až několik sekund) [31]. Rozdíl v dohasínání u obou jevů je způsoben tím, že fluorescenci probíhá ze singletového a fosforescence z tripletového stavu, jak je popsáno v Jablonského diagramu.



Obrázek 7: Jablonského diagram [32]

Fluorescenci můžeme rozlišit na primární, kdy se samotná látka ve vzorku chová jako fluorofor (např. chlorofyl), a sekundární, kdy je nutné nefluorescenční struktury vzorku označit fluorescenčními markery [29].

Fluorescenční mikroskop obsahuje silný zdroj záření (většinou rtuťové, nebo xenonové výbojky), monochromátor a kondenzor [29]. Využívá kombinaci optických filtrů, které blokují krátkovlnné záření, ale propouštějí fluorescenci vzorku s delší vlnovou délkou. Výsledný obraz tedy ukazuje pouze fluorescenční části vzorku, což umožňuje oddělit a vizualizovat distribuci fluorescenčních částic [30]. Jedním z hlavních omezení fluorescenční mikroskopie je fotobělení, kdy částice nebo markery ztrácejí schopnost fluoreskovat, protože proces absorpce trvale pozměnil jejich strukturu [30].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

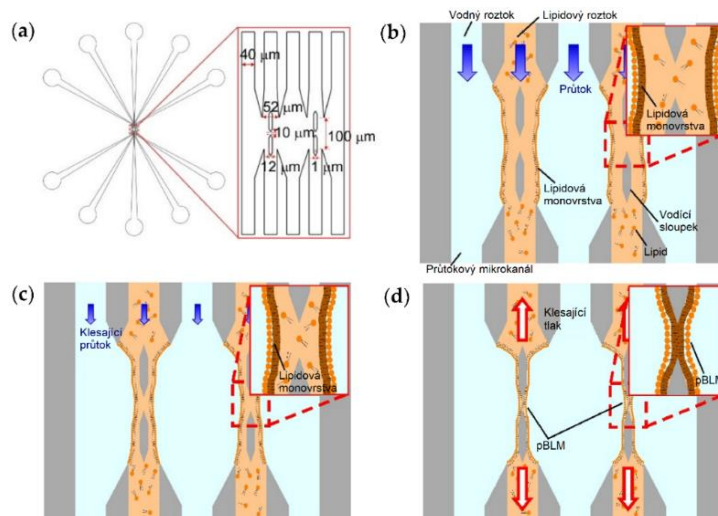
Mikrofluidní technologii lze aplikovat k vytvoření uměle rekonstituovaných lipidových membrán, ať už v podobě planárních lipidových dvojvrstev nebo lipidových vezikul. Tato zařízení jsou užitečná nejen pro tvorbu, ale i manipulaci s lipidovými membránami a lze je využít v různých oblastech výzkumu, např. pro analýzu membránových proteinů, studii umělých buněk nebo vysoce citlivé biosenzory [33].

3.1 Planární lipidové membrány na čipu

Planární lipidové dvojvrstvy se obvykle tvoří přes malé otevřené otvory v kanálcích pevného mikrofluidního nosiče. Jedna ze základních metod přípravy je Langmuir-Blodgettová, kdy se lipidový roztok obsahující fosfolipidy aplikuje přes malý otvor oddělující dvě vodné složky. Lipidové monovrstvy na rozhraní voda-vzduch se při tažení vzhůru nad otvor spojí. Nicméně planární dvojvrstvy vytvořené za použití konvenčních metod bývají často křehké, nestabilní a obtížně se reprodukuje, což omezuje jejich aplikaci ve vysoce výkonných systémech pro farmaceutický screening [33].

Takeuchi et al. [33] vyvinuli tzv. kontaktní metodu, která je reprodukovatelná a umožňuje vytvářet planární lipidové dvojvrstvy bez přítomnosti otvorů s použitím jednoduchého přesně řízeného průtoku. Tato metoda se provádí vstříknutím dvou kapiček vody do jamky mikrokanálku, která je již naplněna lipidovým roztokem. Na rozhraní mezi vodou a lipidovým roztokem obsahujícím fosfolipidy dochází k samovolnému sestavení monovrstvy. Jakmile se obě rozhraní dostanou do vzájemného kontaktu, vytvoří se lipidová dvojvrstva.

Na základě principu této metody, byly postupem času vyrobeny modernější a sofistikovanější zařízení. Jedním z nich je mikrofluidní čip od Shoji et al. [34] umožňující tvorbu dvojité uspořádaných planárních dvouvrstvých lipidových membrán (pBLM) pomocí zmíněné metody kapkového kontaktu.



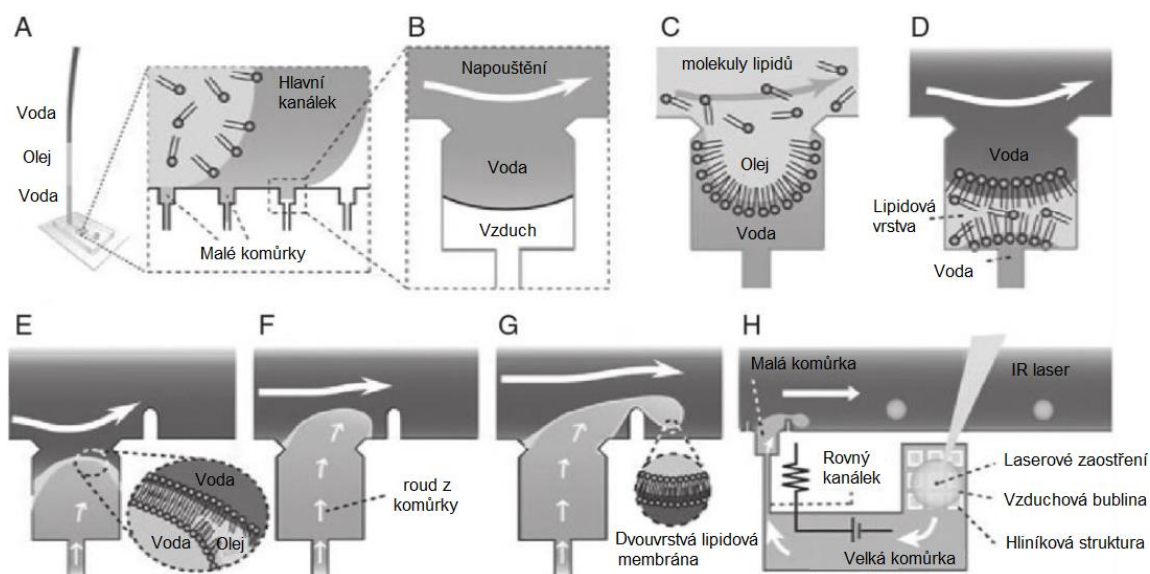
Obrázek 8: (a) Design pětivrstvého mikrokanálu obsahujícího pět vstupů, pět výstupů a oblast soutoku s vodíci sloupkou; (b) v oblasti soutoku proudí pětivrstvý tok z vodných a lipidových roztoků, na jejichž rozhraních se spontánně tvoří lipidové monovrstvy; (c) průtokový tlak všech roztoků se sníží, aby se stabilizovala rozhraní; (d) snížením průtokového tlaku lipidových roztoků dochází v mezerách sloupků ke kontaktu lipidových monovrstev a tvoří se pBLM [34]

pBLM vytvořené touto metodou jsou odolné vůči mechanickým vibracím a mohou zůstat stabilní až po dobu 2 týdnů. Na pBLM byly následně rekonstituovány membránové proteiny tvořící nanopóry a tento model byl využit k měření iontových proudových signálů přes dvě membrány. Přestože vícevrstvé pBLM mají potenciál, jejich tvorba v mikrometrickém měřítku stále čelí problémům.

3.2 Lipidové vezikuly na čipu

Konstruované lipozomy (fosfolipidové vezikuly) mají podobné membránové složení jako živá buňka, a proto se hojně využívají k napodobení a studii struktury, vlastností a funkcí buňky či biomembrány. Široký vědecký zájem vyvolaly zejména unilamelární vezikuly (lipozomy obsahující jedinou lipidovou dvojrstvu), jelikož se nejvíce podobají přirozeným buněčným membránám. Unilamelární vezikuly jsou podle velikosti rozděleny na malé (SUV, 0,02–0,2 μm), velké (LUV, 0,2–1,0 μm) a obří (GUV, $>1 \mu\text{m}$). GUV mají podobnou velikost jako buňky, dobře definované složení lipidů a mohou být snadno vizualizovány pomocí konvenčních technik fluorescenční mikroskopie. Proto jsou GUV široce používány jako modelové membrány pro studium např. mechanických vlastností membrány, deformací vezikul, membránového transportu a interakcí lipid-lipid a lipid-protein [35, 36, 37].

Jednou ze zaběhlejších technik přípravy monodisperzních GUV na čipu představuje PDMS mikrofluidní zařízení od Takeuchi et al. [33] využívající rychlou metodu „vyfukování vezikul“. Při této metodě jsou lipidové vezikuly „vyfukovány“ z předem vytvořené planární lipidové membrány za pomoci krátkého pulzního proudu.

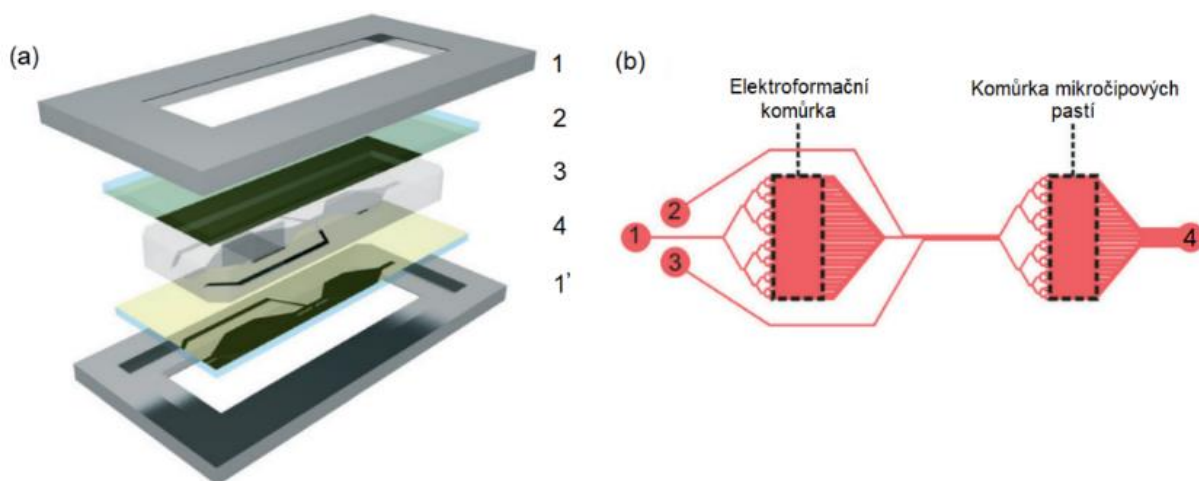


Obrázek 9: (A) Design mikrofluidního čipu sestávajícího z hlavního kanálu s mnoha komůrkami ve stěnách, do kterého jsou postupně napuštěny voda, lipidový olej a voda; (B) voda vytlačuje vzduch přes PDMS; (C) olej spláchne vodu z kanálu a zůstává zadržen v komůrkách; (D) voda vypudí olej z kanálku, ale v každé komůrce zanechá olejový film, ve kterém se fosfolipidy samovolně sestaví do dvou monovrstev na obou rozhraních voda-olej; (E) tekutina v komůrce proudí ven, ohýbá a ztenčuje lipidový film a při kontaktu monovrstev vzniká dvojrstva; (F) pomalý tok směrem ven dále ohýbá dvojrstvu; (G) smykové síly z kontinuálního proudu tekutiny sevrou přední okraj deformované dvojrstvy za vzniku vezikul; (H) systém pro kontinuální tvorbu vezikul integrovaný s opticky generovanou mikrobublinou [33]

Úzký kanálek v jednotlivých komůrkách je navržen tak, aby měl vysoký odpor tekutin, který zabraňuje rychlému bobtnání bubliny a následně zpomaluje tok směrem ven. Tím je dosaženo dostatečně jemné deformace lipidové dvojvrstvy. Původní dvojvrstva zůstává během experimentu nedotčena, a proto z ní lze vygenerovat více vezikul, které mají díky konstantnímu průtoku úzkou distribuci velikostí. Hlavní výhodou této metody je přímé zapouzdření veškerých vypuzených materiálů bez ohledu na jejich velikost, koncentraci nebo chemické vlastnosti.

