



Politechnika Wroclawska

ROZPRAWA DOKTORSKA

Cytometr odkształceniowy typu MEMS do badania deformowalności oocytów zwierzęcych

Mgr inż. Aleksandra Pokrzywnicka

Promotor: prof. dr hab. inż. Rafał Walczak

Promotor pomocniczy: dr inż. Wojciech Kubicki

Słowa kluczowe:
mikrocytometr odkształceniowy, mechaniczne właściwości komórek, deformowalność oocytów

WROCŁAW 2021

*Niniejszą pracę pragnę zadedykować moim
Rodzicom Małgorzacie i Markowi Pokrzywnickim,
dzięki którym miałam możliwość kształcić się
i zdobywać cenną wiedzę na Politechnice Wrocławskiej.*

Spis Treści

Podziękowania.....	4
Spis akronimów	5
1 Wstęp.....	6
2 Wprowadzenie.....	7
2.1 Klasyczne metody selekcji jakościowej oocytów zwierząt hodowlanych	7
2.2 Pomiar mechanicznych właściwości komórek zwierzęcych	11
2.3 Przegląd metod badania mechanicznych właściwości komórek	15
2.4 Mikroinżynieryjne metody badania mechanicznych właściwości oocytów.....	30
2.5 Analiza krytyczna rozwiązań i cel pracy.....	41
3 Konstrukcja, technologia i właściwości mikrocytometru	44
3.1 Założenia pracy i plan badań.....	44
3.2 Projekt i technologia komponentów mikrocytometru.....	47
3.2.1 Krzemowa membrana.....	51
3.2.2 Układ mikrofluidyczny ze strukturą pułapkującą	60
3.2.3 Struktury mikrooptyczne do sprzęgania wiązki laserowej w mikrocytometrze.....	69
3.3 Integracja elementów mikrocytometru.....	83
3.3.1 Konfiguracja A - Integracja mikrostruktur krzemowo-szklanych.....	83
3.3.2 Konfiguracja B - Integracja czujnika ugięcia membrany	85
3.3.3 Konfiguracja C - Integracja mikropryzmatów	92
3.4 Układ kontrolno-pomiarowy	97
3.4.1 Analiza danych i oprogramowanie.....	99
3.5 Podsumowanie cząstkowe.....	102
4 Wyniki badań oocytów	103
4.1 Wstępne badania mikrocytometru - konfiguracja A	103
4.2 Wstępne badania mikrocytometru - konfiguracja B	106
4.3 Badania odkształcenia oocytów żywych.....	111
4.4 Analiza i porównanie deformacji oocytów żywych z utrwalonymi	118
5 Wnioski końcowe i ocena przydatności rozwiązań.....	121
6 Literatura.....	123

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. inż. Rafałowi Walczakowi za wsparcie i poświęcony mi czas, a także cierpliwość i wyrozumiałość okazaną mi podczas pisania mojej pracy.

Bardzo dziękuję wszystkim, którzy podzielili się swoją wiedzą i doświadczeniem przyczyniając się do realizacji tej pracy, w szczególności:

- dr inż. Patrycji Śniadek,
- dr inż. Wojciechowi Kubickiemu,
- dr hab. inż. Tomaszowi Grzebykowi, prof. PWr.

Chciałabym również podziękować za współpracę Pani prof. dr. hab. Dorocie Cieślak i zespołowi z Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Spis akronimów

AFM	(<i>Atomic Force Microscopy</i>) – mikroskopia sił atomowych
CCD	(<i>Charge Coupled Device</i>) – rodzaj detektora światłoczułego ze sprzężeniem ładunkowym
CTC	(<i>Circulating Tumor Cell</i>) – krążące w krwi komórki nowotworowe
IVF	(<i>In Vitro Fertilization</i>) – zapłodnienie metodą <i>in vitro</i>
IVM	(<i>In Vitro Maturation</i>) – pozaustrojowe dojrzewanie komórki
IVP	(<i>In Vitro Production</i>) – produkcja komórek zapłodnionych metodą <i>in vitro</i>
MEMS	(<i>MicroElectroMechanical Systems</i>) – systemy mikroelektromechaniczne
mRNA	(<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>) – informacyjny/matrycowy kwas rybonukleinowy
PBS	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>) – bufor fosforanowy
PDMS	(<i>PolyDiMethylSiloxane</i>) – polimetakrylan metylu
TIR	(<i>Total Internal Reflection</i>) – całkowite wewnętrzne odbicie
UV	(<i>UltraViolet</i>) – promieniowanie ultrafioletowe

1 Wstęp

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad mikrocytometrem odkształceniowym typu MEMS, służącym do wieloparametrycznego badania oocytów świń z wykorzystaniem analizy obrazu deformowanej komórki.

Praca ta została podzielona na trzy zasadnicze części. W pierwszej części (Rozdział 2) omówiono klasyczne metody selekcji jakościowej oocytów zwierząt hodowlanych. Opisano także metody pomiaru właściwości mechanicznych komórek zwierzęcych, które stanowią potencjalną alternatywę do określania potencjału biologicznego tychże komórek w sposób parametryczny. Przeprowadzono analizę krytyczną rozwiązań mikroinżynierskich do badania mechanicznych właściwości oocytów oraz zdefiniowano cel pracy.

Druga część rozprawy (Rozdział 3) zawiera opis technologii i właściwości poszczególnych elementów składających się na trzy różne konstrukcje tytułowego mikrocytometru. Przedstawiono wyniki badań technologicznych i optymalizacyjnych nad wytwarzaniem krzemowej membrany, układu mikrofluidycznego ze strukturą pułapkującą oraz struktur mikrooptycznych. Zaprezentowano i omówiono procesy integracji poszczególnych elementów do postaci mikrocytometru odkształceniowego oraz opisano opracowany układ kontrolno-pomiarowy.

W trzeciej części pracy (Rozdział 4) przedstawiono wyniki badań z wykorzystaniem utrwalonych oraz żywych oocytów świń, przypisanych do klas jakości z wykorzystaniem klasycznej metody selekcji komórek. Doświadczenia z użyciem materiału biologicznego były prowadzone pod ścisłym nadzorem środowiska weterynaryjnego z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w ramach współpracy w projekcie naukowym pt.: „Mikrocytometria odkształceniowa komórek w zintegrowanym systemie mikro-elektro-mechanicznym z aktywacją pneumatyczną i wieloparametryczną detekcją obrazową” (OPUS10 - 2015/19/B/ST8/01110).

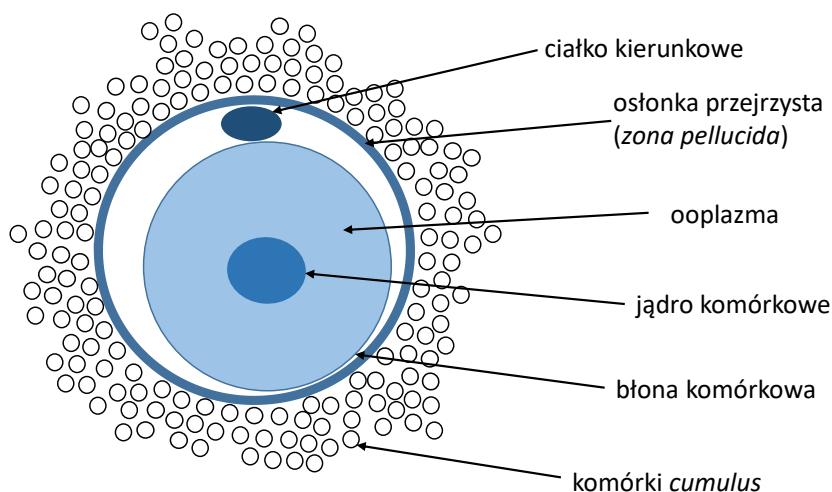
Pracę zakończono krótkim podsumowaniem oraz analizą wniosków krytycznych i oceną przydatności opisanych tu rozwiązań.

2 Wprowadzenie

W rozdziale tym przedstawiono wybrane zagadnienia związane z badaniem oocytów i metodami ich selekcji wykorzystywanymi przez środowisko weterynaryjne. Opisano metody umożliwiające mechaniczną charakteryzację komórek zwierzęcych. Następnie omówiono oraz przeprowadzono analizę krytyczną wybranych metod mikroinżynierskich do badań mechanicznych właściwości oocytów.

2.1 Klasyczne metody selekcji jakościowej oocytów zwierząt hodowlanych

Oocyt jest komórką dającą początek komórce jajowej. W porównaniu do większości komórek zwierzęcych oocyty wyróżnia nie tylko wielkość, ale także szczególna mikrostruktura wewnętrzna komórki. Zazwyczaj komórka zwierzęca składa się z cytoplazmy i otaczającej ją błony. Natomiast oocyt oprócz ooplazmy otoczonej błoną posiada także osłonkę przejrzystą okalającą całość komórki, oddzieloną od błony komórkowej tzw. przestrzenią periwitelinową (Rys. 2.1). Oocyt otoczony jest komórkami *cumulus* zwanymi także komórkami wzgórka jajonośnego [1].



Rysunek 2.1 Schemat budowy oocytu

Dojrzewanie oocytów *in vitro* (IVM) jest kluczowym etapem w technikach wspomaganego rozrodu przeprowadzanych u gatunków, takich jak bydło i trzoda chlewna, w celu produkcji zdrowych i młodych zwierząt, wykorzystywanych później do celów

biomedycznych i rolniczych. Obecnie procedury hodowania zarodków świń z oocytów dojrzewających w warunkach *in vitro* są integralną częścią produkcji transgenicznych świń, które wykorzystywane są jako modele w badaniach chorób człowieka oraz terapii [2, 3]. Pomimo wieloletniego rozwoju metod pozwalających na dojrzewanie oocytów, ich zapłodnienie, produkcję zarodków w warunkach pozaustrojowych oraz wypracowanie bardziej niezawodnych procedur, wysoki odsetek oocytów nie osiąga dojrzałości w porównaniu z komórkami dojrzewającymi *in vivo*. Oocyty poddane dojrzewaniu *in vitro* charakteryzują się obniżoną przeżywalnością i zdolnością do zapłodnienia, a także liczbą i jakością uzyskanych tą metodą zarodków [4]. Stąd też wybór oocytów o najwyższej jakości jest kluczowym czynnikiem determinującym liczbę oocytów rozwijających się do stadium blastocysty. Podejrzewa się także, że spowodowane jest to warunkami odbiegającymi od tych *in vivo* podczas pobierania, dojrzewania oraz hodowli zarodków. Stąd też, prowadzi się badania mające na celu m. in. modyfikację składu medium hodowlanego, w którym zanurzone są oocyty [5], lub dostosowanie warunków panujących w inkubatorze do potrzeb odpowiedniego gatunku oocytów, czy zminimalizowanie negatywnych skutków przechowywania komórek w stanie zamrożenia [6]. W przypadku oocytów świń, skuteczność zapłodnienia *in vitro* jest wciąż mniejsza o 50% w odniesieniu do całkowitej liczby zakwalifikowanych oocytów [7, 8].

Każdy oocyt charakteryzuje się indywidualną kompetencją rozwojową (z ang. developmental competence), tzn. posiada swoistą zdolność do prawidłowego dojrzewania, zapłodnienia, a także późniejszego rozwoju zarodka [9, 10]. Uzyskanie przez oocyt kompetencji rozwojowej zachodzi podczas oogenezy, czyli procesu powstawania i dojrzewania komórek jajowych. W wyniku szeregu przemian biochemicznych oraz komórkowych zachodzących w trakcie oogenezy oocyt uzyskuje dojrzałość genową, jądrową i cytoplazmatyczną [4].

Istnieje szereg metod określania kompetencji rozwojowej oocytów. Wśród nich wyróżnić można metody molekularne (w tym głównie transkryptomikę i proteomikę) oraz metody oparte na ocenie morfologicznej komórek. Metody molekularne opierają się na wykorzystywaniu wskaźników mRNA oraz białek, które regulują ważne etapy rozwoju oocytu podczas oogenezy. Metody te pozwalają na dokładne określenie etapu rozwoju cytoplazmy bądź jądra komórki, a więc także kompetencji rozwojowej komórki. Wadą tych metod jest jednak ich inwazyjność, przez co niemożliwe jest powtórne wykorzystanie oocytów do dalszych badań [11].

Metody klasyfikacji kompetencji rozwojowej oocytów oparte na strukturze morfologicznej komórki opierają się na obserwacji pod mikroskopem takich elementów jak: stopień jednorodności, zabarwienia i ziarnistości cytoplazmy, ilość warstw komórek *cumulus* wokół oocytu, zaokrąglenie komórki, wielkość przestrzeni periwitelinowej, czy przezroczystość i grubość *zona pellucida* [12-15]. Wymienione wyżej parametry podlegają stopniowaniu, które umożliwia przydzielenie oocytu do jednej z trzech bądź czterech klas jakości, w zależności od przyjętej metody [16-20]. Procedura selekcji oocytów bazująca na ich wyglądzie jest powszechnie stosowana przed dojrzewaniem komórek *in vitro*, zapłodnieniem *in vitro* (IVF) lub produkcją zarodków w warunkach pozaustrojowych (IVP). Przykładowa metoda klasyfikacji oocytów wraz z oocytami reprezentującymi poszczególne klasy jakości, przedstawiona została na Rys. 2.2. Podziału na poszczególne klasy dokonuje obserwator. Jest to więc podział subiektywny, obarczony błędami.

Istnieje szereg czynników powiązanych pośrednio z kompetencją rozwojową oocytów, które wykorzystuje się do uzupełnienia standardowej metody klasyfikacji na podstawie wyglądu komórki. Jednym z tych czynników jest wielkość pęcherzyków jajnikowych, z których pobiera się oocyty oraz średnica samych oocytów. W wyniku szeregu badań zaobserwowano, że oocyty wyizolowane z większych pęcherzyków (> 5 mm) charakteryzują się większą średnicą, a także kompetencją rozwojową niż oocyty uzyskane z pęcherzyków mniejszych niż 3 mm [22-24]. Dodatkowo zaobserwowano wzrost jakości badanych oocytów wraz ze wzrostem średnicy komórek [25].

Po wyizolowaniu oocytu, ocenie poddaje się również kompleks komórek *cumulus* otaczających oocyt. Zakłada się przy tym, że *cumulus* dobrej jakości posiada dobrze wykształcone i regularnie rozłożone komórki, które tworzą kilka warstw okalających oocyt. Po oczyszczeniu oocytu z komórek *cumulus*, poddaje się ocenie samą komórkę według wcześniej opisanej metody.



oocyt o prawidłowym wyglądzie
morfologicznym, otoczony rozległą warstwą
komórek wzgórka jajonośnego o jednolicie
granulowanej ooplazmie



oocyt o prawidłowym wyglądzie
morfologicznym, otoczony ścisłą warstwą
komórek wzgórka jajonośnego o jednolicie
granulowanej ooplazmie



nieliczne warstwy komórek wzgórka
jajonośnego, nieznaczna degeneracja
ooplazmy



nieliczne komórki wzgórka jajonośnego,
widoczna degeneracja ooplazmy

Rysunek 2.2 Przykład klasyfikacji oocytów do poszczególnych klas jakości kolejno od najlepszej (++) do najgorszej (-) [21]

Kolejnym parametrem badanym pod względem potencjału rozwojowego oocytów jest lokalizacja kropeł lipidowych w obrębie ooplazmy oocyty [26]. W badaniu tym wykorzystano oocyty, które sklasyfikowane zostały metodą oceny morfologicznej jako komórki najlepszej jakości. Po zabarwieniu kropeł lipidowych zaobserwowano, że oocyty różnią się między sobą rozmieszczeniem mikrostruktur w obrębie ooplazmy. Wykazano, że oocyty, których krople lipidowe były jednorodnie rozłożone w całej objętości cytoplazmy odznaczały się lepszą zdolnością do przekształcenia w blastocystę po zapłodnieniu, niż oocyty których krople lipidowe skupione były w centralnej części ooplazmy. Badano również zróżnicowanie w grubości osłonki przejrzystej wśród oocytów

wyselekcjonowanych drogą oceny morfologicznej pod względem liczby udanych zapłodnień oraz implantacji zarodków podczas IVF [27-29]. Badania te wykazały, że dostępne kryteria oceny morfologii oocytów wydają się niewystarczające z uwagi na fakt istnienia parametrów, które dodatkowo rozróżniają oocyty z większym potencjałem rozwojowym spośród już wcześniej ocenionych komórek.

Metody molekularne umożliwiają obiektywną ocenę jakości oocytów oraz precyzyjne określenie ich potencjału rozwojowego. Jak wspomniano, charakteryzują się one jednak znaczną inwazyjnością, uniemożliwiającą często wykorzystanie oocytu do dalszych badań. Z kolei wykorzystywanie metod morfologicznych prowadzi często do niejednoznacznej oceny badanego materiału. Sprawność w ocenie jakości komórek uzależniona jest od doświadczenia osoby dokonującej selekcji, przyjętych standardów oceny komórek – m. in. liczby klas jakości i parametrów podlegających ocenie, oraz klasy mikroskopu wykorzystanego do obserwacji oocytów. Wykorzystanie jedynie metody morfologicznej powoduje, że pomiar – choć nieinwazyjny dla komórki - jest niepowtarzalny. Powoduje to przypisanie grupy oocytów do najwyższej klasy jakości, pomimo, że część z nich znajduje się w rzeczywistości w stadium degeneracji uniemożliwiającym prawidłowy rozwój zarodka w dalszych etapach.

Wciąż poszukuje się metod klasyfikacji oocytów, które charakteryzowałyby się wysoką skutecznością metod molekularnych i jednocześnie nieinwazyjnością charakterystyczną dla metod morfologicznych. Dodatkowo, określenie potencjału rozwojowego oocytu powinno odznaczać się niskim kosztem pojedynczego badania i dawać możliwość przeprowadzenia oceny bez konieczności wykorzystania wyspecjalizowanego laboratorium. Najbardziej pożądanymi metodami badań są te, które wykorzystują wskaźniki pozbawione znakowania komórek barwnikami lub innymi substancjami uniemożliwiającymi dalsze wykorzystanie komórki po badaniu. Jedną z takich metod może być badanie właściwości mechanicznych oocytów, w szczególności z wykorzystaniem technik mikroinżynierii.

2.2 Pomiar mechanicznych właściwości komórek zwierzęcych

Oocyty i zarodki wchodzą w interakcję ze środowiskiem (*in vivo* czy *in vitro*), w którym się rozwijają i podlegają wpływom sił zewnętrznych tj. ściskania, rozciągania, skręcania, lub ciśnienia hydrostatycznego pochodzących z tego środowiska. Wykazują one także znaczące zróżnicowanie w zakresie właściwości mechanicznych w wyniku

reagowania na właściwości fizyczne środowiska, w którym znajdują się. Siły pozakomórkowe, bądź ich brak, mogą wpływać na losy rozwojowe komórki, a zmiany właściwości mechanicznych komórki mogą służyć jako biomarkery choroby lub wskaźniki wewnętrznego stanu molekularnego komórki. Takie właściwości jak adhezyjność, sztywność, lepkość czy deformacja, mogą być wykorzystane jako wskaźniki biologicznego stanu komórki (np. procesów degeneracyjnych), a także są wykorzystywane do oceny ich dojrzałości, jakości lub do określenia cyklu życia w jakim się znajdują [30].

Badania nad właściwościami mechanicznymi oocytów zwierzęcych relacjonowane są od wielu lat w literaturze przedmiotu [31-33]. Wskazują one dynamiczne zmiany właściwości mechanicznych oocyty w trakcie jego dojrzewania oraz podczas przeprowadzania procesów wspomaganego rozrodu. Przykładem takich zmian jest wzrost sztywności *zona pellucida* podczas zapłodnienia metodą *in vitro*. Oznacza to, że informacja dotycząca właściwości mechanicznych oocyty może zapewnić użyteczny wgląd w zdarzenia na poziomie molekularnym, które wskazują na dojrzewanie, starzenie się i zewnętrzne czynniki stresogenne, które mogą być predykcją zapłodnienia lub ciąży.

Podczas badań mechanicznych właściwości oocytów i zarodków rozpatruje się takie aspekty jak obszar pomiaru oocyty (np. *zona pellucida*, czy ooplazmę), czy stadium rozwojowe w jakim znajduje się komórka.

Najczęściej badanym elementem oocyty jest osłonka przejrzysta. Osłonka przejrzysta badana jest w kontekście technik zapłodnienia *in vitro*, podczas którego, jak wspomniano wcześniej, *zona pellucida* zwiększa swoją sztywność m. in. uniemożliwiając przedostanie się do wnętrza komórki (zwykle) więcej niż jednemu plemnikowi (tzw. polispermii) u niektórych gatunków [34].

Ponadto obserwuje się spontaniczne twardnienie osłonki przejrzystej w wyniku starzenia się poowulacyjnej komórki w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Zjawisko to wiąże się ze zmniejszonym współczynnikiem zapłodnienia, złą jakością zarodków, błędami po implantacji i nieprawidłowościami u potomstwa. Zwiększenie sztywności osłonki przejrzystej może również zachodzić w niektórych warunkach hodowli *in vitro*, takich jak skład medium hodowlanego, lub warunki hodowli oocytów (np. temperatura) [35].

Badaniom właściwości mechanicznych poddawano także ooplazmę oocytów. Jej „płynność” (z ang. fluidity) została skorelowana z dojrzałością oocytów, starzeniem poowulacyjnym i wynikami rozwojowymi embrionów po zapłodnieniu komórki [36]. Zaobserwowano, że starzejące się oocyty wykazują zmniejszoną płynność ooplazmy, co

może powodować hamowanie fuzji plemników, a także zmniejszenie prawdopodobieństwa pomyślnego zapłodnienia. Podejrzewa się, że ooplazma gamet może również podlegać zmianom mechanicznym w trakcie rozwoju i dojrzewania oocytu oraz podobnie jak w przypadku osłonki przejrzystej, może zapewnić dokładniejsze przewidywanie potencjału rozwojowego oocytu [37].

Do badań nad określeniem potencjału rozwojowego oocytu, a także potencjału implantacyjnego, wykorzystuje się oocyty, zygoty i embriony na różnym etapie procesu IVF. Opracowywanie parametrów mechanicznych oocytów pozwala na porównanie i docelowo rozróżnienie grup komórek o różnym potencjale biologicznym. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że potencjał embrionu zależy od jakości i dojrzałości oocytu jeszcze przed zapłodnieniem. To z kolei oznacza, że istnieje szansa na zwiększenie produktywności przeprowadzanych technik wspomaganego rozrodu w najwcześniejszych etapach procesu. Obecnie wstępna manualna selekcja następuje podczas pobierania materiału biologicznego z jajników dawczyni. Opiera się ona na ocenie morfologicznej komórki przy zwróceniu uwagi na takie cechy jak grubość osłonki przejrzystej, ziarnistość, przestrzeń okołoołtkowa i kształt oocytów. Niektóre oocyty nie osiągają optymalnego dojrzewania z powodu zewnętrznego stresu podczas dojrzewania lub z powodu niskiej jakości. W wyniku badań nad mechanicznymi właściwościami oocytów wielokrotnie zaobserwowano różnice w sztywności osłonki przejrzystej oocytów niedojrzałych i dojrzałych. Brak natomiast badań, które wskazywałyby jednoznacznie na różnice pomiędzy dojrzałymi gametami, które mogłyby być skorelowane jednoznacznie z potencjałem rozwojowym oocytu. Badanie oocytów zaraz po zapłodnieniu i porównywanie ich z innymi fazami rozwojowymi podejmowane są sporadycznie, ale wyniki wskazują na różnice w elastyczności osłonki przejrzystej również na tym etapie.

Analizując wyniki badań mechanicznych właściwości oocytów należy zwrócić uwagę na szczególną złożoność budowy oocytów. Oocyt jest strukturą mechanicznie niejednorodną, gdzie każdy jego składnik ma unikalny zestaw właściwości lepkosprężystych, poszczególne komponenty wykazują różne stopnie mechanicznego sprzężenia pomiędzy sobą, a także działają czynne siły wewnątrzkomórkowe.

W celu określenia właściwości mechanicznych oocytów przyjmuje się szereg uproszczeń. Stosuje się model oocytu, w którym komórka jest idealną sferą, pomija się istnienie wielu elementów komórki, pozostawiając jedynie osłonkę przejrzystą oraz cytoplazmę, która jest w tym przypadku elementem jednorodnym. Mechaniczny model

komórki związany jest nie tylko z typem badanej komórki (np. czy jest komórką adherentną), ale także wyborem metody umożliwiającej pomiar komórki [38].

Obszar deformacji komórki może mieć charakter lokalny i dotyczyć zewnętrznej powierzchni oocytu – osłonki przejrzystej – lub mieć charakter globalny, gdzie odkształceniom poddawana jest cała komórka, ze wszystkimi elementami znajdującymi się w jej wnętrzu. Pomiar komórek może mieć także charakter populacyjny, gdzie w obrębie większej grupy komórek bada się różnice w ich odkształcalności bez dokładnego określania właściwości mechanicznych.

Kolejnym parametrem koniecznym do rozpatrzenia jest liczebność komórek w próbce, którą chcemy przebadать. Metody mikrofluidyczne sprzyjają pomiarom dużych populacji komórek ze stosunkowo wysoką przepustowością. Natomiast takie metody jak AFM, czy zasysanie komórki mikropipetą, skupiają się bardziej na pomiarze pojedynczych komórek. W praktyce metody badań oocytów oparte na technologii lab-on-a-chip lub MEMS nie osiągają przepustowości charakterystycznej dla technik pomiaru mechanicznych właściwości innych typów komórek np. krwinek czerwonych. Warto jednak zaznaczyć, że liczba możliwych do uzyskania oocytów z pojedynczego jajnika jest ograniczona, na co wpływ mają m. in. ilość dawczyń i czasochłonność pobierania oocytów. Stąd też metoda badawcza oocytów oparta na technologii lab-on-a-chip lub MEMS może charakteryzować się średnią przepustowością, a to powoduje, że nie jest konieczne stosowanie wyspecjalizowanej aparatury do obrazowania deformacji oocytów.

Tradycyjne badania laboratoryjne nad oocytami przeprowadzane są w ściśle kontrolowanych warunkach, pozwalających na możliwie jak najlepsze odtworzenie naturalnego środowiska rozwoju oocytu (*in vivo*). W związku z tym warunki pomiarów przeprowadzonych z wykorzystaniem nowych technik i instrumentów powinny być możliwie jak najbardziej zbliżone przynajmniej do protokołów pracy *in vitro* z oocytami.

W tym celu należy rozważyć takie czynniki jak całkowity czas pomiaru wybranych właściwości komórki, dobór składników medium hodowlanego, pH i temperatura medium hodowlanego. Wydłużony czas pomiaru w sztucznym środowisku laboratoryjnym (*in vitro*) może wpływać na niektóre aspekty zdrowia i rozwoju zarodka, zwłaszcza jeżeli badania przebiegają w warunkach odbiegających od tych w inkubatorach [39]. Podłoże, do którego przyłączone są komórki (sztywność materiału) oraz gęstość medium hodowlanego wpływają na rozwój komórek, a nieprawidłowe środowisko hodowlane może zaburzyć wzrost pęcherzyków, zmienić poziom hormonów i w konsekwencji obniżyć jakość oocytów. Specjalne preparaty pożywek hodowlanych *in vitro* mogą zmniejszyć

stopień twardnienia osłonki przejrzystej, która wchodzi w bezpośredni kontakt z medium hodowlanym i poprawić wskaźniki zapłodnienia u myszy i innych gatunków. Inne cechy środowiska hodowlanego takie jak osmolalność czy pH mogą również wpływać zmianę właściwości mechanicznych oocytu, ale ich dokładne działanie na biomechanikę oocytów i zarodków jest nadal nieznane [40]. Konieczne jest także rozważenie temperatury hodowli, która musi być dokładnie kontrolowana, aby uniknąć pogorszenia żywotności oocytów. Temperatura medium hodowlanego nie powinna odbiegać od wartości wyznaczonych dla standardowej hodowli oocytów. Istnieją pewne dowody na to, że szok termiczny może przyspieszyć dojrzewanie cytoplazmatyczne i zmniejszyć tempo tworzenia blastocysty, ale wpływ na twardnienie *zona pellucida* jest nadal niejasny [40, 41]. Zarówno znaczenie badania jak i zagadnienia związane z określaniem potencjału biologicznego oocytów na podstawie ich właściwości mechanicznych są istotne i nietrywialne.

2.3 Przegląd metod badania mechanicznych właściwości komórek

Literatura przedmiotu związana z badaniem mechanicznych właściwości komórek zwierzęcych jest rozproszona w wyniku niejednorodnego nazewnictwa wykorzystywanego do opisu wykorzystanych metod badawczych. Powoduje to konieczność poszukiwań z wykorzystaniem specyficznych nazw badanych parametrów np. „deformability”, konkretnych typów komórek np. „oocytes” lub wykorzystanych metod np. AFM. W celu kompleksowego przeglądu literatury wykorzystuje się słowa kluczowe takie jak „mechanical properties”, „cell mechanics”, „biophysical properties”, czy też „label-free parameters”. Część sformułowań oraz ich kombinacji przedstawiono w Tabeli 2.1 oraz Tabeli 2.2 z wykorzystaniem dwóch różnych baz danych dla porównania. Bez względu na wykorzystane nazewnictwo i stopień szczegółowości zagadnień, zaobserwować można wzrost zainteresowania tematyką mechanicznych właściwości komórek na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat. Tematyka ta jest więc naukowo ważna i aktualna.

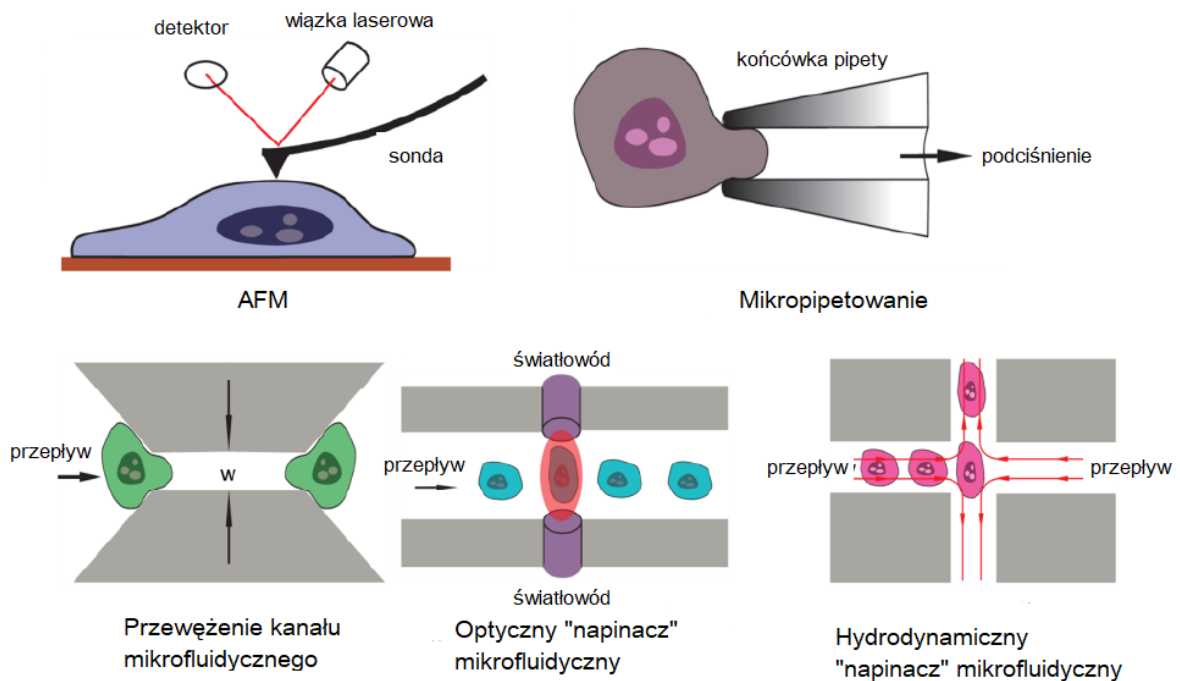
Tabela 2.1 Liczba publikacji w latach 2010-2019 z bazy danych NCBI PubMed

Rok	Wyszukiwane słowa i zwroty							
	„mechanical properties” + „cells”	„mechanical properties” + „deformability”	„mechanical properties” + „microfluidics”	„deformability” + „microfluidics”	„mechanical properties” + „single-cell analysis”	„mechanical properties” + „oocytes”	„deformability” + „oocytes”	„microfluidics” + „oocytes”
2010	277	73	6	17	8	1156	40	1
2011	334	80	7	14	10	1225	42	1
2012	412	88	9	29	8	1321	45	2
2013	465	98	9	38	11	1362	41	1
2014	521	108	19	36	18	1401	38	6
2015	567	159	22	51	15	1559	62	8
2016	589	200	36	73	24	1425	33	4
2017	599	225	28	62	22	1455	36	12
2018	684	227	29	74	16	1445	49	10
2019	733	299	36	76	15	1444	56	2

Tabela 2.2 Liczba publikacji w latach 2010-2019 z bazy danych NCBI PMC

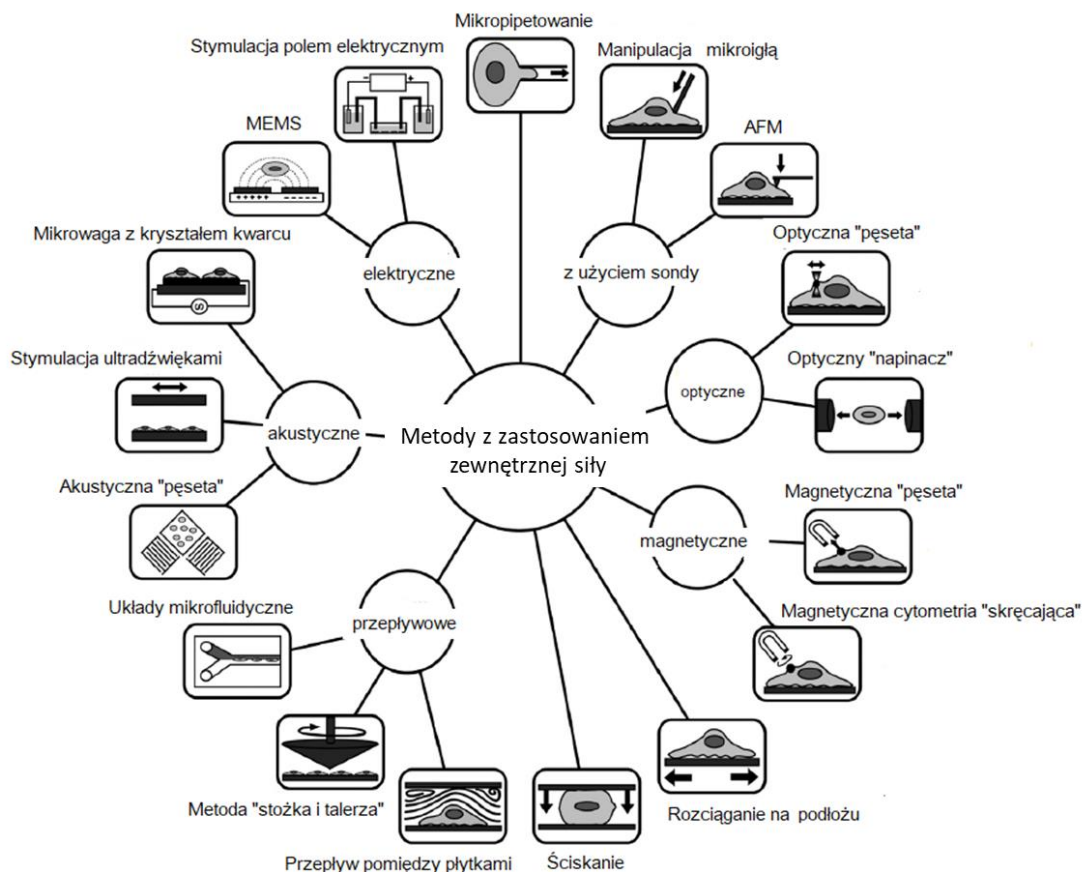
Rok	Wyszukiwane słowa i zwroty							
	„mechanical properties” + „cells”	„mechanical properties” + „deformability”	„mechanical properties” + „microfluidics”	„deformability” + „microfluidics”	„mechanical properties” + „single-cell analysis”	„mechanical properties” + „oocytes”	„deformability” + „oocytes”	„microfluidics” + „oocytes”
2010	2096	114	78	20	7	3555	9	17
2011	2543	119	92	34	14	4040	10	21
2012	3085	155	118	55	25	4517	7	31
2013	3562	183	134	81	37	4859	9	35
2014	4121	218	179	75	43	4928	11	42
2015	4680	271	224	103	43	5233	13	55
2016	5007	295	316	145	78	5099	18	51
2017	5692	339	346	166	83	5229	18	70
2018	6625	430	460	189	94	5417	19	69
2019	7076	493	464	183	88	5298	19	55

Publikacje przeglądowe, odnoszące się do badań mechanicznych właściwości komórek, nie podejmują się pełnej klasyfikacji metod badawczych. Próby usystematyzowania sprowadzają się głównie do przeglądu metod służących do badań ściśle określonych komórek (np. krwinek czerwonych) [42], lub metod spełniających określone funkcje badawcze (np. do badań przesiewowych i oceny skuteczności leków dla pojedynczych komórek) [43]. W związku z tym nie wprowadzono do tej pory jednolitych kryteriów podziału i nie stworzono powszechnie akceptowanej klasyfikacji metod badawczych komórek zwierzęcych. Przykładem jest publikacja przeglądowa metod umożliwiających charakteryzację mechanicznych właściwości komórek z uwzględnieniem typu badanej komórki i jej stanu biologicznego [44]. Autor skupia się na najczęściej badanych komórkach tj. krwinkach czerwonych, komórkach rakowych, leukocytach oraz komórkach macierzystych. Metody opisane w publikacji zawężone zostały do najczęściej wykorzystywanych metod badawczych: AFM, mikropipetowania, a także metod mikrofluidycznych (Rys. 2.3.).



Rysunek 2.3 Wybrane techniki badawcze umożliwiające scharakteryzowanie właściwości mechanicznych pojedynczych komórek wg J. Chena [44]

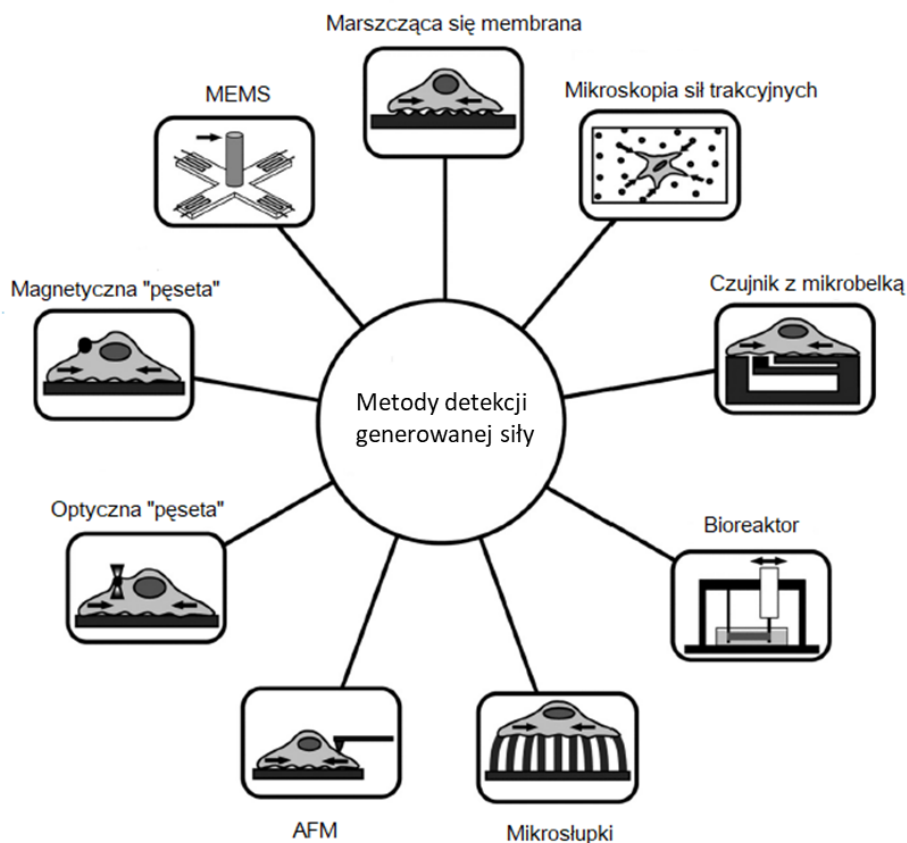
Jedno z ogólnych kryteriów podziału technik badawczych zaproponował M. L. Rodriguez [45], gdzie metody badania właściwości mechanicznych komórek rozdzielono na dwie główne kategorie. W pierwszej znalazły się metody, w których siła jest przykładana bezpośrednio do komórki, powodując jej odkształcenie (Rys. 2.4).