Nejnovější techniky přípravy GUV na čipu zahrnují např. integrované mikrofluidní zařízení konstruované Patersonem et al. [36]. Tato platforma umožňuje výrobu, manipulaci a vysoce výkonnou analýzu savčích biomimetických vezikul (mGUV; faksimile buněčných membrán in vivo) a byla použita ke zkoumání interakcí lipid-lipid a lipid-protein.

Za pomoci elektroformace byly na čipu vytvořeny fluorescenčně značené mGUV, které byly pomocí laminárního toku umístěny do mikročipových pastí. Při membránové interakci mezi lipidy a pórtvorným antimikrobiálním peptidem (AMP) melitinem docházelo ke spuštění uvolňování fluorescenčních barviv z biomimetických vezikul. Na základě úniku tohoto barviva probíhalo vyhodnocování kombinující fluorescenční mikroskopickou analýzu s přesnou kontrolou expozice membrány rozpuštěným látkám.

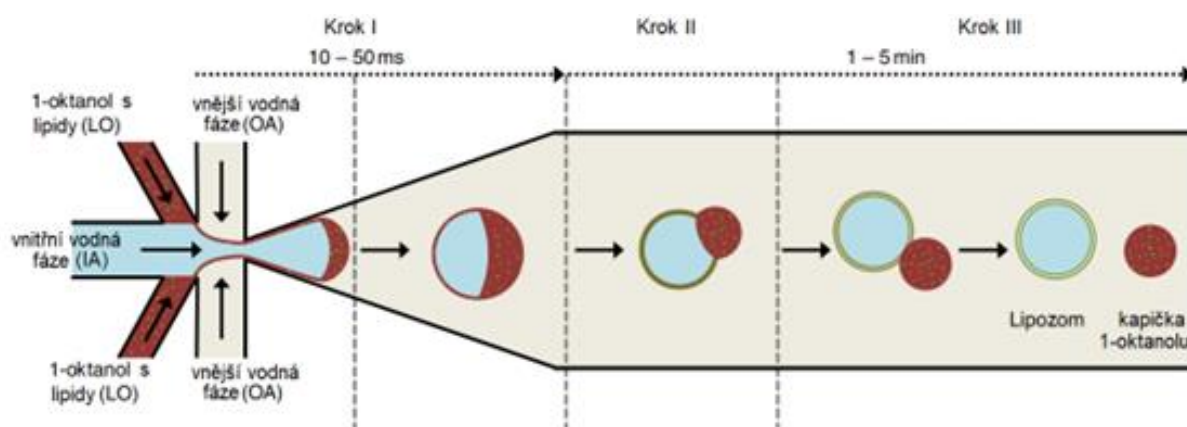


Obrázek 10: (a) 3D diagram mikrofluidního zařízení znázorňující svorku (1), sklíčko potažené lipidem, oxidem india a cínem (ITO) (2), čip z PDMS polymeru (3) a sklíčko potažené ITO (4); (b) design čipu sestávajícího z elektroformační a mikropastičkové analytické komůrky spojené mikrofluidními kanálky (1), promývacího (2) a peptidového (3) kanálku a společného výstupu pro odpad (4). Přerušované čáry na elektroformační komůrce byly za účelem elektroformace z čipu vyříznuty [36]

Tento model mikrofluidního zařízení lze snadno přizpůsobit pro jiné aplikace, např. ke zkoumání in vitro proteinové exprese v mikrokapkách nebo pro lipidové dynamické studie. Nicméně technologie tvorby lipozomů na čipu za pomoci elektroformace má několik nevýhod, jako je nízký výtěžek, variabilita mezi dávkami, nízká účinnost enkapsulace a polydisperzita [37].

Deshpande et al. [38] nedávno vyvinuli mikrofluidní techniku oktanolem asistovaného lipozomového sestavení (OLA) k vytvoření monodisperzních GUV s vynikající účinností

enkapsulace. Tato technika zahrnuje také účinný, autonomní a rychlý mechanismus extrakce rozpouštědlem, díky kterému lze snadno odstranit zbytkové rozpouštědlo v lipozomové dvojvrstvě. Design OLA mikrofluidního zařízení sestával ze vzájemně spojených šesticestných PDMS kanálků: jeden kanálek vnitřní vodné fáze (IA), dva kanálky organické fáze nesoucí fluorescenčně značené lipidy (LO), dva vnější kanálky vodné fáze (OA) a sestupný kanálek. Aby se zabránilo adsorpci lipozomů na povrchu kanálků, bylo zařízení potažené polyvinylalkoholem,



Obrázek 11: Princip tvorby lipozomů na čipu pomocí OLA; krok I: IA fáze a okolní LO fáze jsou pomocí tlakově poháněných průtokových čerpadel hydrodynamicky zaměřeny a následně sevřeny dvěma proudy OA za vzniku kapky dvojité emulze; krok II: podél rozhraní se začíná sestavovat lipidová dvojvrstva, zatímco molekuly 1-oktanolu spolu s přebytkem lipidů se spontánně fázově oddělují za vzniku prominentní kapsy; krok III: 1-oktanolová kapsa obsahující přebytek lipidů se spontánně oddělí ve formě kapičky za vzniku plně sestaveného unilamelárního lipozomu [38]

Technika OLA nabízí všestranné využití pro budoucí analytické nástroje, nanoreaktory, syntetické buňky a potenciální systémy pro dodávání léků a genů. Kromě toho je odolná vůči fyziologickým koncentracím solí a změnám ve složení dvojvrstvy, což z ní činí univerzální a vysoce výkonnou techniku pro tvorbu lipozomů na čipu.

Mezi nejmodernější mikrofluidní zařízení využívající právě OLA techniku patří např. čip umožňující přímo kvantifikovat permeaci léčiva přes biomimetické membrány GUV. Tato platforma integruje kontinuální produkci lipozomů pomocí OLA s kontrolovanou expozicí lipozomů rozpuštěné autofluoreskujícího látky léčiva a fluorescenční analýzou transportu léčiva přes lipidovou membránu [37].

Jako další příklad lze uvést zařízení od Al Nahas et al. [39] pro charakterizaci membránově aktivních antimikrobiálních látek. GUV vytvořené OLA technikou do sebe zapouzdří fluorescenční barvivo a následně jsou zachytávány do pastí, které jsou schopné pojmout až tisíce vezikul. Zde jsou GUV podrobeny antimikrobiální léčbě a analýze metodami fluorescenční mikroskopie.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Název	Čistota	Výrobce	CAS	Šarže
Polydimethylsiloxan, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	–	ELCHEMCo	–	0008885206
Aceton	p. a.	PENTA	67-64-1	PP/2020/08485
Isopropylalkohol	p. a.	Lach:ner	67-63-0	PP/2014/07814
Hydroxid sodný (pecky)	p. a.	PENTA	1310-73-2	1905160514
Kyselina chlorovodíková 35%	p. a.	Lach:ner	7647-01-0	PP/2014/05946
Dihydrogenfosforečnan draselný	p. a.	PENTA	7778-77-0	1805180516
Hydrogenfosforečnan didraselný trihydrát	p. a.	PENTA	16788-57-1	1806290616
Chlorid sodný	p. a.,	PENTA	7647-14-3	2106210616
Chloroform	99,8%	PENTA	67-66-3	2107210716
L- α -Fosfatidylcholin (z vaječného žloutku)	~ 60%	Sigma-Aldrich	8002-43-5	#BCBV3947
Hexadekan	99%	Sigma-Aldrich	544-76-3	SHBG3884V
Rhodamin 6G	99%	Sigma-Aldrich	989-38-8	MKBF7515V

4.2 Přístroje a pomůcky

Předvážky – S-603, Denver Instruments

Ultrazvuková čistička – Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H

Membránová vývěva – KNF Laboport N 86

Sušárna – Durocell BMT MMM-Group

Plasmovací přístroj – CEPLANT RPS50+

Analytické váhy – OHAUS Pioneer

pH metr – SevenEasy METTLER TOLEDO

Magnetická míchačka – ColorSquid IKA

Vortex – MS2 Minishaker IKA

Třepačka – Heidolph Vibramax 100

LED/UV lampa – 48 W/ 60 W, RUSCONA

Digitální stříkačková pumpa – LONGER dLSP 500, Darwin microfluidics

Invertní mikroskop – Olympus IX71

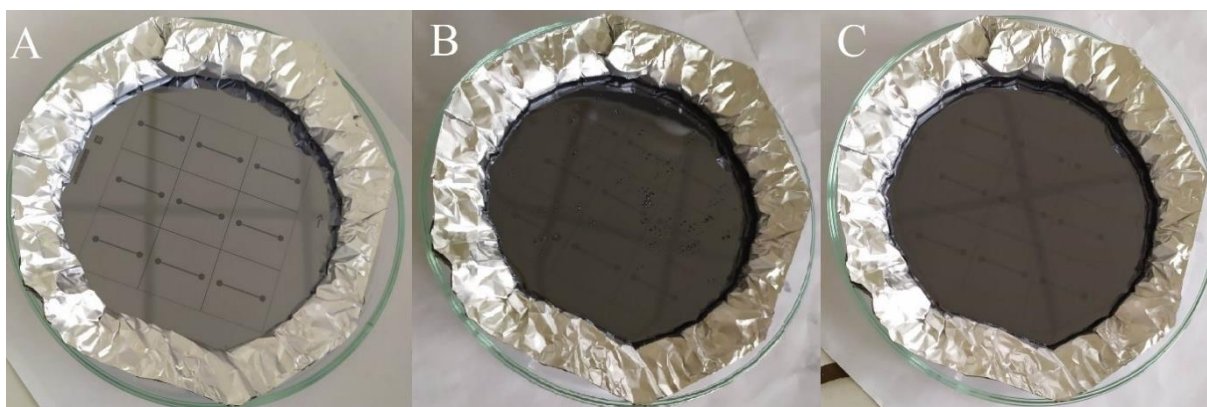
Lampa – X-Cite 120Q

Kamera – Olympus XM10

4.3 Metody

4.3.1 Výroba mikrofluidního čipu

Prvním krokem při výrobě mikrofluidního čipu bylo odlévání PDMS polymeru na křemíkovou masku obsahující strukturu mikrokanálek navrženou v předešlé diplomové práci [9]. Masku byla nejprve opláchnuta deionizovanou vodou a ofoukána do sucha stlačeným vzduchem. Následovalo těsné obalení okrajů masky třemi vrstvami alobalu za účelem zabránění podtečení polymeru. Na předvážkách bylo do kádinek naváženo potřebné množství PDMS a síťovacího činidla v poměru 10:1 g. Síťovací činidlo bylo za intenzivního promíchávání tyčinkou slito s PDMS. Sonifikací pomocí ultrazvukové čističky byla během 10 min odstraněna převážná část bublin ve směsi. Polymer byl nalit na obalenou křemíkovou masku a umístěn do exsikátoru napojeného na membránovou vývěvu, kde za pomoci vzniklého podtlaku došlo k odstranění zbylých bublin.