Rysunek 2.4 Metody badań mechanicznych właściwości komórek z zastosowaniem zewnętrznej siły oddziałującej wg M. L. Rodrigueza [45]

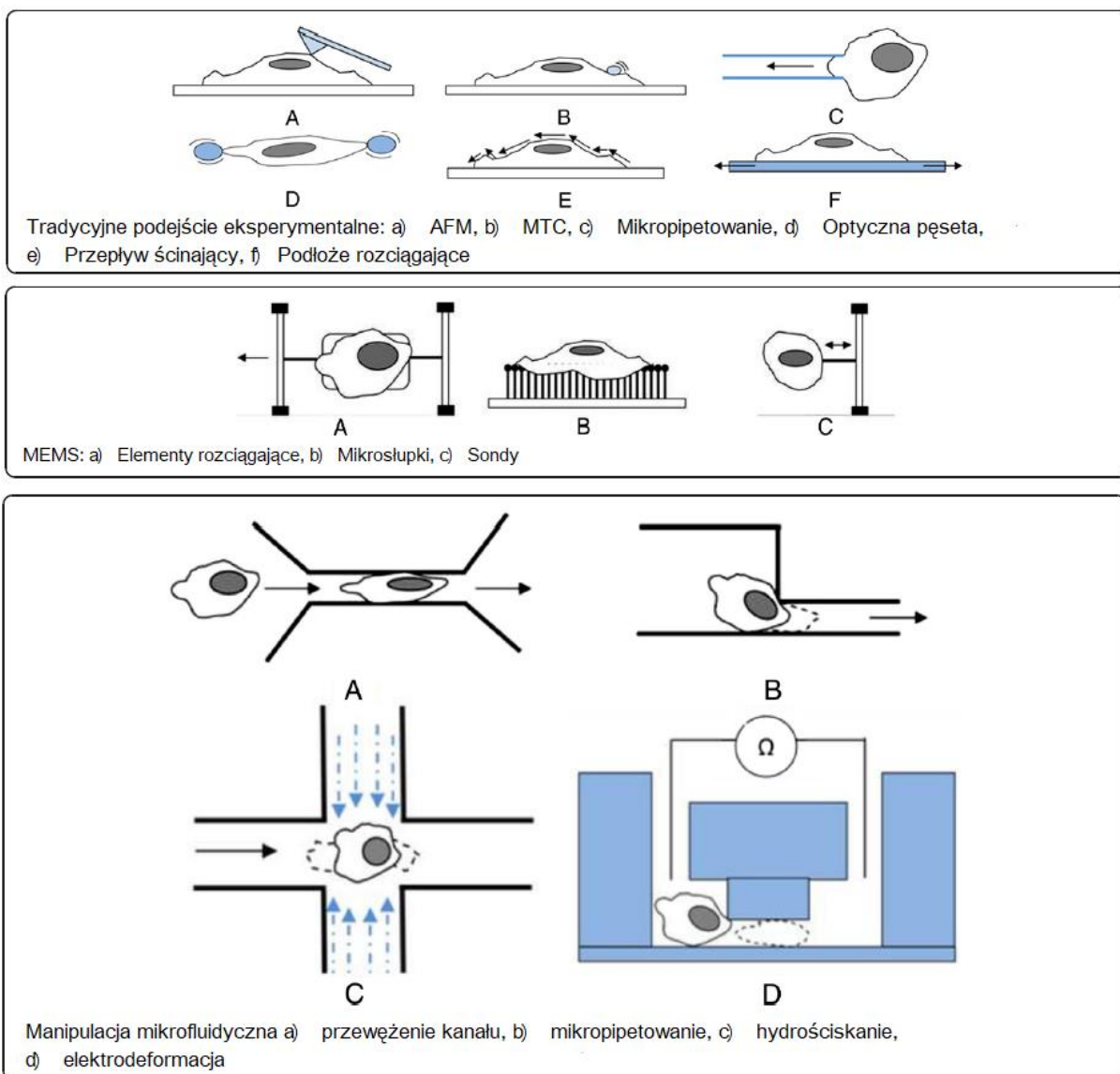
W tym przypadku jest mierzona odpowiedź komórki na zewnętrzny bodziec w postaci jej deformacji bądź siły wygenerowanej przez odkształconą komórkę. Umożliwia to określenie właściwości mechanicznych komórki. Metody opisane w tej kategorii zostały poddane dodatkowemu uporządkowaniu pod względem charakteru bodźca jaki działa na komórkę np. akustyczny, mechaniczny lub elektryczny. Druga kategoria zawiera metody służące do pomiaru sił generowanych przez komórki podczas ich rozwoju, migracji lub

innych procesów komórkowych (Rys. 2.5). Te techniki można łączyć z metodami opisanymi w pierwszej kategorii i badać wpływ sił przyłożonych zewnętrznie na komórki.



Rysunek 2.5 Metody badań mechanicznych właściwości komórek na podstawie wykrywania generowanej przez komórkę siły wg M. L. Rodrigueza [45]

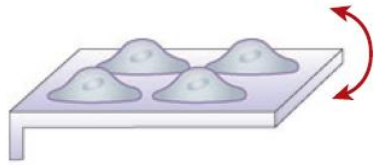
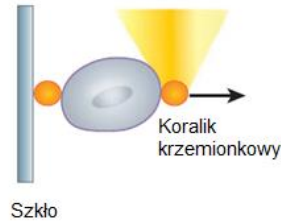
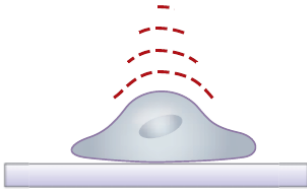
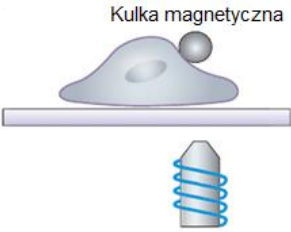
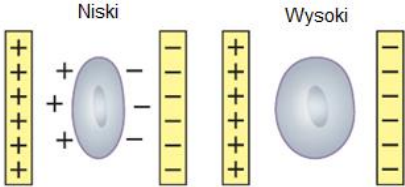
Inny podział metod zaproponował I. L. Ahmad, gdzie podjęto się klasyfikacji z wyłączeniem metod badań całych populacji komórek [46]. Techniki pozwalające na charakteryzowanie właściwości pojedynczych komórek podzielone zostały na trzy kategorie: metody „tradycyjne”, metody MEMS oraz metody mikrofluidyczne. W każdej kategorii dokonano bardziej szczegółowego podziału ze względu na specyfikę pomiaru, typy wykorzystanych mikrostruktur czy typ bodźca działającego na deformowaną komórkę (Rys. 2.6).



Rysunek 2.6 Klasyfikacja technik pomiaru sztywności pojedynczej komórki wg I. L. Ahmada [46]

Kolejnym kryterium uwzględnionym podczas próby klasyfikacji metod badawczych komórek jest typ bodźca jakim stymulowana jest komórka [47]. Wyróżnić możemy szereg bodźców: mechaniczne, optyczne, akustyczne, magnetyczne oraz elektryczne (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 Wybrane przykłady metod badań mechanicznych właściwości komórek ze względu na bodźce wg H. D. Kima [47]

Bodziec	Idea/Schemat	Badane parametry	Źródła
Mechaniczny		moduł lepkości, moduł sprężystości, sztywność, adhezyjność	[48-52]
Optyczny	 Szkiełko Koralik krzemionkowy	deformowalność	[53-59]
Akustyczny		deformowalność	[60-62]
Magnetyczny	 Kulka magnetyczna	sztywność, moduł sprężystości	[63-66]
Elektryczny	 Niski Wysoki	deformowalność	[67-72]

Każdy z wyżej wymienionych bodźców może wpływać na badaną komórkę i zmieniać jej właściwości mechaniczne, a nawet ją niszczyć. Może do tego doprowadzić zbyt duża intensywność bądź siła z jaką dany bodziec działa na komórkę lub zbyt długi czas stymulacji. Skutkiem pomiaru może być częściowe uszkodzenia struktur komórki, bądź jej całkowite zniszczenie, np. przez przerwanie osłonki przejrzystej lub błony

komórkowej okalającej organelle. W literaturze przedmiotu trwają dyskusje czy i w jakim stopniu poszczególne typy bodźców mogą zaburzać wyniki badań mechanicznych właściwości komórek.

Bardziej szczegółowy podział metod badawczych przeprowadzony został w kontekście pomiaru odkształcalności pojedynczych komórek z wykorzystaniem urządzeń bazujących na manipulacji mikrofluidycznej. W pracy autorstwa Yi Zhenga [73], metody badawcze również podzielone zostały ze względu na typ bodźca użytego do deformacji komórek. Szczególną uwagę zwraca rozszerzenie liczby czynników mechanicznych umożliwiających deformację komórki w urządzeniach mikrofluidycznych. Przedstawione w tej pracy rozwiązania oparte na technikach mikroinżynierskich umożliwiają m. in. wykorzystanie geometrii mikrostruktur takich jak przewężenia mikrokanałów do deformowania przepływających komórek. Ponadto możliwość precyzyjnej manipulacji przepływem mikrofluidycznym powoduje, że kolejnym bodźcem deformującym komórkę może być strumień przepływającej w określony sposób cieczy.

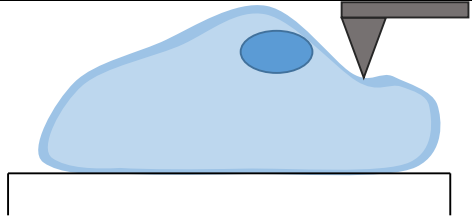
Na podstawie przeprowadzonej analizy metod można stwierdzić, że tematyka badań właściwości mechanicznych komórek jest złożona i nieusystematyzowana. Opisane w dalszej części tego rozdziału metody są najlepiej scharakteryzowane i najpowszechniej wykorzystywane do badań komórek.

Dodatkowo, w dalszych rozważaniach wzięto pod uwagę jedynie bodźce mechaniczne, ponieważ jako jedyne (poza czynnikami biochemicznymi) wpływają na deformacje oocytów znajdujących się w żywym organizmie. Natomiast takie grupy bodźców, jak: optyczne, magnetyczne, akustyczne czy elektryczne nie występują „naturalnie” w układzie rozrodczym ssaków.

Pierwsze mechaniczne metody wykorzystywane do badań właściwości mechanicznych komórek pojawiły się w wyniku połączenia rozwoju technik mikroskopowych (głównie AFM) oraz prób wykorzystania tradycyjnych metod manipulacji komórką np. kontrolowanego zasysania za pomocą mikropipety.

Mikroskopia sił atomowych jest metodą wykorzystującą mikroskop wyposażony w sondę do pomiaru siły oddziaływania ostrza z powierzchnią próbki podczas jej skanowania (Tab. 2.4). W wyniku zetknięcia się z powierzchnią komórki, sonda pomiarowa ulega ugięciu, które jest skorelowane z „twardością” badanej komórki.

Tab. 2.4 Mikroskopia sił atomowych (AFM) jako narzędzie do badania właściwości mechanicznych komórek

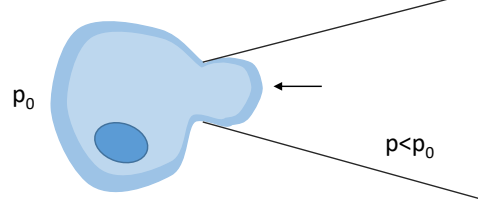
Obszar pomiaru	Schemat	Parametry	Źródła
lokalny	 Schemat przedstawia niebieską komórkę z ciemniejszym niebieskim jądrem. Na jej powierzchni znajduje się szary, trójkątny wierzchołek sondy AFM, który jest w kontakcie z komórką. Pod komórką widoczny jest prostokątny element podłoża.	moduł sprężystości, siła adhezji komórki, moduł Younga	[74-78]
Zalety	szeroki zakres wartości przyłożonych sił		
	wysoka precyzja pomiaru		
	szeroki wybór kształtu końcówki sondy		
	nieniszczące i powtarzalne pomiary		
	precyzyjny pomiar właściwości mechanicznych powierzchni komórki (membrany, osłonki)		
Ograniczenia	do stosowania z żywymi komórkami eukariotycznymi		
	losowe pozycjonowanie sondy, trudna manipulacja, zależna od operatora		
	nieporęczne i czasochłonne ustawienie eksperymentu, ograniczony obszar pomiaru		
	niska wydajność pomiaru		
	badane mogą być jedynie komórki adherentne		
komplikacje w wyznaczeniu parametrów ze względu na interakcję sondy z środowiskiem wodnym, w którym znajdują się komórki			

W kolejnej metodzie szklana mikropipeta kontrolowana jest przez mikromanipulator, który umieszcza mikropipetę w pobliżu komórki [79-82]. Badana komórka znajduje się w komorze w zawieszynie z innymi komórkami (Tab. 2.5). Komórka jest częściowo zasysana do mikropipety za pomocą podciśnienia. Następnie, odkształcenie komórki jest rejestrowane przez obrazowanie w mikroskopie optycznym. Wykorzystując metodę analizy obrazów deformowanej komórki i określone modele mechaniczne komórek dokonuje się wyznaczenia takich parametrów jak moduł lepkości, moduł sprężystości, moduł Younga lub sztywność komórki.

Ograniczeniem tej metody badawczej jest jej przepustowość. W danym momencie możliwe jest pobranie pipetą jednej komórki. Zwykle wykonanie jednego pomiaru zajmuje

kilka minut. Dodatkowo, należy uwzględnić występowanie fizjologicznej degradacji komórek i zmiany zachodzące w środowisku wodnym komórek (np. pH).

Tab. 2.5 Mikropipetowanie jako narzędzie do badania właściwości mechanicznych komórek

Obszar pomiaru	Schemat	Parametry	Źródła
lokalny		moduł sprężystości, moduł lepkości, sztywność, moduł Younga	[79-83]
Zalety	prawidłowo skalibrowana nie powoduje pęknięcia komórek		
	precyzyjna kontrola ciśnienia zasysania (do 0,1 Pa)		
	umożliwia badanie komórek adherentnych i nieadherentnych		
Ograniczenia	czasochłonna i żmudna manualna operacja		
	niska przepustowość metody		
	rozmieszczenie organelli w komórce może wpłynąć na zassanie określonego obszaru komórki		

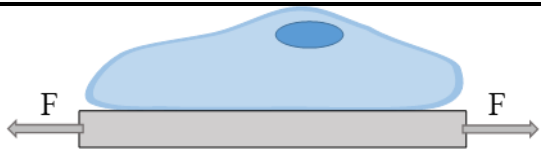
W celu równomiernego odkształcenia komórki stosuje się metodę badawczą opartą o ściskanie pomiędzy dwiema równoległymi płytkami (Tab. 2.6). Pojedyncza komórka jest umieszczona pomiędzy dwiema płytkami: nieruchomą sztywną płytką, a elastyczną płytką, współpracującą z czujnikiem siły. Elastyczna płytka rozciągana/uginana jest przez stałe lub oscylacyjne przemieszczenia. Metoda ta stosowana jest najczęściej do komórek adherentnych, które przylegają do powierzchni obu płytek. Podczas naciskania na komórkę ruchomą płytką, przykładana jest siła powodująca deformację komórki – pełni ona wtedy rolę sondy siły. Natomiast podczas oddalania płytek od siebie siły wywierane są przez wiązania molekularne powstałe między płytkami, a powierzchnią komórki. Metoda ta umożliwiła określenie modułu lepkości i sprężystości komórki oraz wyznaczenie funkcji relaksacji i „pełzania/płynięcia” (z ang. creep) poszczególnych komórek, przez pomiar naprężeń powstających w komórce oraz deformacji pod stałym naprężeniem.

Tab. 2.6 Reometria z równoległymi płytkami jako narzędzie do badania właściwości mechanicznych komórek

Obszar pomiaru	Schemat	Parametry	Źródła
całościowy		moduł lepkości i sprężystości, współczynnik Poissona, deformacja	[84-87]
Zalety	całościowe ściskanie komórki przy odpowiednio niewielkim ugięciu płytki możliwe jest badanie jedynie membrany komórki		
Ograniczenia	badane mogą być jedynie komórki adherentne możliwe jest precyzyjne badanie ilościowe tylko jednej komórki lub badanie jakościowe całej populacji komórek komórki mogą się odzepić w wyniku zbyt dużego ugięcia płytki		

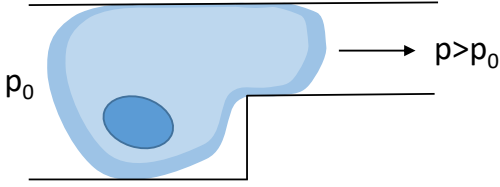
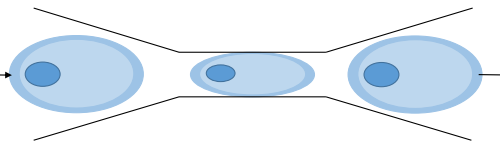
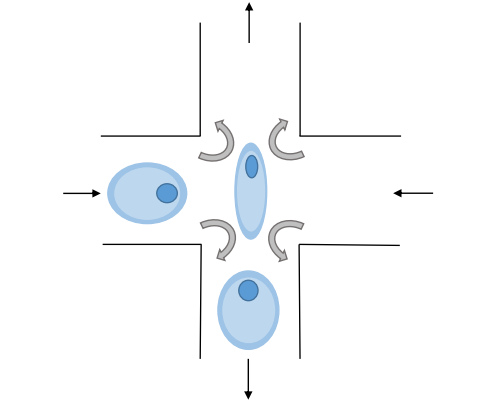
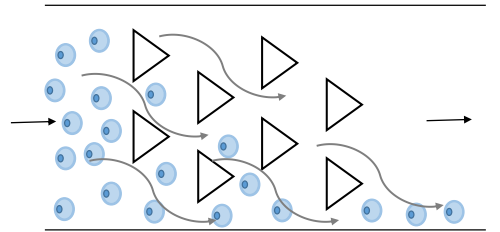
Do badań całych populacji komórek adherentnych jednocześnie wykorzystuje się elastyczne podłoża lub membrany, które w wyniku rozciągania bądź ściskania oddziałują na przyłączone do niego komórki (Tab. 2.7). Metoda ta umożliwia także badanie odkształceń zachodzących w komórkach przez wykorzystanie ciśnienia do ugięcia membrany i wytworzenia gradientu naprężeń na całej powierzchni membrany. Alternatywnym sposobem na zmianę wartości bodźca, jakiemu poddawane są komórki, jest kontrola właściwości mechanicznych materiału, z którego wykonana jest membrana przez zmianę składu chemicznego materiału.

Tab. 2.7 Deformacja komórek na podłożu rozciągającym

Obszar pomiaru	Schemat	Parametry	Źródła
całościowy, populacyjny		siły trakcyjne komórek	[88-93]
Zalety	do stosowania z żywymi komórkami eukariotycznymi		
	umożliwia badanie całej populacji komórek z uwzględnieniem pomiaru pojedynczych komórek		
Ograniczenia	zbyt duże naprężenia mogą spowodować oderwanie się komórek od podłoża bądź ich pęknięcie		
	zmiany w składzie chemicznym materiału membrany mogą powodować zmiany w środowisku wodnym komórek, np. zmianę pH		
	badane mogą być jedynie komórki adherentne		
	komórki zachodzące na siebie nie mogą być efektywnie badane tą metodą		

Ze względu na ograniczenia przedstawionych wcześniej metod „tradycyjnych”, metody bazujące na technikach mikroinżynierskich stały się atrakcyjną alternatywą do badań komórek zwierzęcych. Przykładem jest zastąpienie pipety laboratoryjnej do zasysania komórek strukturami mikrofluidycznymi [94-96]. W rozwiązaniach takich w obrębie mikrostruktury kanału wytwarza się przewężenie uniemożliwiające komórce dalsze przejście i unieruchamiające komórkę poprzez zassanie części jej objętości (Tab. 2.8). W rozwiązaniach mikrofluidycznych możliwe jest wytworzenie równoległe wielu obszarów zasysania komórki w obrębie jednego układu mikrofluidycznego. To z kolei pozwoliło na zwiększenie przepustowości pomiaru deformacji komórek oraz umożliwiło automatyzację, przez kontrolę przepływu cieczy z komórkami w obrębie układu mikrofluidycznego. Warto zaznaczyć, że to rozwiązanie sprawdza się jedynie w przypadku heterogenicznych populacji komórek. Jeżeli istnieje duże zróżnicowanie wśród grupy badanych komórek, na przykład w ich wymiarach – to każda komórka zostanie zassana do przewężenia kanału w różnym stopniu. W istniejących rozwiązaniach stosuje się jedną pompę strzykawkową bądź sterownik umożliwiający sterowanie całym układem mikroprzepływowym, bez możliwości uwzględnienia rozmiarów pojedynczych komórek podczas pomiaru.

Tab. 2.8 Przegląd wybranych metod mikrofluidycznych wykorzystujących bodźce mechaniczne

Obszar pomiaru	Schemat	Parametry	Źródła
lokalny	Mikropipetowanie		
		moduł Younga, moduł sprężystości, moduł lepkości	[94-96]
całościowy	Przewężenie kanału		
		czas przejścia komórki przez przewężenie, wydłużenie komórki czas regeneracji, odkształcalność komórki	[97-101]
całościowy	Rozciąganie hydrodynamiczne		
		objętość komórki, wskaźnik deformacji	[102-105]
populacyjny	Sortowanie komórek		
		selekcja komórek	[106-108]

Warto także zwrócić uwagę na różnice pomiędzy przekrojem poprzecznym tradycyjnej mikropipety, a przekrojem kanału mikrofluidycznego. Geometria kanału jest krytyczna zarówno dla dokładności, jak i kontroli warunków pomiaru parametrów mechanicznych komórki. W przypadku rozwiązań mikrofluidycznych, w zależności od użytego materiału (np. szkło, PDMS), uzyskanie symetrycznego, kołowego profilu kanału nie zawsze jest możliwe do osiągnięcia.

Wykorzystanie przewężenia w kanale mikrofluidycznym może również posłużyć do badań deformacji komórki przepływającej wraz z cieczą przez to przewężenie [97-101]. Wówczas, cała komórka zostaje poddana ściśnięciu, a badanymi parametrami są czas przejścia komórki przez obszar przewężenia, całościowe wydłużenie komórki, czas regeneracji komórki i powrotu do pierwotnych rozmiarów po ściśnięciu. O charakterze pomiaru decyduje geometria mikrokanalu, jego profil czy długość, a także charakter przepływu mikrofluidycznego – tutaj przede wszystkim wartość prędkości przepływu. Metoda badawcza, o której u mowa, opiera się na obserwacji deformowanej komórki i na analizie obrazu. Podobnie, jak w przypadku mikropipety, ustalone wymiary mikrostruktur niedopasowane są do zróżnicowanych wymiarów badanych komórek. Przepustowość pomiaru jest wysoka z uwagi na możliwość szybkiego przebadania całej populacji komórek z uwzględnieniem deformacji pojedynczych komórek, o ile uwzględnione zostanie odpowiednie sortowanie komórek i zapewnienie odstępu w przepływie pomiędzy nimi, tak aby nie nachodziły na siebie podczas przeciskania się przez przewężenie. Z tego powodu konieczne może być zastosowanie bardziej rozbudowanych systemów kontroli przepływu cieczy zarówno od strony sprzętowej jak i programistycznej.

Do odkształcenia wykorzystać można również przepływ cieczy i siłę z jaką może napierać ona na komórkę przepływającą w mikrokanale [102-105]. Przykładem takiego rozwiązania jest zastosowanie skrzyżowania dwóch mikrokanalów, gdzie jednym z nich przemieszcza się komórka, natomiast drugi służy do „podania” na komórkę dwóch przeciwległych strumieni cieczy. Powoduje to krótkotrwałą deformację komórki w obszarze krzyżowania się prostopadłych do siebie kanałów mikrofluidycznych. Z tego też powodu, aby zaobserwować deformację komórki stosuje się bardziej wyrafinowane i szybkie kamery do przechwytywania obrazu. Metoda ta, podobnie jak większość rozwiązań mikrofluidycznych, opiera się na analizie obrazu, gdzie parametrem jest głównie wskaźnik deformacji komórki.

Istnieje także metoda badania deformowalności komórek oparta na sortowaniu całych populacji komórek w układzie mikrofluidycznym. Proces ten zachodzi w wyniku

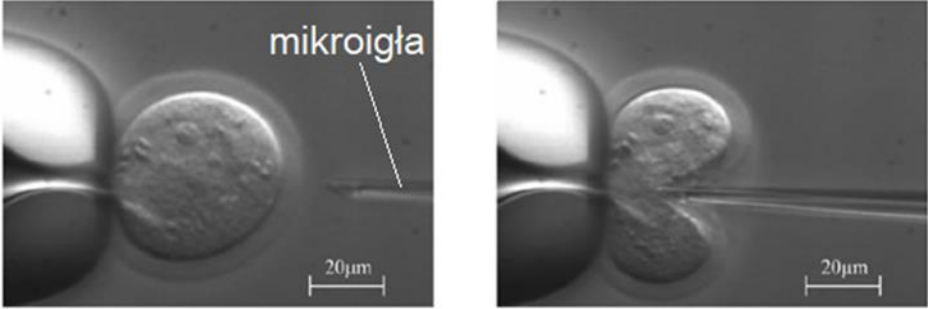
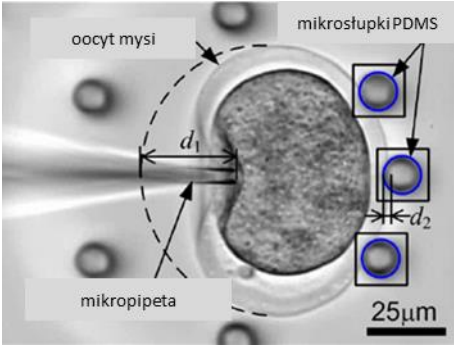
różnic w rozmiarze, kształcie i odkształcalności pomiędzy komórkami [106-108]. W układzie mikrofluidycznym wytwarzane są mikrostruktury, które ustawione są w szeregach w kanale przepływowym, w określonych odległościach. Znaczenie ma geometria mikrostruktur, które pełnią rolę przeszkód. Definiuje ona charakter poruszania się przepływających komórek pomiędzy słupkami oraz drogę jaką te komórki przebędą. Obserwacja pojedynczych komórek w obrębie całej populacji jest utrudniona, istnieje również ryzyko nachodzenia na siebie komórek podczas przechodzenia i przeciskania się pomiędzy przeszkodami. Wynikiem końcowym działania tego układu jest gromadzenie się komórek po przejściu przez układ mikrofluidyczny z przeszkodami. Nie jest to zatem metoda, która umożliwia bezpośrednie wyznaczenie parametrów mechanicznych komórki, a jedynie jakościowe porównanie komórek pomiędzy sobą.

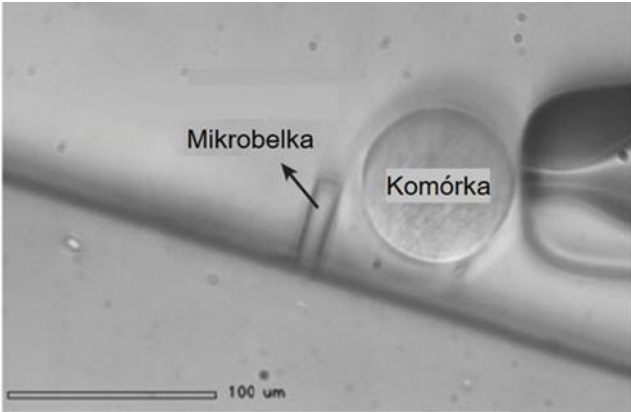
Obecnie najczęściej badanymi komórkami przy użyciu metod mikrofluidycznych są „małe komórki” (o średnicy około 10-30 μm), takie jak komórki CTC (krążące komórki nowotworowe), czy krwinki. Wiąże się to głównie z kompatybilnością naturalnego środowiska tych komórek z systemem pomiarowym opartym na rozwiązaniach mikrofluidycznych oraz możliwością precyzyjnej kontroli zarówno przemieszczania się komórki jak i przepływu cieczy w układzie mikrofluidycznym. Znacznie rzadziej podejmowane są badania właściwościami mechanicznymi „większych komórek”, takich jak oocyty ssaków (~50-150 μm). Niektóre metody „tradycyjne” i mikrofluidyczne zostały wykorzystane do badań właściwości mechanicznych oocytów i zarodków. Metody te zostały opisane w następnym podrozdziale.

2.4 Mikroinżynierskie metody badania mechanicznych właściwości oocytów

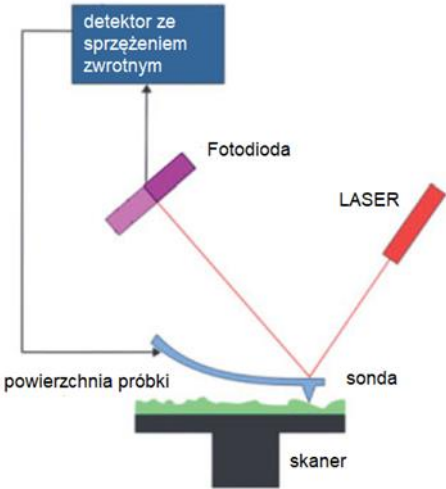
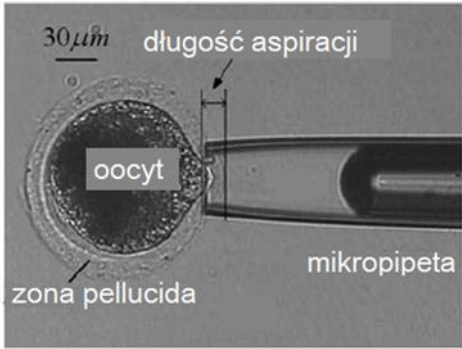
Badania mechaniczne oocytów prowadzono dotychczas z wykorzystaniem różnych instrumentów wykonanych technikami mikroinżynierskimi (Tab. 2.9). Wymiary charakterystyczne opracowanych instrumentów odpowiadają wymiarom badanych oocytów i pozwalają na manipulowanie komórkami i kontrolowanie środowiska (np. temperatury, pH, przepływu medium). Warto jednak podkreślić, że nie ma standardowej metodologii określania właściwości mechanicznych oocytów. Opublikowane dotychczas wyniki badań eksperymentalnych są trudne do porównania ze względu na różne bodźce mechaniczne stosowane do deformacji komórek oraz metody pomiaru parametrów mechanicznych komórek.

Tab. 2.9 Wybrane metody badań oocytów z wykorzystaniem technik mikroinżynieryjnych

Przykład 1.	Mikroigła połączona z czujnikiem siły			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
punktowy	40 szt.	brak informacji	mysi	[109] / 2003
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	<p>Zbadano mysie oocyty o wymiarach 52-61 μm. Każdy oocyt został unieruchomiony przy użyciu mikropipety, która częściowo zasysa komórkę do wewnątrz, a następnie ścisnana jest punkowo przy użyciu igły i czujnika. Czujnik siły wykonany jest w technologii MEMS i wyposażony w system do mikrorobotycznej manipulacji sondą. Przy wgłębieniu sondy w komórkę na około 45 μm dochodzi do przebicia osłonki przejrzystej. Największą wartość siły z jaką sonda napiera na komórkę zmierzono tuż przed przebiciem osłonki, wynosiła ona około 7,5 μN. W wyniku pomiarów otrzymano krzywe zależności siły napierającej na komórkę (w μN) od uzyskanego wgłębienia sondy w komórkę (odkształcenia w μm).</p>			
Przykład 2.	Ugięcie mikroslupków PDMS i wgniecenie mikroigłą			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
punktowy	40 szt.	brak informacji	mysi	[110] / 2010
Ilustracja				

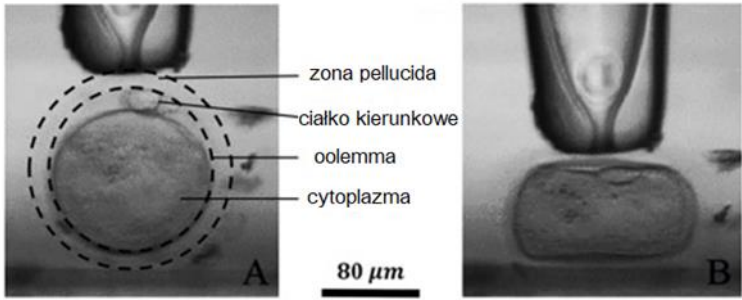
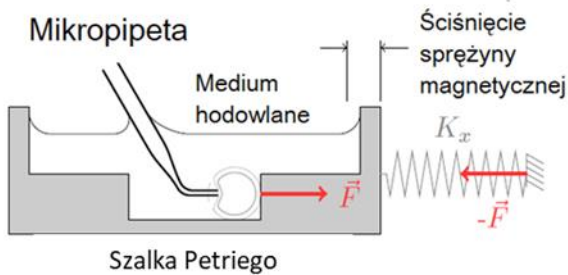
Opis metody i wyniki	<p>Oocyt znajduje się w zbiorniku otoczony przez mikroślupki wykonane z polimeru PDMS. Na oocyt napiera mikroigła, która powoduje przesuwanie się komórki</p> <p>w kierunku słupków i ich odkształcanie proporcjonalne do zadanej przez mikroigłę siły. Do pomiaru ugięcia słupka PDMS zastosowano techniki przetwarzania obrazu, a do odwzorowania ugięć słupka na siły komórkowe korzystano z modelu mechanicznego wspornika o właściwościach materiałowych odpowiadającym PDMS. Średnia wartość średnicy oocytów wynosiła 96 μm, a wgłębienie mikropipety wynosiło podczas każdego pomiaru 25 μm. W wyniku pomiarów możliwe było rozróżnienie pomiędzy grupą oocytów od młodych dawczyń, a oocytami pochodzącymi od dawczyń starszych.</p>			
Przykład 3.	Odgięcie mikrobjelki PDMS i wgniecenie mikropipetą			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
punktowy	11 szt.	brak informacji	mysi	[111] / 2013
Ilustracja	 <p>The image is a grayscale micrograph showing a biological cell (labeled 'Komórka') positioned next to a narrow channel (labeled 'Mikrobjelka') in a PDMS substrate. An arrow points from the label 'Mikrobjelka' to the channel. A scale bar at the bottom left indicates 100 μm.</p>			
Opis metody i wyniki	<p>Oocyt umieszczony jest przy mikrobjelce wykonanej z PDMS. Na oocyt napiera końcówka mikropipety sterowana mikromanipulatorem, co powoduje, że oocyt zaczyna przylegać do polimerowej belki. Podczas pomiaru odkształca się zarówno polimerowa belka jak i oocyt w obszarze styku z belką. Zbadanie oocytów i embrionów tą samą metodą pozwoliło na oszacowanie i porównanie sztywności i lepkości osłonki przejrzystej pomiędzy dwiema grupami. Ustalono, że zarówno sztywność jak i lepkość jest zdecydowanie niższa w przypadku oocytów niż embrionów.</p>			

Przykład 4.	Sonda z czujnikiem siły			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
punktowy	104 szt.	brak informacji	mysi	[112] / 2008
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	<p>Oocyt unieruchomiony jest przy użyciu mikromanipulatora zakończonego mikropipetą, która zasysa częściowo komórkę do wnętrza. Na przeciwko umieszczony jest czujnik siły zakończony sondą o sferycznym kształcie o średnicy 20 μm, która wbija się punktowo w komórkę. Sonda podczas każdego pomiaru powodowała wgłębienie w komórce na 10 μm. Zaobserwowano różnice w elastyczności osłonki przejrzystej pomiędzy oocytami, komórkami zapłodnionymi, a embrionami w różnym stadium rozwoju. Dla niedojrzałych oocytów otrzymano średnią wartość modułu Younga ($22,8 \pm 10,4$ kPa), zaś dla oocytów dojrzałych ($8,26 \pm 5,22$ kPa).</p>			
Przykład 5.	AFM			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
punktowy	20 szt.	wstępne testy	ludzki	[113] / 2016
Ilustracja				

Opis metody i wyniki	Pomiary dojrzałych oocytów zostały wykonane metodą spektroskopii sił. Sonda zakończona mikrosferą o średnicy 4,5 μm dociskała powierzchnię komórki z maksymalną siłą o wartości 2 nN. Wykazano różnice w średniej wartości modułu Younga dla oocytów dojrzałych i niedojrzałych, także tych odrzuconych jak i zakwalifikowanych do zapłodnienia.			
Przykład 6.	AFM			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
punktowy	10 szt.	brak informacji	świni	[114] / 2014
Ilustracja	 <p>Schemat układu pomiarowego AFM. Wykazuje on skaner, powierzchnię próbki, sondę, laser, fotodiody i detektor ze sprzężeniem zwrotnym.</p>			
Opis metody i wyniki	Do pomiaru wykorzystano sondę o średnicy 10 nm, która z różną prędkością naciskała na badaną komórkę (0,5-10 $\mu\text{m/s}$). Pomiaru dokonano w 250 różnych punktach na 10 oocytach. Zaobserwowano różnice pomiędzy kolejnymi punktami pomiarowymi w obrębie tej samej komórki.			
Przykład 7.	Aspiracja mikropipetą			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
częściowy	26 szt.	brak informacji	świni	[115] / 2013
Ilustracja	 <p>Zdjęcie mikroskopowe aspiracji oocytu mikropipetą. Wykazuje długość aspiracji (30 μm), oocyt i zonę pellucidą.</p>			

Opis metody i wyniki	Oocyty zostały częściowo zassane do mikropipety o średnicy około 56 μm . Wyznaczono moduł Younga dla trzech grup komórek: niedojrzałych oocytów, dojrzałych oocytów oraz oocytów sześć godzin po zapłodnieniu. Stwierdzono, że wartości moduł Younga dla tych grup różnią się i wynoszą średnio $13,82 \pm 2,76$ kPa, $10,31 \pm 1,94$ kPa oraz $17,81 \pm 2,30$ kPa.			
Przykład 8.	Przewężenie mikrokanalu			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
całościowy	32 szt.	testy morfologiczne i przeżyciowe	mysi	[116] / 2015
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	Oocyty wprowadzone zostały pojedynczo do mikrokanalu z przewężeniem o wymiarze planarnym wynoszącym 50 μm . Zmierzone zostało wydłużenie komórki znajdującej się w zwężeniu oraz czas przecięnięcia się komórki przez przewężenie dla zadanej prędkości przepływu cieczy przez układ mikrofluidyczny.			
Przykład 9.	Deformacja płaską sondą i sensor siły			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
całościowy	30 szt.	brak informacji	krowi	[117] / 2015
Ilustracja				

Opis metody i wyniki	<p>Pomiar właściwości mechanicznych oocytów wykonany został w zintegrowanym z mikrorobotem układzie mikroprzepływowym. Komórka przemieszcza się w kanale mikrofluidycznym w kierunku obszaru z sondą i czujnikiem siły. Oocyt zostaje następnie ściśnięty przez płaską sondę i dociśnięty do czujnika siły, który mierzy siłę reakcji oocytu na działanie siły ściskającej. Moduł Younga został obliczony na podstawie przemieszczenia się czujnika siły i odkształcenia oocytu. Zbadano wpływ czasu pomiędzy pobraniem oocytów od dawczyni, a rozpoczęciem hodowli komórkowej na zmianę właściwości mechanicznych oocytów (2-18 dni). Nie uzyskano znaczących różnic pomiędzy grupami, wartości wynosiły 4-9 kPa.</p>			
Przykład 10.	Wgniecenie sondą, ściskanie pomiędzy dwiema płytkami			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
całościowy	67 szt.	brak informacji	świni	[118] / 2018
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	<p>Z wykorzystaniem mikromanipulatora zakończonego sferą lub płaską sondą, badany oocyt jest dociskany do czujnika siły. Komórka podczas pomiaru jest unieruchomiona przy użyciu mikropipety, która zasysa komórkę. Deformacja komórki obserwowana jest przy użyciu odwróconego mikroskopu, co pozwala na wyznaczenie właściwości geometrycznych komórki.</p>			

Przykład 11.	Wgniecenie sondą, ściskanie pomiędzy dwiema płytkami			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
całościowy	-	brak informacji	ludzki	[119] / 2019
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	Oocyty zostały dociśnięte do ścianki szalki Petriego przy użyciu końcówki mikropipety o średnicy mniejszej od średnicy komórek oraz sondy zakończonej sferą. Zaobserwowano odkształcenia cytoplazmy i osłonki przejrzystej, a następnie opisano je za pomocą uproszczonego modelu Herza.			
Przykład 12.	Ściskanie mikropipetą oraz sondą			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
całościowy	4 szt.	testy przeżyciowe	ludzki	[120] / 2014
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	W tym rozwiązaniu wykorzystano czujnik siły złożony ze sprężyn magnetycznych. Mikropipeta dociska badany oocyt do krawędzi platformy zawieszonyj na sprężynach. W celu zmierzenia siły przyłożonej do oocytu zmierzono wartość ściśnięcia magnetycznych sprężyn. Zmierzone zostały wartości sztywności dla łącznie 4 oocytów.			