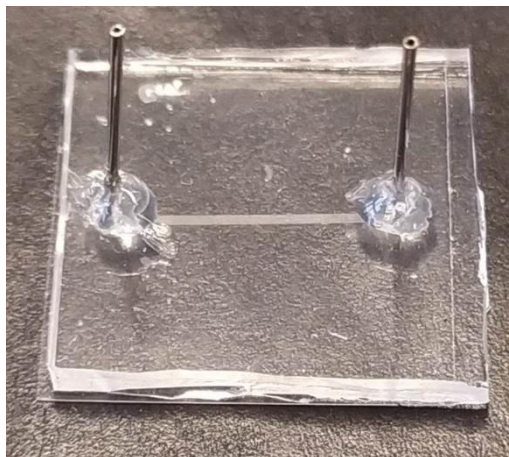
Obrázek 12: (A) Petriho miska s křemíkovou maskou obalenou v alobalu; (B) maska s odlitým PDMS polymerem před odstraněním bublin v exsikátoru; (C) maska s PDMS po odstranění bublin

Maska s tekutým polymerem byla vytvrzena v sušárně při 80°C po dobu 1 h. Po vychladnutí polymeru byl skalpelem vyříznut hlavní čtverec sestávající z 9 čipů, který byl přenesen na čistou Petriho misku omytou acetonem a vyfoukanou stlačeným vzduchem do sucha. Petriho miska byla podložena černým papírem pro lepší viditelnost jednotlivých obrysů. V místech, kde se kanálky spojují dohromady byly jehlou vyvrtány přívodní a vývodní otvory pro konektory o velikosti 0,5 mm. Na konec byly skalpelem vyřezány jednotlivé čipy.

Dalším krokem výroby bylo lepení krycího sklíčka na PDMS. Čipy byly přeneseny do kádinky s isopropylalkoholem a sonifikovány v ultrazvukové čističce po dobu 4 min. Krycí sklíčka byla očištěna v acetonu. Následovalo ošetření plazmou. Na přístroji CEPLANT RPS50+ bylo nastaveno napětí na 10 V, které odpovídalo době plazmování 4,21 s. Čip orientovaný otevřenými kanálky na horní ploše byl položen na držák přístroje a pokryt krycím sklíčkem, aby při nastavování hlavičky plazmy nedošlo k přilepení PDMS k přístroji. Držák s čipem byl zasunut pod hlavičku s plazmou, se kterou se sjelo až na úroveň čipu. Od této nulové hladiny byla nastavena vzdálenost 1,5 mm. Krycí sklíčko bylo z čipu odstraněno, přístroj se zapnul a po ustálení teploty plazmy započalo ošetření. Proces probíhal po dobu 84 s, což odpovídalo projetí držáku s čipem pod plazmovou hlavičkou 20krát tam a zpátky do původní polohy. Ošetřené PDMS bylo vloženo do čisté Petriho misky tak, aby nedošlo k žádnému

kontaktu oplazmované části. Stejným způsobem bylo ošetřeno i krycí sklíčko, které bylo následně svou oplazmovanou částí zešikma opatrně pokládáno na ošetřené PDMS. Po spojení byly vzniklé bubliny opatrně vytlačeny pinzetou. Poloslepené čipy byly vyžháný v sušárně při 150 °C po dobu 30 min a po úplném spojení byly skladovány zakryté v deionizované vodě.

Posledním krokem bylo lepení kovových konektorů do otvorů ve slepených čipech. Konektory byly za pomoci kleští opatrně vloženy do vyřezaných přívodních a vývodních otvorů čipů. Na spoje bylo špejlí naneseo lepidlo Pattex Gel, které se nechalo schnout po dobu 24 h v uzavřené nádobě. Na závěr bylo provedeno 24hodinové máčení v deionizované vodě.



Obrázek 13: Kompletní slepený mikrofluidní čip s konektory

4.3.2 Příprava zásobního roztoku pufru

Do 250 ml odměrné baňky byl připraven zásobní roztok fosfátového pufru (PBS) o koncentraci 10 mmol/l rozpuštěním potřebných navážek chloridu sodného, trihydrátu hydrogenfosforečnanu didraselného a dihydrogenfosforečnanu draselného v deionizované vodě. Přidáním 1 mol/l roztoků hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH na 7,4. Připravený pufr byl řádně uzavřen parafilmem a skladován v lednici při teplotě 8 °C.

4.3.3 Příprava lipidových roztoků asolectinu

Byl připraven zásobní roztok asolectinu v chloroformu o koncentraci 250 g/l navážením a rozpuštěním potřebného množství asolectinu v 1 ml chloroformu. Vialka s roztokem byla zabezpečena parafilmem a uchována v mrazícím boxu při -20 °C.

Následně byl připraven zásobní roztok asolectinu v hexadekanu o koncentraci 10 g/l. Ze zásobního roztoku asolectinu v chloroformu byl odpipetován potřebný objem do nové vialky, chloroform byl odpařen v exsikátoru ve vakuu po dobu 30 min, a nakonec byl asolectin rozpuštěn v 1 ml hexadekanu. Vialka s roztokem byla zabezpečena parafilmem a skladována při pokojové teplotě za stálého protřepávání.

4.3.4 Lepení a napouštění hadičky

Aby se zabránilo tlakovým ztrátám při napouštění roztoků do čipu injekční pumpou, bylo zapotřebí připevnit na těsně hadičku k injekční stříkačce (BD U-100 Insulin 0,5 ml). Slepení bylo provedeno pomocí LED/UV Flex gelu (RUSCONA), který byl špachtlí naneseo po menších vrstvách okolo spoje hadičky se stříkačkou (předem naplněnou ze 3/4 deionizovanou

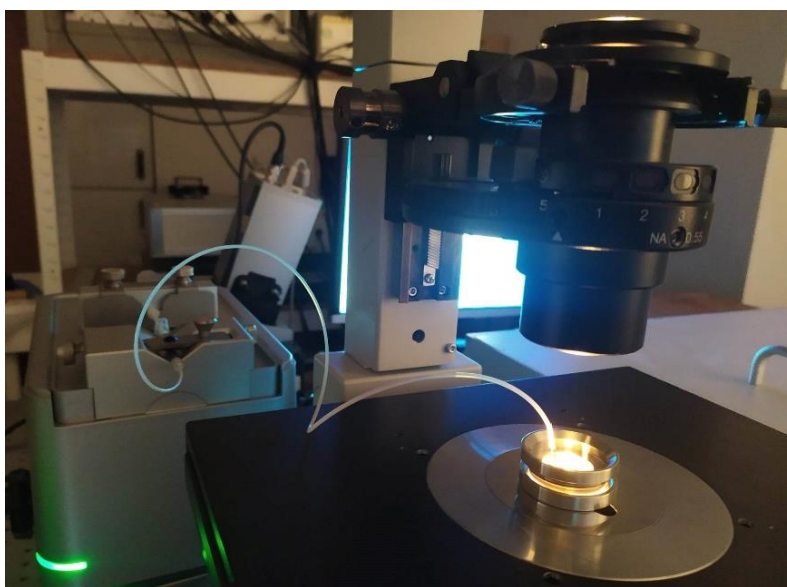
vodou bez bublin) a každá z vrstev byla zvlášť vytvrzena pod LED/UV lampou během 120 s. Do slepené hadičky byly injekční stříkačkou nasávány malé objemy roztoků (do 5 μ l) v pořadí: vodný roztok PBS, fluorescenční sonda (vodný roztok Rhodaminu o koncentraci 10^{-4} mol/l), lipidový roztok asolectinu v hexadekanu a na konec opět vodný roztok PBS. Čip byl vyjmut z deionizované vody, osušen a za pomoci kleští připojen přes vstupní konektor k naplněné hadičce s roztoky.

4.3.5 Ověření tvorby membrán v čipu pod fluorescenčním mikroskopem

Pro tyto účely měření byl zvolen invertní mikroskop Olympus IX71, na kterém byl pomocí metod transmise a fluorescenčního záření pozorován celý průběh modelace membrán ve vnitřní struktuře čipu. Na očištěný objektiv se zvětšením 60x byly Pasteurovou pipetou nakápnuty dvě kapky deionizované vody. Čip se zapojenou hadičkou byl vložen do kovového držáku a umístěn na posuvný stolek tak, aby se jeho kanálky nacházely přímo nad objektivem mikroskopu. Byla nastavena vhodná vzdálenost objektivu od čipu pro zřetelné zobrazení vnitřní struktury kanálků. Na voliči filtrů byla zvolena pozice č. 6, která neobsahuje žádný filtr a používá se pro transmisní zobrazení.

Injekční stříkačka byla upevněna k injekční pumpě, na jejímž displeji byl nastaven objem k vypumpování na 50 μ l a počáteční průtok na 500 nl/min. Po protečení počátečního roztoku PBS všemi kanálky byl průtok snížen na 200 nl/min. Tato rychlost byla experimentálně ověřena jako ideální pro tvorbu fosfolipidových membrán uvnitř čipu. Během procesu modelace membrán na rozhraní kanálek/komůrka byly pořizovány digitální snímky jednoho ze čtyř kanálků za pomoci černobílé kamery Olympus XM10.

Po protečení roztoku Rhodaminu bylo možné pozorovat fluorescenční záření uvnitř kanálků. Pro tuto metodu byla na voliči filtrů zvolena pozice č. 3 pro 470 nm. Čip byl zakryt před parazitickým světlem, byla zapnuta xenonová lampa X-Cite 120Q a nastavena intenzita záření. Pomocí této lampy byly pořizovány digitální snímky kanálků ve stejných polohách jako u transmisního zobrazení.



Obrázek 14: Měření pod fluorescenčním mikroskopem s mikrofluidním čipem napojeným na injekční pumpu

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výroba PDMS čipů

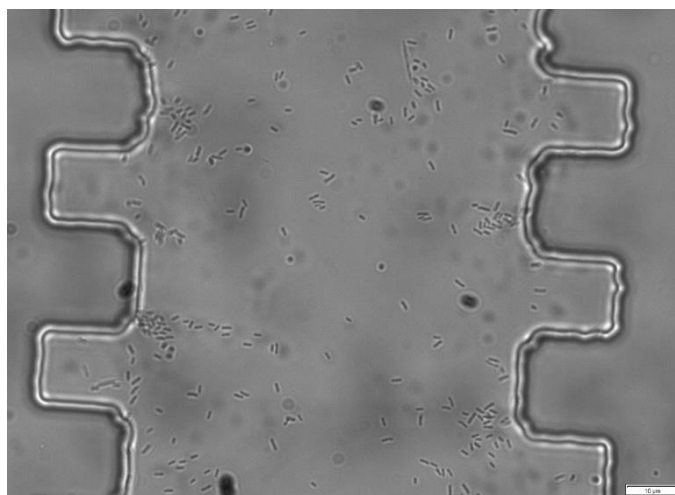
Příprava mikrofluidních čipů z PDMS polymeru probíhala dle pracovního postupu, jehož optimalizací z hlediska pevnosti a vhodnosti čipu pro tvorbu umělých buněčných membrán se zabývala předešlá bakalářská práce. Při sonifikaci bylo výhodné nechat polymer déle v exsikátoru (v rozmezí 0,5 až 1 hod). Dosáhlo se tak efektivnějšího odstranění i okem neviditelných bublin v polymeru, které by byly schopné znehodnotit strukturu mikrokanálek. Křemíkové masky byly hodně náchylné na poškození, po prvním použití již obsahovaly známky opotřebování. Zvýšené opatrnosti se muselo dbát zejména během vyřezávání skalpelem, jinak došlo k vážnému narušení jejich struktury.

Jeden z hlavních problémů představovalo vyvrtávání přívodních a vývodních otvorů pro konektory. Tento krok se standardně prováděl pomocí speciální mikrofluidní děrovačky (WellTech Rapid-Core 0.50), která bohužel zanechávala zbytky vyvrtaného polymeru uvnitř otvorů, a tím je ucpala. Z tohoto důvodu se častokrát stávalo, že značné množství vyrobených čipů bylo nefunkčních. Problém byl vyřešen nahrazením mikrofluidní děrovačky obyčejnou injekční jehlou a stoprocentní propustnost všech otvorů byla zajištěna mírným nadzvednutím polymeru při provrtávání.

Další problémy se objevily při lepení konektorů. Pokud se konektory zasunuly příliš hluboko do polymeru, docházelo opět k ucpání přívodních a vývodních otvorů a napouštění roztoků do čipu nebylo možné. Aby se předešlo zmíněnému ucpání, bylo zapotřebí konektory v polymeru mírně povysunout. Jedinou nevýhodou při lepení konektorů tímto způsobem byla vyšší náchylnost k utržení.

5.1.1 Skladovatelnost slepených čipů

Kompletní slepené čipy, které nebyly po 24hodinovém máčení využity, se nechaly dále skladovat ponořené v deionizované vodě. Při pozorování mikrokanálek pod fluorescenčním mikroskopem bylo zjištěno, že se v čipu skladovaném 3 týdny ve stejné deionizované vodě vytvořily kolonie bakterií.



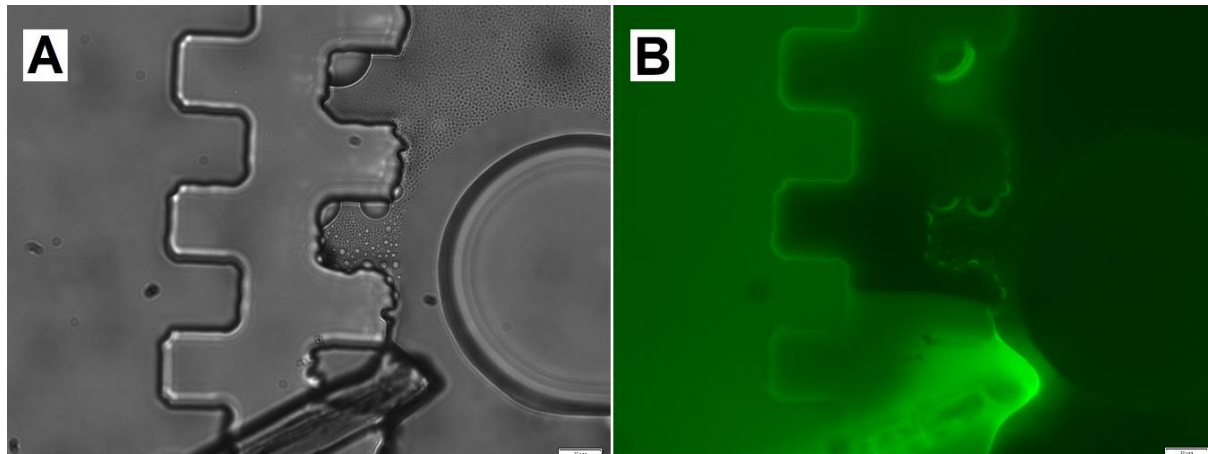
Obrázek 15: Transmisní zobrazení mikrokanálky čipu obsahujícího kolonie bakterií pomocí fluorescenčního mikroskopu při 60x zvětšení; měřítko na snímku má rozměr 10 μm

Uvnitř mikrokanálku znázorněném na obrázku č. 15 lze pozorovat malé pohybující se „útvary,“ které byly identifikovány jako bakterie na základě jejich tyčinkovitého tvaru a autofluorescence při fluorescenčním zobrazení mikroskopu. Nepohyblivé tyčinky představovaly usmrčené bakterie. Většina přítomných bakterií se po napuštění roztoku do čipu vyplavila ven z kanálku, ale některé, převážně usmrčené, zůstaly ulpělé na krycím sklíčku.

Přestože by přítomné bakterie s největší pravděpodobností nijak nenarušily modelaci fosfolipidových membrán v čipu, nelze tuto možnost plně vyloučit. Pro prevenci jejich vzniku je důležité pravidelně měnit deionizovanou vodu a spleené čipy raději moc dlouho neskladovat. Dalším možným řešením by mohla být stabilizace deionizované vody azidem sodným.

5.1.2 Ověření kvality spleených čipů pod fluorescenčním mikroskopem

Přestože byla u odlévání, vyřezávání a lepení snaha o co největší čistotu, práce probíhala v nesterilním prostředí. To mělo za následek kontaminaci vyrobených čipů různými prachovými částicemi, vlákny atd., které zůstaly obsaženy buď přímo na křemíkové masce, nebo na povrchu polymeru a krycího sklíčka. Po spleení polymeru s krycím sklíčkem docházelo v místech nečistot ke vzniku vzduchových kapes, které narušovaly pevnost spleeného čipu. Nicméně většina nečistot neměla žádný negativní dopad na funkčnost čipu kromě těch, které se nacházely v oblasti mikrokanálků. Tyto údaje byly získány na základě provedeného experimentu, kdy se injekční stříkačkou do spleeného čipu opatrně napustil roztok Rhodaminu o koncentraci 10^{-4} mol/l a za pomoci transmisního a fluorescenčního zobrazení byl pod mikroskopem pozorován stav naplněných mikrokanálků.



Obrázek 16: (A) Transmisní zobrazení struktury mikrokanálků spleeného čipu pomocí fluorescenčního mikroskopu při 60x zvětšení; (B) fluorescenční zobrazení v pseudobarvě; měřítko na snímcích má rozměr $10\ \mu\text{m}$

Na mikroskopických snímcích z obrázku č. 14 je uveden extrémní příklad, kdy nečistoty obsažené ve struktuře mikrokanálků závažně narušily funkčnost čipu. Největší problém způsobilo vlákno položené přes dva kanálky, jelikož vytvořilo mezi polymerem a krycím sklíčkem velkou mezeru, a tím umožnilo vtečení roztoku Rhodaminu do mezikanálového prostoru. Na pravé straně snímků lze pozorovat velkou vzduchovou kapsu, která ucpala celý kanálek, a podél okrajů několik malých bublin částečně zaplňujících vnitřní prostory komůrek.

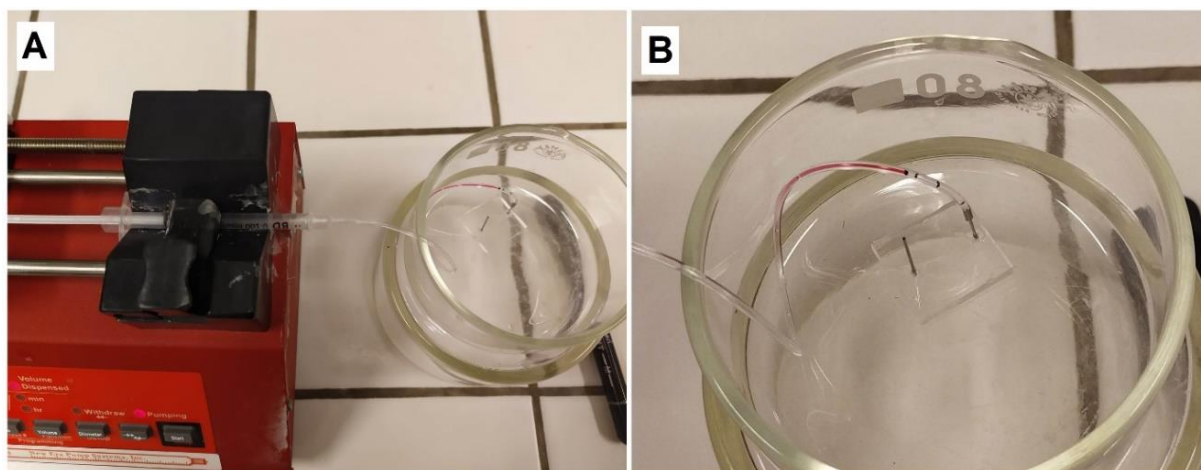
U levého kanálku na snímku B si můžeme mimo jiné všimnout, že na jeho okrajích dochází k mírnému vtažení roztoku Rhodaminu do polymeru.

K takovýmto extrémním případům docházelo jen velmi zřídka, např. pokud polymer spadl na zem nebo nebyl zakrytý v Petriho miskách a delší dobu se na něj prášilo. Většinou docházelo pouze k částečnému ucpání některých komůrek z důvodu přítomnosti malých nečistot. Jejich počet byl však ve srovnání s celkovým množstvím komůrek zanedbatelný.

Pokud se zaměříme na strukturu kanálků u jednotlivých mikroskopických snímků, vidíme, že obsahuje spoustu nerovností, které mají vliv na celkové proudění tekutin uvnitř kanálků a mohou také zásadně ovlivnit tvorbu membrán. Důvodem těchto nerovností jsou nekvalitně vyrobené křemíkové masky.

5.2 Těsnění hadičky při napouštění

První napouštěcí experiment probíhal se starším modelem injekční pumpy (NE-300 SyringePump.com, New Era Pump Systems, Inc.) a spoj mezi injekční stříkačkou a hadičkou byl utěsněn parafilmem. Jako napouštěcí roztok byl zvolen Rhodamin (10^{-4} mol/l), protože je díky svému výraznému zbarvení dobře pozorovatelný uvnitř hadičky i mikrokanálků čipu. V průběhu 5hodinového měření při nastaveném minimálním průtoku pumpy (7 nl/min) nebylo zaznamenáno žádné napouštění. Čip byl pořád prázdný, naopak docházelo ke zpětnému toku roztoku Rhodaminu uvnitř hadičky.