Przykład 13.	Metoda separacyjna w układzie mikroprzepływowym			
Obszar pomiaru	Liczba komórek	Przeżywalność	Typ oocytu	Źródło / Rok
populacyjny	93 szt.	testy przeżyciowe	krowi	[121] / 2018
Ilustracja				
Opis metody i wyniki	<p>Grupa oocytów wprowadzana jest do układu mikrofluidycznego głównym mikrokanalem. Dwoma sąsiadującymi kanałami wprowadzany jest do kanału głównego bufor sacharydowy. Na długości 10 mm dochodzi do separacji komórek o lepszej jakości, od tych zakwalifikowanych jako niezdatne do zapłodnienia. Kanał główny następnie rozdziela się na dwie odrębne „ścieżki”. Zaobserwowano, że oocyty lepszej jakości charakteryzują się wyższą szybkością sedimentacji w roztworze hipertonicznym, w związku z tym kierują się do jednego z kanałów wylotowych.</p>			

Analizując powyższą tabelę zaobserwować można, że do badań oocytów wciąż wykorzystywane są metody „tradycyjne”, oparte na wykorzystaniu mikroskopii sił atomowych [113, 114], czy manipulacji komórką poprzez kontrolowane odsysanie za pomocą mikropipety [115]. Istnieją także rozwiązania opierające się na technologiach mikro- i nanoinżynierskich pozwalających na wytwarzanie mikrostruktur w takich materiałach jak szkło, krzem, czy różnego rodzaju polimery (tutaj głównie PDMS) [110-112, 118-120].

Część z opisanych wyżej metod wykorzystuje do badań struktury wyposażone w układy mikrofluidyczne. Umożliwia to precyzyjną kontrolę środowiska, w którym dokonywany jest pomiar oraz manipulowanie pojedynczymi komórkami lub całą ich populacją [115, 121]. Ponadto, wykorzystanie techniki mikrofluidycznej stwarza możliwość zautomatyzowania pomiarów i przeprowadzania ich w znacznie większych przepustowościach w porównaniu do AFM lub mikropipetowania.

Metody badawcze oparte na mikroinżynierii umożliwiają precyzyjną, mikrorobotyczną manipulację mikrosondami ściskającymi komórkę i wykorzystanie układów sensorycznych do pomiarów siły oddziałującej na komórkę [109, 117]. Wprowadzenie zintegrowanych układów elektronicznych i mechanicznych (MEMS) do urządzeń badawczych pozwala na aktywną manipulację oocytem w układzie mikrofluidycznym oraz na dostosowanie stopnia deformacji do rozmiarów komórki.

Warto jednak zaznaczyć, że wyżej opisane metody wymagają wykorzystania dodatkowego oprzyrządowania umożliwiającego sterowanie przepływem cieczy, czy manipulację sondą. Powoduje to rozbudowanie urządzenia bądź stanowiska pomiarowego o dodatkowe komponenty. Konieczność sterowania kilkoma modułami wymusza także korzystanie z wyspecjalizowanego oprogramowania przeznaczonego oddzielnie dla każdego z nich. W praktyce, istniejące rozwiązania służą badaniom wstępnym i nie są rozwijane w stopniu umożliwiającym skorzystanie z zalet opisywanych metod i technologii.

Większość przedstawionych w Tab. 2.9 rozwiązań polega na pomiarze siły z jaką oddziałuje deformowany oocyt dociskany do czujnika siły [109, 113, 117, 118, 120] bądź PDMS-owej belki [110, 111]. Metody badawcze, w których przeprowadza się obserwację i analizę obrazu deformowanej komórki dokonywane są w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku ściskania. Uniemożliwia to często identyfikację i rozróżnienie zmian zachodzących w organellach komórki widocznych podczas deformacji [118, 119]. W przypadku rozwiązań, które polegają na wykorzystaniu przewężenia w mikrokanale [116] bądź zależności wynikających z przepływu mikrofluidycznego w mikrostrukturach, możliwe jest rozróżnienie jakościowe pomiędzy oocytami [121].

Ponadto, oocyty wykorzystane w badaniach należą do różnych gatunków ssaków, charakteryzują się różnym stopniem dojrzałości. Wiek i stopień dojrzałości dawczyń zwykle nie jest brany pod uwagę przy pobieraniu materiału biologicznego do badań. Liczba zbadanych oocytów z wykorzystaniem określonej metody badawczej ma wpływ na wiarygodność skuteczności przeprowadzonych eksperymentów, stąd też wyniki przedstawione dla kilku komórek nie należą do miarodajnych. Każda z zaproponowanych metod badawczych wymaga kompleksowych badań z użyciem dużej liczby komórek.

Kolejną kwestią do rozpatrzenia jest przeżywalność badanych komórek podczas deformacji. Jeżeli metoda badawcza ma służyć klasyfikacji jakościowej oocytów, to komórki nie mogą ulec jakimkolwiek uszkodzeniom podczas pomiarów. W większości danych eksperymentalnych brakuje informacji dotyczącej badań nad przeżywalnością

oocytów. Natomiast tam, gdzie możliwość uszkodzenia komórki przez ściśnięcie jest brana pod uwagę, przeprowadza się testy przeżyciowe i morfologiczne.

Czynnikiem wpływającym na przeżywalność i potencjalne zmiany właściwości mechanicznych oocytów jest również biokompatybilność materiałów, z których wytworzone są mikrostruktury, a także parametry środowiskowe podczas przeprowadzanych badań. W przedstawionych rozwiązaniach nie podejmuje się kwestii potencjalnej cytotoksyczności urządzeń, w których przeprowadzane jest ściskanie komórek. Ponadto, nie uwzględnia się wpływu czasu badania pojedynczej komórki, czyli czasu w jakim komórka przebywa poza standardowymi warunkami laboratoryjnymi podczas procedury IVM.

Jedną z charakterystycznych cech rozróżniających istniejące metody badań oocytów jest obszar pomiaru. Część metod skupia się na pomiarze mechanicznych właściwości jedynie zewnętrznej części oocytu – osłonki przejrzystej. Wówczas deformacja komórki jest stosunkowo niewielka i obejmuje punktowo powierzchnię komórki, jak w przypadku metod AFM lub odkształca tylko niewielki obszar komórki poprzez zassanie mikropipetą. Istnieją również metody wykorzystujące sondę do naciskania na komórkę bądź przyciskania komórki do wyznaczonej powierzchni, gdzie deformuje się jedynie niewielki obszar oocytu w skali całej jej objętości. Badania te nie rozpatrują deformacji i obserwacji organelli wewnątrz oocytu.

Metody badawcze ściskające komórkę całościowo pomiędzy dwoma równoległymi do siebie powierzchniami dotyczą badania oocytu podczas ściśnięcia w całej jego objętości bez rozróżnienia wpływu deformacji na poszczególne jego elementy. Elementem dociskającym jest często mikropipeta bądź sonda wyposażona w czujnik siły, których średnica jest mniejsza od średnicy oocytu. Powoduje to, że oocyt jest ściskany nierównomiernie i w wyniku deformacji sonda „wbija się” w komórkę. W takiej sytuacji rozróżnianie i pomiar deformacji osłonki przejrzystej i wnętrza komórki jest nieprecyzyjny.

Przeciskanie oocytu przez przewężenie kanału mikrofluidycznego sprawdza się jedynie pod warunkiem, że każda komórka ma jednakowe wymiary. W innym przypadku każdy oocyt poddawany jest ściśnięciu w różnym stopniu, co powoduje, że porównanie czasu przejścia komórki przez przewężenie jest niemiarodajne.

Dodatkowo, wśród metod mikrofluidycznych wyróżnić można rozwiązanie wykorzystujące odkształcalność komórek w całej populacji oocytów przepływających przez układ mikrofluidyczny o zadanych właściwościach środowiskowych. W tym badaniu kierunek przepływu komórek różni się w zależności od właściwości mechanicznych

oocytów. W wyniku tego dochodzi do segregacji oocytów na dwie grupy bez rozpatrywania odkształcalności poszczególnych elementów pojedynczych komórek. Wśród przedstawionych metod rozwiązania mikrofluidyczne charakteryzują się najwyższą przepustowością pomiarów. Ograniczeniem tychże rozwiązań jest jakościowa i pośrednia parametryzacja właściwości mechanicznych oocytów poprzez określenie szybkości lub charakteru przepływu komórki w układzie mikrofluidycznym.

Każde z wyżej przedstawionych metod skupia się jedynie na wybranych aspektach deformowalności oocytu nie podejmując się kompleksowej charakteryzacji właściwości mechanicznych komórek. W związku z tym znajdują one zastosowanie przede wszystkim do badań wstępnych i oceny możliwości wykorzystania danej metody w kompleksowym badaniu oocytów. Metody te umożliwiły określenie niektórych czynników wpływających na deformację komórki jak np. stopień dojrzałości oocytu oraz pozwoliły na częściową ocenę potencjału biologicznego oocytów wspomagającą wybór oocytów do sztucznego zapłodnienia.

2.5 Analiza krytyczna rozwiązań i cel pracy

Rozwój nowoczesnych metod badawczych wykorzystujących nano- i mikroinżynierię umożliwia badanie wybranych właściwości mechanicznych komórek i określenie roli, jaką pełnią one w ocenie potencjału biologicznego zarówno pojedynczej komórki, jak i całego żywego organizmu. Stan biologiczny i właściwości mechaniczne każdej komórki służą jako wskaźnik stanu chorobowego komórki, a także służą do oceny ich dojrzałości lub do określenia cyklu życia komórki. Metody badania właściwości mechanicznych komórek obejmują między innymi tradycyjną manipulację materiałem biologicznym poprzez kontrolowane odsysanie za pomocą mikropipety czy metodę XXI wieku z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych. Ze względu na niejednorodność komórek w całej ich objętości, a także zróżnicowanie w obrębie populacji, konieczne jest badanie pojedynczej komórki w obrębie całej populacji (np. krwinki czerwone lub komórki nowotworowe) lub pojedynczych komórek o znacznym potencjale biologicznym (np. oocyty zwierzęce). Urządzenia MEMS są atrakcyjną alternatywą dla „tradycyjnych” eksperymentalnych metod badań komórek ze względu na dostosowanie skali mikroinstrumentu do wymiarów charakterystycznych badanych obiektów biologicznych. Systemy mikroprzepływowe i mikromechaniczne umożliwiają analizę w czasie rzeczywistym odpowiedzi komórek na bodziec mechaniczny z precyzyjną kontrolą

parametrów środowiska pomiarowego. Ponadto przepustowość metody może być znacznie większa niż w przypadku metod konwencjonalnych. Zintegrowane i zautomatyzowane systemy MEMS nie wymagają obsługi urządzenia przez wysoko wykwalifikowanych pracowników, a także minimalizują możliwość popełnienia błędów podczas ich użytkowania. Jednak istniejące rozwiązania techniczne i metodologiczne nie uwzględniają niektórych czynników wpływających na odkształcalność komórek i często powodują uszkodzenia materiału biologicznego podczas badań. Brak jest również informacji o analizach porównawczych między metodami badawczymi z wykorzystaniem MEMS, a innymi metodami referencyjnymi.

Analiza krytyczna rozwiązań mikroinżynierskich i metodologii badawczych opisywanych w literaturze przedmiotu dotyczących badania właściwości mechanicznych oocytów wskazuje na z jednej strony aktualność i zainteresowanie poruszaną tematyką, a z drugiej strony powielanie stałych schematów badawczych i technicznych. Schematy te można podzielić na dwie grupy.

Grupa pierwsza to metody badawcze dające możliwość parametryzacji (ocena jakościowa) właściwości mechanicznych wykorzystując pomiar (pośredni lub bezpośredni) siły działającej na oocyt. W tym celu wykorzystuje się często aktuatory siły i czujniki siły w postaci struktur MEMS. Unieruchomienie badanej komórki, niezbędne do przeprowadzenia kontrolowanego ściskania, realizowane jest przez zasysanie komórki (mikropipetowanie) lub zatrzymanie na fizycznej przeszkodzie (mikrosłupki lub przegroda). W przypadku takich konstrukcji część mikrofluidyczna nie jest kluczowa. Ponadto, w metodach tych dominuje pomiar siły (jeden parametr), a obrazowanie deformacji komórki nie jest głównym nośnikiem informacji na temat właściwości mechanicznych badanej komórki. Relacjonowane w literaturze przedmiotu liczby badanych komórek zawierają się w zakresie od kilku do kilkudziesięciu komórek, co często nie jest statystycznie miarodajnym wynikiem.

Grupa druga to układy mikrofluidyczne, w których właściwości mechaniczne określa się na podstawie czasu przejścia przez zwichnięcia/przeszkodę, deformacje w strumieniu cieczy lub uzyskanie ilościowego efektu działania układu mikrofluidycznego (sortowanie oocytów). W rozwiązaniach wykorzystujących układy mikrofluidyczne brak jest zintegrowanych aktuatorów/czujników. W metodach tych wykorzystywana jest analiza obrazu „przeciskanej” lub deformowanej komórki, a wynikiem tej analizy jest zwykle jeden parametr (np. współczynnik deformacji). Ponownie, w odniesieniu do oocytów, liczba badanych komórek nie przekracza kilku lub kilkudziesięciu sztuk.

Mimo zatem różnorodności relacjonowanych w literaturze przedmiotu metod badawczych i towarzyszących im mikroinżynierskich rozwiązań instrumentów analitycznych, nadal poszukiwane są nowe rozwiązania techniczne i metodologie, w tym łączące rozwiązania mikrofluidyczne i mikromechaniczne (MEMS). Główną motywacją autora niniejszej rozprawy jest zatem połączenie rozwiązań mikrofluidycznych w zakresie zarządzania przepływem komórki i mikromechanicznych do kontrolowanej deformacji komórki w ramach mikrocytometru typu MEMS umożliwiającego wieloparametryczne badanie oocytów świńskich z wykorzystaniem analizy obrazu deformowanej komórki. W ramach rozprawy doktorskiej podjęto badania nad nowym rozwiązaniem (technicznym i metodologicznym) wykorzystującym technikę kontrolowanej deformacji oocytów zwierzęcych w układzie mikroprzepływowym i mikromechanicznym oraz metodologią określania odkształcenia komórek z wykorzystaniem analizy obrazu w typowym systemie mikroskopu biologicznego.

Celem niniejszej pracy jest opracowanie oryginalnej i autorskiej konstrukcji, technologii i metodologii badawczej mikrocytometru typu MEMS do badania właściwości mechanicznych ściskanych oocytów. Realizacja tego celu wymaga przeprowadzenia kompleksowych prac badawczych obejmujących:

- opracowanie założeń funkcjonalnych, projektowych i technicznych,
- opracowanie konstrukcji i technologii oraz charakteryzacja elementów mikromechanicznych, mikrooptycznych i mikrofluidycznych opracowanego mikrocytometru,
- integrację mikrostruktur do postaci mikrocytometru odkształceniowego,
- opracowanie i badania układów oraz algorytmów sterowania pneumatycznego i fluidycznego dla mikrocytometru,
- badania deformowalności oocytów przy użyciu opracowanego mikrocytometru.

W kolejnych rozdziałach opisano wyniki badań własnych zgodnie z przedstawioną wyżej kolejnością.

3 Konstrukcja, technologia i właściwości mikrocytometru

W rozdziale tym zdefiniowano założenia pracy oraz plan badań. Zaproponowano trzy różne konstrukcje mikrocytometru odkształceniowego. Opisano przeprowadzone badania technologiczne i optymalizacyjne poszczególnych elementów mikrocytometru tj. membrany krzemowej, układu mikrofluidycznego ze strukturą pułapkującą oraz struktur mikrooptycznych do sprzęgania wiązki laserowej w mikrocytometrze. Przedstawiono metody integracji poszczególnych elementów mikrocytometru oraz wyniki weryfikacji działania wszystkich konfiguracji. Ponadto zaprezentowano układ kontrolno-pomiarowy oraz oprogramowanie do analizy danych.

3.1 Założenia pracy i plan badań

Na podstawie przeprowadzonej analizy literatury przedmiotu przyjęto szereg założeń dotyczących funkcjonalności, projektu konstrukcji i technologii mikrocytometru (Tab. 3.1). Założono, że mikrocytometr powinien umożliwić ściśnięcie badanej komórki o precyzyjnie zadaną wartość procentową z dokładnością ugięcia aktuatora do pojedynczych mikrometrów. Ściskanie to powinno odbywać się pomiędzy dwoma płaskimi, równoległymi względem siebie powierzchniami. Przyjęto, że będą to ruchoma membrana i nieruchoma powierzchnia tworzące komorę pomiarową. Obydwa te elementy będą tworzyć układ mikromechaniczny cytometru. Założono również, że podczas pomiarów uwzględniona zostanie wielkość badanej komórki tak, aby komórki ściskane były w jednakowym stopniu.

Wymiary układu mikrofluidycznego, w którym przemieszczać będzie się komórka, powinny być dostosowane do przeciętnej średnicy oocytów świń (110-150 μm). Układ ten umożliwić ma wprowadzenie, pozycjonowanie w komorze pomiarowej oraz nieniszczące wyprowadzenie badanego oocytu.

Przyjęto, że w opracowanym mikrocytometrze możliwe będzie obserwowanie deformacji każdej komórki oraz jej mechanicznej parametryzacji przez obrazową detekcję optyczną. Podczas deformacji oocytu badane będą jego elementy widoczne w trybie mikroskopii odbiciowej (osłonka przejrzysta, ooplazma oraz ciało kierunkowe), a także organelle wewnątrz komórki, widoczne po zabarwieniu w trybie mikroskopii

fluorescencyjnej. Do zrealizowania tego celu wytworzone zostaną struktury mikrooptyczne pozwalające na sprzężenie wiązki laserowej do struktury mikrofluidycznej z oocytem.

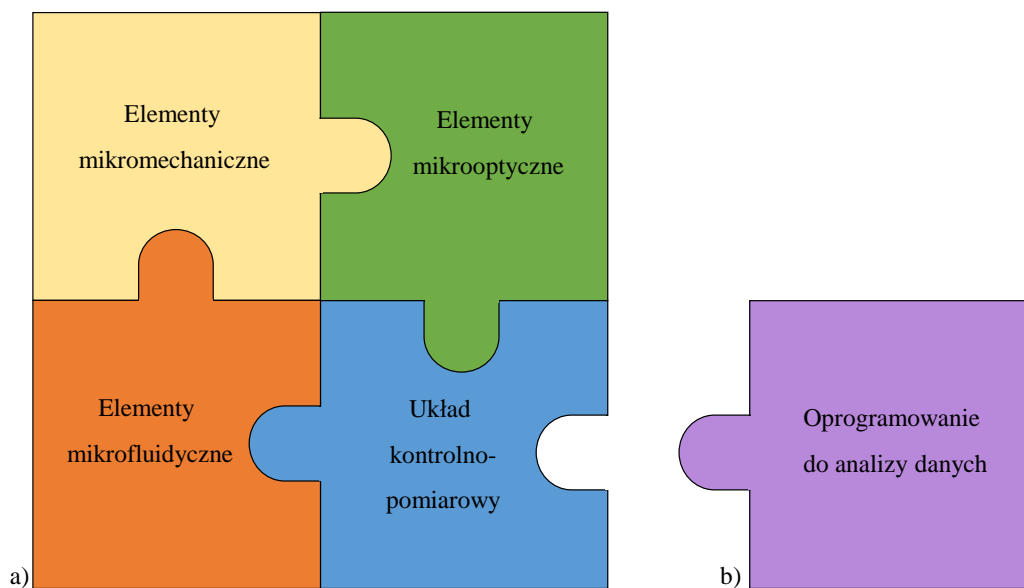
W celu wykorzystania mikrocytometru do potencjalnych badań nad określaniem potencjału biologicznego oocytów, pomiar deformacji komórek nie powinien niszczyć ich w wyniku przzerwania osłonki przejrzystej, ani uszkadzać poprzez trwałe odkształcenie poszczególnych organelli komórek. Stąd też konieczne będzie kontrolowanie procesu ściskania i zbadanie wpływu ściskania oocytu na mierzone parametry geometryczne przed pomiarem i określenie ewentualnych zmian w kształcie czy rozmiarze komórki po jej ściśnięciu. Dodatkowo, przeprowadzone zostaną badania polegające na obserwacji morfologicznych zmian w komórkach podczas ściskania. Efektem końcowym badań uszkodzeń oocytów będzie określenie bezpiecznego zakresu ich ściskania.

Realizacja celu pracy wymaga opracowania i integracji elementów mikromechanicznych, mikrooptycznych, a także mikrofluidycznych w cytometrze (Rys. 3.1). Działania badawcze podjęte w ramach tej pracy uwzględniają: projektowanie i modelowanie numeryczne mikrostruktur, wytwarzanie i badanie niezależnie poszczególnych komponentów mikrocytometru, a następnie ich optymalizację i integrację w kompletną platformę do badania oocytów. Z mikrocytometrem współpracować będzie układ kontrolno-pomiarowy służący do obserwacji badanej komórki, rejestrowania danych pomiarowych i sterowania parametrami pracy mikrocytometru (m. in. ugięciem membrany krzemowej). Aktuacja membrany generującej odkształcenie komórki zrealizowana będzie przez sterowanie pneumatyczne. Częścią mikrocytometru może być również zintegrowany czujnik ugięcia membrany, co pozwoli na dostosowanie stopnia ściśnięcia komórki do jej wielkości.

Założono, że do wytworzenia poszczególnych mikrostruktur cytometru wykorzystane zostaną krzem i szkło, z uwagi na dostęp do mikroinżynierskich technologii obróbki tych materiałów oraz ich biologiczną neutralność z badanymi obiektami biologicznymi. Istotną częścią mikrocytometru jest oprogramowanie do analizy obrazu. Jednakże, ze względu na złożoność algorytmów analizy jest to temat osobnej rozprawy doktorskiej autorstwa mgra inżyniera Danylo Lizanetsa.

Tab. 3.1 Główne założenia dotyczące funkcjonalności, projektu i technologii mikrocytometru

Funkcjonalne	Projektowe	Techniczno-technologiczne
Prowadzenie badań z materiałem biologicznym	Biokompatybilność mikrocytometru	Uwzględnienie biokompatybilności wykorzystanych materiałów do wytworzenia mikrostruktur cytometru
	Możliwość sterylizacji mikrocytometru	Określenie procedury czyszczenia i przechowywania mikrocytometru po każdej serii badań
Badanie i parametryzacja deformacji oocytów świni	Wytworzenie struktury, która umożliwia badanie obiektów o średnicy 110-150 μm	Wykorzystanie technik mikroinżynierskich i obserwacja mikroskopowa
Równomierne ściśnięcie oocytu w całej jego objętości	Ściskanie komórki pomiędzy dwiema płaskimi, równoległymi względem siebie powierzchniami	Wytworzenie membrany krzemowej ze wzmocnieniem tworzącą płaską powierzchnię struktury podczas uginania
	Pozycjonowanie oocytu w strukturze mikrofluidycznej	Wytworzenie mikrostruktury pozycjonującej komórkę w obszarze wzmocnienia membrany
Możliwość ściśnięcia oocytu do 80% wartości średnicy komórki	Zaprojektowanie membrany krzemowej o wymiarach umożliwiających ugięcie do 120 μm	Modelowanie odkształceń i naprężenia w krzemowej membranie, optymalizacja konstrukcji i technologii
Precyzyjna kontrola stopnia ściśnięcia komórki	Określenie zależności wartości ugięcia membrany (μm) od ciśnienia sterującego (kPa)	Pomiar ugięcia membrany, uwzględnienie wpływu typu cieczy wypełniającej kanał oraz obecności komórki w obszarze ściskania
Pomiar nieniszczący, umożliwiający dalsze wykorzystanie oocytów	Monitorowanie ugięcia membrany umożliwiające badanie bezpiecznej wartości ściśnięcia oocytów	Obserwacja potencjalnych uszkodzeń komórki oraz badanie zmian geometrycznych parametrów komórki przed i po ściśnięciu
Prowadzenie pomiaru w trybie mikroskopii fluorescencyjnej	Sprzęganie wiązki światła do struktury mikrofluidycznej	Wytworzenie mikrostruktur optycznych w szkłe zintegrowanych z mikrocytometrem



Rysunek 3.1 Elementy składające się na mikrocytometr odkształceniowy: a) opisane w niniejszej pracy, b) przedstawione w rozprawie Danylo Lizanetsa

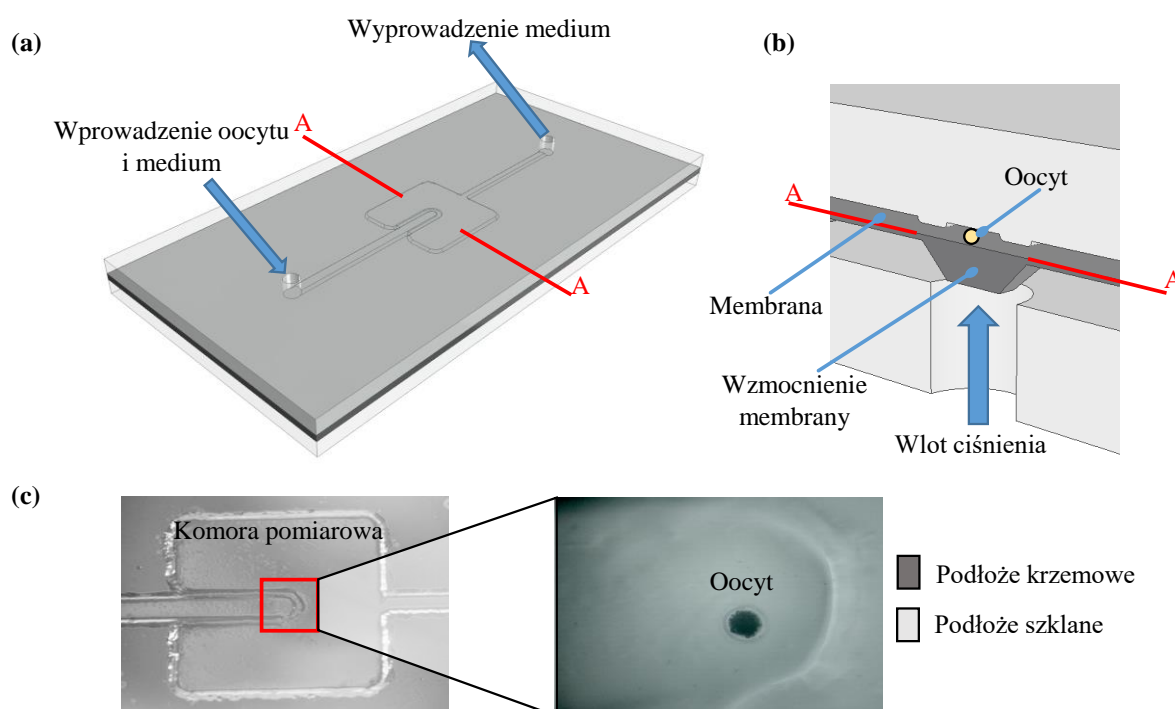
Badania nad możliwością wieloparametrycznej mechanicznej charakteryzacji komórek będą obejmowały wyznaczanie wybranych parametrów geometrycznych deformowanej komórki oraz poszukiwanie zależności pomiędzy morfologicznymi cechami komórki, a ich potencjałem biologicznym. Poddane obserwacji zostaną różne organelle komórki w celu badania potencjalnych różnic w ich zachowaniu podczas ściskania i mechanicznej parametryzacji komórki w ujęciu nie tylko globalnym, ale z uwzględnieniem lokalnych zmian w poszczególnych organellach.

3.2 Projekt i technologia komponentów mikrocytometru

Jak wspomniano wcześniej zaprojektowany mikrocytometr w zasadniczej części składa się z układu mikroprzepływowego wytworzonego w szklanym podłożu, układu mikromechanicznego wytworzonego w podłożu krzemowym oraz komory pneumatycznej utworzonej z dodatkowego szklanego podłoża, które razem są trwale połączone w procesie bondingu anodowego. Badaną komórkę wprowadza się przez otwór w górnym szklanym podłożu do mikrokanalu, a następnie układem mikrofluidycznym jest ona kierowana do komory pomiarowej i pozycjonowana w jej centralnej części (Rys. 3.2 oraz Rys. 3.3).

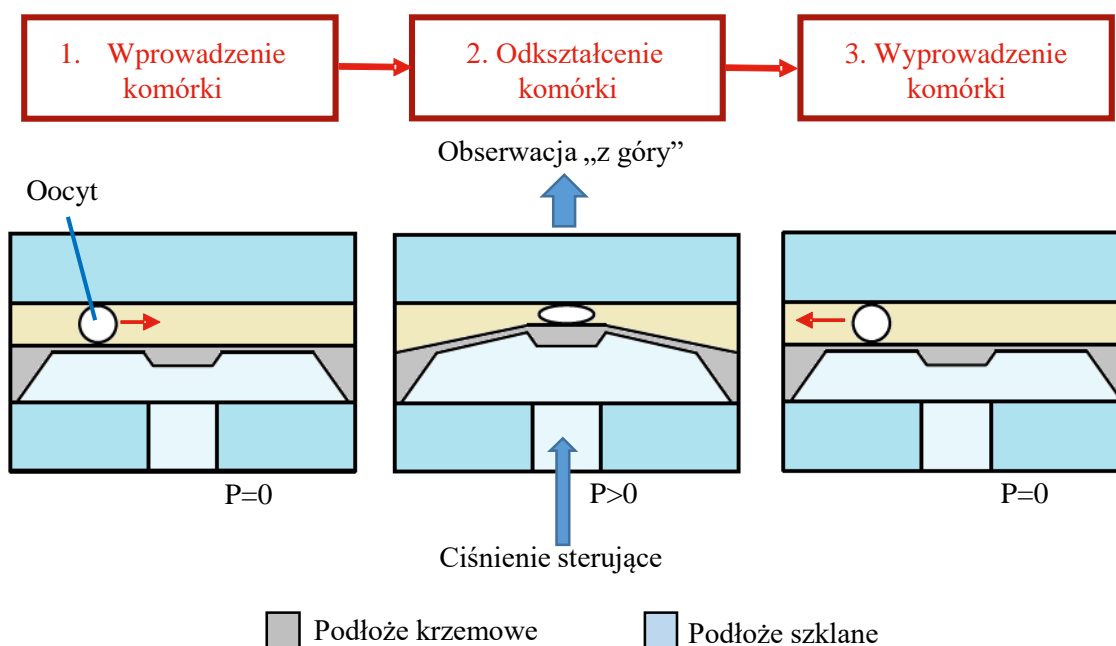
Prawidłowe spozycjonowanie oocytu w obszarze wzmocnienia membrany jest operacją krytyczną, ponieważ jest to obszar, w którym membrana krzemowa pozostaje płaska podczas uginania. Schematyczny przekrój przez strukturę mikrocytometru

z „uwięzionym” oocytem pokazano szczegółowo na (Rys. 3.2). Mikrostruktura pałapkowa wykonana w szklanym podłożu zapewnia prawidłowe ułożenie oocytu podczas pomiaru. Struktura mikromechaniczna, która ścisną komórkę, jest sterowana pneumatycznie. Dolne szklane podłoże jest trwale połączone z krzemowym podłożem, tworząc komorę pneumatyczną i umożliwiając doprowadzenie ciśnienia sterującego do membrany. Precyzyjny regulator ciśnienia o dokładności regulacji ciśnienia do 0,1 kPa umożliwia precyzyjne ugięcie membrany krzemowej ścisnącej komórkę. Po pomiarze oocyt jest wyprowadzany z mikrocytometru układem mikrofluidycznym wcześniej wykorzystanym do wprowadzania komórki.



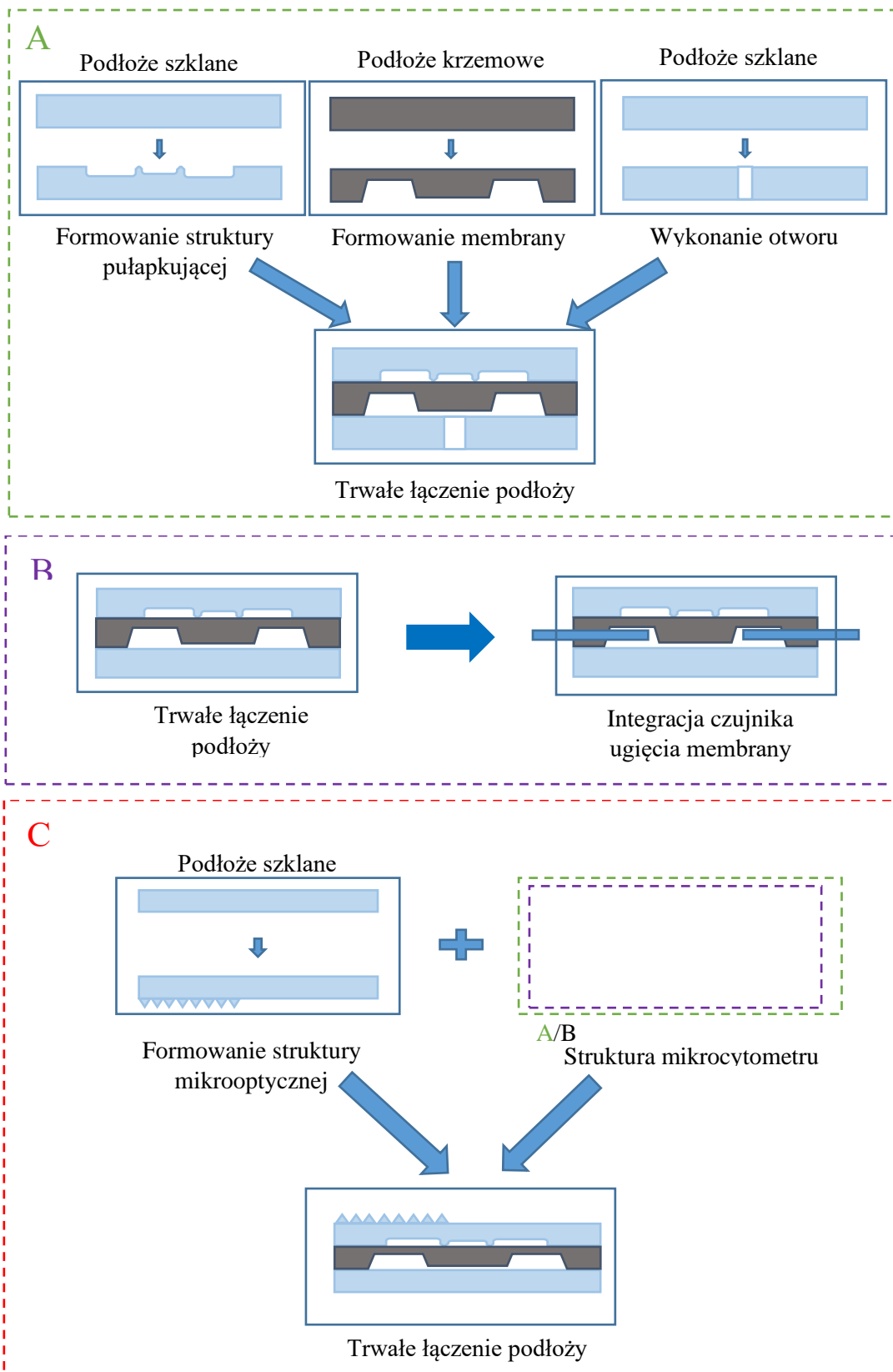
Rysunek 3.2 Mikrocytometr odkształceniowy (a) schemat chipu, (b) przekrój komory pomiarowej oraz (c) widok komory pomiarowej od góry i spulapkowany oocyt świni

Mikroskop z kamerą i dedykowanym oprogramowaniem służy do rejestrowania obrazów komórki podczas deformacji i w trakcie jej wprowadzania/wyprowadzania z chipa. Obserwację komórki przeprowadza się „z góry” przez podłoże szklane, aby scharakteryzować szczegółową strukturę oocytu (Rys. 3.3). Oprogramowanie analityczne umożliwia identyfikację komórki i jej organelli (np. osłonki przejrzystej) oraz określenie różnych parametrów geometrycznych umożliwiających określenie deformacji oocytów.



Rysunek 3.3 Schemat przekroju mikrocytometru podczas trzech etapów pomiaru deformacji komórki

Kluczowe elementy mikrocytometru to: mikrostruktura umożliwiająca pozycjonowanie komórki wewnątrz komory pomiarowej (struktura pułapkująca w szkłe), mikrostruktura pozwalająca na kontrolowane ściskanie oocytu (membrana krzemowa), oraz otwory doprowadzające do komory pomiarowej i ciśnieniowej (mikrocytometr w konfiguracji A) (Rys. 3.4). Uwzględniono także, możliwość zintegrowania z mikrocytometrem czujnika ugięcia membrany krzemowej (mikrocytometr w konfiguracji B). Opcjonalnie, górne podłoże szklane może zawierać także zintegrowane mikrostruktury optyczne pozwalające na wprowadzanie wiązki laserowej do wnętrza komory pomiarowej i tym samym na przeprowadzenie dodatkowych badań zabarwionych oocytów w trybie mikroskopii fluorescencyjnej (mikrocytometr w konfiguracji C).



Rysunek 3.4 Schemat etapów technologicznych koniecznych do wykonania struktury krzemowo-szklanej mikrocytometru: a) struktura podstawowa mikrocytometru (konfiguracja A), b) struktura wyposażona w czujnik ugięcia membrany (konfiguracja B), c) struktura z zintegrowaną strukturą mikrooptyczną (konfiguracja C)

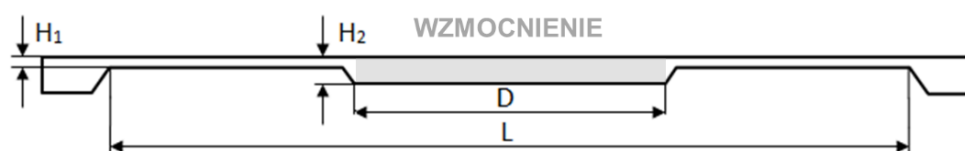
Wytworzenie każdej mikrostruktury (membrany, szklanej pułapki oraz struktur mikrooptycznych) wymaga przeprowadzenia badań technologicznych oraz zoptymalizowania poszczególnych etapów technologii tak, aby uzyskać precyzyjne wymiary poszczególnych elementów mikrocytometru dostosowanych do badanych komórek i dających łatwo zintegrować się w kompletny instrument. Konieczne jest także zweryfikowanie poprawności działania każdego z komponentów oraz zintegrowanej platformy do badania oocytów.

3.2.1 Krzemowa membrana

Membrana płaska podczas uginania uwypukla się. W celu zachowania płaskiego profilu membrany podczas ugięcia stosuje się tzw. membrany profilowane, bądź ze wzmocnieniem [122]. W przypadku, gdy obszar „płaski” stanowi niewielką część powierzchni membrany, łatwiejszym technologicznie rozwiązaniem jest wytworzenie membrany ze wzmocnieniem (tzw. *bossed*) zamiast tworzenia pofalowanej (Rys. 3.5). Prawidłowy dobór wymiarów wzmocnienia D , wraz z jego grubością H_2 , są krytyczne do uzyskania jednorodnego ściskania komórki w całej jej objętości pomiędzy dwiema równoległymi powierzchniami (Rys. 3.6).



Rysunek 3.5 Schemat przekroju membrany: a) ze wzmocnieniem (*bossed*) oraz b) pofalowanej



Rysunek 3.6 Schemat przekroju membrany ze wzmocnieniem z uwzględnieniem krytycznych wymiarów struktury: D – dł. wzmocnienia, L – dł. membrany, H_1 – grubość membrany, H_2 – grubość wzmocnienia

W pierwszym etapie badań przeprowadzono symulację ugięcia membran bez wzmocnienia w celu określenia przybliżonej wartości grubości membrany H_1 względem przyjętej wstępnie powierzchni membrany (5 mm x 5 mm). W tym celu wykorzystano

platformę do symulacji komputerowych firmy COMSOL Multiphysics. Zgodnie z oczekiwaniami symulacje wykazały, że dla mniejszych wartości grubości membrany uzyskuje się większe wartości ugięcia przy tym samym ciśnieniu podanym na strukturę. Jednocześnie, zaobserwowano, że naprężenia występujące w odkształconej strukturze również rosną wraz z ugięciem membrany i są wyższe w przypadku cieńszych membran. W wyniku przeprowadzonych symulacji bez uwzględnienia wzmocnienia, wstępnie dokonano wyboru grubości membrany do dalszych badań o wartości 50 μm . Pozwoliło to na uzyskanie względnie wysokich wartości ugięcia membrany (do 250 μm) przy założonych wartościach ciśnienia sterującego (do 200 kPa), oraz równoczesnym zminimalizowaniu wartości naprężeń, które mogłyby spowodować uszkodzenie membrany.

Następnie, w drugim etapie badań przeprowadzono symulacje ugięcia membrany z uwzględnieniem różnych wymiarów wzmocnienia. Grubość wzmocnienia membrany H_2 została dobrana po uwzględnieniu założeń techniczno-technologicznych struktury mikrocytometru wynikających ze standardowej grubości podłoża krzemowych oraz parametrów technologicznych stosowanych do integracji mikrostruktur szklanych i krzemowych (Tab. 3.2). Wartość maksymalnego ugięcia membrany wyznaczona została po uwzględnieniu średniej wielkości badanej komórki oraz wymiarów geometrycznych komory pomiarowej mikrocytometru, w tym wysokości pułapki. Wstępnie założono, że membrana powinna ugiąć się o 100 μm przy maksymalnym ciśnieniu 200 kPa (limit sterownika ciśnienia). Mikrostruktura zaprojektowana została przy użyciu oprogramowania AutoCAD, a jej ugięcie symulowano za pomocą COMSOL Multiphysics. Podczas symulacji badano ugięcie membrany dla trzech różnych wartości długości wzmocnienia (D) z uwzględnieniem naprężeń von Missesa powstających w strukturze.