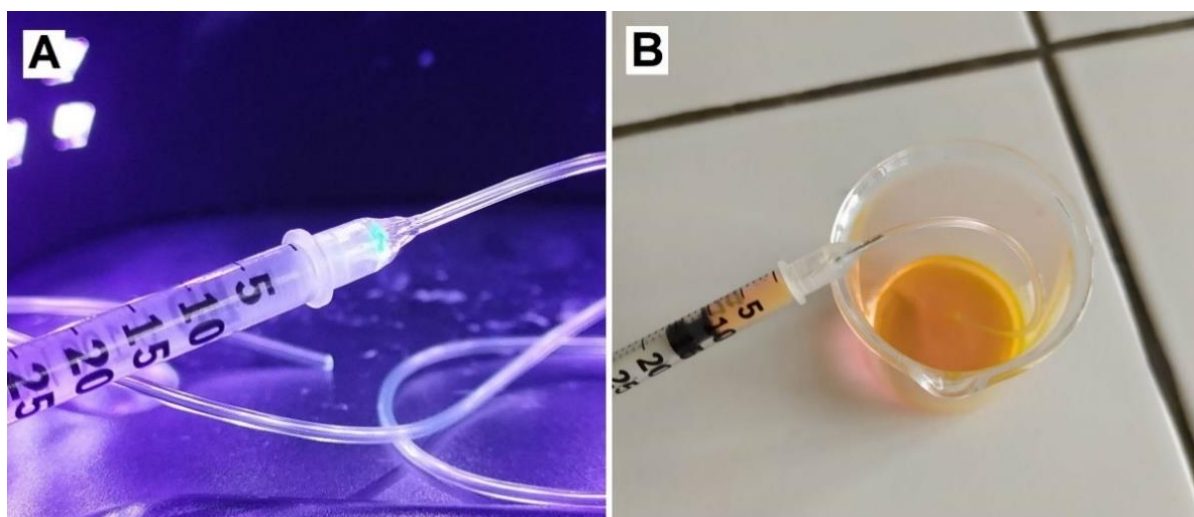
Obrázek 17:(A) Kompletní sestava pro napouštěcí experiment zahrnující injekční pumpu, injekční stříkačku, hadičku naplněnou roztokem Rhodaminu a mikrofluidní čip; (B) detail čipu se zapojenou hadičkou dokazující zpětný tok roztoku Rhodaminu

Při vyšších průtokových rychlostech bylo možné pozorovat prosakování roztoku z hadičky v oblasti parafilmu. Na základě těchto výsledků bylo usouzeno, že zmíněný zpětný tok roztoku Rhodaminu v hadičce s největší pravděpodobností zapříčinily tlakové ztráty vyvolané nedostatečným těsněním mezi injekční stříkačkou a hadičkou. Parafilm byl uznán jako nevyhovující těsnící materiál a bylo třeba navrhnout vhodnou alternativu.

Lepidlo Pattex Gel se jeví jako jedno z možných řešení, jelikož bylo dostupné a spolehlivě pevné (ověřeno při lepení konektorů na čip). Jedinou a poměrně zásadní nevýhodou tohoto

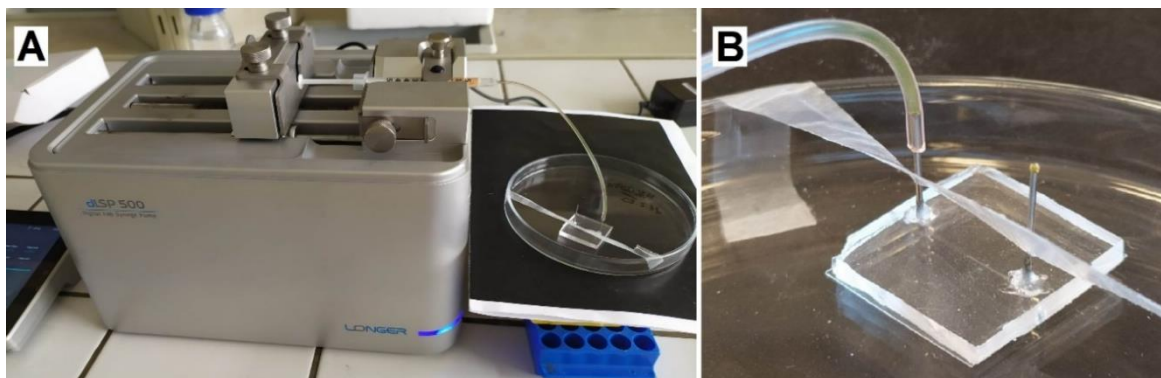
lepidla bylo časově náročné schnutí, kvůli kterému by se muselo čekat 24 h, než by bylo možné hadičku s injekční stříkačkou použít.

Dalším návrhem bylo použití kosmetického LED/UV Flex gelu (RUSCONA), který je schopný pod UV zářením vytvrdnout během několika desítek sekund (záleží na tloušťce vrstvy). Pro tyto účely byla pořízena malá UV baterka, se kterou bylo svíceno na nanesený gel okolo spoje hadičky. Nicméně gel se ani po několika minutovém ozařování nevytvrdil. Z toho vyplývá, že tato lampa neemitovala dostatečně silné UV záření. Následovala zkouška ve větším UV boxu. Bohužel ani UV zářivky s příkonem 20 W nebyly dostačující, gel se podařilo vytvrdit jenom z části, a to za dobu delší než 10 min. Problém s rychlejším a pevnějším těsněním nakonec vyřešila kosmetická LED/UV lampa (RUSCONA) s příkonem 48 W/ 60 W. Hadičku se stříkačkou se za pomoci této lampy podařilo slepit během 1–2 min, přestože byl gel nanesen ve větší vrstvě. Spoj se zdál být pevný, k žádnému stékání gelu nedocházelo. Těsnění spoje s vytvrzeným gelem bylo nejprve otestováno při napouštění a vypouštění roztoku Rhodaminu do/z injekční stříkačky. V obou případech roztok Rhodaminu spojením nevytékal.



Obrázek 18: (A) Vytvrzování naneseného gelu mezi spojem injekční stříkačky a hadičky pod LED/UV lampou; (B) těsnící experiment s roztokem Rhodaminu

Další těsnící experiment zahrnoval napouštění roztoku Rhodaminu do čipu. Tentokrát byla již k dispozici nová modernější injekční pumpa (LONGER dLSP 500, Darwin microfluidics), která umožňovala mnohem lepší řízení průtoku. Experiment byl úspěšný, při nastaveném průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ se do 10 min objevila na konci výstupního konektoru čipu zvětšující se kapka roztoku Rhodaminu. Uvnitř hadičky nedocházelo k žádnému zpětnému toku, nebyly zde přítomny ani žádné bubliny a kolem těsnění nikde roztok nevytékal. Mikrofluidní čip se tedy podařilo napustit a těsnění gelu bylo v pořádku.

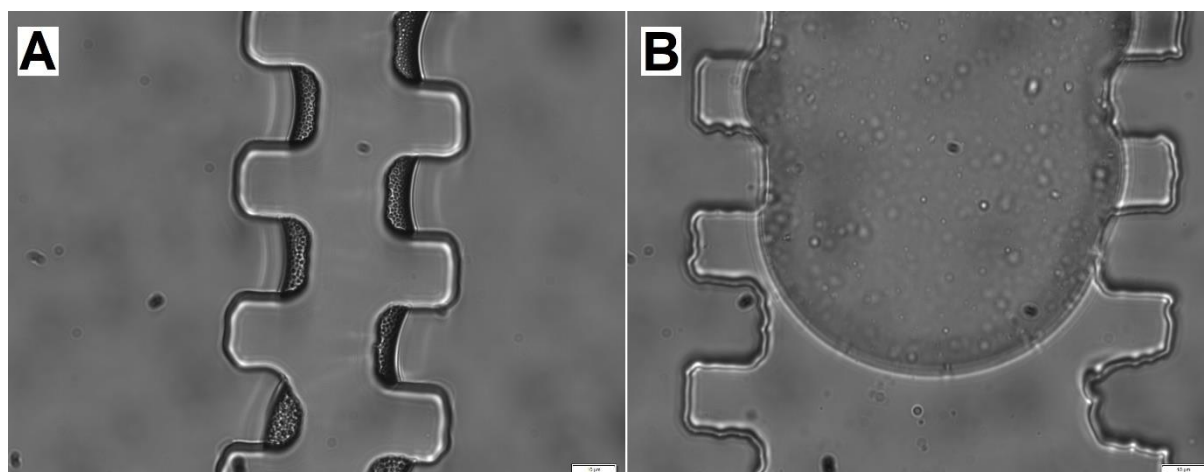


Obrázek 19: (A) Napouštěcí experiment s novou injekční pumpou; (B) detail protečeného čipu s viditelnou kapkou roztoku Rhodaminu na konci vývodního konektoru

Přestože se lepení UV/LED gelem osvědčilo, stále se v krajních případech stávalo, že roztok těsněním protékal a docházelo opět ke zpětnému toku v hadičce. Záleželo na zručnosti, pokud se při vytvrzování pod UV/LED lampou s hadičkou příliš hýbalo, vytvořila se mezi gelem a spojem netěsnící mezera.

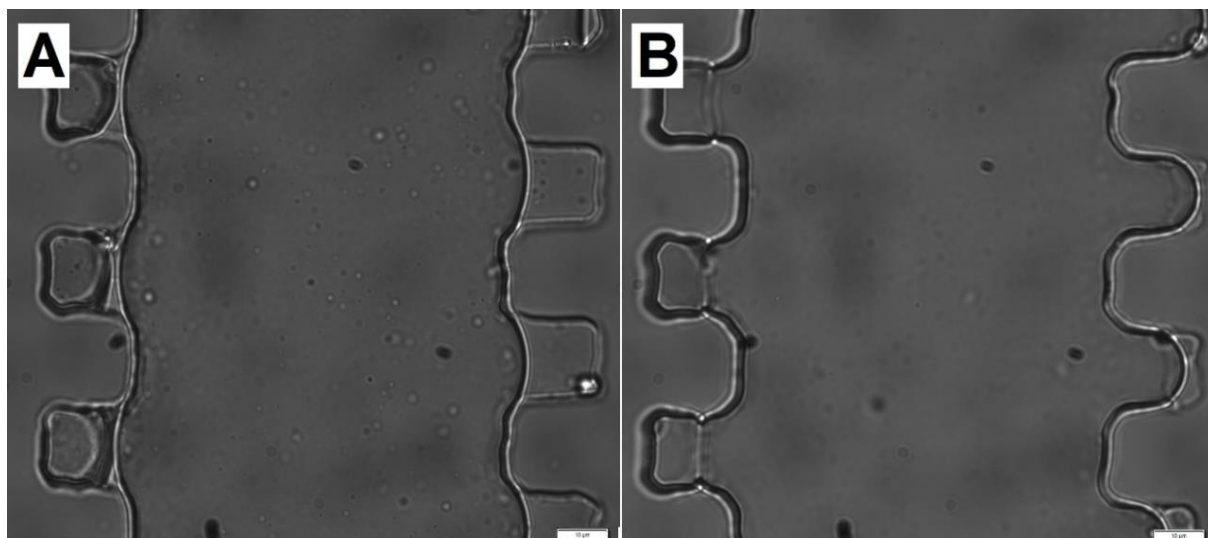
5.3 Modelování membrán v čipu pod fluorescenčním mikroskopem

Během několika předešlých experimentů bylo zjištěno, že průtoky vyšší než 200 nl/min nejsou dostatečně pomalé pro přeskupení fosfolipidů do planární lipidové dvojvrstvy mezi dvěma vodnými prostředími. Kvůli snaze dosáhnout konstantního průtoku, který by stabilizoval průběh modelace membrán, byl již od počátku měření nastaven průtok na 200 nl/min. Bohužel se ani po 20 min nepodařilo napustit roztok fosfátového pufru do čipu. Aby experiment netrval spoustu hodin, byl průtok zvýšen na 500 nl/min. Při této rychlosti bylo do 15 min vyzorováno natečení roztoku PBS do mikrokanálek čipu. Přibližně po 1 h intenzivního napouštění se v kanálcích objevil naprosto odlišný roztok plný malých částecek a bublinek, který při kontaktu s roztokem PBS vytvořil pozorovatelné rozhraní. Na základě této charakteristiky bylo usouzeno, že se jedná o lipidový roztok asolectinu v hexadekanu.



Obrázek 20: (A) Transmisní zobrazení mikrokanálek čipu plněných se roztokem PBS, prázdné kanálky mají díky máčení v deionizované vodě kapkovitou strukturu připomínající srst geparda; (B) Transmisní zobrazení mikrokanálku s roztokem PBS, do kterého postupně natéká lipidový roztok, PBS zůstává uzavřené v komůrkách; měřítko na snímcích má rozměr 10 µm

Průtok byl okamžitě snížen na 200 nl/min, aby se co nejdříve vytvořily v kanálcích vhodné rychlostní podmínky, a zvýšila se tak šance na vznik membrán. V průběhu následných 15 min natekl do kanálek vodný roztok Rhodaminu a bylo možné pozorovat vznik membrán.

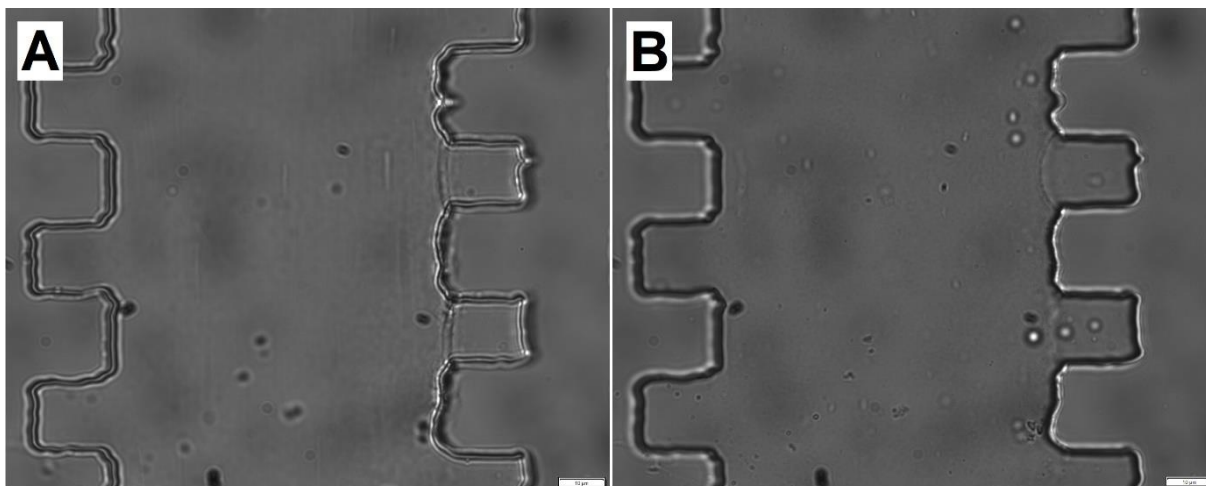


Obrázek 21: Transmisní zobrazení postupného vzniku lipidových membrán v mikrokanálku čipu; měřítko na snímcích má rozměr 10 µm

Na snímku A lze pozorovat proudění roztoku Rhodaminu uvnitř mikrokanálku. Z komůrek na pravé straně kanálku byl roztok PBS vyplaven, a proto obsahovaly pouze roztok lipidový. Naproti tomu u komůrek na levé straně kanálku se roztok PBS nevyplavil a zůstal obklopený roztokem hexadekanu, ve kterém se fosfolipidy spontánně uspořádaly do dvou monovrstev na obou vodných rozhraních. Tímto způsobem se postupně tvořil fosfolipidový film. Snímek B znázorňuje finální fosfolipidové dvouvrstvy, jedna z nich však okamžitě zanikla. Zbylé dvě membrány zůstaly stabilní po dobu 1–2 min, poté se v kanálku samovolně vytvořil extrémně zrychlený proud, který způsobil úplné vyplavení většiny komůrek včetně těch s membránami.

Kvůli velmi krátké stabilitě membrán nebyly pořízeny snímky při fluorescenčním zobrazení, které by potvrdily přítomnost roztoku Rhodaminu uvnitř kanálku. Navíc tato metoda není jasně definovaná a efektivně porovnatelná, jelikož na použitý design čipu neexistuje mnoho literárních podkladů. Proto nelze s naprostou jistotou říci, zda se skutečně jednalo o lipidové membrány. Ovšem na základě doby jejich vzniku (když známe umístění hexadekanu v hadičce), přesvědčivého vzhledu lipidového roztoku a samotného průběhu modelace je tato pravděpodobnost poměrně vysoká.

Modelaci membrán v čipu se podařilo zopakovat pouze jednou. Tentokrát byl již od začátku měření nastaven průtok na 500 nl/min. Roztok PBS natekl do čipu okamžitě, protože při nasazování injekční stříkačky na injekční pumpu se omylem pohnulo s pístem. Tato chyba naštěstí nezpůsobila žádné škody, nicméně při prudce zvýšeném tlaku v hadičce by mohlo dojít k narušení spoje mezi polymerem a krycím sklíčkem a napouštěný roztok by natekl mimo mikrokanálky. Přibližně po 1 h se v kanálcích čipu objevil roztok hexadekanu. Po protečení roztoku Rhodaminu se podařilo vytvořit několik fosfolipidových membrán.



Obrázek 22: Transmisní zobrazení vzniklých lipidových membrán v mikrokanálku čipu; měřítko na snímcích má rozměr 10 μm

Na obrázku č. 22 jsou na pravé straně mikrokanálků viditelné membrány, které bohužel zanikly během několika sekund. Důvodem jejich zániku byla obrovská vzduchová bublina v roztoku, která narušila jedno z vodných rozhraní membrán a následně svou silou vytlačila veškerý kapalný obsah z kanálku. Pohybující se malé bubliny přítomné na snímku A dokazují laminární proudění uvnitř kanálku.

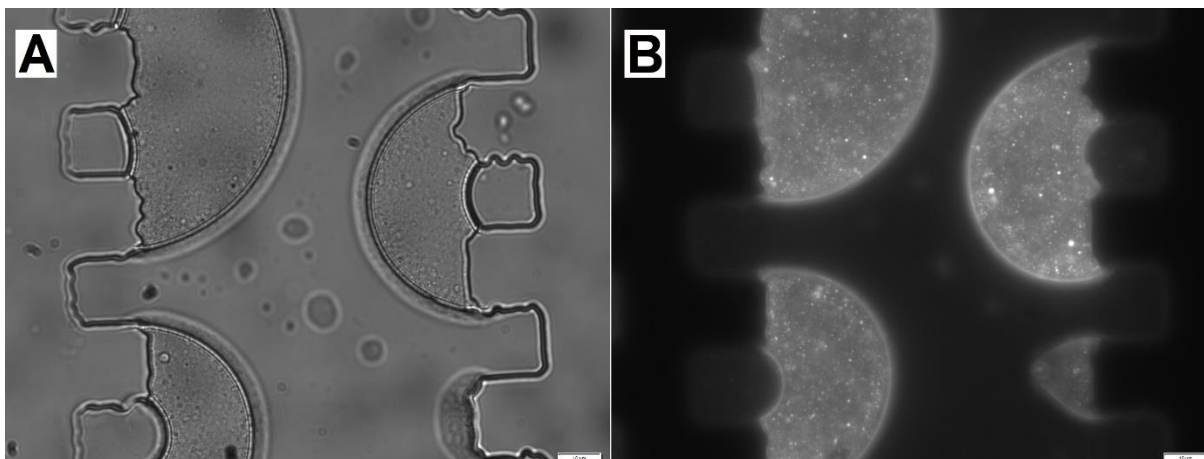
Stanovení přesného počtu vzniklých membrán je těžko dosažitelné, protože při tak krátké stabilitě membrán není možné prozkoumat celý kanálek natož všechny čtyři. Kromě toho do každého z kanálků proudily jednotlivé roztoky v odlišných časových intervalech, proto bylo nejvýhodnější zaměřit se pouze na jeden kanálek.

5.4 Stávající komplikace během měření

Z poznatků uvedených v kapitole 5.3 vyplývá, že tato metoda modelace membrán v čipu čelí hned několika hlavním problémům. Patří mezi ně velmi nízký počet vzniklých membrán (bereme-li v potaz, že se v čipu nachází více než 100 komůrek), jejich stabilita a zejména opakovatelnost samotného experimentu.

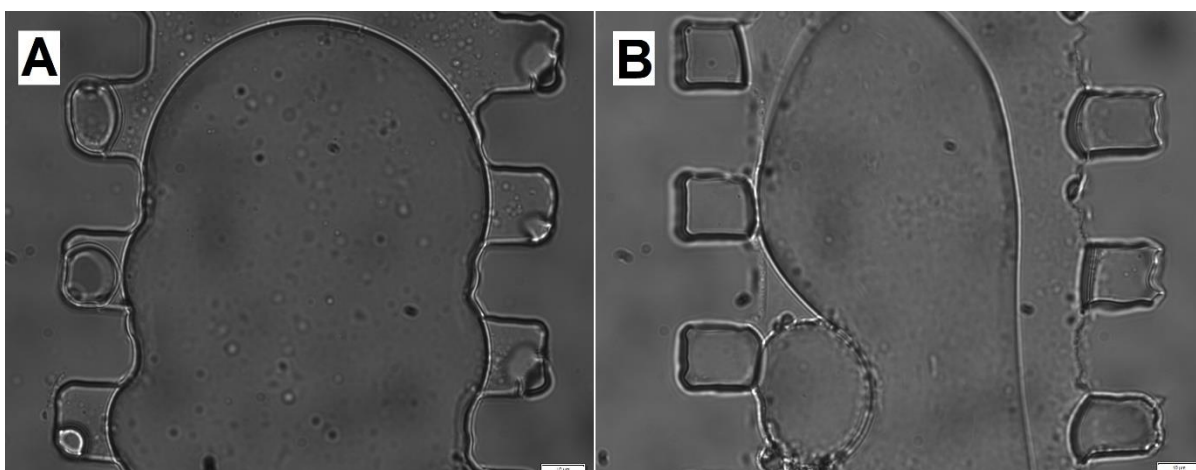
K příčinám výše zmíněných komplikací docházelo převážně během napouštění roztoků do hadičky, kdy bylo velmi důležité nabírat opravdu minimální objemy roztoků, jinak experiment trval spoustu hodin. Mnohokrát se stávalo, že se kanálky z velkého množství protečeného PBS ucpaly nebo poškodily dříve, než stihl do čipu dotéct roztok hexadekanu.

Samotný roztok hexadekanu způsoboval řadu potíží kvůli své vysoké viskozitě a nižší hustotě vůči vodě. Snižoval reálný průtok v hadičce a v podobě kapek se velice často promíchal s roztokem Rhodaminu. Výjimečně se stávalo, že se s roztokem Rhodaminu v hadičce plně prohodil a do čipu natekl až jako předposlední v pořadí.