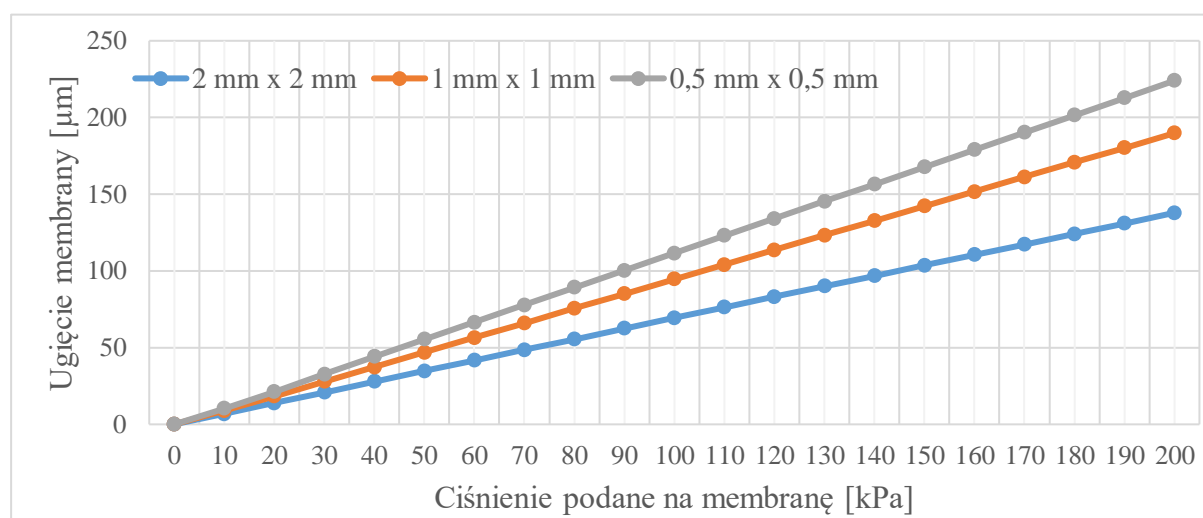
Tab. 3.2 Wymiary membrany krzemowej ze wzmocnieniem

Wymiary planarne membrany [mm]	5 x 5		
Grubość membrany H_1 [μm]	50		
Wymiary wzmocnienia D [mm]	0,5 x 0,5	1 x 1	2 x 2
Grubość wzmocnienia H_2 [μm]	330		

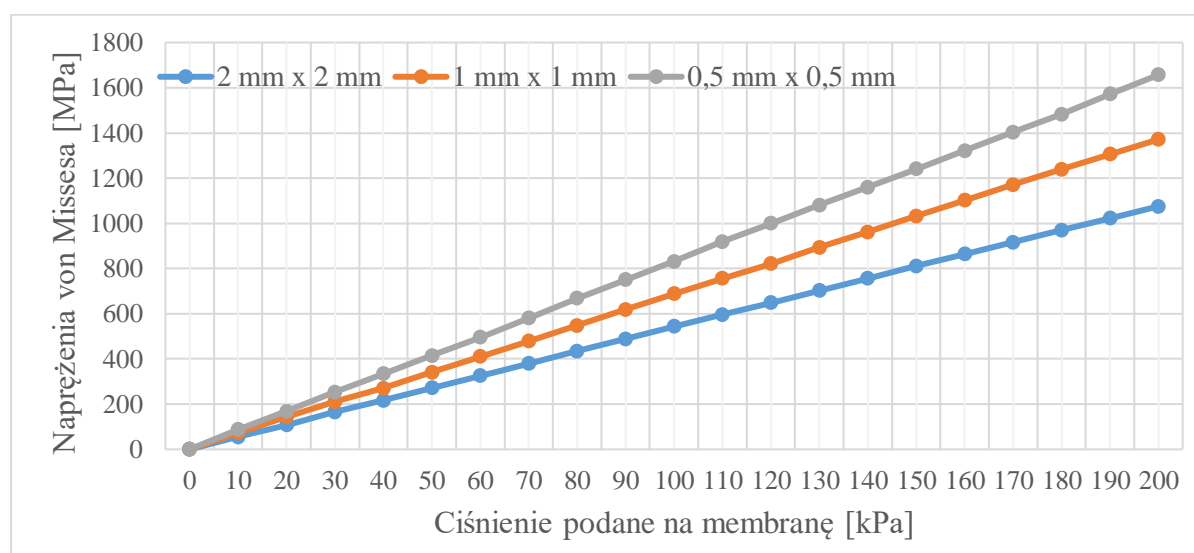
Na podstawie symulacji stwierdzono, że zgodnie z oczekiwaniami wymiary wzmocnienia membrany wpływają na ugięcie struktury i wynikające z niego naprężenia w materiale (Rys. 3.7). Największą wartość ugięcia membrany uzyskano dla wzmocnienia

o wymiarach 0,5 mm x 0,5 mm. Maksymalną teoretyczną wartością naprężenia von Missesa dopuszczalnego dla krzemu to 7 GPa [122]. Podczas przeprowadzonych symulacji nie przekroczono wartości 1,6 GPa, stąd założono, że żadna z zaprojektowanych membran nie powinna ulec zniszczeniu w wyniku podania ciśnienia o wartości 200 kPa. Założono jednak, że końcowa weryfikacja wartości ugięcia membrany nastąpi w wyniku pomiaru rzeczywistych struktur.

a)

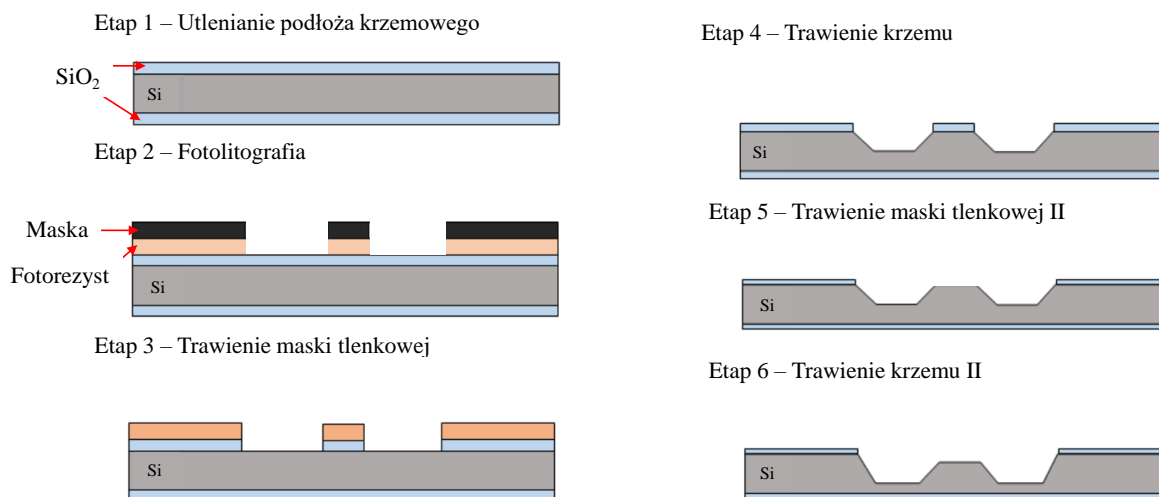


b)



Rysunek 3.7 Wyniki symulacji ugięcia membrany krzemowej ze wzmocnieniem o różnych wymiarach:
a) wartość ugięcia membrany w funkcji ciśnienia, b) maksymalne naprężenia von Missesa powstałe w ugiętej membranie w funkcji ciśnienia

Do wytworzenia membrany wykorzystano 3-calowe podłoże krzemowe obustronnie polerowane o orientacji krystalograficznej (100) i grubości 380 μm . Na powierzchni podłoża wytworzono warstwę maskującą SiO_2 o grubości około 1,2 μm w procesie wysokotemperaturowego utleniania w atmosferze pary wodnej (Rys. 3.8).



Rysunek 3.8 Schemat procesu wytwarzania membran krzemowych

Do procesu fotolitografii wykorzystano fotorezyst AZ1512HS. Po naświetleniu fotorezystu przez maskę foliową, wywołano pożądany wzór w wywoływaczu AZ351B. Maskę tlenkową została następnie selektywnie wytrawiona w roztworze BHF. Formowanie struktury membrany zostało przeprowadzone w procesie mokrego trawienia w 40% KOH w temperaturze 80 $^{\circ}\text{C}$. Wzmocnienie membrany zostało strawione o dodatkowe 50 μm w celu wyeliminowania możliwości zbondowania się mikrostruktury z podłożem szklanym tworzącym komorę pneumatyczną. Parametry poszczególnych etapów wytwarzania membrany przedstawiono w Tabeli 3.3.

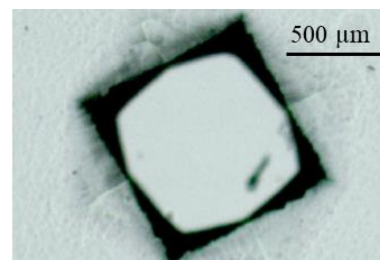
W wyniku przeprowadzenia wyżej opisanego procesu technologicznego wytworzono szereg membran o wymiarach przedstawionych w Tab. 3.2, które następnie zbadano w celu weryfikacji wyników symulacji. Widok przykładowej membrany krzemowej po procesie wytwarzania z usuniętym tlenkiem krzemu przedstawiono na Rys. 3.9.

Tab. 3.3 Główne etapy wytwarzania membrany w krzemie

Etap	Proces	Parametry
1.	Wysokotemperaturowe utlenianie w atmosferze pary wodnej	
	t= 10 godz., T= 1050 °C, grubość SiO ₂ około 1,2 μm	
2.	Fotolitografia	
	Nawirowanie warstwy fotorezystu	zgodnie z instrukcją producenta
	Wygrzewanie podłoża	115 °C przez 1 min
	Naświetlanie UV warstwy fotolakieru przez maskę cieniową (tzw. <i>shadow mask</i>)	50 sek
	Wywołanie wzoru w roztworze zalecanym przez producenta	1 min
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	1 min
	Suszenie strumieniem azotu	1 min
	Wygrzewanie podłoża	135 °C przez 1 min
4.	Selektywne trawienie warstwy maskującej SiO ₂	
	Zabezpieczenie spodniej strony podłoża folią maskującą	-
	Roztwór BHF	15 min
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min
	Usunięcie folii polimerowej	-
5.	Mokre anizotropowe trawienie	
	Roztwór 40% KOH	80 °C, (~1 μm/min)
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min
6.	Usunięcie warstwy maskującej SiO ₂	
	Roztwór BHF	15 min
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min



a)

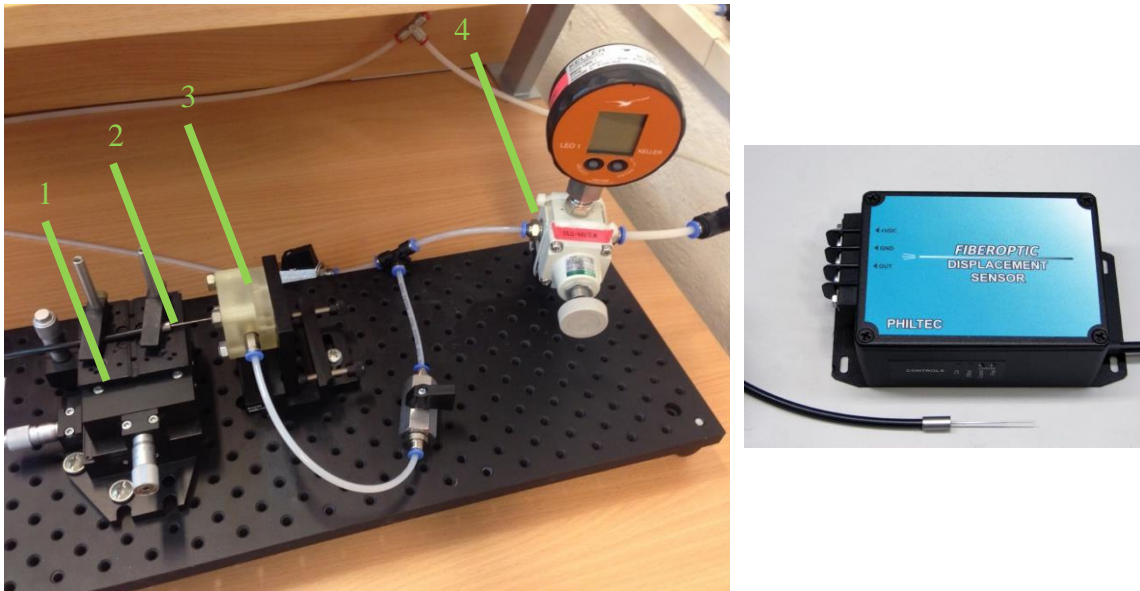


b)

Rysunek 3.9 Przykładowa membrana krzemowa: a) zdjęcie struktury, widok od strony wzmacnienia,

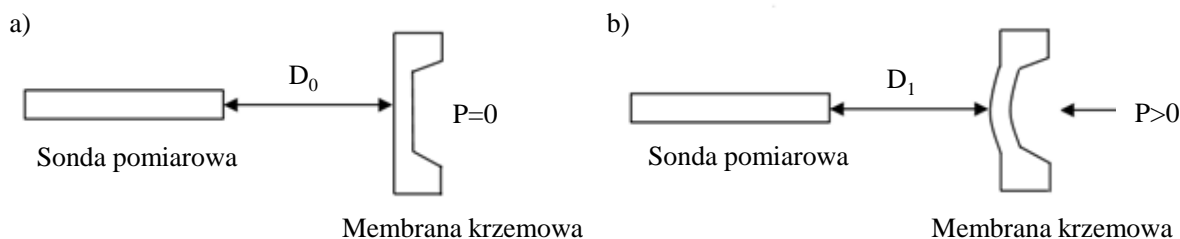
b) zdjęcie mikroskopowe wzmocnienia

Badania ugięcia membran zostały przeprowadzone na stanowisku pomiarowym przy użyciu światłowodowego czujnika odległości (Fiberoptic Displacement Sensor PHILTEC, Inc.) (Rys. 3.10). Membrana została umieszczona w obudowie polimerowej zapewniającej doprowadzenie ciśnienia pod strukturę. Głowica miernika światłowodowego znajdowała się w odległości $150\ \mu\text{m}$ od powierzchni membrany. Pozwoliło to na przeprowadzenie pomiarów w zakresie pomiarowym czujnika o największej czułości. Ciśnienie podawane na membranę regulowane było zaworem wyposażonym w manometr cyfrowy do pomiaru ciśnienia z dokładnością do $0,1\ \text{kPa}$. (LEO 1, KELLER).



Rysunek 3.10 Stanowisko pomiarowe do badania ugięcia membrany krzemowej: (po lewej) 1) stolik XYZ z przesuwem mikrometrycznym, 2) głowica miernika światłowodowego, 3) membrana krzemowa w obudowie polimerowej, 4) zawór wyposażony w manometr precyzyjny, (po prawej) precyzyjny światłowodowy miernik odległości (Fiberoptic Displacement Sensor PHILTEC)

Podczas pomiaru w wyniku uginania się membrany odległość pomiędzy końcówką głowicy czujnika, a powierzchnią membrany malała wraz ze wzrostem ciśnienia (Rys. 3.11). Wartości odkształcenia membrany krzemowej D wyznaczone zostały poprzez odjęcie wartości początkowej $D_0 = 150\ \mu\text{m}$ od wartości zmierzonej D_1 .

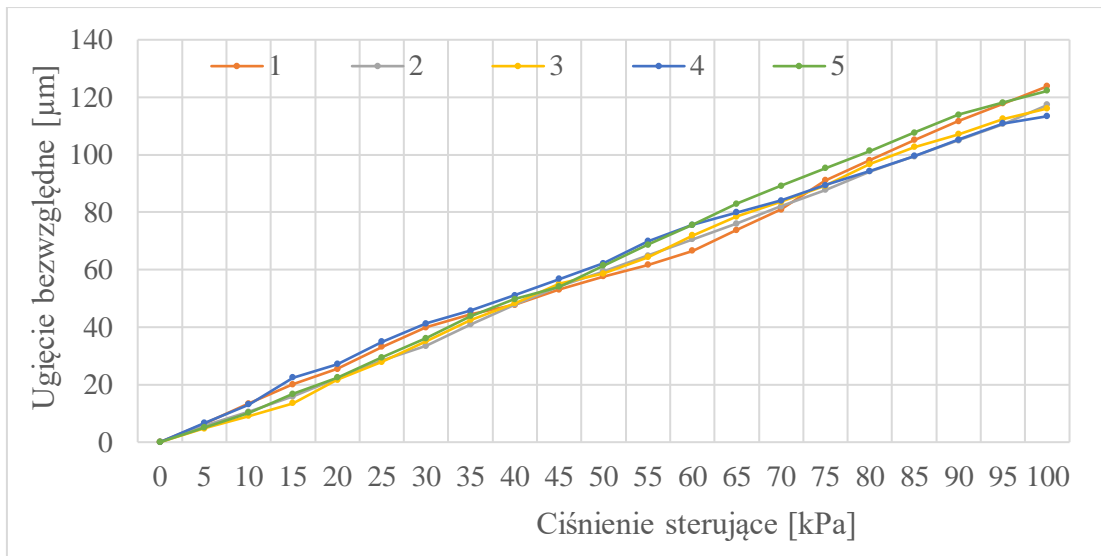


Rysunek 3.11 Pomiar ugięcia membrany, gdzie D_0 to odległość czopa światłowodu od powierzchni membrany według nastaw śruby mikrometrycznej, a D_1 to odległość wskazana przez czujnik podczas pomiarów

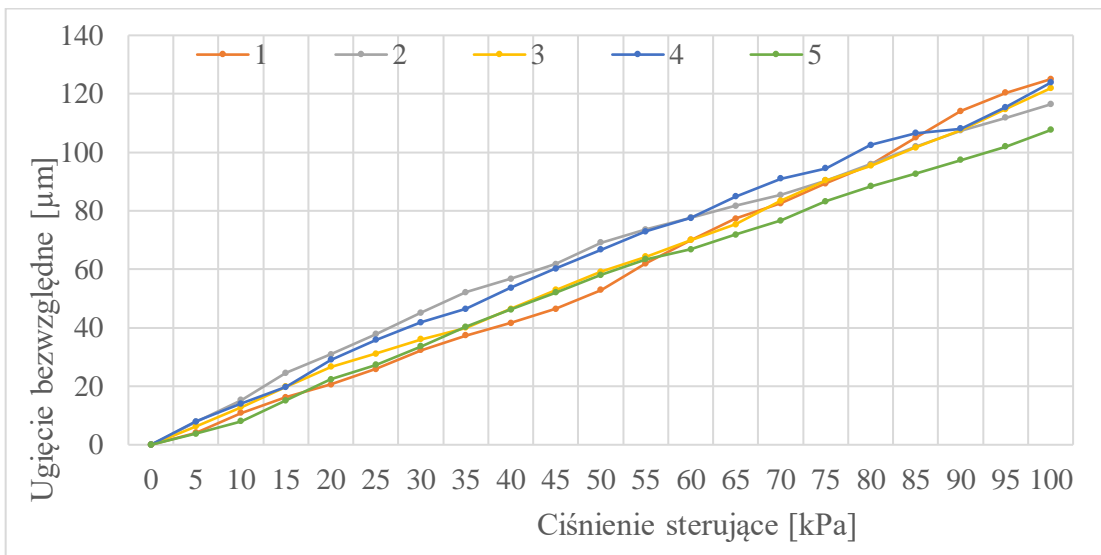
Przed przeprowadzeniem charakteryzacji ugięcia poszczególnych membran, dokonano wstępnej weryfikacji wyników symulacji odnoszących się do naprężeń występujących podczas ugięcia mikrostruktury. Na membrany krzemowe podane zostało ciśnienie w zakresie od 0 do 200 kPa. Zaobserwowano, że symulowane wartości graniczne naprężeń nie przekładają się na rzeczywiste zachowanie membrany krzemowej. Badane mikrostruktury uległy całkowitemu zniszczeniu po jednokrotnym przekroczeniu wartości 150 kPa. Dodatkowo, membrany poddano wielokrotnemu ugięciu dla mniejszych wartości ciśnienia, co pozwoliło na oszacowanie względnie bezpiecznej wartości ciśnienia na 120 kPa dla ustalonych parametrów geometrycznych membrany zastosowanych w Tab. 3.2. Ostatecznie, podczas dalszych badań przyjęto wartość ciśnienia sterującego od 0 do 100 kPa i zmierzono ugięcie membrany co 5 kPa. Wynikało to z faktu, że założona wartość ugięcia membrany o $100\ \mu\text{m}$ uzyskiwana była głównie dla wartości ciśnienia poniżej 100 kPa. Przykład ugięcia membrany w polimerowej obudowie przedstawiono na Rys. 3.12. Wyniki pomiaru ugięcia dla pięciu membran o grubości $50\ \mu\text{m}$ i o różnych wymiarach struktury krzemowej wzmocnienia pokazano na Rys. 3.13.



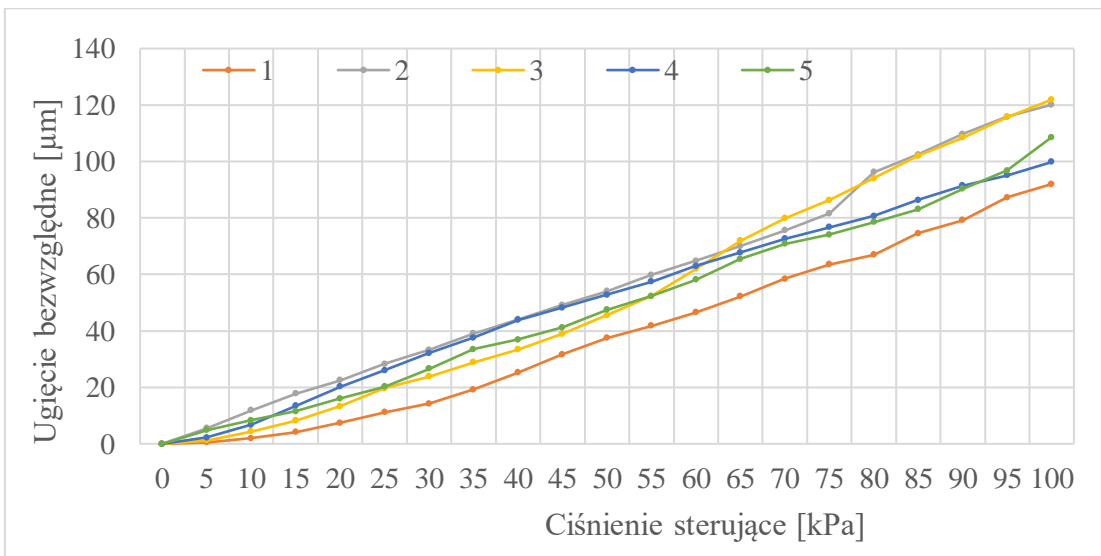
Rysunek 3.12 Krzemowa membrana w polimerowej obudowie przed (po lewej) i podaniu ciśnienia $P = 100$ kPa (po prawej). Ugięcie membrany wynosiło $105\ \mu\text{m}$



a)



b)



c)

Rysunek 3.13 Ugięcie pięciu membran krzemowych o wymiarach wzmacnienia: a) 0,5 mm x 0,5 mm, b) 1 mm x 1 mm, c) 2 mm x 2 mm

Charakter ugięcia membran w funkcji podanego ciśnienia zbliżony jest do liniowego, jednak wartości ugięcia znacząco odbiegają od przeprowadzonych symulacji (Tab. 3.4). Ponadto, wartości ugięcia poszczególnych membran różnią się między sobą, a rozbieżności pomiędzy najniższą, a najwyższą wartością przy ciśnieniu równym 100 kPa wynoszą odpowiednio 33% dla membran o wzmocnieniu 2 mm x 2 mm, 21% dla membran o wzmocnieniu 1 mm x 1 mm, oraz 6% dla membran o najmniejszych wymiarach wzmocnienia membrany (0,5 mm x 0,5 mm).

Tab. 3.4 Zestawienie wartości ugięcia membrany podczas symulacji i pomiarów wytworzonych struktur przy ciśnieniu $P = 100$ kPa

Wymiary wzmocnienia membrany	Wyniki symulacji			Eksperymentalne wyniki ugięcia membran (zakres dla 5 sztuk)		
	2 x 2	1 x 1	0,5 x 0,5	2 x 2	1 x 1	0,5 x 0,5
Wart. ugięcia membrany [μm] przy ciśnieniu $P = 100$ kPa	69,4	94,6	111,6	92-123	105-127	116-123

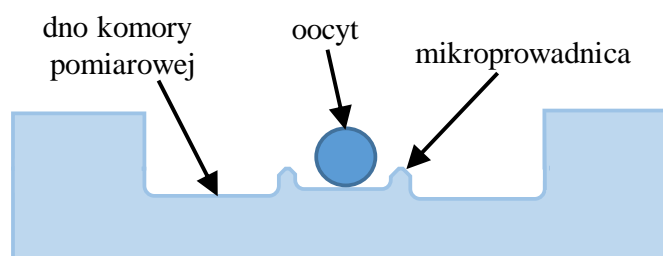
Żadna z membran nie uległa zniszczeniu podczas testów z wykorzystaniem ciśnienia do 100 kPa, co świadczyć może, że rzeczywiste naprężenia powstające w materiale nie przekraczają krytycznej wartości. Zaobserwowano różnice w ugięciu membran o różnych wymiarach wzmocnienia – im większe wymiary wzmocnienia tym średnio mniejsze wartości ugięcia membrany, ale także większe rozbieżności w wartościach ugięcia w obrębie tej samej grupy membran. Wobec tego, najlepszymi parametrami, z punktu widzenia założeń opracowanego mikrocytometru, odznaczały się membrany o najmniejszych wymiarach wzmocnienia tzn. 0,5 mm x 0,5 mm.

Dalsza charakterystyka ugięcia membrany przeprowadzona została po integracji mikrostruktur krzemowej i szklanych. Umożliwiło to określenie wpływu na ugięcie membrany takich czynników jak: wypełnienie komory pomiarowej cieczą o różnej gęstości oraz obecność komórki w komorze pomiarowej i potencjalny opór stawiany strukturze krzemowej podczas jej ugięcia. Ponadto, badanie membrany krzemowej w zintegrowanej strukturze mikrocytometru umożliwiło wyznaczenie charakterystyki ugięcia membrany w funkcji zadanego ciśnienia i kontrolowaną deformację każdego oocytu z uwzględnieniem indywidualnych rozmiarów każdej komórki.

3.2.2 Układ mikrofluidyczny ze strukturą pułapkującą

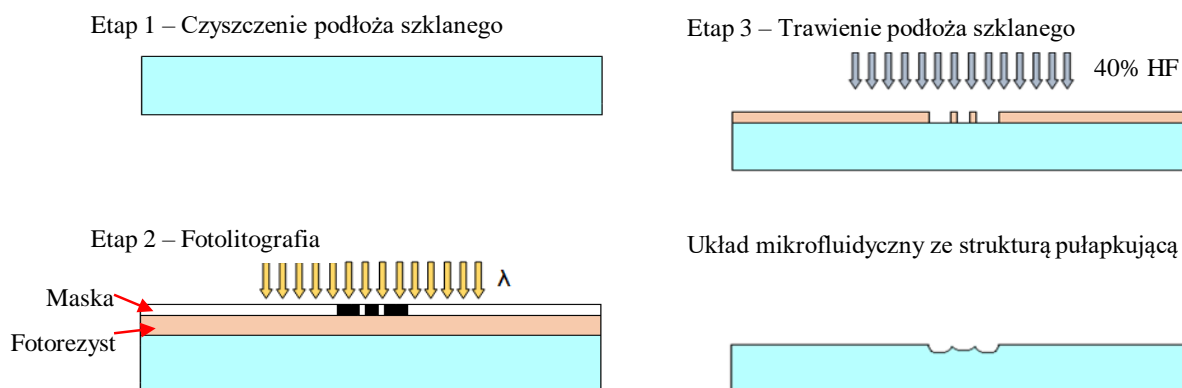
Układ mikrofluidyczny, w którym przemieszczać będą się komórki, powinien być wymiarami dostosowany do przeciętnej średnicy oocytów świni tj. 110-150 μm . Układ ten umożliwić ma wprowadzenie, pozycjonowanie w komorze pomiarowej oraz wyprowadzenie badanego oocytu.

Prawidłowe spozycjonowanie oocytu w obszarze wzmocnienia membrany jest operacją krytyczną, ponieważ jest to obszar, w którym membrana krzemowa pozostaje płaska podczas uginania. Mikrostruktura pułapkowa wykonana w szklanym podłożu musi zapewnić prawidłowe ułożenie oocytu podczas pomiaru. Założono, że struktura ta będzie miała formę kanału wewnątrz wytrawionej mikrostruktury. Kanał ten będzie utrzymywał komórkę w wyznaczonym obszarze umożliwiając jednocześnie swobodny przepływ cieczy (Rys. 3.14). Trudnością w wykonaniu struktury pułapkującej jest konieczność przeprowadzenia głębokiego trawienia w szkle na dwie różne głębokości podczas jednego procesu technologicznego.



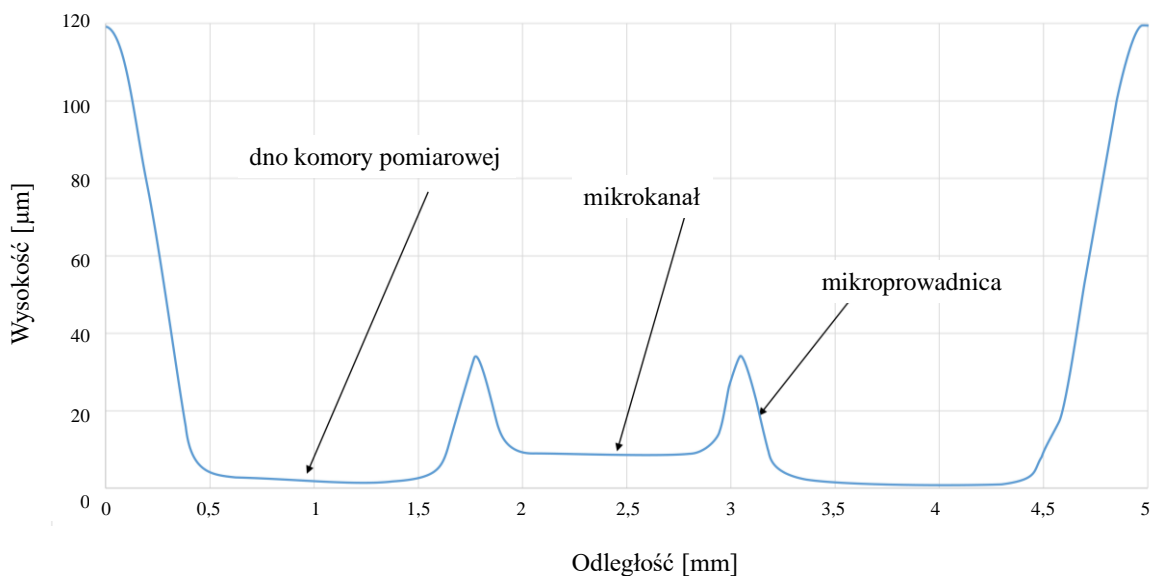
Rysunek 3.14 Schemat przekroju powierzchni szklanej mikrostruktury pułapkującej

Badano możliwość stosowania dwóch fotorezystów SU-8 2100 (Microchem) oraz SU-8 3045CF DFR (Nippon Kayaku), charakteryzujących się różnym sposobem nanoszenia na podłoże. Do wytworzenia struktury pułapkującej wykorzystano szkło Borofloat® 33 firmy SCHOTT (Rys. 3.15). Powierzchnię podłoża przygotowano do procesów technologicznych poprzez dokładne ich odtłuszczenie w detergencie i płukanie w wodzie dejonizowanej. W procesie fotolitografii warstwa fotorezystu została selektywnie naświetlona przez maskę cieniową. Wzory przestrzenne w szkle uformowane zostały z wykorzystaniem metody mokrego trawienia szkła w roztworze 40% HF. W końcowym etapie warstwa fotorezystu została usunięta z podłoża szklanego.



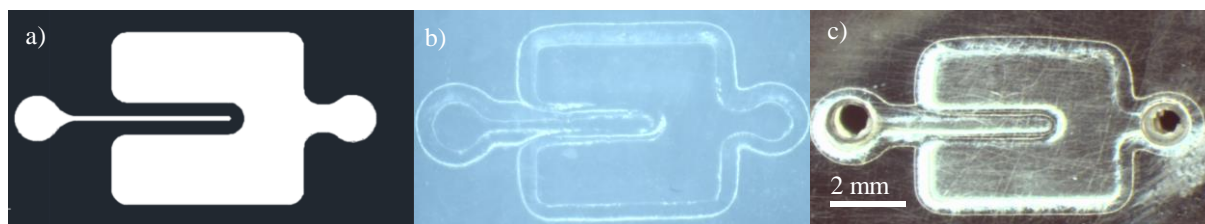
Rysunek 3.15. Schemat procesu wytwarzania pułapkujących struktur szklanych

Fotorezyst SU-8 2100 charakteryzuje się dużą gęstością i lepkością przypominającą konsystencję miodu. Powoduje to problemy z równomiernym rozprowadzaniem fotorezystu na powierzchni podłoża. Wykorzystując metodę rozwirowania konieczne jest dobranie odpowiednich parametrów: liczby obrotów na minutę oraz czasu rozwirowania. Zaletą fotorezystu SU-8 2100 jest możliwość formowania głębokich struktur podczas mokrego trawienia szkła ze względu na względnie dużą odporność materiału na działanie kwasu fluorowodorowego. Z uwagi na średnicę oocytu świń, wykorzystując fotorezyst SU-8 2100 należałoby móc wytworzyć struktury mikrofluidyczne na głębokość do 150 μm . W ramach wcześniejszych prac we współpracy z dr inż. Wojciechem Kubickim opracowano protokół technologiczny umożliwiający naniesienie warstwy fotolakieru o grubości ok. 120 μm . Głębokość uformowanych mikrostruktur wstępnie zmierzona została za pomocą śruby mikrometrycznej. Dokładny profil wytrawionej struktury zmierzono przy użyciu profilometru stykowego (Rank Taylor Hobson Ltd.). Wyniki pomiaru przekroju przykładowej struktury szklanej zmierzonej profilometrem stykowym przedstawione zostały na Rys. 3.16. Optymalizacja wygrzewania podłoża z naniesionym fotorezystem umożliwiła wytrawienie mikrostruktur w sposób powtarzalny na głębokość 100-120 μm .



Rysunek 3.16 Wyniki pomiaru przekroju przykładowej powierzchni struktury szklanej zmierzonej profilometrem stykowym po przeprowadzonej optymalizacji procesu wytwarzania pułapek

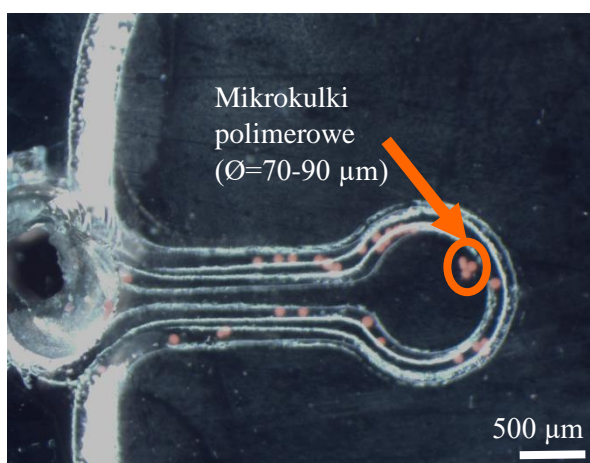
W celu potwierdzenia kompatybilności poszczególnych etapów procesu technologicznego wytworzono prototypowe struktury pułapkujące (Rys. 3.17).



Rysunek 3.17 Szklana mikrostruktura pułapkująca: a) projekt maski fotolitograficznej, b) struktura do pozycjonowania komórki wytrawiona w szkle, c) zbondowana szklana struktura z membraną krzemową

Wytworzoną mikrostrukturę testowano pod kątem efektywności pułapkowania obiektów w obrębie ścieżki prowadzącej do centralnej części komory pomiarowej (Rys. 3.18). W tym celu wykorzystano kulki polimerowe o średnicy około 70-90 μm . Wszystkie kulki wprowadzone do struktury mikrofluidycznej pozostały w wyznaczonym obszarze. Testy wykazały, że stosunek wysokości szklanej mikroprowadnicy względem średnicy cząstki powinien wynosić przynajmniej 1:3, aby nie przedostała się ona poza obszar pomiarowy. Podobne wyniki uzyskano przy zastosowaniu mikrokulek żelowych, odznaczających się podobną elastycznością, co komórki zwierzęce (10% B Agarose Beads Standard, ABT) o średnicy 50-100 μm . Warto zaznaczyć, że elastyczne komórki z większą łatwością klinowały się w podtrawieniach w szkle, ale także szybciej niż twardsze kulki

polimerowe mogły zostać usunięte podczas pipetowania cieczy w układzie mikrofluidycznym .

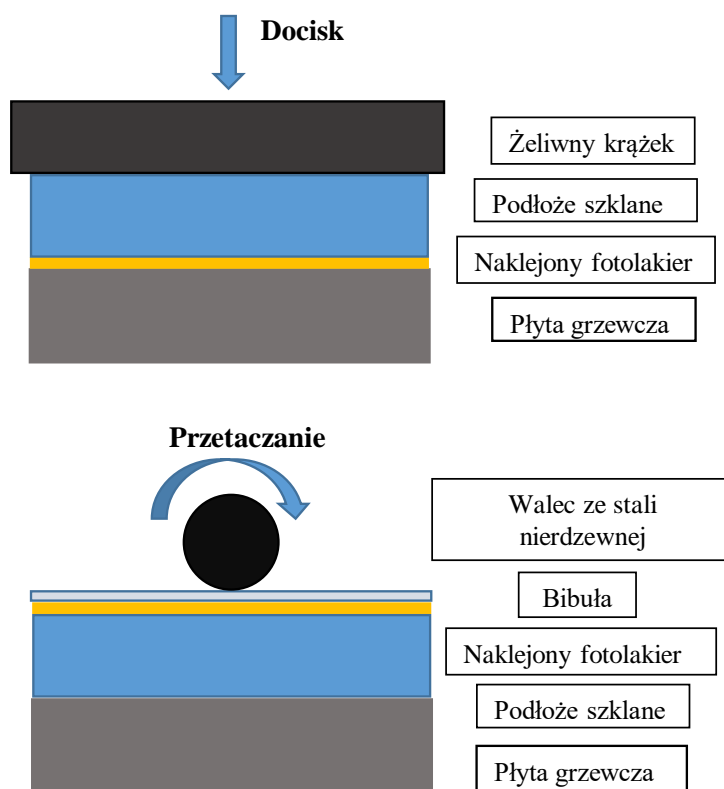


Rysunek 3.18 Mikrokulki polimerowe o średnicy około 70-90 μm spułapkowane w obrębie mikrokanalu w zbondowanej strukturze komory pułapkującej

W rezultacie przeprowadzonych prac technologicznych nie udało uzyskać się zakładanej głębokości 150 μm trawienia w szkle ze względu na ograniczoną „wytrzymałość” fotorezystu na roztwór HF.

Drugim z badanych fotorezystów był fotorezyst SU-8 3045CF DFR (Nippon Kayaku). Jest on nanoszony na folię nośną w postaci arkusza o grubości 20 μm i zabezpieczony folią ochronną. Unikalny charakter postaci fotorezystu pozwala na powtarzalne i precyzyjne nanoszenie warstwy fotolakieru o określonej grubości. Opracowanie i optymalizacja procesu laminacji warstw fotolakieru na podłoże szklane przeprowadzona została na podstawie wyników badań dra inż. Wojciecha Kubickiego.

Badano dwie metody nanoszenia warstw fotolakieru: poprzez docisk oraz przetaczanie walca po podłożu (Rys. 3.19). W pierwszej metodzie fotolakier przyklejony do podłoża szklanego dotyka płyty grzewczej przez warstwę folii nośnej i dociskany jest żeliwnym krążkiem o wadze 0,5 kg. Temperatura na nastawie płyty grzewczej wynosiła 70 °C. Na podłoże naniesiono łącznie trzy warstwy fotolakieru. Każda z nich była dociskana przez różny czas: pierwsza przez 60 s, druga przez 90 s, zaś trzecia przez 120 s.