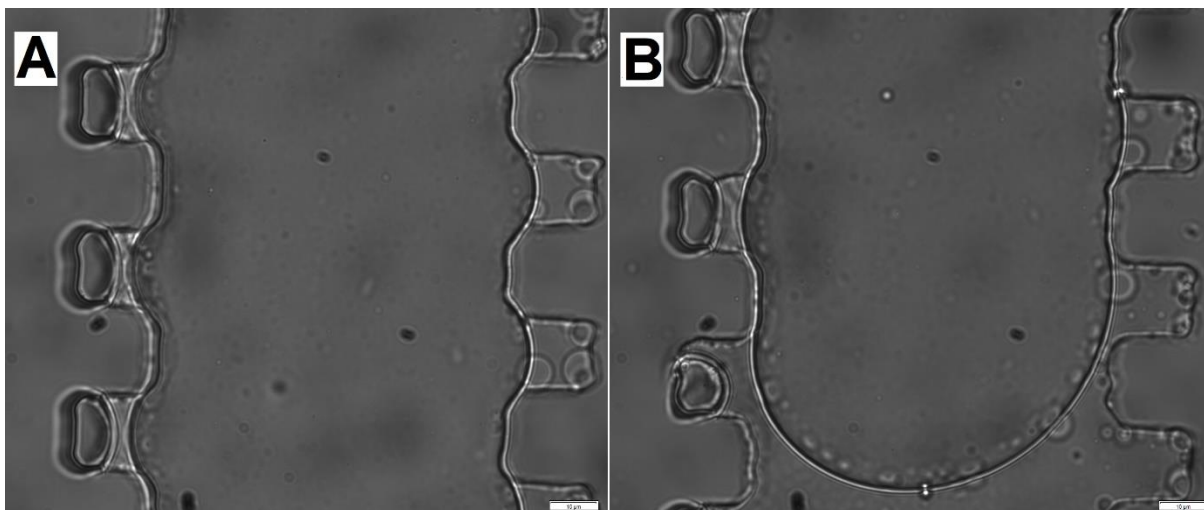
Obrázek 23: (A) Transmisní zobrazení mikrokanálku čipu naplněného roztokem hexadekanu smíšeného s bublinami roztoku Rhodaminu; (B) fluorescenční zobrazení; měřítko na snímcích má rozměr 10 μm

Další problémy související s napouštěním představovaly velké vzduchové bubliny, které se v hadičce tvořily při neopatrné manipulaci s pístem injekční stříkačky, během střídání napouštěných roztoků (nabrané roztoky měli tendenci tvořit vzduchové mezery na konci hadičky) a po nasazení hadičky na konektor. Velikost vznikající bubliny při nasazování na konektor bylo možné značně eliminovat, pokud se hadička zaškrtila kleštěmi co nejbližší ke svému okraji. Velké bubliny způsobovaly uvnitř kanálků nekontrolovatelně proměnlivý průtok, vyplavování roztoků a úplné zničení membrán z důvodu silného tlaku působícího na jednu stranu fosfolipidové dvouvrstvy.



Obrázek 24: Transmisní zobrazení mikrokanálku čipu obsahujícího velké a malé vzduchové bubliny; měřítko na snímcích má rozměr 10 μm

Při střídavém proudění roztoků a bublin uvnitř kanálků docházelo v některých případech ke vzniku „nepravých membrán“. Jednalo se pouze o kapky chycené mezi stěnami komůrek a vzduchem, ale měly velmi podobný vzhled jako skutečné membrány. Rozlišit je bylo možné na základě jejich tloušťky, která se místo smršťování postupně zvětšovala, až nakonec zaplnila celou komůrku. Pokud by se skutečně jednalo o membrány, vodný roztok nacházející se uvnitř komůrky by nebylo možné stoprocentně stlačit.



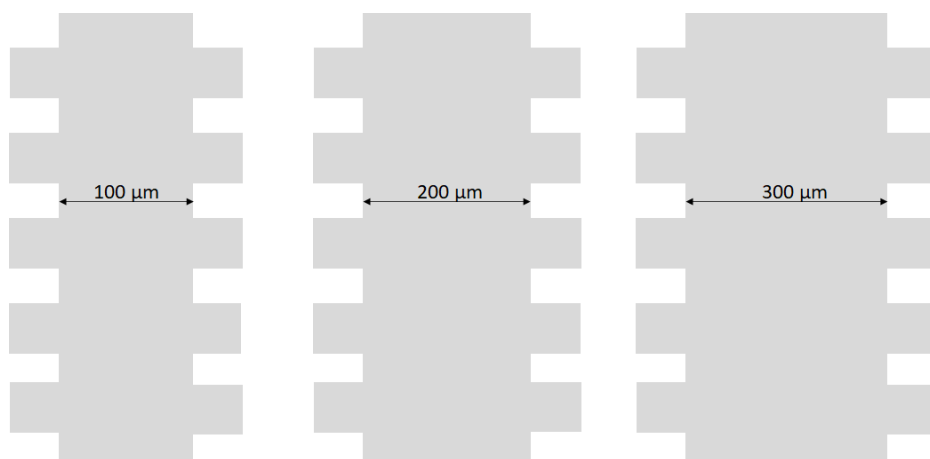
Obrázek 25: Transmisní zobrazení „nepravých membrán“ nacházejících se uvnitř mikrokanáleků čipu; měřítko na snímcích má rozměr 10 µm

Na spodní levé straně snímku B lze zřetelně pozorovat rozpínající se kapku, která postupně vytlačuje vzduch uvnitř komůrky, a tím dokazuje nepravost vzniklých membrán.

V poslední řadě je třeba zmínit problémy týkající se průtoků, které mají též negativní dopad na úspěšnost modelování membrán. Jelikož je tato metoda stále hodně experimentální, použité průtokové rychlosti nejsou plně optimalizované, včetně jejich změn v závislosti na čase a druhu protékajícího roztoku v kanálcích. Příčinou některých neúspěšných experimentů bylo pouze pozdní snížení průtoku, kdy se hexadekan nestihl včas zpomalit a tvořící se membrány po vzájemném styku dvou monovrstev okamžitě zanikly z důvodu silného proudu v kanálku. Častějším případem byly zpětné, střídavě zpětné nebo zrychlené toky, které v kanálcích vznikaly z vícero důvodů. Jedním z nich bylo ucpání kanálku, ke kterému docházelo např. během samotné výroby čipu (viz kapitola 5.1) nebo kvůli mikronečistotám v napouštěných roztocích hromadících se na konci vývodního otvoru. Kromě vzduchových bublin a uvolněných spojů mezi konektorem nebo hadičkou byla dalším důvodem také složitost designu čipu. Zatímco prostřední dva kanálky umožňovaly přímý směr toku, postranní kanálky byly od vstupního konektoru zakřivené. Tok do zakřivených kanálek byl pro kapaliny nepřírozený a vyžadoval rozdílně velký tlak. Tyto tlakové rozdíly uvnitř kanálek poté vyvolávaly nekonstantní průtok.

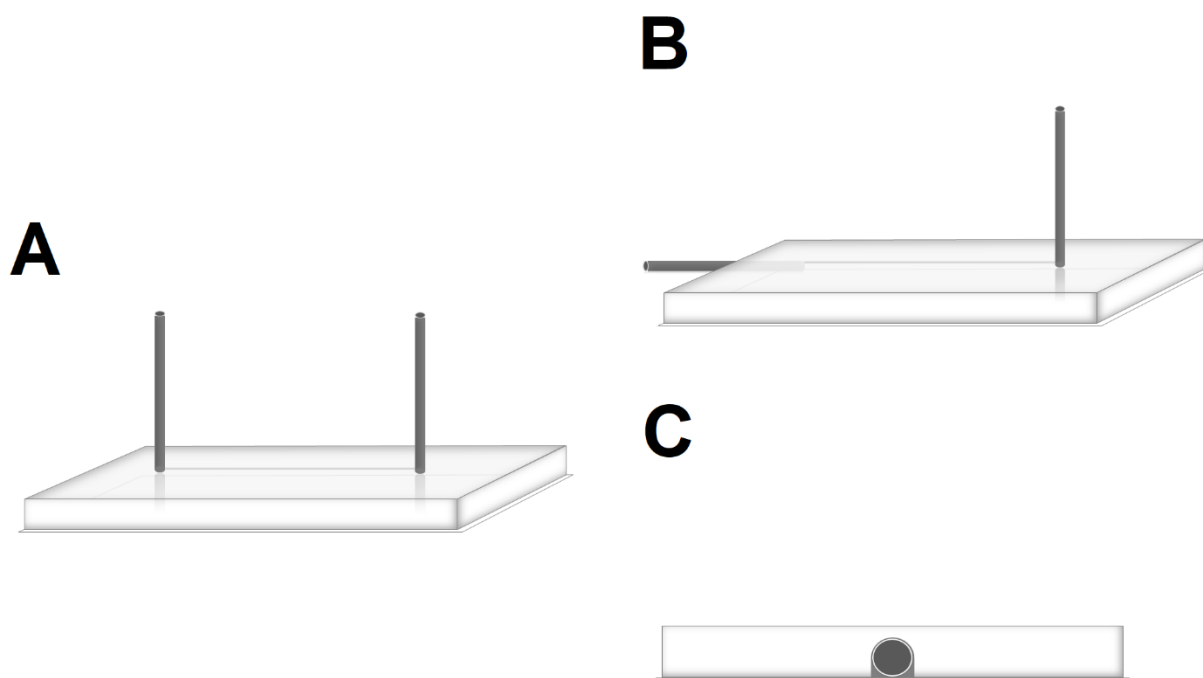
5.5 Řešení problémů

Jedním z možných řešení problémů objasněných v kapitole 5.4 je nový model mikrofluidního čipu. Takovýto čip by místo čtyř kanálek obsahoval pouze jeden, čímž by se značně zjednodušil průtok roztoků a omezil vznik tlakových rozdílů. Zatímco původní kanálky měly rozměry na šířku 70 µm, nový kanálek by byl široký 100, 200 nebo 300 µm (nejvhodnější velikost by bylo třeba otestovat). Širší kanálek by nejen umožnil použití vyšších průtokových rychlostí, ale také by částečně vyřešil problém týkající se větších objemů roztoků v hadičce.



Obrázek 26: Design různě širokých kanálků pro nový model mikrofluidního čipu

Dalším vylepšením by byla planární poloha vstupního konektoru vůči kanálku. Polymer by obsahoval vylisovaný žlábek o definované velikosti, do kterého by se během lepení ke krycímu sklíčku umístil konektor. Těsnění spoje mezi konektorem, polymerem a krycím sklíčkem by sice nebylo stoprocentní, nicméně tento fakt by neměl nijak ohrozit napouštění roztoků. Kapaliny by vstupovaly do čipu ve stejném směru, jako jsou pumpovány, čímž by se snížilo riziko vzniku turbulencí při jejich změně směru. Připojení konektoru k čipu tímto způsobem by navíc mohlo zamezit častému ucpání vstupního otvoru.



Obrázek 27: (A) původní model mikrofluidního čipu; (B) nový model mikrofluidního čipu; (C) detail spoje mezi položeným konektorem, polymerem a krycím sklíčkem

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo osvojit si techniku přípravy mikrofluidních čipů a následně v nich vytvořit modelové membrány z vybraného fosfolipidu. Rešerše vypracovaná dle zadání se zaměřovala na mikrofluidní čipy umožňující modelaci planárních membrán i lipozomů. V rámci této rešerše byl poskytnut přehled možných designů a aplikací od zaběhlejších až po nejmodernější zařízení a byly blíže specifikovány některé techniky tvorby membrán. Jako modelový fosfolipid byl zvolen asolectin. Hlavní výhodou této látky byla její vysoká dostupnost, nicméně komplexita a nižší čistota obsažených fosfolipidů představovaly výzvu při modelaci membrán v mikrofluidním čipu.

Experimentální část se potýkala s řadou komplikací, ať už v rámci výroby čipu, napouštění roztoků nebo samotné modelace membrán uvnitř kanálků (viz kapitola 5), většinu se však podařilo úspěšně vyřešit. Při vyvrtávání otvorů pro konektory byla použita obyčejná injekční jehla a během lepení byly konektory z polymeru mírně povysunuty. Tím byla dosažena stoprocentní propustnost obou otvorů v čipu. Pro prevenci vzniku bakterií uvnitř kanálků skladovaných čipů byla podstatná pravidelná obměna deionizované vody. Možným řešením by dále mohla být stabilizace této vody azidem sodným. Kvůli nesterilním podmínkám prostředí nebylo možné zcela zamezit kontaminaci čipů v průběhu výroby, nicméně většina nečistot neměla žádný negativní dopad na funkčnost čipu. Jako těsnící pojivo se osvědčil LED/UV Flex gel, který za pomoci LED/UV lampy umožnil rychlé (1–2 min) a pevné slepení hadičky k injekční stříkačce. Při průtoku 500 nl/min bylo do 15 min dosaženo natečení roztoku PBS do kanálků čipu. Lipidový roztok asolectinu v hexadekanu se v kanálcích objevil přibližně po 1 h intenzivního napouštění. Průtok byl okamžitě snížen na 200 nl/min. V průběhu následných 15 min natekl do čipu vodný roztok Rhodaminu a bylo možné pozorovat vznik membrán.

Na základě těchto výsledků lze potvrdit vhodnost asolectinu pro modelaci membrán. Jeho možný vliv na stabilitu membrán však nebyl experimentálně ověřen, a proto ho nelze zcela vyloučit. Metoda modelace membrán stále čelí problémům, jako jsou opakovatelnost experimentu, krátká stabilita a nízký počet vytvořených membrán.

Řešením těchto problémů by mohl být nový model mikrofluidního čipu, který by obsahoval pouze jeden kanálek o širší velikosti a planárně orientovaný vstupní konektor. Snížení počtu kanálků by značně zjednodušilo průtok roztoků a zmenšilo riziko tlakových rozdílů. Širší rozměr kanálku by také poskytl použití vyšších průtokových rychlostí a větších objemů roztoků. Vstupní konektor by se do čipu umístil již během lepení ke krycímu sklíčku, což by mohlo zabránit častému ucpání vstupního otvoru. Planární poloha tohoto konektoru vůči kanálku by navíc umožňovala roztokům vstupovat do čipu ve stejném směru, jako jsou pumpovány, a tím opět zamezit komplikace souvisejícím s průtokem.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Microfluidics: A general overview of microfluidics* [online]. Elveflow. 29 August 2019 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/a-general-overview-of-microfluidics/>
- [2] MATHUR, Ashish a Souradeep ROY. Microfluidics and lab-on-a-chip. In: *Electrochemical Sensors* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 261-287 [cit. 2023-03-07]. ISBN 9780128231487. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823148-7.00010-6
- [3] *Microfluidics and microfluidic devices: a review* [online]. Elveflow. 28 January 2020 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/generalmicrofluidics/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/>
- [4] RAPP, Bastian E. Introduction. In: *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 3-7 [cit. 2023-03-07]. ISBN 9781455731411. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-3141-1.50001-0
- [5] *What is Laminar Flow?* [online]. SIMSCALE. [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.simscale.com/docs/simwiki/cfd-computational-fluid-dynamics/what-is-laminar-flow/>
- [6] *Laminar flow* [online]. Britannica. [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.simscale.com/docs/simwiki/cfd-computational-fluid-dynamics/what-is-laminar-flow/>
- [7] TESAŘ, Václav. *Mikrofluidika*. Automa: odborný časopis pro automatizační techniku. Praha, 1994, 2008(10), 6-9. ISSN 1210-9592.
- [8] HOLMES, Douglas P. *Confined Fluid Flow: Microfluidics and Capillarity* [online]. Sapienza, Università di Roma, 2015 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: http://www.bu.edu/moss/files/2015/08/Sapienza2015_Microfluidics.pdf. Short Course. Boston University.
- [9] VARGOVÁ, A. *Pokročilé membránové systémy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..
- [10] PLEČIS, A., G. VELVÉ CASQUILLAS a F. BERTHOLLE. *Flow control in microfluidic devices* [online]. Elveflow. [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic/Flow%20control%20in%20microfluidic%20devices.pdf>

- [11] KIM, Chang-Jin, Carlos H. MASTRANGELO a Holger BECKER. *Microfluidics using the surface tension force in microscale* [online]. In: *Microfluidic Devices and Systems III*. 2000-8-18, s. 18-24 [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: doi:10.1117/12.395667
- [12] WANG, Shuli, Tieqiang WANG, Peng GE, et al. *Controlling Flow Behavior of Water in Microfluidics with a Chemically Patterned Anisotropic Wetting Surface* [online]. *Langmuir*. 2015, **31**(13), 4032-4039 [cit. 2023-03-07]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.5b00328
- [13] YU BORMASHENKO, Edward. *Wetting of Real Surfaces: Studies in Mathematical Physics*. Berlin: de Gruyter, 2013. ISBN 978-3110258530.
- [14] BERTHIER, Jean a Pascal SILBERZAN. *Microfluidics for Biotechnology*. Second Edition. Boston: Artech House, 2010. ISBN 978-1-59693-443-6.
- [15] ZHAO, Bin, Jeffrey S. MOORE a David J. BEEBE. *Surface-Directed Liquid Flow inside Microchannels* [online]. *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2001, **291**(5506), 1023-1026 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/3082289>
- [16] TADMOR, Rafael. *Marangoni flow revisited* [online]. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009, **332**(2), 451-454 [cit. 2023-03-07]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2008.12.047
- [17] SLÍPKA, Jaroslav a Zbyněk TONAR. *Základy histologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2018. ISBN 978-80-246-3934-5.
- [18] Cell Membranes. In: *Goodman's Medical Cell Biology* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 25-56 [cit. 2023-03-18]. ISBN 9780128179277. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817927-7.00002-8
- [19] LODISH, Harvey, Arnold BERK, Paul PAUL MATSUDAIRA, Chris A. KAISER, Monty KRIEGER, Matthew P. SCOTT, Lawrence ZIPURSKY a James DARNELL. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2004. ISBN 978-0716743668.
- [20] *Active transport* [online]. Khan Academy. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-structure-and-function/facilitated-diffusion/a/active-transport>
- [21] Cell Membrane: Structure, Composition, and Functions: What is a Cell Membrane. In: *ScienceFacts.net* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.sciencefacts.net/cell-membrane.html>

- [22] *Transport of substances across cell membranes*. In: *Deranged Physiology* [online]. [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: <https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/cellular-physiology/Chapter%20112/transport-substances-across-cell-membranes>
- [23] *Soy PC (95%)* [online]. Avanti Polar Lipids. [cit. 2020-12-26]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/441601>
- [24] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [25] *Phosphatidylethanolamine, PE (soya)*. In: Larodan: Research Grade Lipids [online]. [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: <https://www.larodan.com/product/phosphatidylethanolamine-pe-soya/>
- [26] *Phosphatidylinositol, PI (plant) Na salt*. In: Larodan: Research Grade Lipids [online]. [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: <https://www.larodan.com/product/phosphatidylinositol-pi-plant-nh4-salt/>
- [27] NAVRÁTIL, Tomáš, Ivana ŠESTÁKOVÁ a Vladimír MAREČEK. Supported Phospholipid Membranes Formation at a Gel Electrode and Transport of Divalent Cations across them. *International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE* [online]. 2011, 1 December 2011, **6**, 6032-6046 [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol6/6126032.pdf>
- [28] JOHNS, Ashley, Steven MORRIS, Kyle EDWARDS a Rafael Lopes QUIRINO. Asolectin from soybeans as a natural compatibilizer for cellulose-reinforced biocomposites from tung oil. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, **132**(17) [cit. 2023-03-24]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41833
- [29] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. *Medicínská biofyzika*. 1. vydání. Praha: Grada, 2005. Kapitola 5.3.1 Mikroskopické metody. s. 241-251. ISBN 978-80-247-1152-2.
- [30] SCHÄDLER, Kevin. An Introduction to the Light Microscope, Light Microscopy Techniques and Applications. *Technology Networks: Analysis & Separations* [online]. September 2, 2021 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/an-introduction-to-the-light-microscope-light-microscopy-techniques-and-applications-351924#D1>
- [31] 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.

- [32] Fyzikální vlastnosti světla: Jablonského diagram. In: *Quizlet* [online]. [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://quizlet.com/186614442/1-fyzikalni-vlastnosti-svetla-flash-cards/>
- [33] TAKEUCHI, Shoji. Formation of Planar Lipid Bilayer Membranes and Vesicles using Microfluidic Technology. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 87-100 [cit. 2023-04-11]. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. ISBN 9780123810137. Dostupné z: doi:10.1016/S1554-4516(10)11004-7
- [34] SHOJI, Kan a Ryuji KAWANO. Microfluidic Formation of Double-Stacked Planar Bilayer Lipid Membranes by Controlling the Water-Oil Interface. *Micromachines* [online]. 2018, **9**(5) [cit. 2023-04-14]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi9050253
- [35] WANG, Xue-Jing, Wei MU a Xiao-Jun HAN. Preparation Methods for Phospholipid Vesicle Arrays and Their Applications in Biological Analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2019, **47**(8), 1134-1144 [cit. 2023-04-05]. ISSN 18722040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(19)61179-5
- [36] PATERSON, D. J., J. REBOUD, R. WILSON, M. TASSIERI a J. M. COOPER. Integrating microfluidic generation, handling and analysis of biomimetic giant unilamellar vesicles. *Lab Chip* [online]. 2014, **14**(11), 1806-1810 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC00199K
- [37] SCHAICH, Michael, Jehangir CAMA, Kareem AL NAHAS, et al. An Integrated Microfluidic Platform for Quantifying Drug Permeation across Biomimetic Vesicle Membranes. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2019, **16**(6), 2494-2501 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00086
- [38] DESHPANDE, Siddharth, Yaron CASPI, Anna E. C. MEIJERING a Cees DEKKER. Octanol-assisted liposome assembly on chip. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**(1) [cit. 2023-04-08]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms10447
- [39] AL NAHAS, K., J. CAMA, M. SCHAICH, K. HAMMOND, S. DESHPANDE, C. DEKKER, M. G. RYADNOV a U. F. KEYSER. A microfluidic platform for the characterisation of membrane active antimicrobials. *Lab on a Chip* [online]. 2019, **19**(5), 837-844 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C8LC00932E

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
PDMS	polydimethylsiloxan
pBLM	planární dvouvrstvá lipidová membrána
SUV	malý unilamelární vezikul
LUV	velký unilamelární vezikul
GUV	obří unilamelární vezikul
mGUV	obří savčí unilamelární vezikul
AMP	antimikrobiální peptid
ITO	oxid india a cín
OLA	oktanolem asistované lipozomové sestavení
IA	vnitřní vodná fáze
LO	organická fáze s lipidy
OA	vnější vodná fáze
PBS	fosfátový pufr
UV	ultrafialové záření
LED	elektroluminiscenční dioda