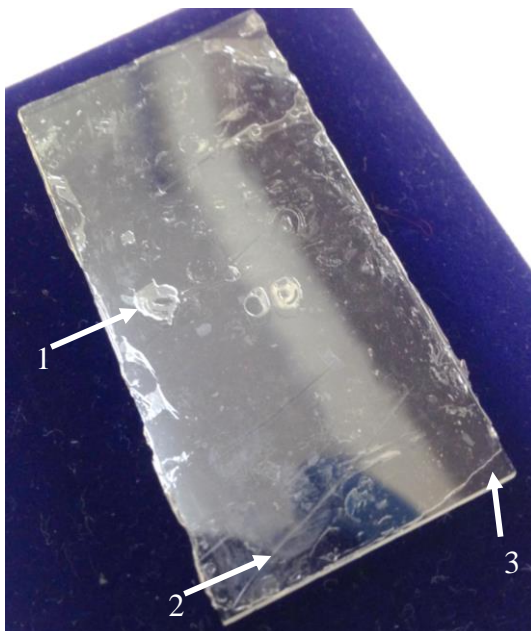
Rysunek 3.19 Metody nanoszenia warstwy fotolakieru na podłoże szklane: poprzez równomierny docisk krążkiem (u góry), poprzez przetaczanie walca po podłożu (na dole)

W wyniku dociskania żeliwnym krążkiem końcowa warstwa fotolakieru o grubości 60 μm była rozprowadzona równomiernie. Defekty powstałe podczas laminowania warstwy pierwszej nie propagowały się w dalszych warstwach tzn. warstwy fotolakieru nie zapadały się w obszarach, gdzie warstwa nie laminowała się do podłoża. Nacisk na podłoże był równomierny, co wpływa na dobrą powtarzalność nanoszenia warstwy fotolakieru.

W drugiej metodzie elementem dociskającym fotolakier był walec kilkakrotnie przetaczany po całej powierzchni podłoża. W tym układzie laminacji temperatura na nastawie płyty grzewczej wynosiła 50 $^{\circ}\text{C}$, zaś sam walec wygrzewany był na osobnej płycie do osiągnięcia temperatury 70 $^{\circ}\text{C}$. Zaobserwowano, że fotolakier nanoszony tą metodą nie rozprowadza się równomiernie na całej powierzchni podłoża i przy jego krawędziach odchodzi razem z folią nośną. Dodatkowo, nacisk na podłoże nie był równomierny, a niewielki obszar styczności walca z podłożem powodował jego szybkie ochłodzenie. Powoduje to mniejszą powtarzalność nanoszenia fotolakieru niż w przypadku pierwszej metody.

Podczas wstępnych testów nanoszenia obiema metodami zaobserwowano szereg defektów (Rys. 3.20). Podczas zdejmowania folii nośnej z warstwy fotolakieru na podłożu

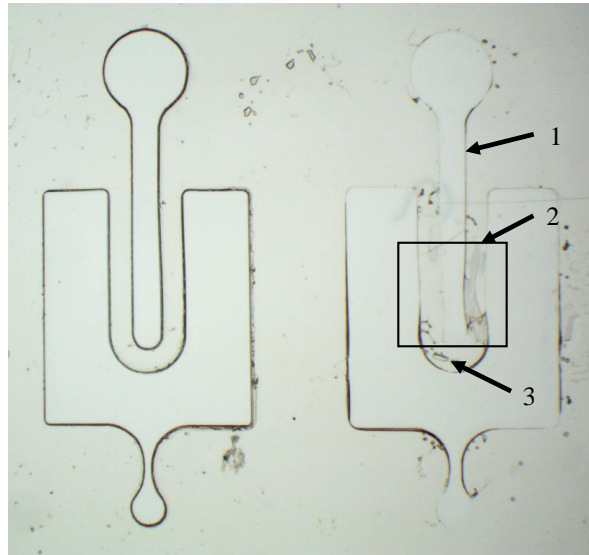
szklanym, powstawały poprzeczne „pręgi” – przerwania spowodowane odklejaniem folii pod zbyt dużym kątem względem powierzchni podłoża. Ponadto, fotolakier kruszył się na obrzeżach podłoża oraz w obszarach, gdzie powstawały bąble powietrza.



Rysunek 3.20 Podłoże szklane pokryte trzema warstwami fotolakieru SU-8 3045CF DFR metodą dociskania. Defekty powstałe podczas wstępnych testów laminacji: 1) zalaminowany pęcherz powietrza w warstwie fotolakieru, 2) przerwanie ciągłości fotolakieru w wyniku zgięcia materiału podczas zdejmowania warstwy nośnej, 3) obszar powierzchni szkła bez fotolakieru

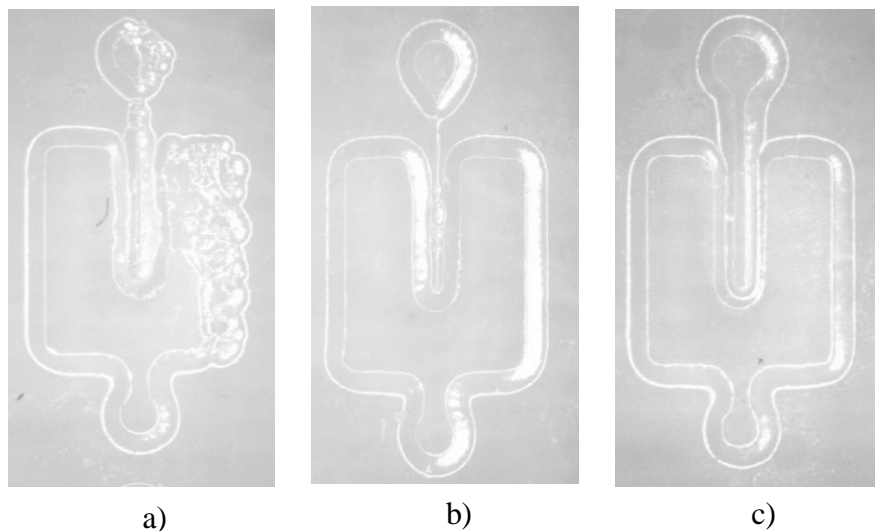
Główne problemy wynikające z obu metod laminacji wynikały z manualnego charakteru nanoszenia warstw. W celu wyeliminowania wyżej opisanych defektów, do laminacji zastosowano laminator (profiLAM A3, OPUS). Po optymalizacji parametrów laminacji każda warstwa fotolakieru została naniesiona w temperaturze 60 °C przy prędkości przesuwu podłoża 12,1 mm/s.

W procesie fotolitografii uzyskane zostały wzory masek do trawienia struktury pułapkującej. Początkowo najczęściej uzyskiwanymi defektami były: brak częściowego lub całościowego wywołania wzoru, deformacje uzyskanego wzoru, bądź odwarstwianie się fotolakieru, w miejscach gdzie znajdowały się pęcherze powietrza bądź zanieczyszczenia z powietrza (Rys. 3.21).



Rysunek 3.21 Warstwa fotorezystu z wywołaniem wzoru na podłoże szklane. Porównanie prawidłowo wywołanego wzoru (po lewej) ze wzorem z defektami (po prawej): 1) częściowe wywołanie wzoru, 2) brak odwzorowania maski, 3) pęcherze powietrza uwiecznione w warstwie fotolakieru

W wyniku mokrego izotropowego trawienia szkła w wodnym roztworze 40% HF : 35% HCl uformowane zostały struktury pułapkujące w szkle. Podczas tego etapu ujawniły się kolejne defekty, które były następstwem zbyt niskiej adhezji fotolakieru do podłoża szklanego lub niecałkowitego wypłukania wywołanego fotolakieru (Rys. 3.22).



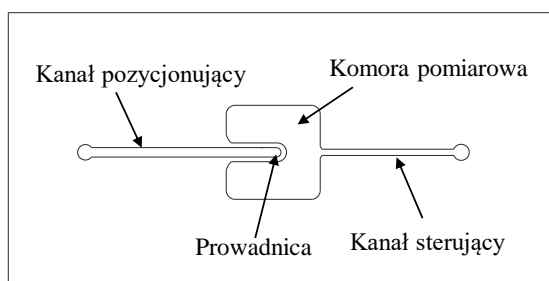
Rysunek 3.22 Struktury przestrzenne uformowane w szkle: a) defekt powstały w wyniku podtrawienia warstwy fotorezystu, b) defekt powstały w wyniku niepełnego wywołania wzoru w fotorezycie, c) prawidłowo wytrawiona struktura

Po zoptymalizowaniu parametrów takich jak temperatura i czas wygrzewania podłoża, warstwy fotolakieru były pozbawione defektów. Parametry poszczególnych etapów wytwarzania pułapki przedstawione zostały w Tabeli 3.5.

Tab. 3.5 Główne etapy wytwarzania pułapki w szkle (fotorezyst SU-8 3045CF DFR, Nippon Kayaku)

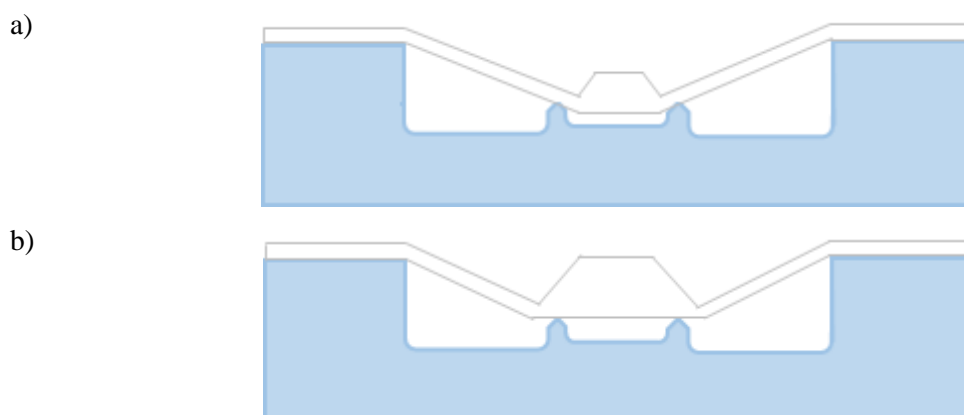
Etap	Proces	Parametry
1.	Przygotowanie powierzchni podłoża do fotolitografii	
	Odłuszczenie w detergencie	5 min
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min
	Kąpiel w izopropanolu z wykorzystaniem płuczki ultradźwiękowej	10 min
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min
	Gotowanie w H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ , 3:1 (v/v)	30 min
	Płukanie w kaskadzie wody dejonizowanej	10 min
	Suszenie strumieniem azotu	5 min
	Dehydratacja	15 min, 150 °C
2.	Laminacja warstw fotolakieru na podłoże szklane (proces powtórzono trzykrotnie)	
	Naklejenie warstwy fotolakieru	20 μm
	Laminacja warstwy	12,1 mm/s, 60 °C
3.	Fotolitografia	
	Naświetlanie UV warstwy fotolakieru przez maskę cieniową (tzw. <i>shadow mask</i>)	35 sek
	Wygrzewanie podłoża (tzw. <i>post-exposure bake</i>)	a) 65 °C przez 3 min b) 95 °C przez 5 min c) 65 °C przez 2 min
	Wywołanie wzoru w roztworze PGMEA	8 min
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min
	Suszenie strumieniem azotu	5 min
	Wysokotemperaturowe wygrzewanie podłoża (tzw. <i>hard-baking</i>)	200 °C przez 60 min
4.	Mokre izotropowe trawienie	
	Zabezpieczenie podłoża folią maskującą	-
	Wodny roztwór 40% HF : 35% HCl, 10:1 (v/v)	23 °C, (~3 μm/min)
	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min
	Usunięcie folii polimerowej	-

W wyniku przeprowadzonych prac technologicznych, wytworzono w szkle strukturę mikrofluidyczną spełniającą założone wymagania funkcjonalne. Kanał do wprowadzania komórki o długości 10 mm i szerokości 350 μm łączy się z komorą pomiarową mikrocytometru o wymiarach 6 mm x 6 mm i przekształca w centralnej jego części w mikroprzewodnicę o długości 3 mm (Rys. 3.23) tworzącą na jej końcu strukturę mikrofluidyczną. Szerokość przewodnicy wynosi 150 μm , wysokość to 45 μm . Z drugiej strony komory pomiarowej znajduje się kanał sterujący o długości 10 mm oraz szerokości 350 μm . Głębokość kanałów i komory pomiarowej wynosi 150 μm , co spełnia założenia projektowe mikrocytometru.



Rysunek 3.23 Schemat struktury mikrofluidycznej z komorą pomiarową i strukturą pałapkującą

Wytworzenie struktury mikrofluidycznej w szkle pozwoliło na zweryfikowanie dopasowania wymiarów wytworzonych wcześniej membran krzemowych. Założono, że podczas maksymalnego ugięcia membrany, mikrostruktura powinna „opierać się” na prowadnicy pałpki, bez wchodzenia pomiędzy te prowadnice (Rys. 3.24).

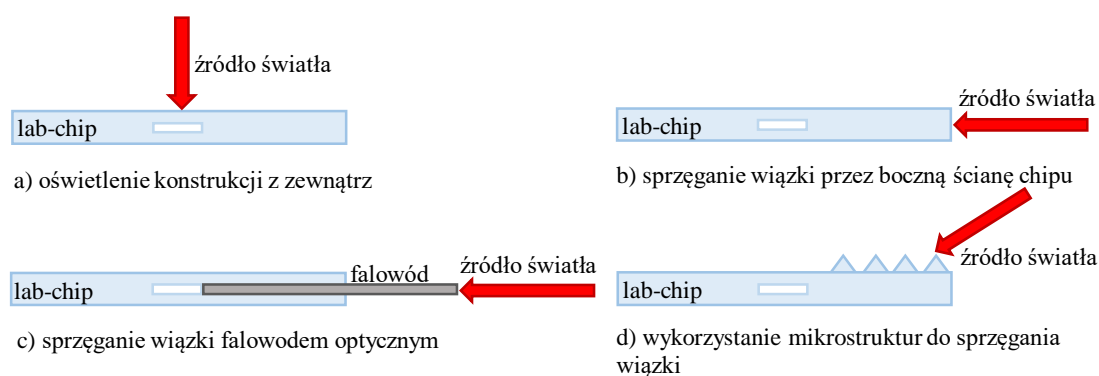


Rysunek 3.24 Różne konfiguracje wzmocnienia membrany z strukturą pałapkującą w szkle: a) zbyt małe wzmocnienie membrany, b) wzmocnienie membrany o prawidłowych wymiarach

Dzięki takiej konfiguracji mikrostruktur, komórka znajdująca się w dowolnym obszarze pułapkowania zostanie ściśnięta równomiernie. Należy jednak zaznaczyć, że komórka nie może znaleźć się podczas badania w podtrawieniach szkła. Ostatecznie do prac nad integracją poszczególnych mikrostruktur wykorzystano membrany o wzmocnieniu 1 mm x 1 mm, ponieważ struktury z mniejszym wzmocnieniem (0,5 mm x 0,5 mm) nie spełniły powyższego założenia.

3.2.3 Struktury mikrooptyczne do sprzęgania wiązki laserowej w mikrocytometrze

W literaturze przedmiotu relacjonowanych jest kilka metod sprzęgania światła do struktury mikrofluidycznej chipa (Rys. 3.25) [123]. W układzie, w którym wiązka światła oświetla powierzchnię chipa, wykorzystuje się typowe elementy optyczne (np. filtry pasmowe, soczewki lub obiektywy mikroskopu) do skupienia wiązki światła w obszarze detekcji chipa (Rys. 3.25 a) [124]. Alternatywnie, obszar sprzężenia światła może znajdować się na krawędzi podłoża, przy założeniu, że sieć mikrokanałów nie jest złożona, a obszar detekcji znajduje się blisko krawędzi chipa (Rys. 3.25 b) [125]. Taki układ jest zwykle używany do pomiarów spektrofluorymetrycznych, w których detektor ustawia się pod kątem 90° do kierunku oświetlenia próbki [126, 127].

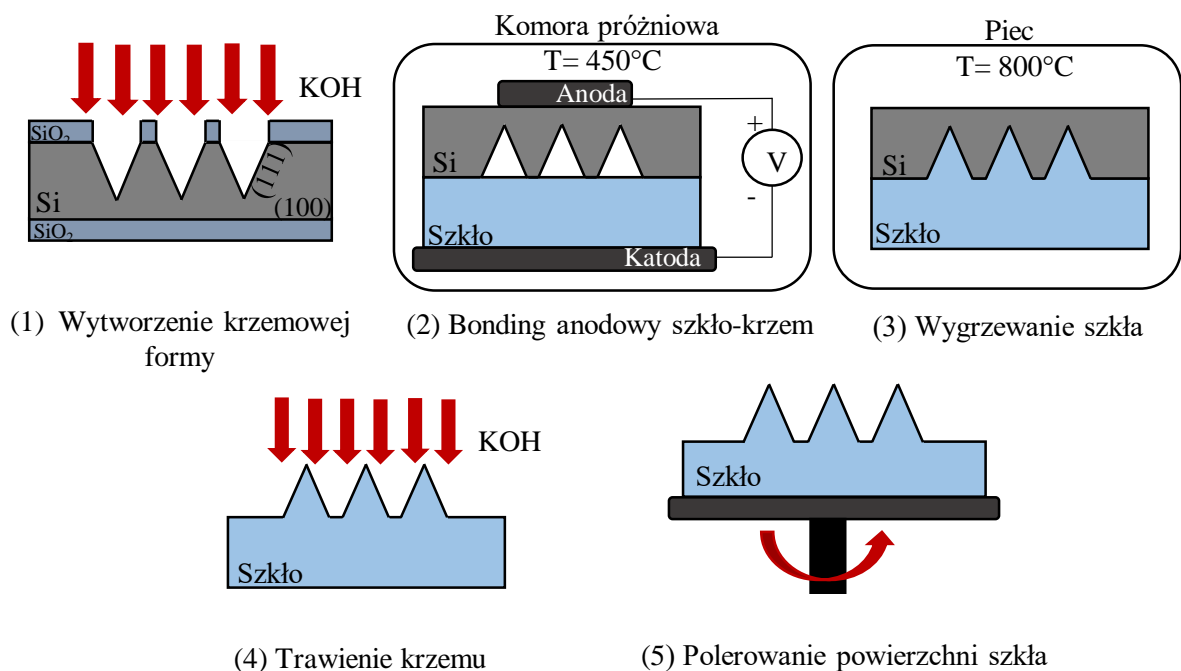


Rysunek 3.25 Metody sprzęgania wiązki światła w układzie mikroprzepływowym

Doprowadzenie wiązki światła do obszaru detekcji może być również zrealizowane z wykorzystaniem światłowodu (Rys. 3.25 c). W tej metodzie konieczne jest uwzględnienie dodatkowych etapów technologicznych, aby uzyskać tzw. rowki do precyzyjnego wprowadzania i zgrywania światłowodów wewnątrz chipa. To rozwiązanie ma też pewne ograniczenia - jak np. wbudowane w podłoże światłowody, zajmują miejsce i wymuszają

stosowanie układów mikroprzepływowych o określonej topologii [128-130]. Ostatnią metodą sprzęgania światła jest wytworzenie mikrostruktur, takich jak soczewki lub pryzmaty na powierzchni chipa (Rys. 3.25 d). Także, mikrostruktury sprzęgające są wytwarzane wykorzystując laser femtosekundowy w szkle lub formowane w warstwie polimeru łączonego później z chipem [131, 132]. Pod względem właściwości optycznych, jak dotąd najlepszym wyborem wydaje się szkło o odporności chemicznej i biogodności. Należy jednak zauważyć, że integracja struktur optycznych i fluidycznych jest trudniejsza i bardziej czasochłonna w szkle niż w polimerach. Wielokrotne wykorzystanie struktur kompensuje te trudności, pod warunkiem, że procedura czyszczenia konstrukcji między eksperymentami jest stosunkowo prosta lub zautomatyzowana. Jeśli chodzi o mikrostruktury optyczne w szkle, to bardziej szczegółowo opisano ich procesy wytwarzania z wykorzystaniem technologii formowania szkła w innej publikacji [133].

W pracach własnych zdecydowano o wykorzystaniu szklanych struktur mikrooptycznych (mikropryzmatów) do sprzęgania światła w szklanej części struktury cytometru. Wytworzenie szklanych struktur mikrooptycznych oparto na autorskim pięcioetapowym procesie technologicznym wykorzystującym metodę „zapadania się” szkła (Rys. 3.26).



Rysunek 3.26 Schemat procesu wytwarzania struktur mikrooptycznych

Wysokość piramidy tworzącej pryzmat jest ograniczona grubością wykorzystanego podłoża krzemowego. Aby otrzymać piramidę o powierzchni ściany bocznej większej niż średnica wiązki lasera (np. 5 mm), piramida powinna mieć wysokość około 6 mm. Użycie podłoża krzemowego o grubości 6 mm jest zbyt kosztowne do wytworzenia takiej mikrostruktury. Ponadto biorąc pod uwagę, że całkowita grubość mikrocytometru wynosi około 2 mm, dodanie kolejnych 6 mm wysokości do konstrukcji zmniejsza zalety miniaturyzacji mikrocytometru. Zamiast tego zaprojektowano szereg mniejszych piramid (matrycę piramid), aby uzyskać jak największą całkowitą powierzchnię ścian bocznych pryzmatów przy użyciu jak najmniejszej powierzchni matrycy.

Geometria pojedynczej mikropiramidy związana jest ze wzorem maski do trawienia. Wymiary maski z kwadratowymi „okienkami” zostały dobrane zgodnie ze wzorem (3.1), gdzie W to szerokość maski, a d_n to głębokość v -rowka. Ze względu na grubość podłoża krzemowego ($380 \mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$), wysokość piramidy została ograniczona do około $350 \mu\text{m}$. Z drugiej strony, aby uzyskać jak największą powierzchnię ścian bocznych piramidy, wysokość mikrostruktury była nie mniejsza niż $250 \mu\text{m}$.

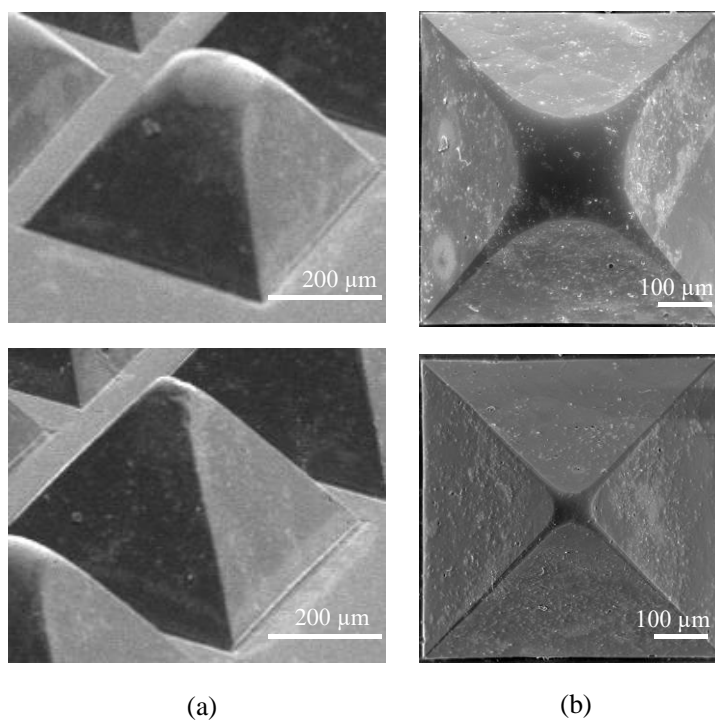
$$d_n = \frac{\sqrt{2}}{1.96} W \quad (3.1)$$

W pierwszym etapie wykonano replikę mikrostruktury w podłożu krzemowym przez selektywne trawienie w roztworze KOH. Replika ta została wytrawiona w monokrystalicznym podłożu krzemowym o orientacji krystalograficznej (100), w którym kwadratowy wzór został zorientowany zgodnie z kierunkiem $\langle 110 \rangle$. Ściany boczne wytrawionej piramidy to płaszczyzna (111) z kątem nachylenia $54,7^\circ$ w stosunku do płaszczyzny (100). Mikrostrukturę wytrawiono w 40% KOH w temperaturze 80°C . Aby otrzymać precyzyjne wgłębienia w kształcie odwróconych normalnych piramid, odpowiednio zaprojektowano geometrię wzorów na masce.

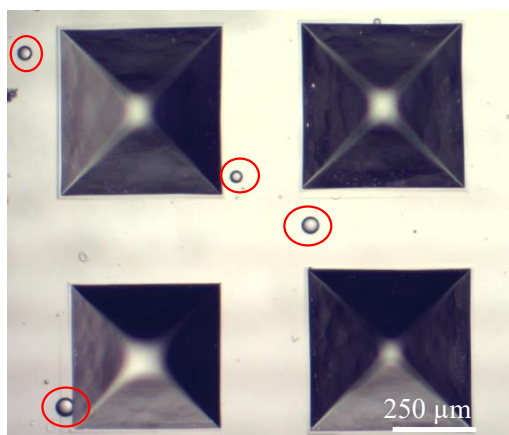
Następnie podłoże krzemowe zostało anodowo połączone z podłożem szklanym (Borofloat 3.3, Schott) w próżni ($\sim 10^{-3}$ mbar) oraz w wysokiej temperaturze ($\sim 450^\circ\text{C}$) i napięciu bondingu 1 kV. W ten sposób ciśnienie gazów wewnątrz zbondowanej struktury było niższe od ciśnienia atmosferycznego. Różnica ciśnień między ciśnieniem atmosferycznym na zewnątrz struktur i niskim ciśnieniem pomiędzy połączonymi podłożami, w temperaturze wygrzewania (etap 3) spowodowała „zapadnięcie się” szkła i wypełnienie wnęk szkłem. W wyniku wygrzewania w piecu w temperaturze do 800°C

utworzono mikropryzmaty szklane. Mikrostruktury optyczne ujawniono przez całkowite wytrawienie podłoża krzemowego w roztworze KOH (etap 4). W ostatnim etapie polerowano szklaną powierzchnię po drugiej stronie mikrostruktur, usuwając około 200 μm materiału tak, aby uzyskać powierzchnię o jakości umożliwiającej połączenie z krzemem lub szkłem.

Podczas procesu wytwarzania mikrostruktur optycznych, a przed ich optymalizacją, zaobserwowano szereg defektów: nierównomierne wypełnianie repliki szkłem podczas wygrzewania (Rys. 3.27), powstawanie pęcherzyków powietrza (Rys. 3.28), czy upływnianie się szkła w obszarach późniejszego łączenia z innymi podłożami. Wyeliminowanie tych defektów było krytyczne, ponieważ ich istnienie uniemożliwiłoby efektywne sprzężenie wiązki laserowej.

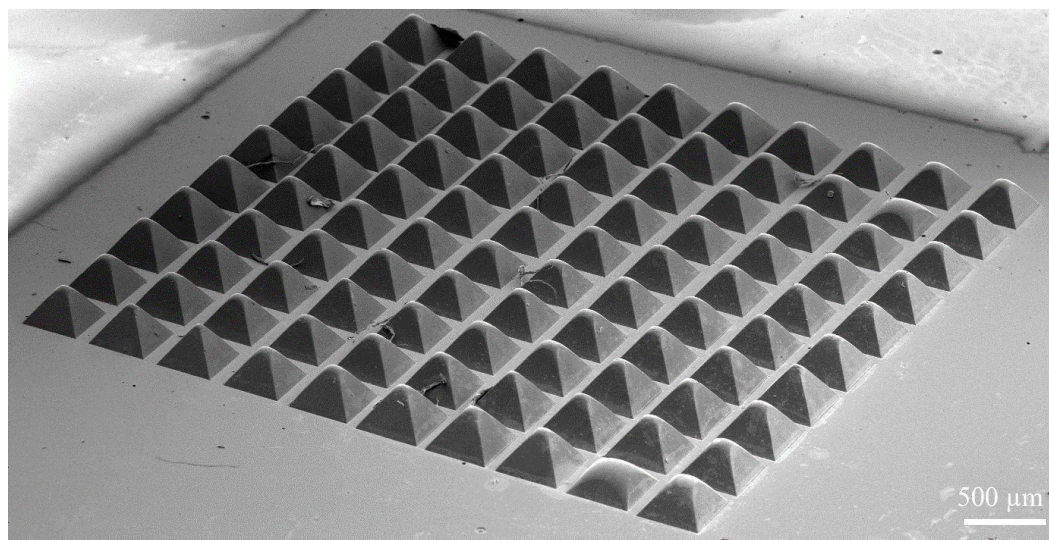


Rysunek 3.27 Zdjęcia SEM przykładowych pryzmatów: u góry niekompletna struktura, u dołu prawie kompletna struktura (a) widok z boku (x22), (b) widok z góry (x130)



Rysunek 3.28 Zdjęcie mikroskopowe: pęcherzyki powietrza „uwięzione” w szkle (zaznaczone na czerwono) uzyskane po nieoptymalizowanym procesie wygrzewania

W rezultacie przeprowadzonych prac zoptymalizowano parametry bondingu anodowego (etap 2) oraz profil wygrzewania struktur (etap 3). W wyniku optymalizacji technologii wykonano szereg matryc mikropryzmatów, w których ze względu na krystalograficzną strukturę krzemu każda ścianka boczna mikrostruktury była nachylona pod kątem $54,7^\circ$. Jakość powierzchni i krawędzi, a także powtarzalność odwzorowania kształtu mikrostruktur uwidoczniło za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Rys. 3.29).



Rysunek 3.29 Zdjęcie SEM (x22) matrycy mikropryzmatów zawierającej 100 szklanych piramid ($52,56 \pm 0,03 \text{ mm}^2$)

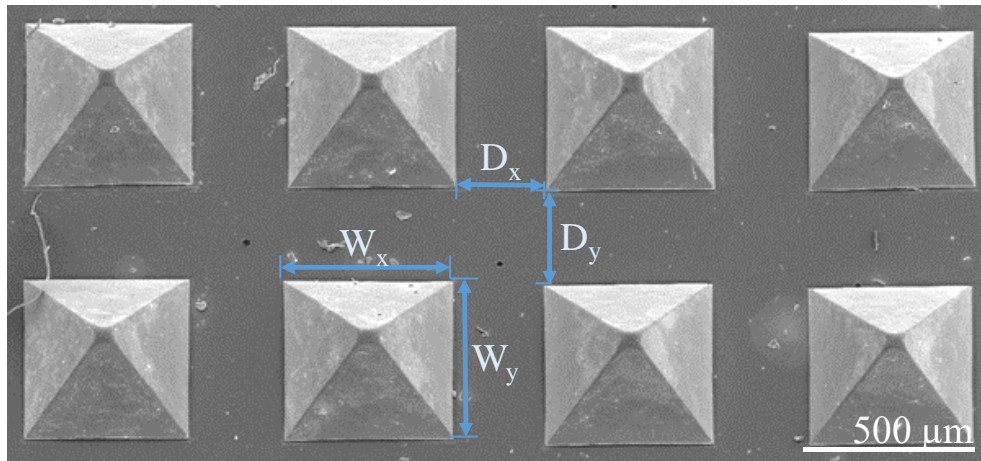
Po optymalizacji procesów wytwarzania przygotowano szklane matryce mikropryzmatów o różnych wymiarach geometrycznych (Tab. 3.6). Uwzględniono

wysokość mikrostruktury H oraz szerokość podstawy W_x i W_y (Rys. 3.30). Ogólnym założeniem było to, że im większa powierzchnia ściany bocznej mikrostruktury, tym lepsze powinno być sprzężenie światła. Kolejnym ważnym wymiarem do rozważenia była odległość między mikrostrukturami (D_x oraz D_y) ze względu na możliwość wzajemnego zasłaniania się pryzmatów podczas oświetlania.

Tab. 3.6 Różne konfiguracje geometryczne szklanej matrycy mikropryzmatów (10 x 10 pryzmatów w każdej matrycy)

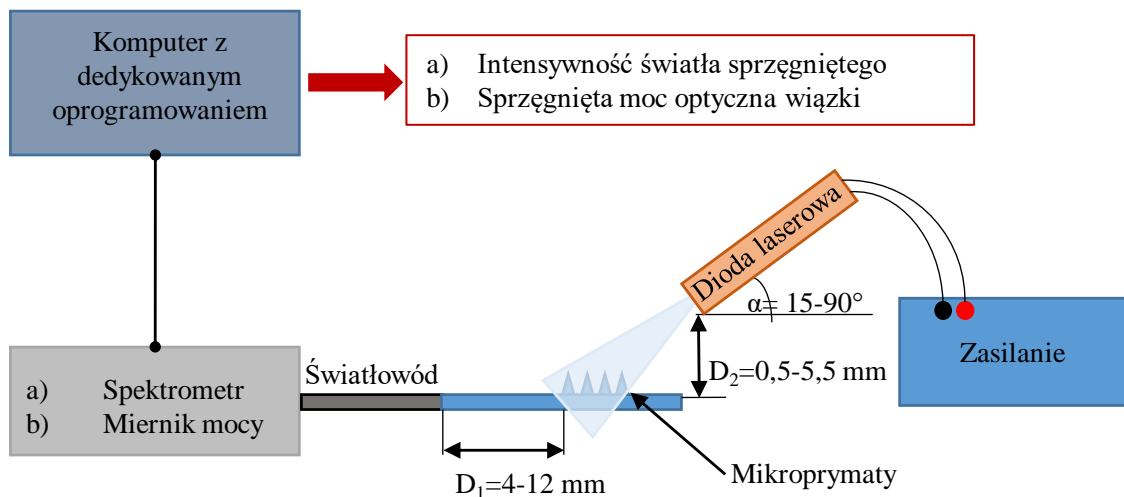
Konfiguracja	Wysokość pryzmatu H [μm]	Szerokość podstawy pryzmatu W_x, W_y [μm]	Dystans pomiędzy krawędziami podstaw pryzmatów D_x, D_y [μm]	Pole powierzchni matrycy [mm^2]
A	350 ± 15	500 ± 10	250 ± 10	$52,6 \pm 0,03$
B			300 ± 10	$59,3 \pm 0,03$
C			350 ± 10	$66,4 \pm 0,03$
D			400 ± 10	$74,0 \pm 0,03$
E	250 ± 15	350 ± 10	150 ± 10	$23,5 \pm 0,03$
F			200 ± 10	$28,1 \pm 0,03$
G			250 ± 10	$33,1 \pm 0,03$
H			300 ± 10	$38,4 \pm 0,03$

Przed ostatecznym doбором parametrów geometrycznych pryzmatów do integracji ze strukturą układu mikroprzepływowego, struktury poddano badaniom sprzężenia wiązki laserowej w podłoże szklane dla różnych konfiguracji geometrycznych mikropryzmatów i układu wprowadzającego światło.



Rysunek 3.30 Przykładowa fotografia SEM (x20) przyzmatów z parametrami geometrycznymi matrycy: szerokość podstawy przyzmatu (W_x , W_y) i odległość między podstawami przyzmatu (D_x , D_y)

Badania te przeprowadzono w dwóch etapach (Rys. 3.31). Celem etapu pierwszego było zdefiniowanie optymalnych wymiarów geometrycznych mikroprzyzmatów i matrycy jako całości, aby uzyskać najlepszą skuteczność sprzężenia światła. Na krawędzi „wejściowej” szkła mierzono intensywność światła sprzężonej wiązki laserowej naprowadzonej przez mikroprzyzmaty. Badania przeprowadzono dla różnych kątów (α) padania wiązki względem podłoża szklanego tzn. $15-90^\circ$ (Rys. 3.31 a).

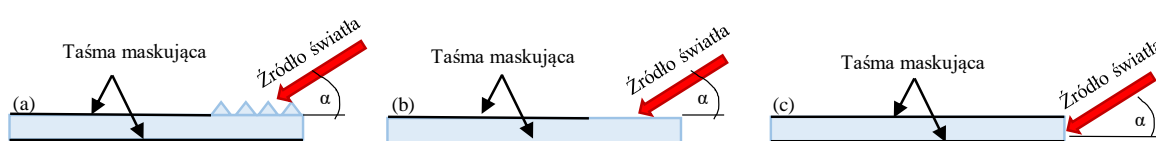


Rysunek 3.31 Schemat stanowiska pomiarowego do badania efektywności sprzężenia wiązki laserowej: a) do pomiaru intensywności światła sprzężanego z wykorzystaniem spektrometru, b) do pomiaru sprzężonej mocy optycznej wiązki z wykorzystaniem miernika mocy

W zastosowanym układzie pomiarowym za diodą laserową emitującą światło o długości fali 635 nm umieszczono filtr antyrefleksyjny o gęstości optycznej 1,0.

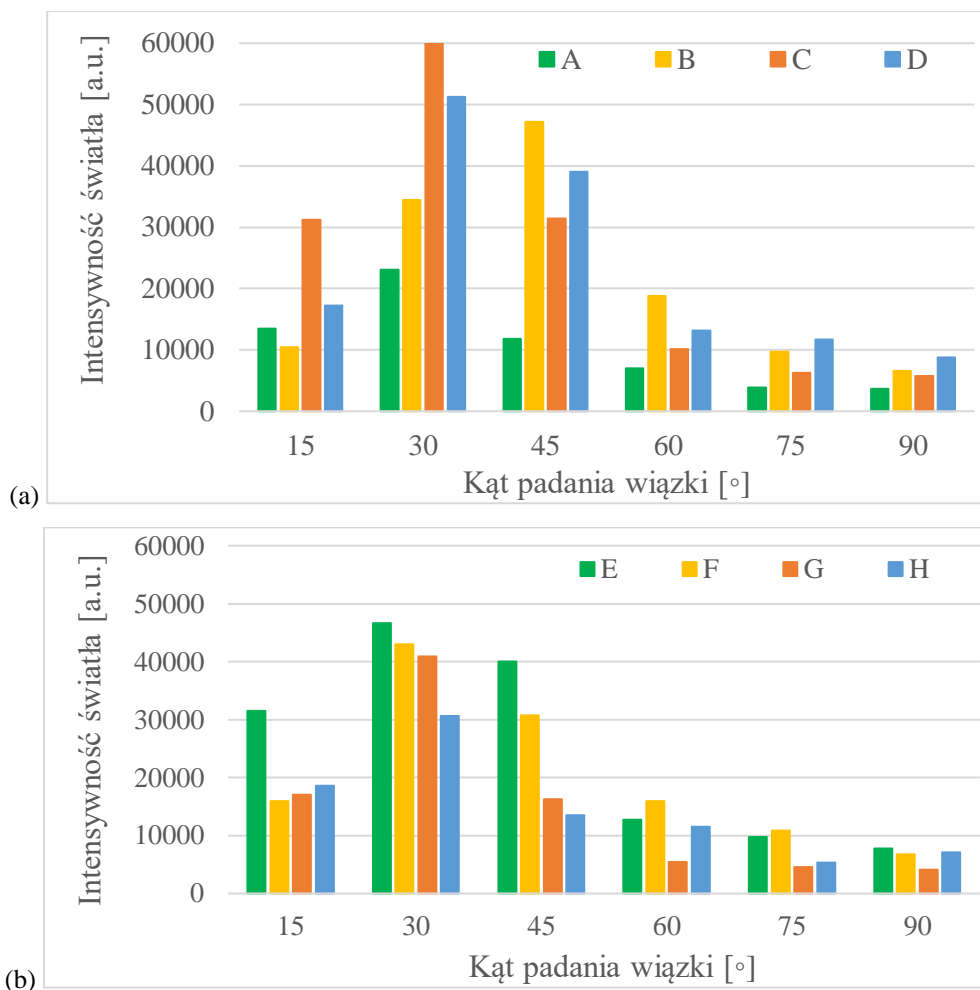
Natężenie światła mierzono spektrometrem (OceanOptics USB 4000) wyposażonym w światłowód jako sondę, przy użyciu oprogramowania Spectra Suite. Czoło światłowodu zostało sprzężone optycznie z „wyjściową” krawędzią podłoża szklanego.

W etapie drugim do najważniejszych analizowanych parametrów należała odległość pozioma D_1 między obszarem detekcji, a matrycą mikropryzmatów oraz odległość pionowa D_2 między diodą laserową, a strukturą szkła oraz optymalny kąt padania. Na podstawie tej analizy możliwe było określenie optymalnej głębokości kanału mikrofluidycznego, odległości między krawędzią kanału i matrycą mikropryzmatów oraz ustalenie obszaru detekcji komórki. Zmierzono moc optyczną wiązki laserowej sprzężonej w strukturze szkła. W zastosowanym układzie pomiarowym zastosowano miernik mocy optycznej (PM130D, Thorlabs) (Rys. 3.31 b). Określono zależność mocy optycznej diody laserowej ($\lambda = 470$ nm) od prądu zasilania i ustalono parametry pracy diody tak, aby wyjściowa moc optyczna była stała i wynosiła 9 mW. W badaniach uwzględniono pomiary referencyjne dla nieustrukturyzowanych powierzchni podłoża szklanego (Rys. 3.32). Badano szkło o niezmodyfikowanej powierzchni, bez matrycy pryzmatów i w konfiguracji światła sprzężonego z krawędzią podłoża. Nieoświetlona powierzchnia podłoża została pokryta czarną taśmą maskującą. W doświadczeniach, w których badano wpływ D_1 , średnica plamki oświetlającej matrycę była zawsze taka sama ($R = 8$ mm). W badaniach ze zmiennym D_2 średnica plamki zmieniała się wraz z odległością D_2 (~7-9 mm).



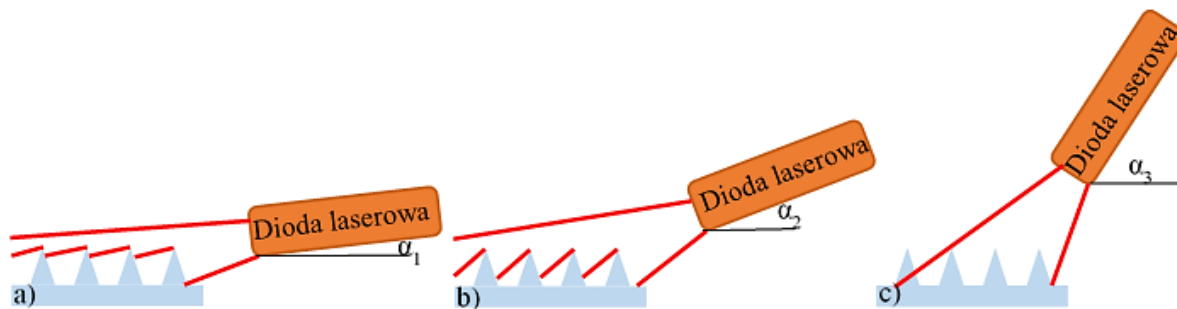
Rysunek 3.32 Referencyjne metody sprzężenia źródła światła w układzie mikroprzepływowym:
 (a) z wykorzystaniem matrycy mikropryzmatów, (b) bez mikrostruktur optycznych, (c) przez krawędź podłoża

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów stwierdzono (zgodnie z założeniami) zależności pomiędzy kątem padania wiązki oświetlającej matrycę pryzmatów, a szerokością podstawy pryzmatu i odległością między podstawami pryzmatów (Rys. 3.33).



Rysunek 3.33 Zależność intensywności wiązki światła mierzonej na krawędziach podłoża dla różnych kątów padania (α) wiązki na powierzchnię szkła dla różnych konfiguracji matrycy pryzmatów: (a) o wysokości 350 μm , (b) o wysokości 250 μm

Potwierdzono zatem, że parametry geometryczne mikropryzmatów i matrycy istotnie wpływają na sprawność sprzęgania wiązki laserowej. Jeśli pryzmaty są zbyt blisko siebie, to zakrywają się nawzajem, zmniejszając całkowitą powierzchnię sprzężenia wiązek w matrycy (Rys. 3.34), natomiast gdy mikrostruktury są zbyt daleko od siebie, powierzchnia szkła nie jest efektywnie wykorzystywana, a większość wiązki rozprasza się lub odbija od powierzchni szklanego podłoża. Wymiary mikropryzmatów również wpływają na efektywność sprzęgania. Stwierdzono, że im wyższa jest mikrostruktura, a zatem także powierzchnia ściany bocznej piramidy, tym większa powierzchnia sprzęgająca wiązkę.

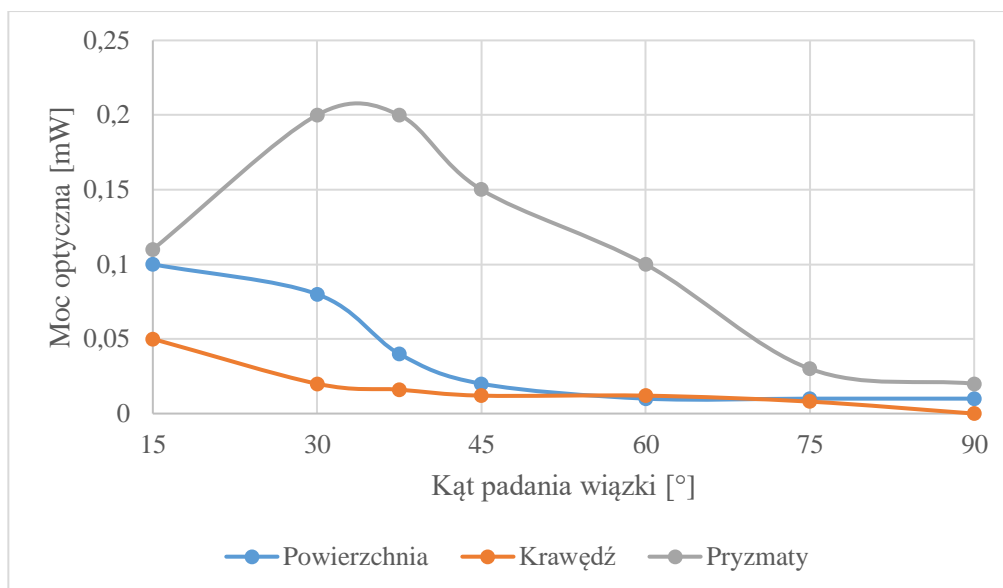


Rysunek 3.34 Zależność natężenia wiązki światła od kąta padania: a) α_1 za mały (mała sprawność sprzężenia),
 b) α_2 - optymalny kąt (optymalna sprawność sprzężenia), c) α_3 za duży (mała sprawność sprzężenia)

W efekcie tej części badań określono optymalne wymiary geometryczne mikropryzmatów i do kolejnych pomiarów wybrano konfigurację matrycy oznaczoną jako C (Tab. 3.7). Stwierdzono również, że efektywność wprowadzenia światła laserowego jest istotnie lepsza w porównaniu do konfiguracji referencyjnej (Rys. 3.35).

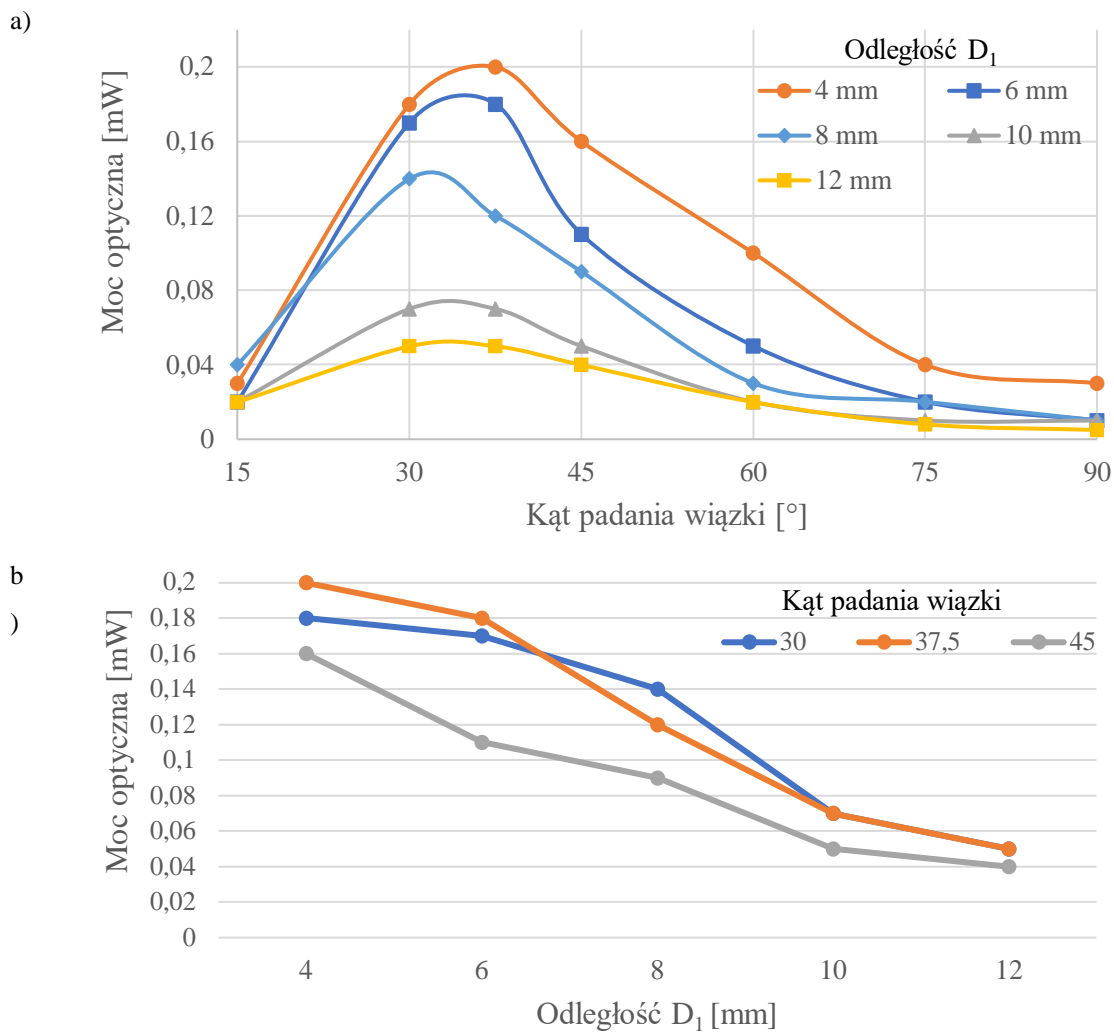
Tab. 3.7 Optymalny kąt padania wiązki laserowej dla różnych konfiguracji matrycy mikropryzmatów

Konfiguracja matrycy	Kąt padania wiązki (maksymalna intensywność)	Znormalizowana intensywność (maks.=1)
A	30	0,38
B	45	0,78
C	30	1,00
D	30	0,85
E	30	0,77
F	30	0,71
G	30	0,68
H	30	0,51



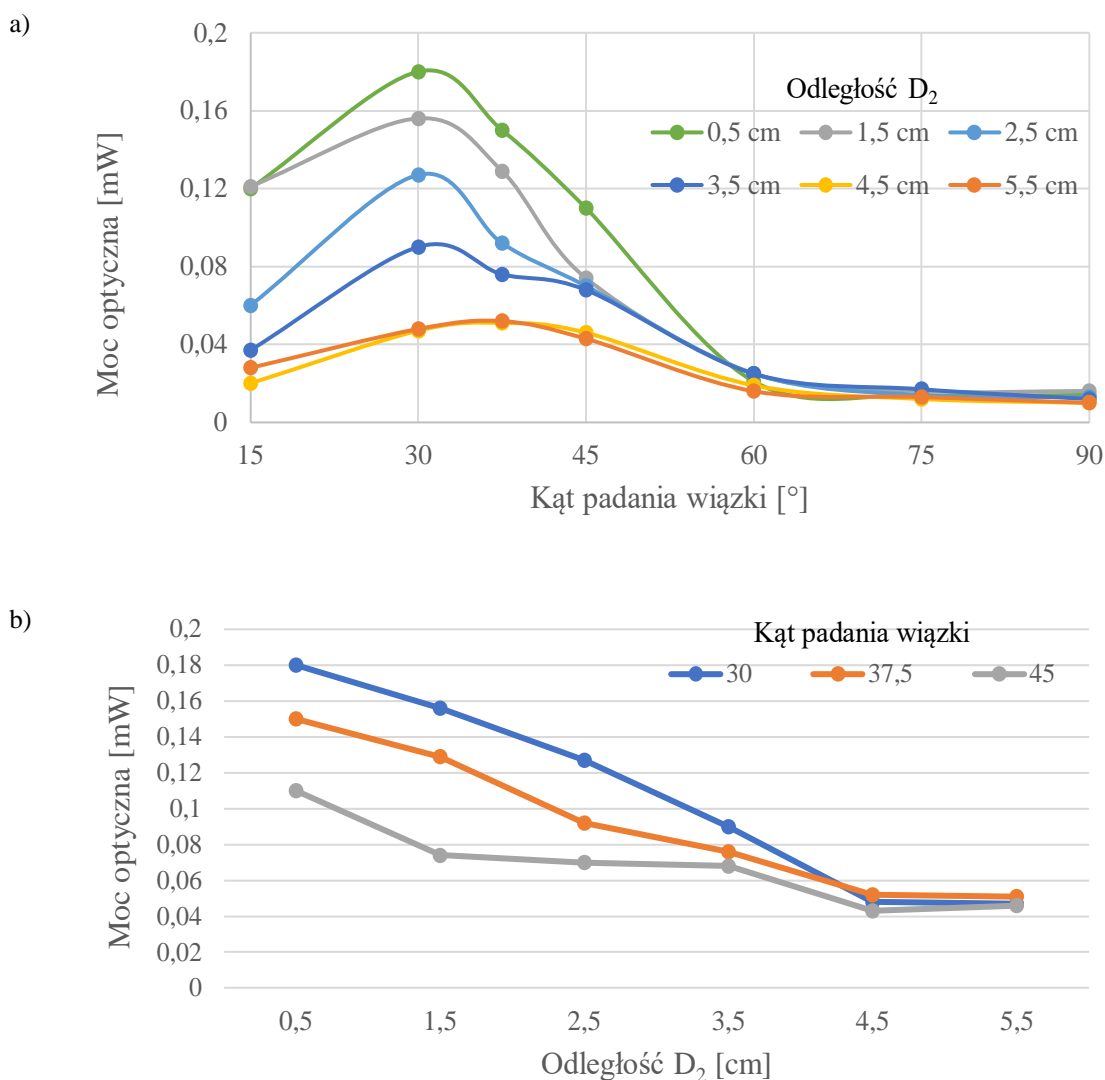
Rysunek 3.35 Zależność mocy optycznej sprzężonej wiązki od kąta padania dla różnych obszarów sprzęgania wiązki laserowej (konfiguracja matrycy C)

Następnie badano rozmieszczenie matrycy mikropryzmatów względem obszaru detekcji w kanale mikrofluidycznym. Stwierdzono, że odległość między diodą lasera, a mikrostrukturą sprzęgającą, zarówno poziomą, jak i pionową, w połączeniu ze zmiennymi kątami padania wiązki, wpływała na wartość mocy optycznej wiązki sprzężonej ze szkłem (Rys. 3.36 oraz Rys. 3.37). Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano, że im mniejsza odległość pryzmatów od mierzonej krawędzi, tym większa moc optyczna sprzężonej wiązki. Również najwyższą wartość mocy optycznej uzyskano dla kąta padania wiązki 30-37,5° względem podłoża w każdym pomiarze.



Rysunek 3.36 Zależność mocy optycznej wiązki sprzężonej (a) od kąta padania wiązki, (b) od odległości pryzmatów od mierzonej krawędzi (D_1 od 4 do 12 mm)

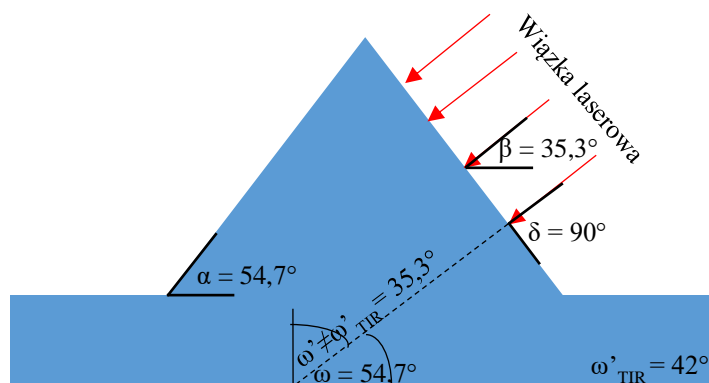
Zakładając, że we wszystkich testach oświetlony jest cały obszar matrycy, a wiązka lasera jest rozbieżna, wzrost odległości D_2 powoduje spadek gęstości mocy optycznej pokrywającej obszar matrycy. Zjawisko to można wyeliminować za pomocą skolimowanej wiązki laserowej lub dostosowując geometrię wiązki po każdorazowej zmianie odległości D_2 .



Rysunek 3.37 Zależność mocy optycznej wiązki sprzężonej (a) od kąta padania wiązki, (b) od odległości diody od powierzchni z pryzmatami (D_2 od 0,5 do 5,5 cm)

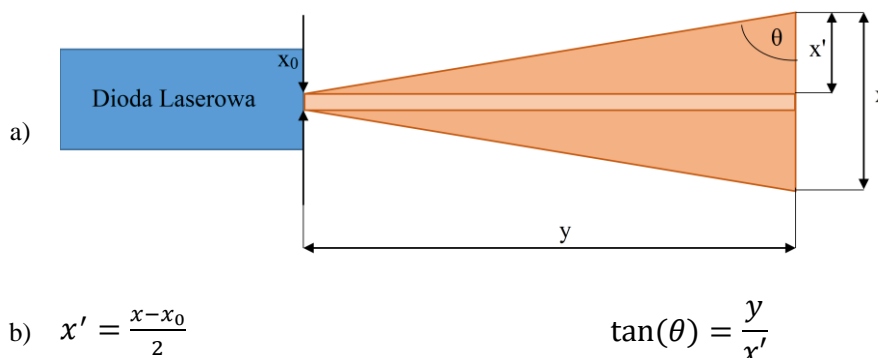
Wyniki te korespondują z geometrycznym ustawieniem światła lasera w stosunku do bocznej ściany piramid (Rys. 3.38). Biorąc pod uwagę, że ściana boczna piramidy jest nachylona pod kątem $\alpha = 54,7^\circ$, optymalny kąt β padania światła wynosi $35,3^\circ$ tak, aby uzyskać kąt prosty w stosunku do ściany bocznej mikrostruktury ($\delta = 90^\circ$). Poprzez sprzężenie wiązki lasera o kącie β równym 30° uzyskuje się kąt padania w stosunku do ściany bocznej δ równy $84,7^\circ$, czyli najbliższą wartość spośród zmierzonych kątów sprzężenia (zakres 15-90°). Badanie optymalnych odległości D_1 i D_2 wykazało, że duża część światła przechodzącego przez szkło jest tracona z powodu niespełnienia warunku zjawiska całkowitego wewnętrznego odbicia (TIR) w strukturze podłoża szklanego [134]. Biorąc pod uwagę, że współczynnik załamania światła w szkle borowo-krzemianowym wynosi 1,52 [135] dla $\lambda = 470$ nm, to kąt graniczny dla TIR wynosi 42° . Aby spełnić ten

wymóg, kąt α pomiędzy ścianą boczną ostrosłupa, a jego podstawą powinien być większy niż 42° . Wartość ta była nieosiągalna ze względu na zdefiniowany kąt między płaszczyznami (111) i (100) tworzącymi mikropryzmaty.



Rysunek 3.38 Schemat geometrycznego ustawienia światła laserowego w stosunku do ściany bocznej piramid i warunków TIR

Wiązka laserowa w stosowanym module laserowym jest rozbieżna, dlatego kąt padania będzie zależał od położenia każdej piramidy w stosunku do położenia źródła światła (Rys. 3.39). Kąt wnikania wiązki lasera do powierzchni δ może być mniejszy od kąta prostego i różnić się o około $10-12^\circ$. Zgodnie z wynikami badań sprzężenia wiązek, najwyższą moc optyczną uzyskano dla $30-45^\circ$ kąta padania, co daje w przybliżeniu do 15° zakresu manipulacji kątem padania wiązki.



Rysunek 3.39 Schemat przedstawiający wpływ rozbieżności wiązki laserowej na optymalny kąt padania wiązki (a) wraz ze wzorami niezbędnymi do obliczenia kąta wnikania wiązki lasera θ w podłoże (b)

Na podstawie przeprowadzonych badań, uwzględniając geometrię mikropryzmatu, wstępnie zaproponowano następującą geometrię układu do wprowadzania wiązki

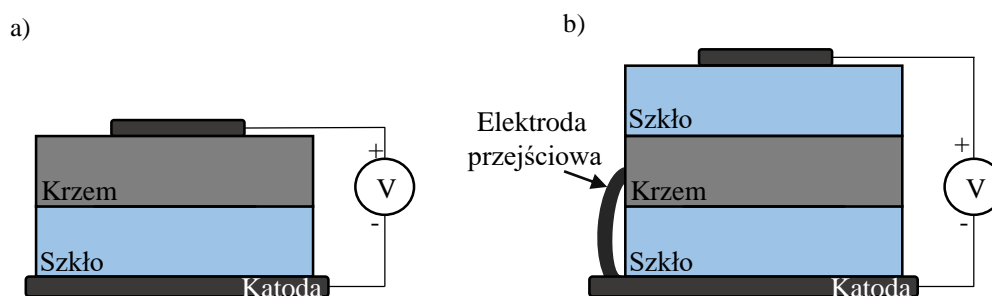
laserowej w podłoże szklane: 4 mm dla odległości pryzmatów do mikrokanalu, 30° dla kąta padania i 4,5 cm dla odległości diody od powierzchni podłoża. Dla konfiguracji układu mikroprzepływowego, ale także dla ułatwienia użytkowania podczas pomiarów, wybrana odległość diody od powierzchni szkła była większa niż odległość określona jako optymalna (tutaj 0,5 cm).

3.3 Integracja elementów mikrocytometru

Po etapie badań związanych z opracowaniem i weryfikacją działania pojedynczych elementów składowych mikrocytometru przystąpiono do integracji tychże elementów w mikrocytometr o różnej konfiguracji A, B lub C, jak przedstawiono wcześniej na Rys. 3.4.

3.3.1 Konfiguracja A - Integracja mikrostruktur krzemowo-szklanych

Trwałe łączenie struktur szklanych i krzemowej mikrocytometru zostało przeprowadzone dwuetapowo metodą bondingu anodowego w temperaturze 450 °C, przy napięciu polaryzacyjnym 1,5 kV (Rys. 3.40).



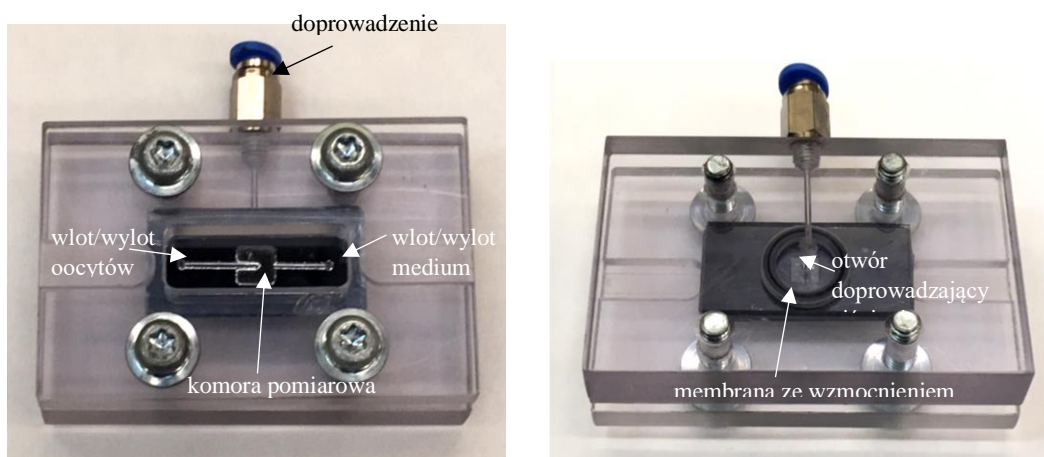
Rysunek 3.40 Schemat procesu łączenia struktur mikrocytometru: a) łączenie krzemowej membrany z podłożem szklanym z otworem, b) łączenie krzemowej membrany z podłożem ze szklaną strukturą pułapkującą i otworami doprowadzającymi

Najpierw podłoża poddano procedurom mycia w detergencie i płukaniu w wodzie dejonizowanej. Następnie połączone zostały krzemowa membrana i podłoże szklane z otworem umożliwiającym doprowadzenie ciśnienia sterującego (Rys. 3.40 a). W tym układzie podłoże szklane zostało umieszczone na płycie grzewczej pełniącej rolę katody. Bezpośrednio na nim spozycjonowano podłoże krzemowe, a następnie umieszczono

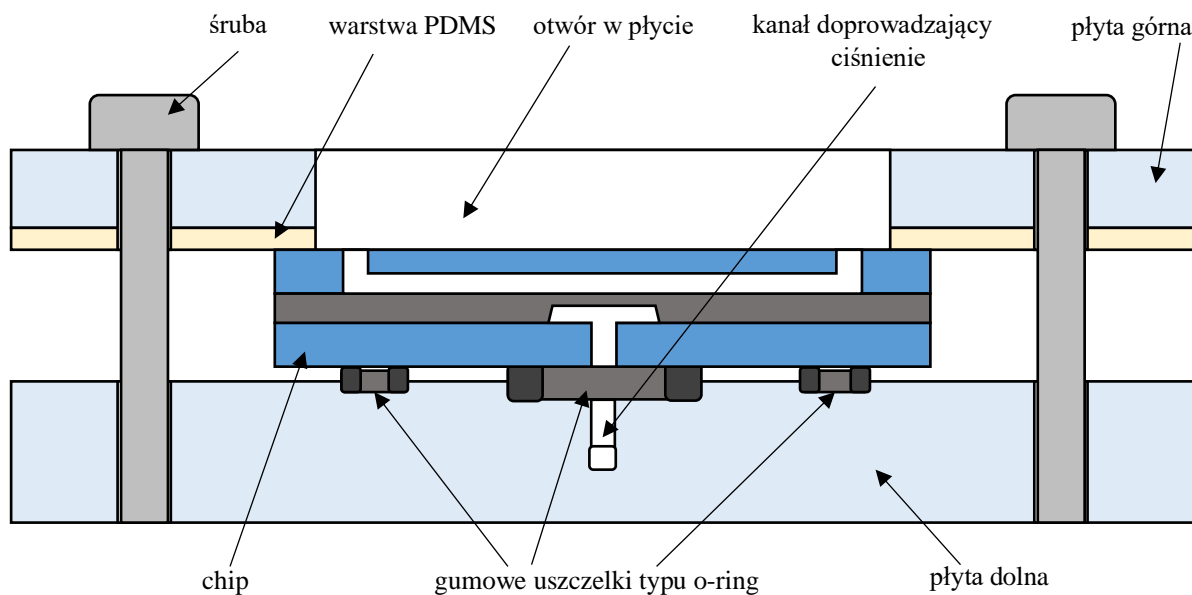
punktową elektrodę i przeprowadzono pierwszy proces bondingu anodowego. W drugim etapie bondingu anodowego, spozycjonowano na połączonych strukturach podłoże szklane z pułapką pozycjonującą. W celu uniknięcia wytrącania się dodatkowych związków ze szkła, pomiędzy elektrodą, a podłożem z pułapką umieszczono dodatkowe podłoże szklane. Podłoże krzemowe zostało spolaryzowane z wykorzystaniem elektrody przejściowej łączącej się z płytą grzewczą (Rys. 3.40 b).

Krzemowo-szklana struktura mikrocytometru została umieszczona w zaprojektowanej i wykonanej obudowie z poliwęglanu, złożonej z dwóch części o wymiarach 4,5 cm x 7 cm oraz wysokości 0,5 cm (górze) i 1 cm (dół) (Rys. 3.41). Dolna część obudowy umożliwia szczelne doprowadzenie ciśnienia pod membranę przez złącze pneumatyczne. Mikrocytometr dociśnięty jest pomiędzy płytami gumowymi uszczelkami typu o-ring od dołu, oraz cienką warstwą polimeru PDMS od góry. Górna część obudowy umożliwia połączenie hydrauliczne układu oraz obserwację komórki podczas pomiarów przez otwór w materiale (Rys. 3.42).

Opracowana obudowa i sposób montażu umożliwia doprowadzenie ciśnienia do komory sterującej mikrocytometru, szczelność pomiędzy mikrocytometrem i polimerową obudową oraz doprowadzenie cieczy do komory pomiarowej. Wymiary geometryczne obudowy dobrano tak, aby możliwe było manipulowanie pipetą podczas wprowadzania i wyprowadzania oocytu z mikrocytometru, oraz podgląd komory pomiarowej przez mikroskop optyczny.



Rysunek 3.41 Mikrocytometr zamontowany w obudowie z poliwęglanu: a) widok z góry b) widok z dołu

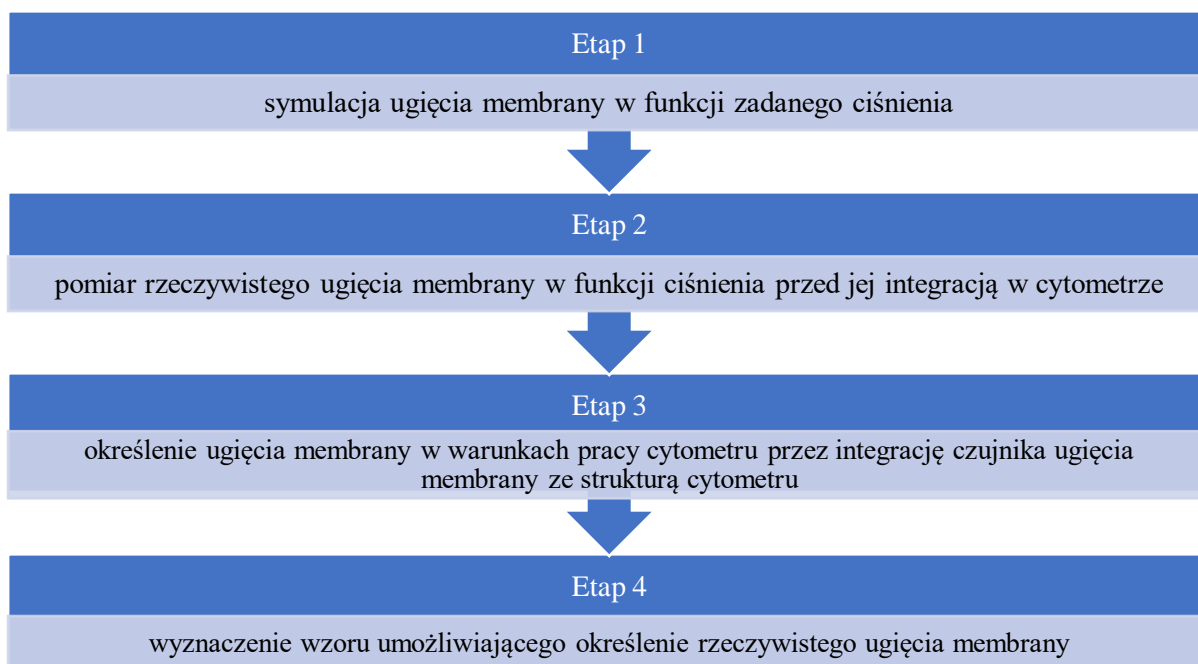


Rysunek 3.42 Przekrój obudowy z zamontowanym mikrocytometrem

3.3.2 Konfiguracja B - Integracja czujnika ugięcia membrany

Kluczowa dla wiarygodności badań nad deformacją komórek jest znajomość rzeczywistego ugięcia membrany ściskającej oocyt. Aby uwzględnić w pomiarach wymiar poszczególnych komórek i dostosować do niego określoną wartość ugięcia membrany należało powiązać wartość ciśnienia sterującego na membranę z jej rzeczywistym ugięciem. Wiązało się to z uwzględnianiem wymiarów geometrycznych komory pomiarowej oraz faktu, że wypełniona jest ona medium o określonej gęstości, co może mieć przełożenie na wartość ugięcia membrany, a co za tym idzie także procent ściśnięcia komórki.

Przeprowadzenie symulacji ugięcia membrany umożliwiło wstępny dobór wymiarów membrany. Podczas pomiarów z wykorzystaniem światłowodowego czujnika odległości określono zależność rzeczywistego ugięcia membrany od ciśnienia sterującego. Pomiar ten dotyczył sytuacji, w której ugięta membrana napotykała jedynie na opór powietrza, a nie cieczy wypełniającej komorę pomiarową mikrocytometru. Istnieje także zagrożenie, że sama komórka może „stawiać opór” membranie podczas ściskania. Dlatego też, należało przeprowadzić pomiar ugięcia membrany w trakcie rzeczywistych pomiarów z materiałem biologicznym wewnątrz komory pomiarowej (Rys. 3.43).



Rysunek 3.43 Zaproponowany algorytm wyznaczania rzeczywistego ugięcia membrany krzemowej

W tym celu układ pomiarowy do wyznaczenia ugięcia membrany powinien stać się integralną częścią mikrocytometru, nie naruszając przy tym funkcjonalności chipa. Wybrane typy czujników umożliwiające określenie ugięcia membrany krzemowej przedstawione zostały w Tabeli 3.8.

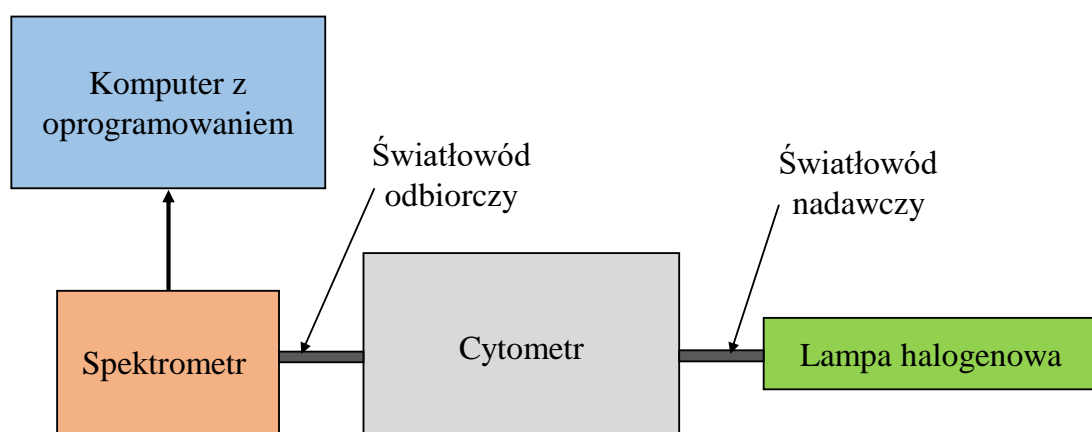
Tab. 3.8 Wybrane typy czujników umożliwiające pomiar rzeczywistego ugięcia membrany krzemowej

Typ czujnika	Cechy metody	Źródła
Czujnik piezorezystancyjny	trudna technologia, konieczność kompensacji wpływu temperatury	[122, 136, 137]
Czujnik pojemnościowy	konieczność doprowadzeń elektrycznych, nieliniowy charakter, mała pojemność	[138]
Czujnik optyczny	brak kontaktów elektrycznych, stosunkowo łatwy do integracji, konfiguracja światłowodu z membraną niekompatybilna z budową mikrocytometru	[123, 139, 140]

Zarówno czujnik piezorezystancyjny jak i pojemnościowy zostały odrzucone ze względu na konieczność wytworzenia dodatkowych układów mikroelektrycznych, które skomplikowałyby konstrukcję mikrocytometru. Natomiast czujnik optyczny odznacza się w tym zestawieniu największą łatwością integracji. Czujnik optyczny wytworzony może

zostać w różnych konfiguracjach względem uginającej się membrany. Zaproponowane rozwiązania możliwe są do zastosowania jedynie w warunkach, gdzie komora pomiarowa nie jest wypełniona żadną substancją. Dlatego też konieczne było zmodyfikowanie budowy czujnika optycznego i struktury mikrocytometru w taki sposób, aby pomiar ugięcia dokonywany był w komorze sterującej.

W proponowanym rozwiązaniu światło z lampy halogenowej transmitowane jest światłowodem do komory pneumatycznej mikrocytometru i oświetla wzmocnienie membrany (Rys. 3.44). Po przeciwległej stronie wzmocnienia światłowód odbiorczy transmituje światło do miniaturowego spektrometru. Jeżeli na membranę nie jest podane ciśnienie, to wzmocnienie przesłania tor optyczny i światło nie dociera do światłowodu odbiorczego. Wraz z zwiększaniem ciśnienia, krzemowa membrana ugina się unosząc jednocześnie wzmocnienie i stopniowo „odslaniając” drogę optyczną pomiędzy światłowodami.



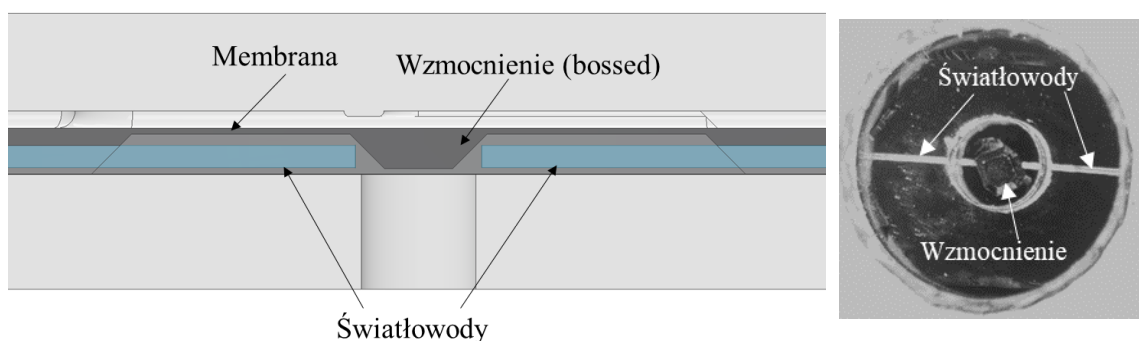
Rysunek 3.44 Schemat układu pomiarowego do pomiaru wartości ugięcia membrany

W układzie pomiarowym do charakteryzacji zintegrowanego czujnika ugięcia membrany wykorzystano: cytometr w obudowie poliwęglanowej, miniaturowy spektrometr USB4000UV-VIS firmy Ocean Optics, miniaturową lampę halogenową HL-2000 firmy Ocean Optics oraz komputer wyposażony w oprogramowanie SpectraSuite do pomiaru charakterystyk spektralnych.

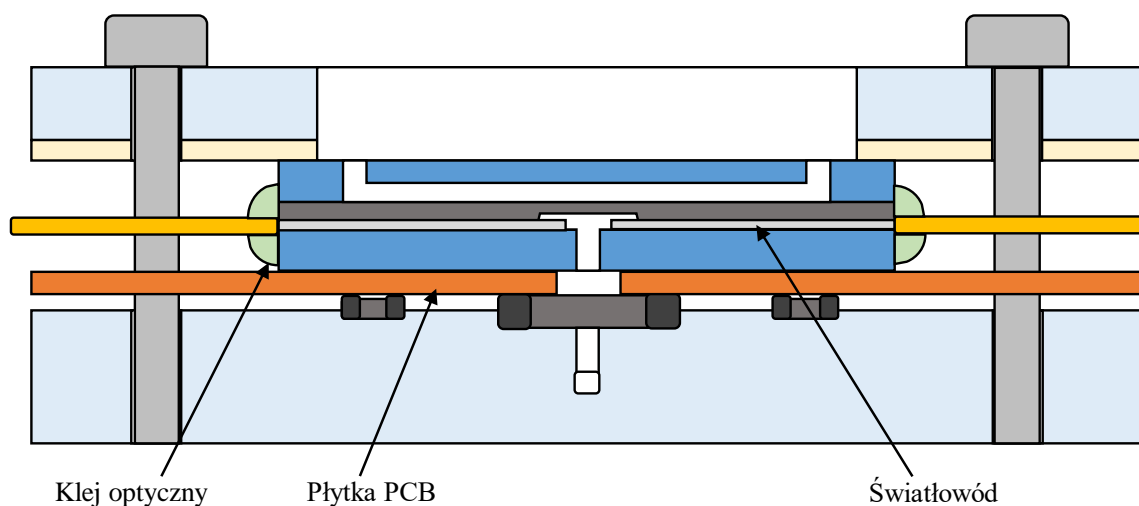
Do pomiarów ugięcia membrany użyte zostały dwa światłowody szklane FG105LCA (Thortlabs) o średnicy rdzenia 105 μm . Przed montażem usunięta została mechanicznie osłona zewnętrzna oraz wzmocnienie światłowodu. Następnie włókno zostało ucięte w przecinacze światłowodowej (Fujikura). Krzemowo-szklana struktura mikrocytometru przyklejona została do płytki PCB, która posłużyła do unieruchomienia

światłowodu w obudowie. Montaż światłowodów wykonano na stanowisku mikroskopowym umożliwiającym obserwację pozycjonowania i wprowadzania włókna w v-rowek wytrawiony w krzemie. Światłowod został unieruchomiony w mikrocytometrze przez zaaplikowanie do v-rowka niewielkiej ilości kleju optycznego (NOA 61, Thorlabs), który dzięki siłom kapilarnym wypełnił kanał z włóknem. Następnie klej został utwardzony światłem UV przez około 5 minut za pomocą lampy dentystycznej (Electro-Lite).

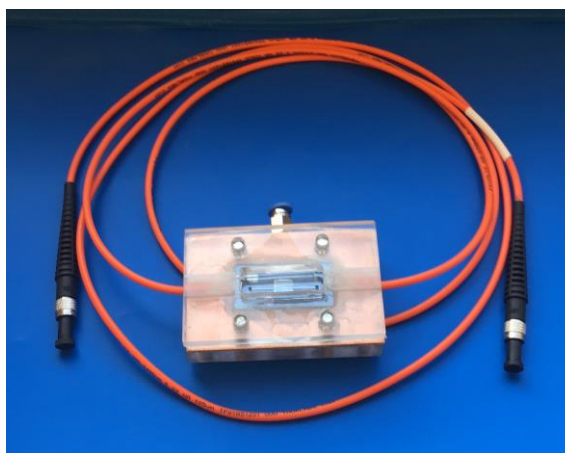
Przyjęto, że montaż światłowodów w strukturze mikrocytometrze był poprawny, jeżeli czoło światłowodu spozycjonowane zostało w obrębie wzmocnienia membrany o grubości 330 μm na jednakowej wysokości oraz w jednej osi patrząc z góry (Rys. 3.45). Wykonany mikrocytometr ze zamontowanymi światłowodami (konfiguracja B) został następnie umieszczony w obudowanie poliwęglanowej umożliwiającej połączenie pneumatyczne i wyprowadzenie światłowodów (Rys. 3.46).



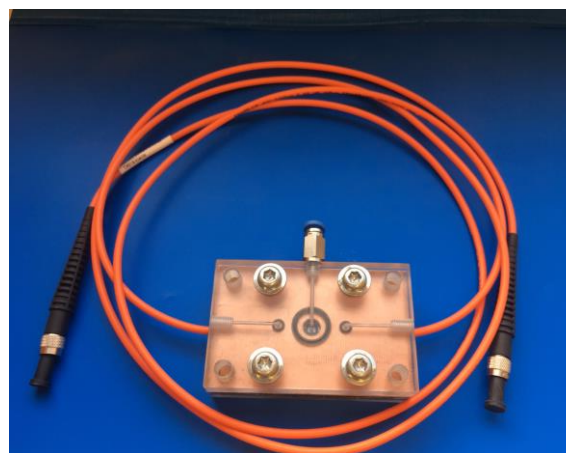
Rysunek 3.45 Spozycjonowane światłowody w mikrocytometrze: a) schemat przekroju chipa, b) zdjęcie mikroskopowe (widok z góry)



a)



b)



c)

Rysunek 3.46 Mikrocytometr zamontowany w obudowie z poliwęglanu: a) przekrój modułu pneumatycznego z mikrocytometrem, b) widok z góry, c) widok z dołu

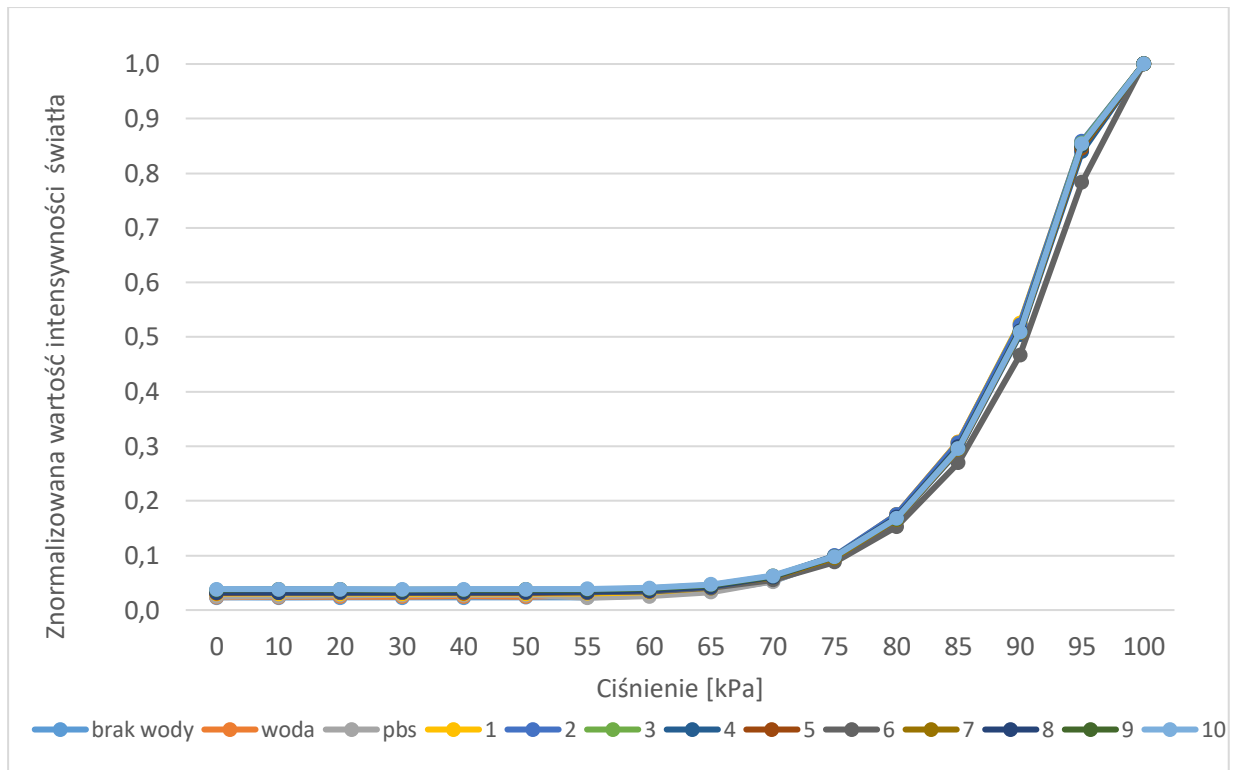
Zgodnie z zaproponowanym algorytmem (Rys. 3.43) przeprowadzono szereg badań z wykorzystaniem m.in. utrwalonych oocytów, które posłużyły jako modelowy materiał badawczy do wyznaczenia rzeczywistego ugięcia membrany w mikrocytometrze w warunkach pracy rzeczywistej. Wstępne pomiary przeprowadzono z wypełnieniem układu mikrofluidycznego cieczą: wodą dejonizowaną albo buforem fosforanowym (PBS). Zbadano wpływ obecności oocytu w komorze pomiarowej, wypełnionej PBS, na wartość ugięcia membrany, która mogłaby zmniejszyć się pod wpływem „stawianego oporu” przez komórki podczas ściskania. W tym celu ściśnięto 10 utrwalonych oocytów o różnej średnicy (Tab. 3.9). Wykorzystano membranę o wymiarach przedstawionych w Tabeli 3.2 ze wzmocnieniem 1 mm x 1 mm.

Tab. 3.9 Średnica komórek ściśniętych podczas testów uginania membrany

Numer komórki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Średnica [μm]	136	135	136	127	138	135	138	137	136	140

W wyniku pomiarów uzyskano szereg charakterystyk spektralnych (modulacji światła) lampy halogenowej przy różnym stopniu ugięcia membrany krzemowej. Z każdej charakterystyki odczytano maksymalną wartość intensywności w zakresie transmisji światła światłowodu. Uzyskane wartości intensywności zostały znormalizowane i przedstawione w funkcji ciśnienia sterującego (Rys. 3.47).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że typ medium zastosowanego w komorze pomiarowej (woda, PBS), bądź jego brak, nie powoduje zmian w wartości ugięcia membrany przy zadanym ciśnieniu. Dodatkowo, zaobserwowano, że obecność komórki w mikrocytometrze, jak i wartość jej średnicy, nie wpływa na charakter ugięcia membrany. Wyjątkiem jest tutaj komórka nr 6. Po przeprowadzeniu analizy wyników i warunków pomiarowych stwierdzono, że podczas pomiarów tej komórki wpływ na wartość zmierzonej intensywności mogło mieć natężenie światła zewnętrznego.



Rysunek 3.47 Zależność znormalizowanej wartości intensywności świecenia światła transmitowanego między światłowodem nadawczym, a odbiorczym od wartości ciśnienia sterującego dla różnych warunków wypełnienia układu mikrofluidycznego oraz podczas ściskania 10 oocytów

W wyniku przeprowadzonych badań ugięcia membrany w zintegrowanej strukturze mikrocytometru w różnych warunkach wypełnienia układu mikrofluidycznego oraz obecności oocytu w komorze pomiarowej ustalono, że wystarczającą metodą charakteryzacji ugięcia membrany jest pomiar mikrostruktury krzemowej na stanowisku pomiarowym z światłowodowym czujnikiem odległości (pomiar przed integracją mikrocytometru). Wykorzystując wyniki ugięcia wytworzonych membran o wymiarach wzmocnienia 1 mm x 1 mm (np. Rys. 3.13) i wymiarach opisanych w Tabeli 3.2, wyznaczono metodą aproksymacji liniowej wzór (3.2) pozwalający na określenie wartości ciśnienia y potrzebnego do ugięcia membrany o wartość x , w której uwzględniona jest indywidualna średnica każdego ściskanego oocytu.

$$y = 1,0247x - 1,9737 \quad (3.2)$$

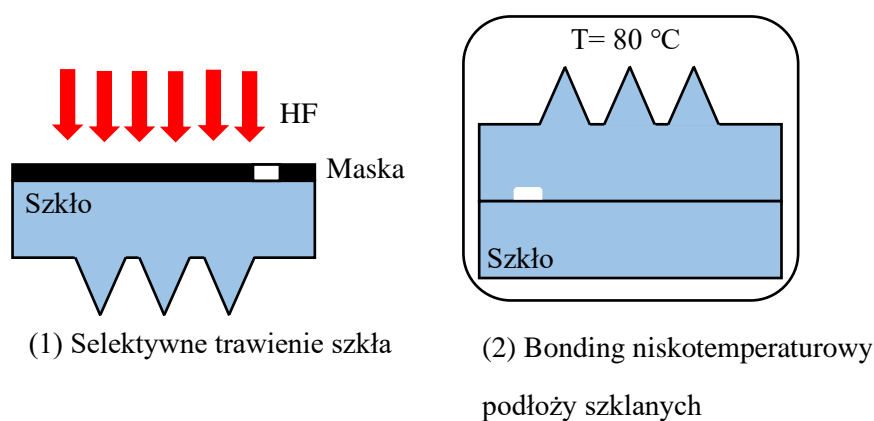
Wartość ugięcia membrany x wyznaczona może zostać ze wzoru (3.3), gdzie w_k to głębokość kanału mikrofluidycznego, którym przemieszcza się oocyt, H_{out} to wartość średnicy komórki oraz $w\%$ to procentowa wartość ściśnięcia komórki.

$$x = (w_k - H_{out}) + (w_{\%} * H_{out}) \quad (3.3)$$

Pozwoliło to na uproszczenie struktury mikrocytometru do konfiguracji A bez zintegrowanych światłowodów. Natomiast integracja tego czujnika daje możliwość kalibracji i monitorowania pracy membrany krzemowej podczas jej uginania.

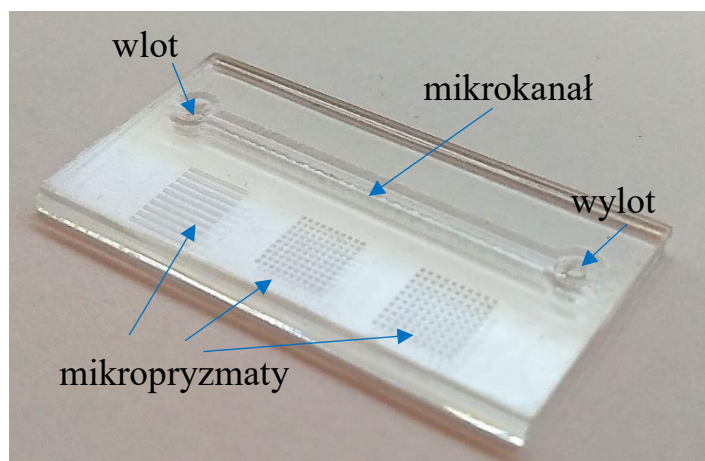
3.3.3 Konfiguracja C - Integracja mikropryzmatów

Po wytworzeniu i optymalizacji geometrii matrycy mikropryzmatów, mikrostruktury zostały zintegrowane z modelowym kanałem mikroprzepływowym w dwóch etapach (Rys. 3.48). Kanał mikrofluidyczny wytrawiono przez warstwę maskującą (taśma polimerowa) na głębokość 300 μm . Po procedurze czyszczenia m.in. roztworem Piranii, podłoże szklane ze zintegrowanym kanałem i matrycą mikropryzmatów zostało trwale połączone z drugim podłożem szklanym w procesie wygrzewania w piecu (do 80 $^{\circ}\text{C}$) przez 8 godzin. Zastosowane tutaj niskotemperaturowe spajanie podłoży szklanych zostało opisane w innych pracach [141].



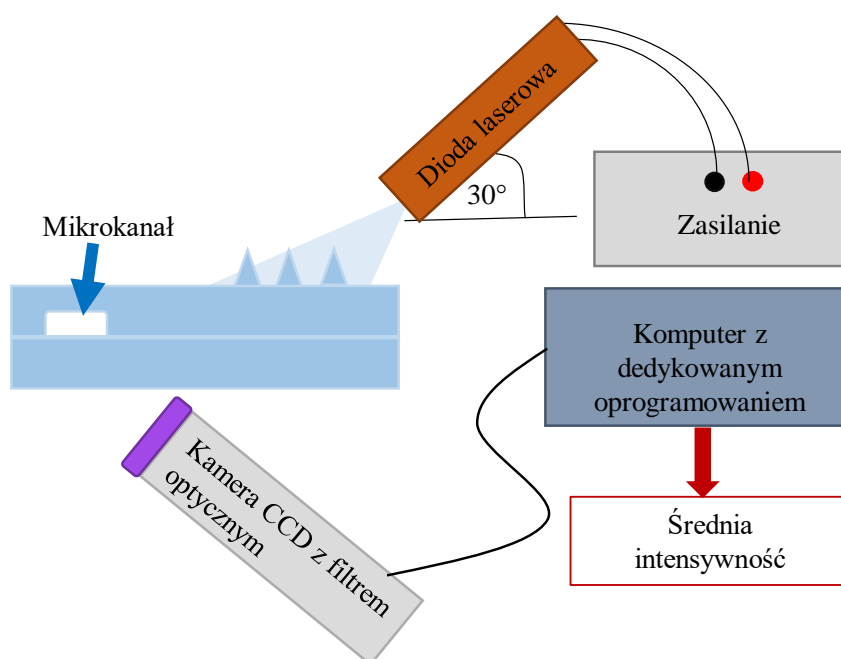
Rysunek 3.48 Schemat wytwarzania zintegrowanego układu mikroprzepływowego z matrycą mikropryzmatów

W rezultacie otrzymano chip mikroprzepływowo z prostym mikrokanalem o głębokości 300 μm i wieloma matrycami struktur mikrooptycznych na jednym podłożu (Rys. 3.49).



Rysunek 3.49 Zdjęcie mikropryzmatów zintegrowanych ze strukturą mikroprzepływową (mikrokanal: długość 25 mm, szerokość 1 mm, głębokość 300 μm)

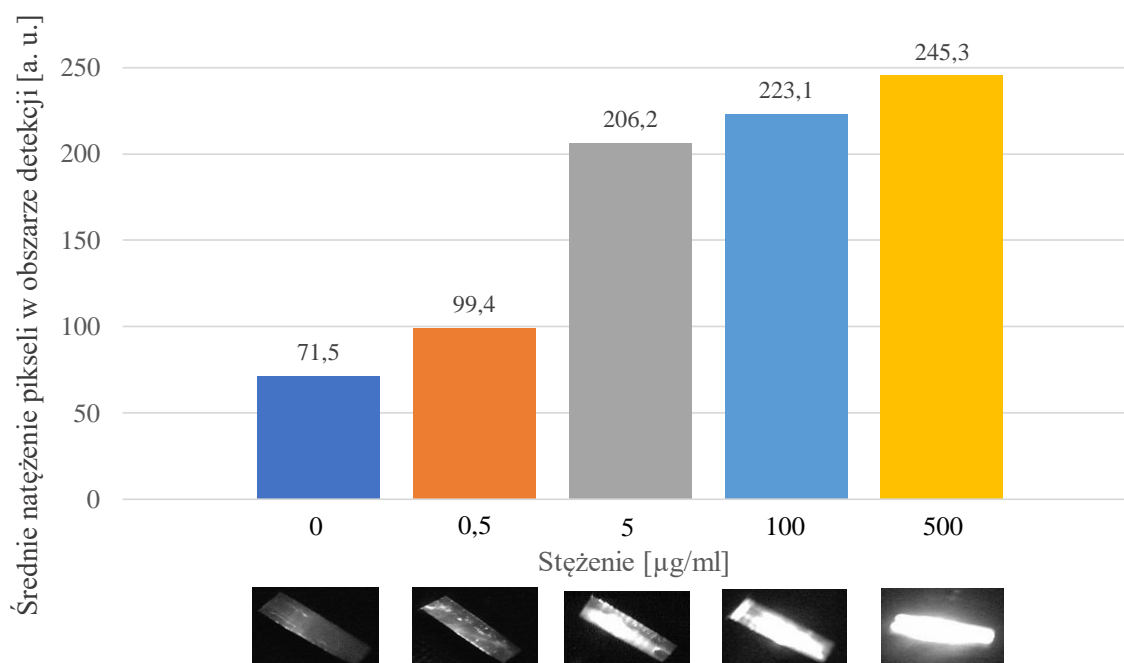
W celu potwierdzenia prawidłowego współdziałania układu mikrofluidycznego i mikrooptycznego umożliwiającego wzbudzenie fluorescencyjne przeprowadzono testy fluorymetryczne w układzie pomiarowym jak na Rys. 3.50.



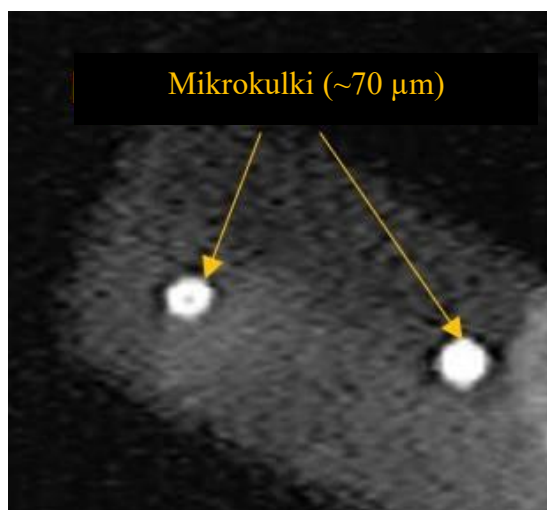
Rysunek 3.50 Schemat układu pomiarowego do testów fluorymetrycznych

Matryce mikropryzmatów oświetlano światłem diody laserowej ($\lambda = 470 \text{ nm}$) pod kątem 30° . Obszar detekcji obserwowano za pomocą kamery CCD z filtrem optycznym (górnoprzepustowy 500 nm). Oprogramowanie Debut Video Capture zostało użyte do przechwycenia obrazów fluorymetrycznego obszaru detekcji, a analizę obrazu

przeprowadzono za pomocą oprogramowania opracowanego w LabVIEW [126, 127]. Dla każdego zdjęcia odczytano średnie natężenie pikseli z obszaru detekcji. Objętościowe testy fluorescencji przeprowadzono stosując roztwór fluoresceiny o różnych stężeniach w zakresie 0,5-500 $\mu\text{g/ml}$ (Rys. 3.51) i diodę laserową do wzbudzenia fluorescencji. Dodatkowo zaobserwowano fluorescencję czerwonych fluorescencyjnych mikrokulek polietylenowych (firmy Cospheric) w tej samej konfiguracji pomiarowej (Rys. 3.52). W rezultacie każda mikrokulka (o średnicy około 70 μm) była wyraźnie widoczna i wyróżniona w mikrokanale. Wykazano, że sprzężona moc optyczna wiązki była wystarczająca, aby wzbudzić fluorescencję w mikrokanale zarówno objętościowo, jak i dla pojedynczych elementów (tj. mikrokulek). Należy mieć na uwadze wpływ mocy optycznej wiązki światła na badaną próbkę biologiczną. Układ pomiarowy pozwala na sterowanie mocą optyczną wiązki laserowej przez zmianę odległości D_2 . W razie konieczności możliwe jest także zastosowanie światła laserowego o mniejszej lub większej wyjściowej mocy optycznej.



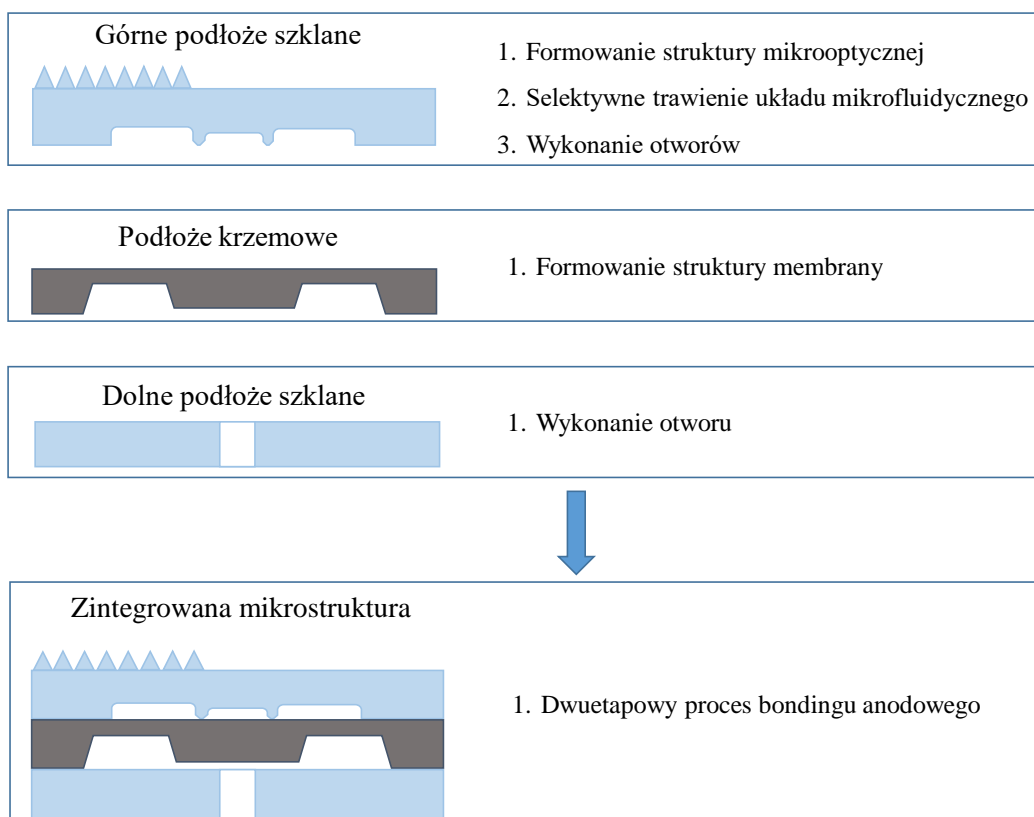
Rysunek 3.51 Zależność odczytanego średniego natężenia pikseli z obszaru detekcji od stężenia fluoresceiny w wodzie (od 0 do 500 $\mu\text{g/ml}$) z załączonymi zdjęciami obszaru detekcji



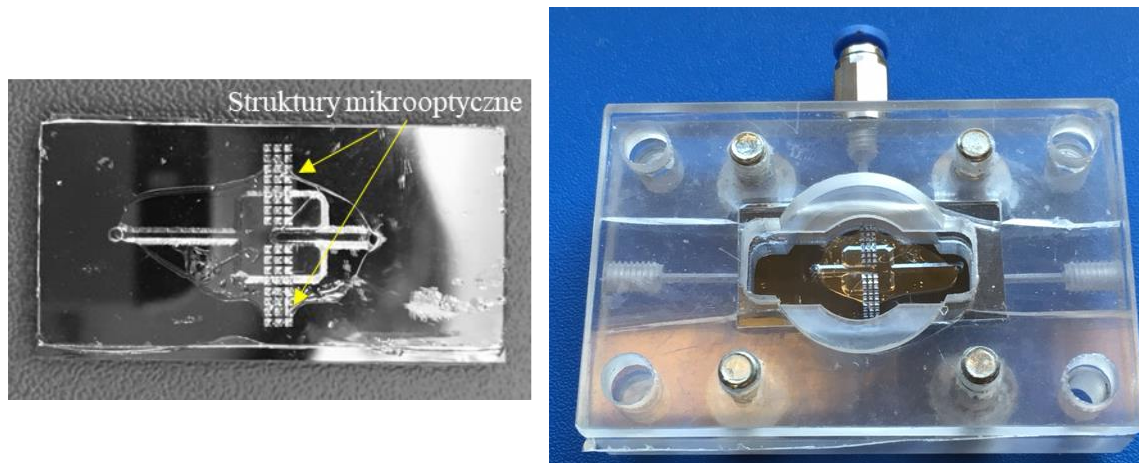
Rysunek 3.52 Przykładowe zdjęcie fluorescencji mikrokulek w mikrokanale

Badania potwierdziły prawidłowe działanie matrycy mikropryzmatów zintegrowanej z kanałem mikroprzepływowym jako elementem mikrooptycznym. Wytworzona matryca mikropryzmatów umożliwia fluorymetryczną detekcję w kanale mikroprzepływowym. Może być zatem z powodzeniem stosowana do dalszych badań oocytów z detekcją fluorymetryczną.

W celu zintegrowania struktur mikrooptycznych z pozostałymi elementami konstrukcji C mikrocytometru, proces wytwarzania mikropryzmatów zaprezentowany na Rys. 3.26 został zmodyfikowany. Na jednym podłożu szklanym wykonano strukturę mikrooptyczną, selektywne trawienie układu mikrofluidycznego oraz otwory (Rys. 3.53). Krzemowa membrana oraz dolne podłoże szklane zostały wytworzone w identyczny sposób jak w konstrukcji A mikrocytometru. W celu zintegrowania wszystkich elementów konieczne było przeprowadzenie dwuetapowego procesu bondingu anodowego dla parametrów określonych wcześniej w podrozdziale 3.3.1. Struktura prototypowa mikrocytometru została sklejana przy użyciu kleju na gorąco na bazie poliolefiny (polimeru) (Rys. 3.54). Obudowa poliwęglanowa została zmodyfikowana w sposób umożliwiający łatwe doprowadzenie wiązki laserowej do powierzchni struktur mikrooptycznych.



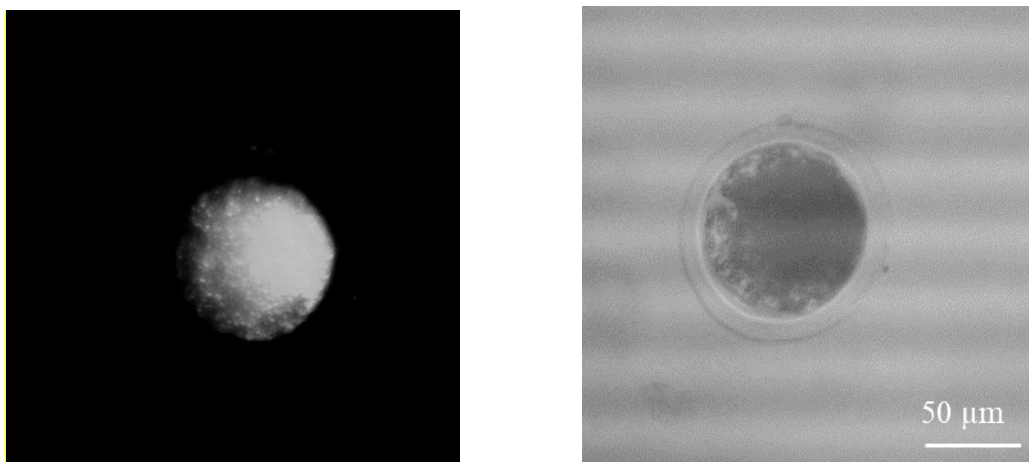
Rysunek 3.53 Schemat wytwarzania zintegrowanego mikrocytometru z matrycą mikropryzmatów



Rysunek 3.54 Zdjęcie struktury prototypowej mikrocytometru ze zintegrowaną matrycą mikropryzmatów:
a) bez obudowy, b) z obudową

W celu zweryfikowania poprawności działania mikrocytometru zbadano fluorescencję kropeł lipidowych oocytu zabarwionych fluoresceiną. Pozwoliło to na wykorzystanie diody laserowej ($\lambda = 470 \text{ nm}$) oraz parametrów pomiaru (np. kąt oświetlania pryzmatów wiązką laserową) z poprzednich testów dla roztworu fluoresceiny opisanych w poprzednim podrozdziale. Badania potwierdziły prawidłowe działanie struktury C

mikrocytometru i umożliwiły fluorymetryczną detekcję oocytu w komorze pomiarowej (Rys. 3.55).

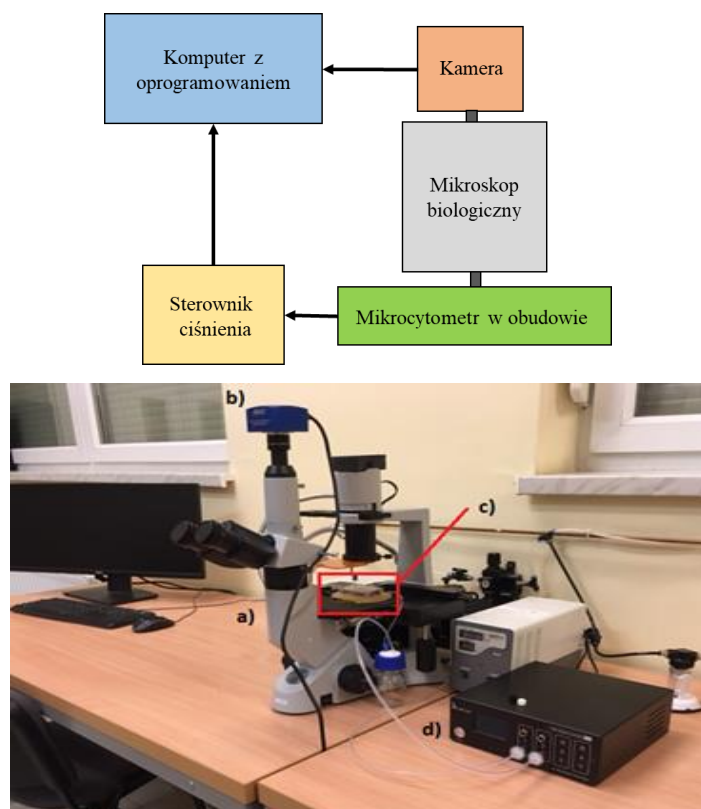


Rysunek 3.55 Przykład fluorescencji zabarwionych kropelek lipidowych oocytu w komorze pomiarowej mikrocytometru (po lewej) w porównaniu do fotografii uzyskanej w trybie mikroskopii odbiciowej (po prawej)

3.4 Układ kontrolno-pomiarowy

Zadaniem układu kontrolno-pomiarowego było umożliwienie obserwacji oocytu podczas manipulowania komórką w układzie mikrofluidycznym oraz podczas badań, a także rejestrowania danych pomiarowych. Posłużył on również do sterowania ugięciem membrany krzemowej wraz ze zintegrowanym z mikrocytometrem czujnikiem ugięcia membrany. Układ kontrolno-pomiarowy wykorzystany został do badań przeprowadzanych w trybie mikroskopii odbiciowej oraz mikroskopii fluorescencyjnej.

W układzie pomiarowym użyto mikroskop biologiczny do określania prawidłowej pozycji badanej komórki w czasie pomiarów w chipie oraz kamerę mikroskopową (DLT- Cam PRO 6.3 MP USB 3.0, Delta Optical) do rejestrowania zmian zachodzących w oocytach podczas deformacji (Rys. 3.56).



Rysunek 3.56 Stacja pomiarowa: schemat (po lewej), widok stanowiska (po prawej): a) mikroskop biologiczny, b) kamera, c) mikrocytometr w obudowie, d) sterownik ciśnienia

Do regulacji ciśnienia wykorzystano sterownik ciśnienia (OB1 MK3, Elveflow) umożliwiający podanie na membranę krzemową ciśnienia do 200 kPa z dokładnością większą niż założony 1 μm ugięcia membrany (Tab. 3.10). W przypadku pomiarów wykonywanych z wykorzystaniem konfiguracji C mikrosystemu do pracy w trybie mikroskopii fluorescencyjnej do układu pomiarowo-kontrolnego dołączona jest spozycjonowana w uchwycie dioda laserowa z zasilaczem.

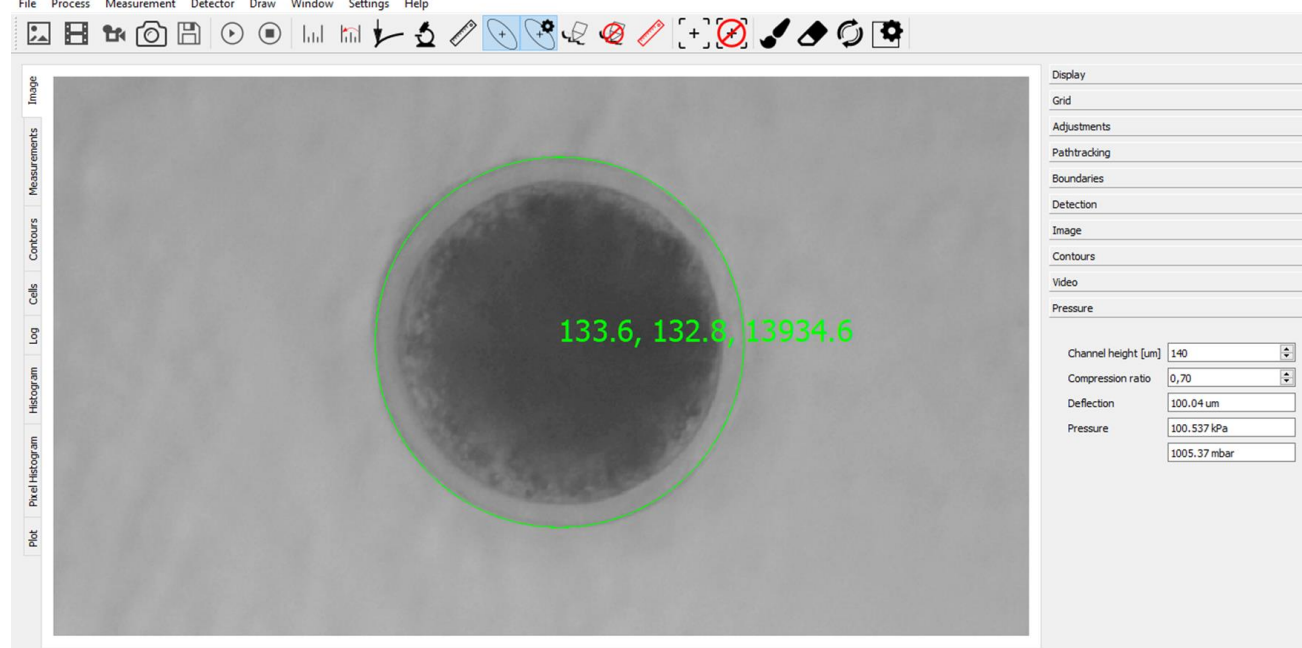
Tab. 3.10 Wybrane parametry sterownika ciśnienia OB1 MK3 firmy Elveflow (na podstawie danych katalogowych) [142]

Zakres ciśnienia regulacji:	0–200 kPa	Szacowany zakres odkształcenia membrany typu bossed:	$\sim 0\text{--}200 \mu\text{m}$
Minimalny przyrost ciśnienia:	0,0122 kPa	Szacowane minimalne odkształcenie membrany typu bossed:	$\sim 0,0122 \mu\text{m}$
Czas odpowiedzi:	9 ms	Czas ustawienia zadanej wartości ciśnienia:	35 ms

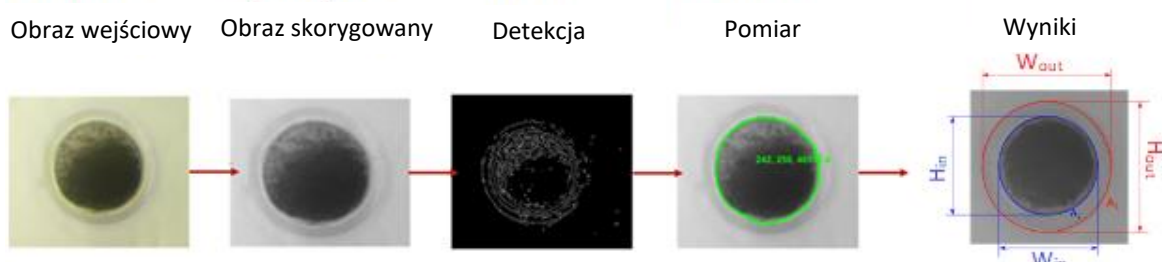
3.4.1 Analiza danych i oprogramowanie

Do identyfikacji oocytów, wyznaczenia różnych geometrycznych parametrów komórki oraz obserwacji zmian zachodzących podczas ściskania, wykorzystano oprogramowanie do przetwarzania obrazu opracowane na potrzeby badań przez mgra inżyniera Danylo Lizanetsa (Rys. 3.57). Oprogramowanie to jest częścią jego pracy doktorskiej i nie jest przedmiotem szczegółowego opisu w tej rozprawie.

Każdy obraz analizowanego oocytu jest wstępnie korygowany (Rys. 3.58). Ze względu na niski kontrast oocytów i tła oraz ograniczoną rozdzielczość mikroskopu oprogramowanie wykonuje wielopoziomowe korekty dotyczące jasności, kontrastu, desaturacji i normalizacji każdego zdjęcia. Następnym krokiem jest detekcja komórki i jej poszczególnych elementów. W celu odróżnienia oocytów od tła, a następnie znalezienia konturu komórki, zastosowano zestaw algorytmów, takich jak progowanie, wykrywanie krawędzi, wykrywanie kropelek i odejmowanie tła. Następnie, dla każdego konturu możliwe jest obliczenie następujących parametrów: pole, kształt, wymiary liniowe, dopasowywanie / zamykanie elipsy, histogram jasności, środki masy i inne. Szczegółowy opis algorytmu przetwarzania obrazu został przedstawiony w pracy autora oprogramowania [143].

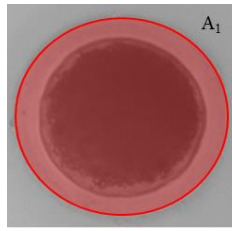


Rysunek 3.57 Widok ekranu programu do przetwarzania i analizy obrazu opracowanego przez Danylo Lizanetsa. Przykładowy pomiar średnicy oraz pola powierzchni komórki

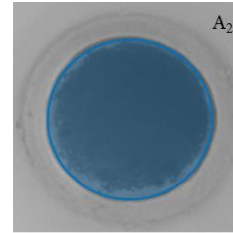


Rysunek 3.58 Schemat przetwarzania obrazu wykorzystany do pomiaru parametrów oocyty podczas ściskania

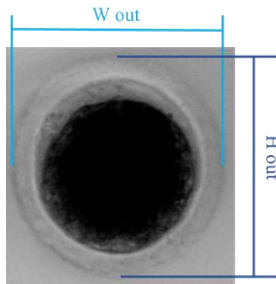
Oprogramowanie umożliwia określenie różnych parametrów geometrycznych oocytów: średnicy komórki i jej ooplazmy (W_{in} , H_{in} , W_{out} , H_{out}), pola powierzchni (A_1 , A_2), grubość osłonki przejrzystej (Z_p) oraz zmiany tych parametrów (Rys. 3.59). Pola powierzchni (A_1 , A_2) odnosiły się do pola przekroju obrazu oocytów zarejestrowanego podczas ściskania komórek. W celu porównania zmian w odkształcalności oocytów w trzech różnych klasach jakości określono zmianę pola powierzchni i zmianę średnicy. Zmiana pola powierzchni była procentową zmianą wartości powierzchni komórki, gdy membrana została ugięta przy zadanej wartości ciśnienia w stosunku do nieodkształconej membrany ($P = 0$ kPa). Zmiana średnicy była procentową zmianą średnicy komórki od nieściśniętego oocyty do zastosowanego ciśnienia sterującego. Zebrane parametry są zapisywane i można je eksportować z oprogramowania w celu dalszego przetwarzania.



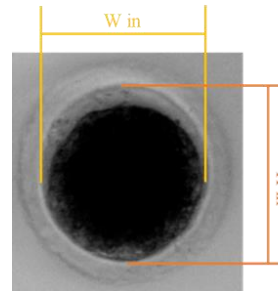
A_1 – pole powierzchni całej komórki



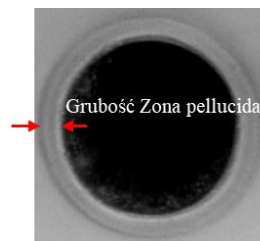
A_2 – pole powierzchni komórki z wyłączeniem osłonki przejrzystej



W_{out} oraz H_{out} – średnice całej komórki mierzone w osi X i Y



W_{in} oraz H_{in} – średnice wewnętrzne komórki (tj. z wyłączeniem osłonki przejrzystej) mierzone w osi X i Y



Z_p – grubość zony pellucidy (osłonki przejrzystej)

$$\%H_{out} = \frac{H_{out}^k * 100\%}{H_{out}^p}$$

$$\%H_{in} = \frac{H_{in}^k * 100\%}{H_{in}^p}$$

$$\%A_1 = \frac{A_1^k * 100\%}{A_1^p}$$

$$\%A_2 = \frac{A_2^k * 100\%}{A_2^p}$$

$$\%Z_p = \frac{Z_p^k * 100\%}{Z_p^p}$$

$H_{out}^p | H_{in}^p | A_1^p | A_2^p | Z_p^p$ – wartość parametru zmierzona przed ściśnięciem komórki

$H_{out}^k | H_{in}^k | A_1^k | A_2^k | Z_p^k$ - wartość parametru zmierzona podczas ściskania komórki

$\%H_{out} | \%H_{in} | \%A_1 | \%A_2 | \%Z_p$ – procentowa zmiana parametru w wyniku ściśnięcia komórki

Rysunek 3.59 Parametry geometryczne określone podczas badań

3.5 Podsumowanie cząstkowe

Na podstawie przeprowadzonej analizy krytycznej rozwiązań mikroinżynierskich i metodologii badawczych opisywanych w literaturze przedmiotu określono założenia funkcjonalne, projektowe i technologiczne mikrocytometru. Zdefiniowano elementy składające się na autorski i nowatorski mikrocytometr odkształceniowy tj. elementy mikromechaniczne, mikrofluidyczne oraz mikrooptyczne, a także układ kontrolno-pomiarowy wyposażony w oprogramowanie do analizy obrazu.

W wyniku przeprowadzonych badań:

- zasymulowano, a następnie scharakteryzowano rzeczywiste ugięcie membrany krzemowej w różnych konfiguracjach,
- opracowano i wytworzono krzemową membranę służącą do ściskania oocytów,
- opracowano i wytworzono układ pomiarowy do pomiaru rzeczywistego ugięcia membrany krzemowej,
- zoptymalizowano technologię struktur pułapek mikrofluidycznych uzyskując dwie różne głębokości trawienia szkła podczas jednego procesu technologicznego,
- opracowano i wytworzono szklaną strukturę pułapkującą oocyty,
- opracowano i wytworzono struktury mikrooptyczne umożliwiające sprzężenie światła do obszaru detekcji oocytu wewnątrz mikrocytometru,
- zintegrowano elementy składające się na mikrocytometr w trzech różnych konfiguracjach,
- zweryfikowano działanie poszczególnych konfiguracji mikrocytometru odkształceniowego,
- zestawiono układ kontrolno-pomiarowy.

Wyniki prac technologicznych wykorzystano do wytworzenia trzech konfiguracji mikrocytometru. W konfiguracji A mikrocytometru zweryfikowano początkowe założenia związane z zasadą pomiaru deformacji oocytów. W konfiguracji B mikrocytometru wyznaczono rzeczywiste ugięcie membrany krzemowej. Natomiast zintegrowanie mikrocytometru z matrycą mikropryzmatów w konfiguracji C dała możliwość wytworzenia układu pomiarowego do badań deformacji organelli oocytu w trybie mikroskopii fluorescencyjnej. Opracowane konfiguracje wykorzystano w badaniach z rzeczywistym materiałem biologicznym (oocyty), a wyniki tych prac przedstawiono w kolejnym rozdziale.

4 Wyniki badań oocytów

Przeprowadzono szereg badań weryfikujących działania poszczególnych konfiguracji mikrocytomietru, układu kontrolno-pomiarowego oraz oprogramowania do analizy danych pomiarowych z wykorzystaniem rzeczywistego materiału biologicznego. Badania te prowadzono przy współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu z grupą prof. dr hab. Doroty Cieślak.

Do badań wykorzystano żywe oraz utrwalone (martwe) oocyty świń. Wybrane grupy komórek podzielone zostały na cztery klasy jakości w oparciu o kryteria morfologiczne (Rys. 2.2), przy czym klasa czwarta (najgorsza) nie została wykorzystana w badaniach.

W ramach badań z wykorzystaniem różnych konfiguracji mikrocytomietru odkształceniowego przeprowadzono próby określenia:

- nieniszczącej wartości procentowej ściśnięcia oocytu,
- potencjalnych różnic w deformacji utrwalonych oraz żywych oocytów,
- potencjalnych różnic w deformacji oocytów przypisanych do różnych klas jakości,
- zależności pomiędzy badanymi parametrami geometrycznymi komórek (zdefiniowanymi jak na Rys. 3.59).

W celu zapewnienia sterylności mikrocytomietru, przed i po każdym eksperymencie komora pomiarowa mikrocytomietru była poddawana procedurze czyszczenia izopropanolem, a następnie płukana wodą dejonizowaną.

4.1 Wstępne badania mikrocytomietru - konfiguracja A

Celem wstępnych badań było zweryfikowanie działania zintegrowanego mikrocytomietru w konfiguracji A oraz opracowanego układu pomiarowo-kontrolnego. Analiza wykonanych zdjęć mikroskopowych oocytów pozwoliła na sprawdzenie możliwości charakteryzacji deformowanych komórek z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania.

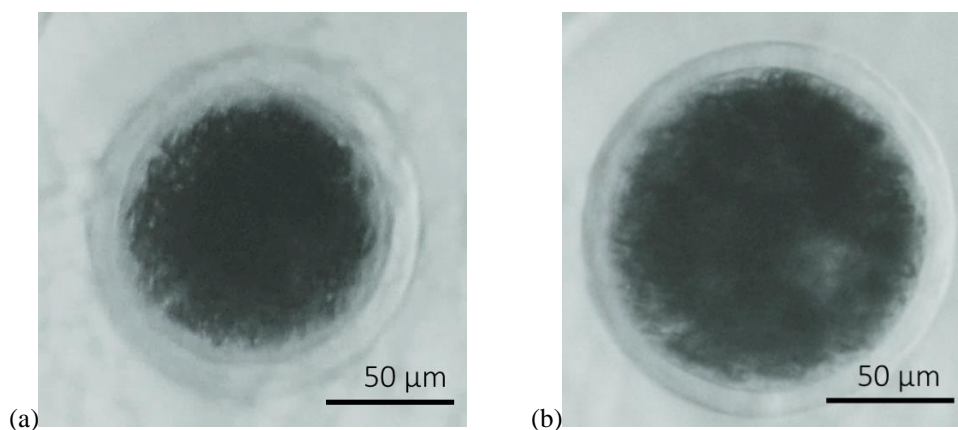
Każdy oocyt został wprowadzony do komory pomiarowej cytometru przy użyciu pipety laboratoryjnej, a następnie ściśnięty krzemową membraną, na którą podana została wartość ciśnienia o wartości 100 kPa, co odpowiadało ugięciu membrany o 100 μm . Podczas pomiarów wykonane zostały dwa zdjęcia mikroskopowe – przed i w trakcie

ściskania, które posłużyły do wstępnej parametryzacji komórki. Łącznie, wykonano pomiar deformacji 10 utrwalonych oocytów (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Średnica badanych oocytów

Numer komórki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Średnica początkowa [μm]	141	148	146	145	154	135	137	124	136	131
Średnica dla $P=100$ kPa [μm]	150	159	161	153	166	138	144	131	137	139

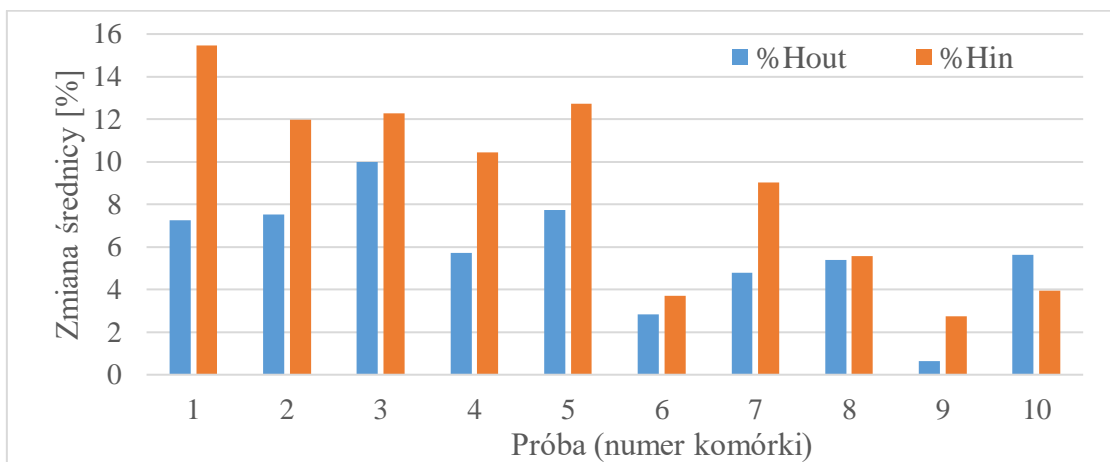
Podczas pomiarów zaobserwowano deformowanie się komórek podczas ich ściskania (Rys. 4.1). Wykonane zdjęcia mikroskopowe pozwoliły na parametryzację każdego oocytu, wyznaczając parametry geometryczne komórki opisane wcześniej w Rys. 3.59. Zgodnie z przewidywaniami zaobserwowano niewielkie rozbieżności w wartościach mierzonych średnic oocytów H_{in} , H_{out} oraz odpowiednio W_{in} , W_{out} . Różnice te wynikają z niedoskonałego kształtu komórki, który może odbiegać od kształtu idealnej kuli. W przypadku badanych tutaj oocytów utrwalonych zaobserwowano nieznaczne różnice na poziomie 1-2 μm . Dla każdej badanej komórki wyznaczono obie średnice zewnętrzne oraz wewnętrzne w celu monitorowania ewentualnych zmian zachodzących w kształcie oocytów podczas i po deformacji. Stwierdzono, że jest to na tyle niewielka różnica, że w dalszych badaniach oocytów utrwalonych wyznaczano tylko H_{in} i H_{out} .



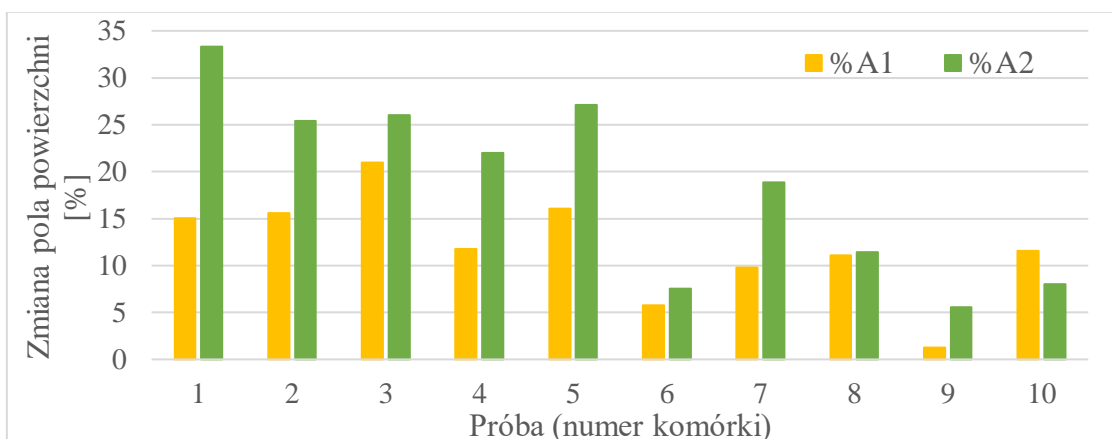
Rysunek 4.1 Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające przykładowy oocyt: (a) przed ściśnięciem dla $P=0$ kPa, (b) podczas ściskania dla $P=100$ kPa

Zaobserwowano znaczące różnice w stopniu w jakim zmieniły się pozostałe parametry geometryczne komórek podczas ściskania (Rys. 4.2, Rys. 4.3 oraz Rys. 4.4). Ponadto zwrócono uwagę na zależności pomiędzy badanymi parametrami – polami

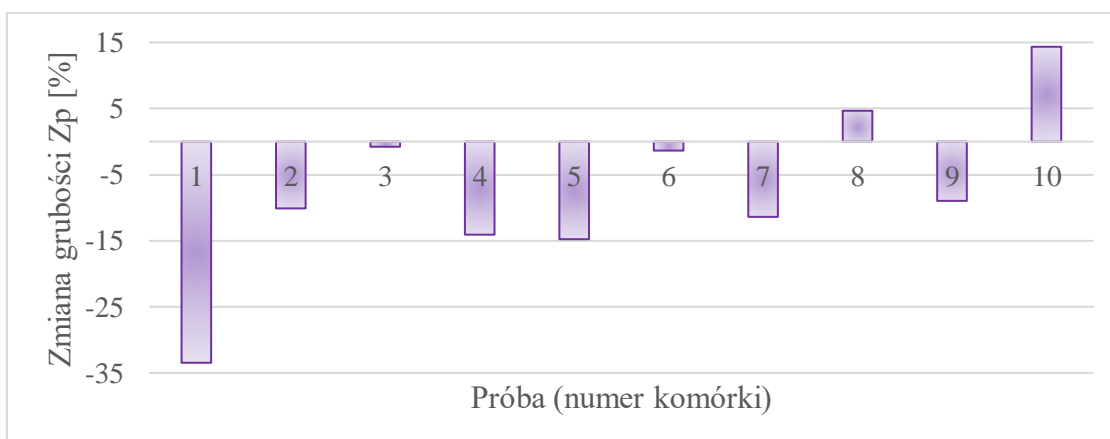
powierzchni A_1 oraz A_2 , a także grubości osłonki przejrzystej Z_p . Ujemna procentowa zmiana grubości Z_p oznaczała zmniejszenie jej grubości (ściśnięcie).



Rysunek 4.2 Histogram zależności zmiany średnicy zewnętrznej oocytu $\%H_{out}$ i zmiany średnicy wewnętrznej $\%H_{in}$ podczas deformacji dla $P = 100$ kPa dla 10 komórek



Rysunek 4.3 Histogram zależności zmiany pola powierzchni oocytu $\%A_1$ i zmiany pola powierzchni wewnętrznej $\%A_2$ podczas deformacji dla $P = 100$ kPa dla 10 komórek

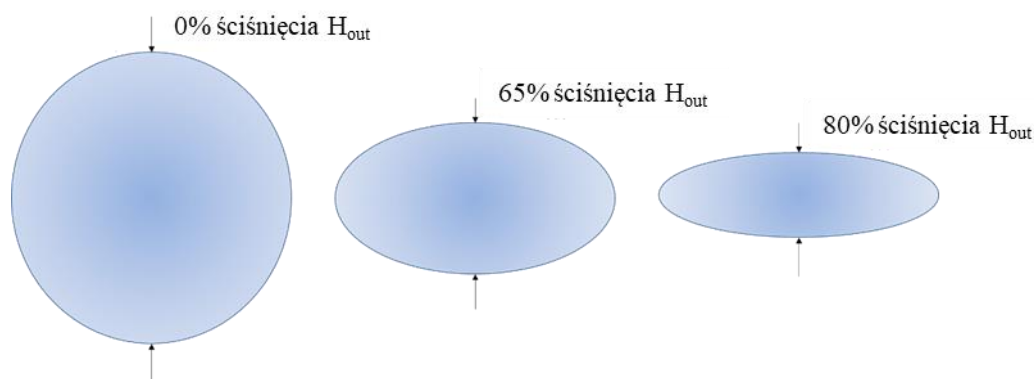


Rysunek 4.4 Histogram zależności zmiany grubości osłonki przejrzystej oocytu Z_p podczas deformacji dla $P = 100$ kPa dla 10 komórek

Przeprowadzone pomiary wykazały, że wytworzony mikrocytometr w konfiguracji A działa poprawnie, a opracowany układ pomiarowy umożliwia sprawną manipulację oocytami, obserwację komórek podczas pomiarów oraz analizę wykonanych zdjęć mikroskopowych. Oocyty różniły się między sobą wielkością, stąd też przy jednakowym ugięciu membrany, każda została ściśnięta w innym stopniu. Dlatego też kolejne badania z utrwalonymi oocytami przeprowadzono w konfiguracji B mikrocytometru z zastosowaniem algorytmu opisanego w podrozdziale 3.3.

4.2 Wstępne badania mikrocytometru - konfiguracja B

Celem wstępnych badań mikrocytometru w konfiguracji B była weryfikacja algorytmu wyznaczającego rzeczywiste ugięcie membrany i umożliwiającego ściśnięcie każdego oocytu z uwzględnieniem jego wielkości. W celu określenia nieniszczącej wartości procentowej ściśnięcia oocytu zmierzono zmiany w geometrycznych parametrach komórek ($\%H_{out}$, $\%H_{in}$ oraz $\%Zp$) bezpośrednio po deformacji (do 10 sekund) i porównano je z wartościami przed ściśnięciem. Wykorzystano łącznie 60 oocytów utrwalonych i ściśnięto odpowiednio 30 komórek o 65% i pozostałe 30 komórek o 80% wartości średnicy zewnętrznej H_{out} (Rys. 4.5).



Rysunek 4.5 Wizualizacja wybranych procentowych wartości ściśnięcia oocytu wykorzystanych podczas badań wstępnych konfiguracji B mikrocytometru

Podczas pomiarów nie zaobserwowano fizycznego uszkodzenia oocytów lub nieprawidłowości w widocznych pod mikroskopem optycznym organellach nawet dla 80% ściśnięcia. Zauważono, że komórki mogą zarówno zwiększyć swoje wymiary początkowe, jak i trwale „skurczyć się” pod wpływem ściskania. Średnia procentowa wartość zmiany średnic H_{out} oraz H_{in} po ściśnięciu nie przekroczyła 2%, zaś w przypadku osłonki

przejrzystej zawierała się pomiędzy 8 a 12% (Tab. 4.2). W wyniku ściśnięcia oocyty utrwalone (H_{out}) uległy trwałemu zniekształceniu o wartość nieprzekraczającą 3 μm .

Tab. 4.2 Wartości średnie wybranych parametrów oocytów przed i po ściśnięciu

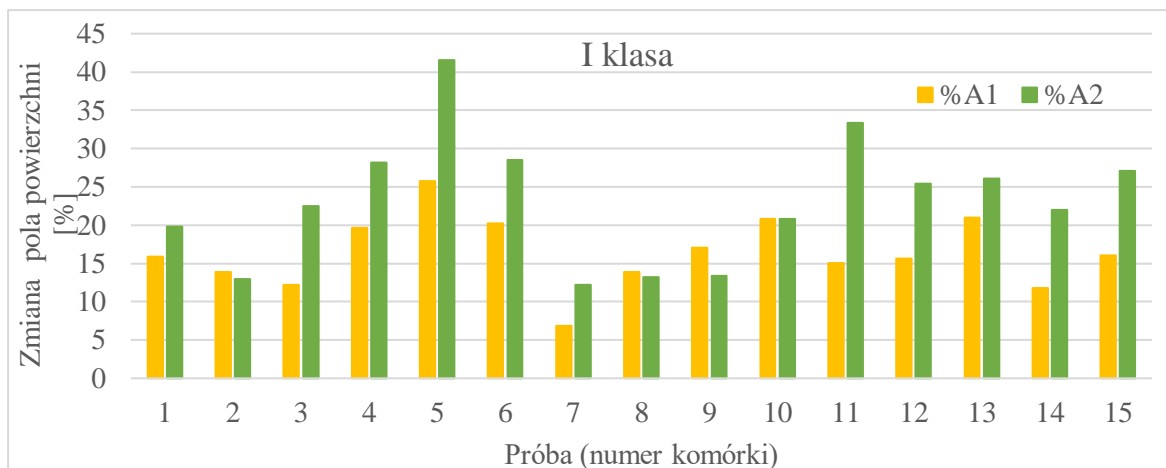
Wartość średnia parametru komórki przed ściśnięciem			Stopień ściśnięcia	Wartość średnia zmiany parametru po ściśnięciu komórki		
H_{out} [μm]	H_{in} [μm]	Z_p [μm]		% H_{out}	% H_{in}	% Z_p
142,5	115,8	13,4	65% (30 szt)	1,3	2,0	8,5
128,4	104,0	12,2	80% (30 szt)	1,6	2,0	11,8

Kolejnym etapem badań było określenie potencjalnych różnic w deformacji utrwalonych oocytów przypisanych do różnych klas jakości. W tym celu ściśnięto 45 oocytów, przypisanych do jednej z trzech klas jakości (po 15 sztuk na klasę jakości). Każda komórka została ściśnięta o 65% wartości swojej średnicy H_{out} ze względu na mniejszy wpływ na odkształcenia osłonki przejrzystej (w porównaniu z 80% stopniem ściśnięcia).

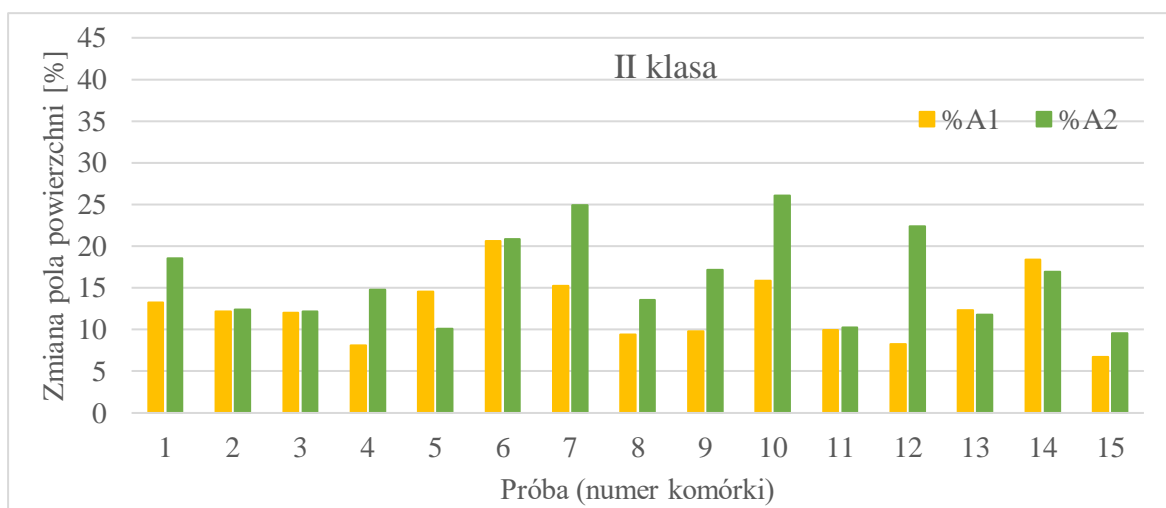
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że każda komórka, bez względu na przypisaną jej klasę jakości charakteryzuje się innym sposobem i stopniem deformacji. Podczas ściśnięcia komórki zaobserwować można różny stopień zmian pomiędzy polami powierzchni komórki A_1 i A_2 (Rys. 4.6). Pole powierzchni ooplazmy A_2 części ściskanych oocytów powiększyło się znacznie bardziej w stosunku do powierzchni całej komórki A_1 ($\%A_1 < \%A_2$). Zaobserwowano także sytuację odwrotną, gdzie to ooplazma nie zmienia znacząco swoich wymiarów podczas ściskania, w przeciwieństwie do pola powierzchni całkowitej komórki ($\%A_1 > \%A_2$). Wyżej opisane zależności mają różny charakter w zależności od klasy jakości, do której należy badana komórka.

Zaobserwowano także zmiany w grubości osłonki przejrzystej $\%Z_p$ podczas ściskania oocyty. Większość komórek (68,9%), w wyniku odkształcenia, zmniejszyła grubość osłonki względem pierwotnej wartości ($-\%Z_p$). (Rys. 4.7).

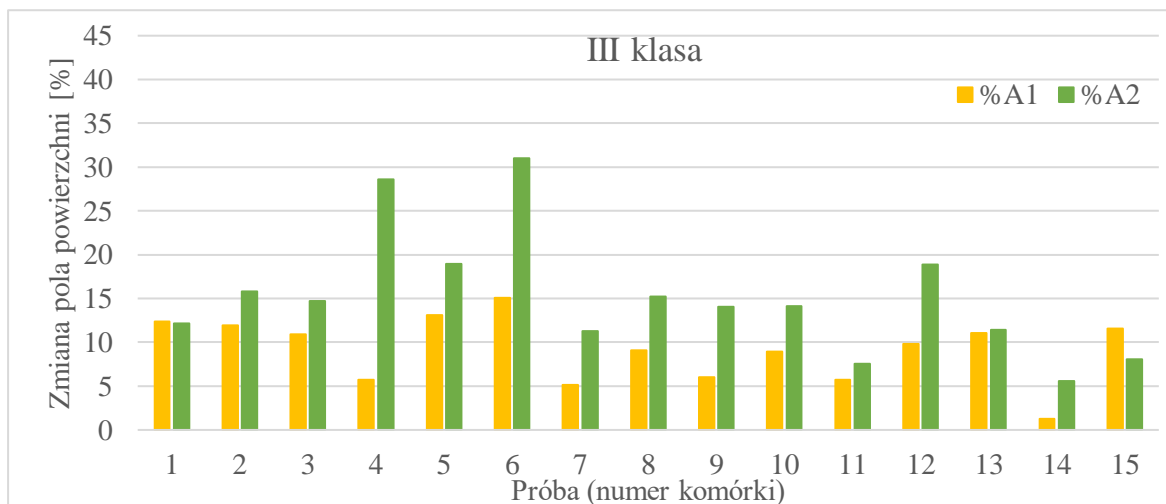
(a)



(b)

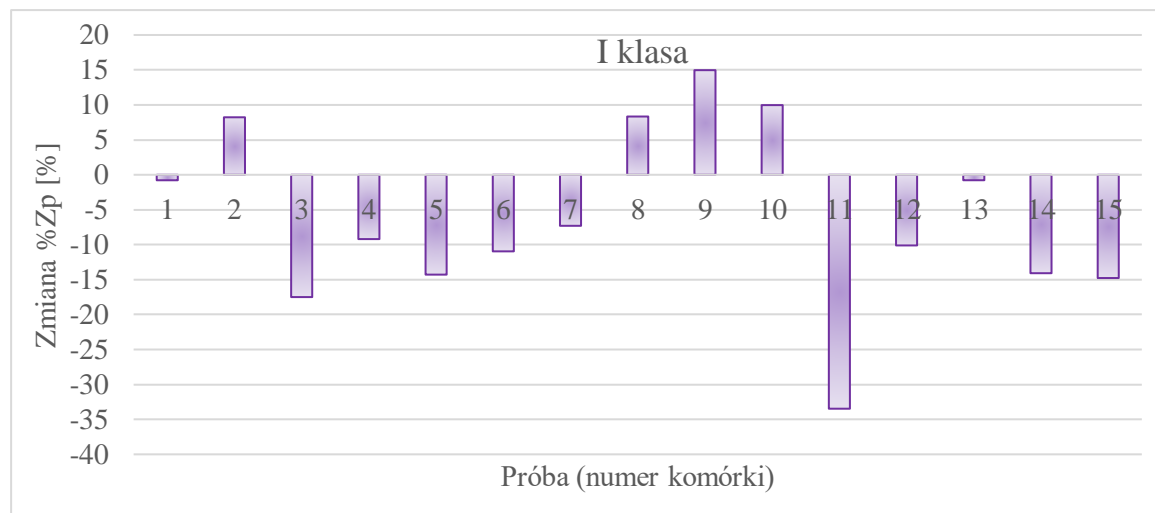


(c)

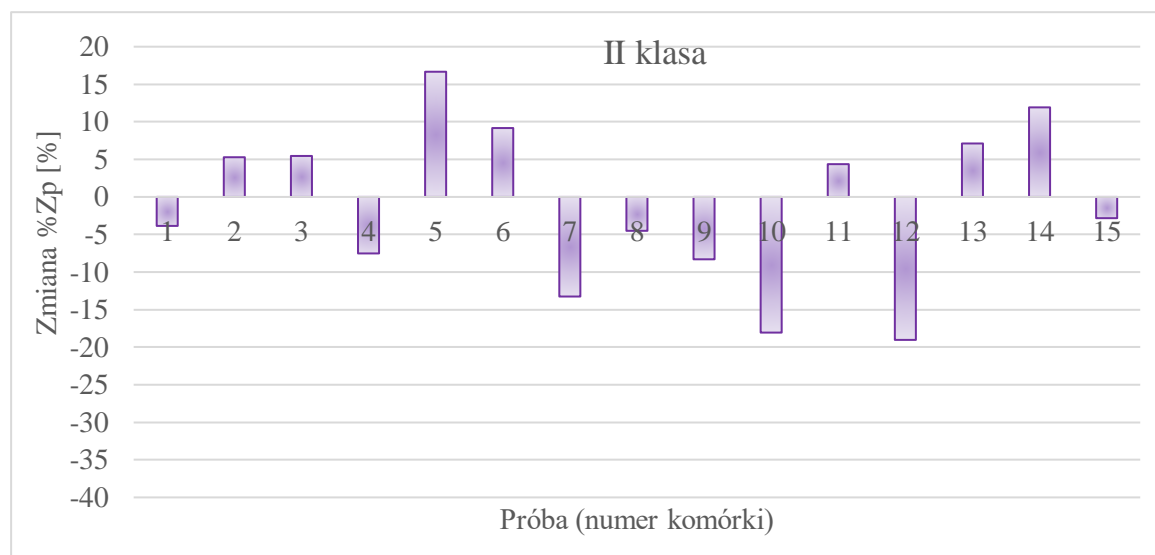


Rysunek 4.6 Histogram zależności zmiany pola powierzchni oocytu %A₁ i zmiany pola powierzchni wewnętrznej %A₂ podczas deformacji 15 oocytów utrwalonych o 65% : a) I klasy jakości, b) II klasy jakości, c) III klasy jakości

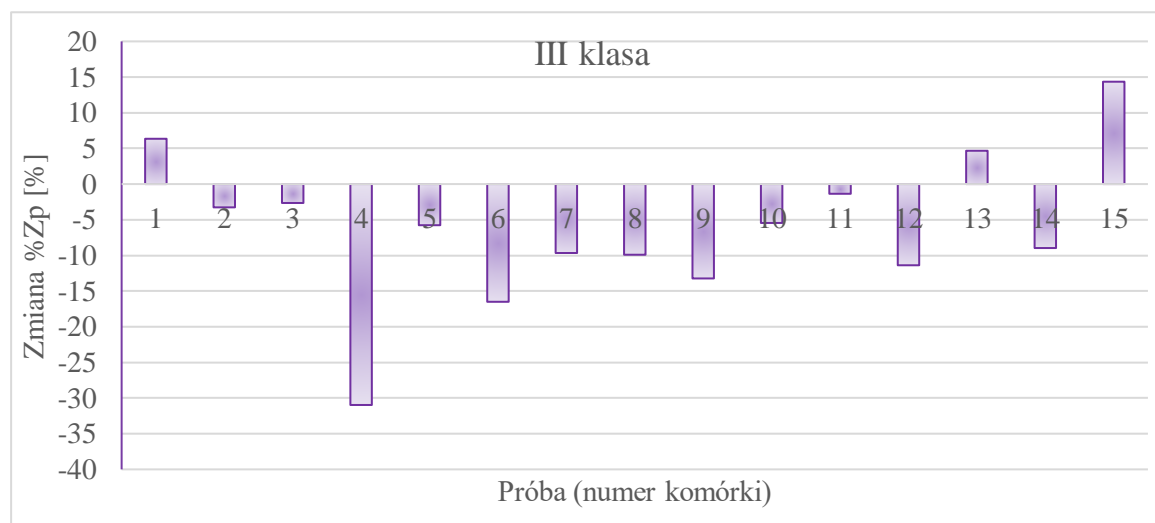
(a)



(b)



(c)



Rysunek 4.7 Histogram zależności zmiany grubości osłonki przejrzystej %Z_p podczas deformacji 15 oocytów utrwalonych o 65%: a) I klasy jakości, b) II klasy jakości, c) III klasy jakości

W celu porównania odkształcalności oocytów rozpatrzono dodatkowo dwa przypadki. Powiązано ze sobą zależność pomiędzy $%A_1$, a $%A_2$ ze zmianami zachodzącymi w grubości osłonki przejrzystej $%Z_p$. Każdą komórkę zakwalifikowano do jednej z grup i podliczono łączną liczbę oocytów charakteryzujących się wybranymi właściwościami podczas ściskania (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 Wybrane zależności pomiędzy badanymi parametrami geometrycznymi utrwalonych oocytów przypisanych do różnych klas jakości

Zmiana wartości parametrów podczas deformacji	Liczba oocytów				
	I klasa	II klasa	III klasa	Łącznie [szt]	Łącznie [%]
$%A_1 > %A_2$	4	3	2	9	20
$%A_1 < %A_2$	11	12	13	36	80
+ $%Z_p$	4	7	3	14	31,1
- $%Z_p$	11	8	12	31	68,9
$%A_1 < %A_2$ oraz + $%Z_p$	0	4	1	5	13,9
$%A_1 < %A_2$ oraz - $%Z_p$	11	8	12	31	86,1

Stwierdzono, że w przeważającej liczbie zbadanych komórek (80%) ooplazma była bardziej podatna na odkształcenia. W przypadku około 1/3 komórek, *zona pellucida* „zwiększyła” swoją grubość podczas ściskania, natomiast pozostałe 2/3 komórek „zmniejszyła” swoją grubość umożliwiając ooplazmie deformację. Ostatecznie *zona pellucida* komórki „zmniejszyła” swoją grubość w 86,1% przypadków, kiedy zmiana pola powierzchni ooplazmy $%A_2$ była większa od zmiany $%A_1$.

Dodatkowo, wyznaczono średnie wartości zmian parametrów geometrycznych dla komórek spełniających warunki $%A_1 < %A_2$ oraz (- $%Z_p$). (Tab 4.4). Zaobserwowano, że średnia wartość zmiany średnic komórki maleje wraz z przypisaniem oocytu do niższej klasy jakości. W przypadku średniej wartości zmiany $%Z_p$ komórki, wartość dla pierwszej klasy wynosiła około 12%, zaś dla drugiej i trzeciej klasy wartości były zbliżone i wynosiły około 10%. Podobnej analizy nie przeprowadzono dla drugiego przypadku ($%A_1 < %A_2$ oraz (+ $%Z_p$)) ze względu na łącznie 5 oocytów spełniających ten warunek.

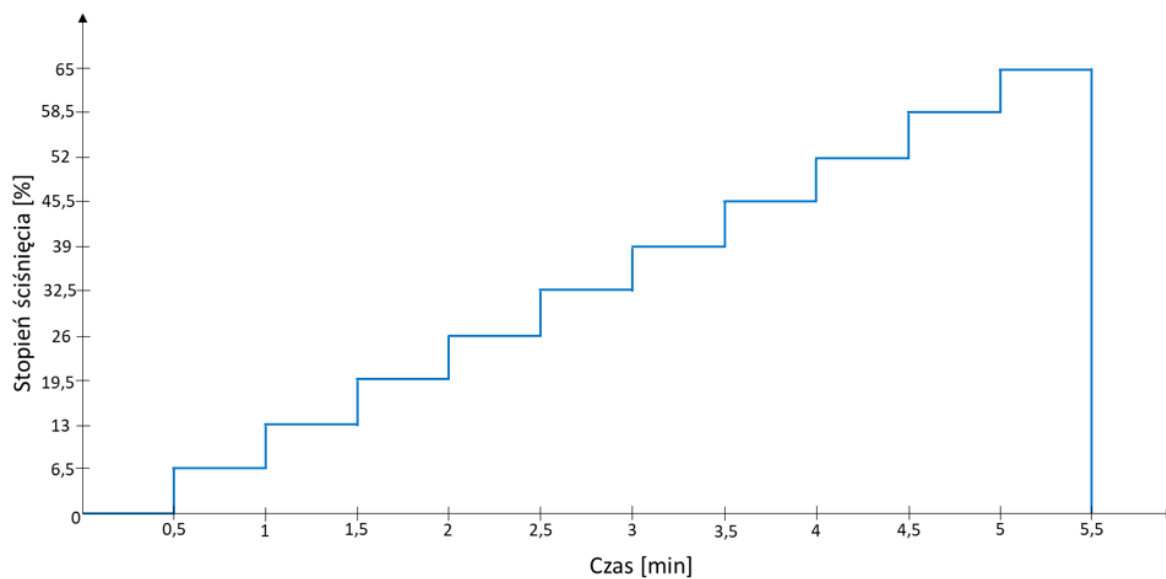
Tab. 4.4 Wartości średnie procentowych zmian wybranych parametrów utrwalonych oocytów w trakcie ściśnięcia z uwzględnieniem klas jakości, do jakich komórki zostały przypisane przed pomiarem

	śr. z %H _{out}	odchyl. standard.	śr. z %H _{in}	odchyl. standard.	śr. z %Z _p	odchyl. standard.
I klasa (11 szt)	7,8	2,4	12,2	3,3	-12,1	8,9
II klasa (8 szt)	5,3	1,6	8,8	2,6	-9,7	6,4
III klasa (12 szt)	4,2	1,9	7,8	3,4	-9,9	8

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem zróżnicowanego materiału biologicznego pozwoliły na zweryfikowanie poprawnego działania wytworzonego mikrocytometru. Zaproponowany układ pomiarowo-kontrolny umożliwia wyznaczenie wieloparametrycznych zmian w odkształcaniu komórek podczas ściśnięcia. Zaobserwowano również różnice w deformowalności utrwalonych komórek w poszczególnych klasach jakości.

4.3 Badania odkształcenia oocytów żywych

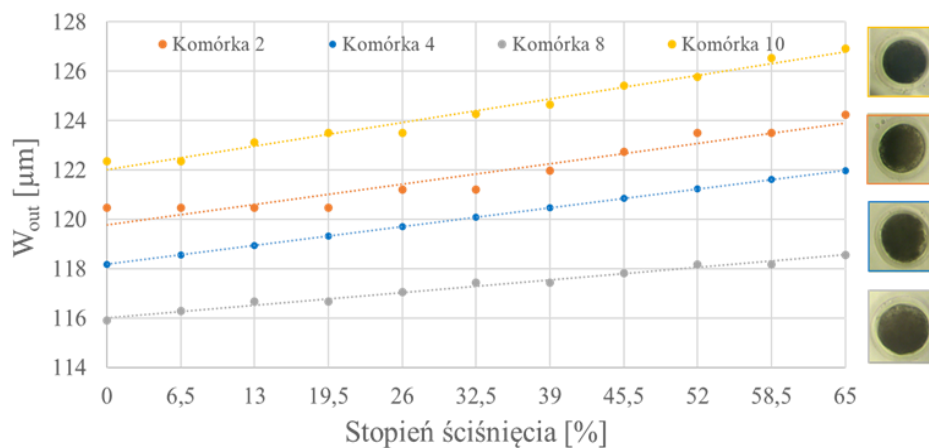
W zaplanowanym eksperymencie skoncentrowano się na pomiarze zmian średnic całej żywej komórki W_{out} , H_{out} , średnic ooplazmy W_{in} , H_{in} , pół powierzchni całej komórki A_1 i ooplazmy A_2 oraz grubości osłonki przejrzystej Z_p . Poszukiwano zależności pomiędzy poszczególnymi elementami wewnętrznymi komórki (tutaj osłonki przejrzystej oraz ooplazmy) i ich wkładu w ogólną odkształcalność oocyty. Wykorzystane do badań żywe oocyty zostały przygotowane zgodnie ze stosowanymi procedurami pozyskiwania oocytów oraz przydzielone do trzech różnych klas jakości. Każdy oocyt został wprowadzony do komory pomiarowej mikrocytometru przy użyciu pipety laboratoryjnej, a następnie ściśnięty krzemową membraną, na którą podana została wartość ciśnienia pozwalająca na ściśnięcie komórki o 65% wartości jej średnicy według profilu ściśnięcia przedstawionego na Rys. 4.8. Celem wykorzystania tego profilu ściśnięcia było zaobserwowanie zmian w odkształcaniu się każdego oocyty dla różnych poziomów ściśnięcia. Podczas każdego etapu ściśnięcia wykonane zostało zdjęcie mikroskopowe, które później posłużyło do parametryzacji komórki. Podczas pomiaru każdej komórki wykonanych zostało 11 zdjęć.



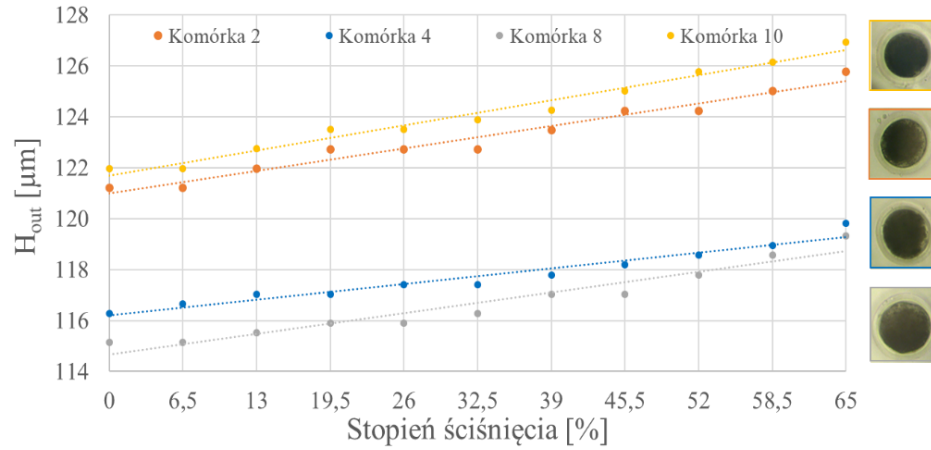
Rysunek 4.8 Czasowy profil ściskania oocytów

Testy ściskania wykazały przybliżoną liniową zależność zmiany wszystkich wartości parametrów: średnic zewnętrznych (W_{out} , H_{out}), średnic wewnętrznych (W_{in} , H_{in}) i pól powierzchni komórki (A_1 , A_2), od zmian ciśnienia podanych na membranie. Wyniki dla czterech wybranych oocytów o różnych średnicach przedstawiono na Rys. 4.9 oraz Rys. 4.10.

a)

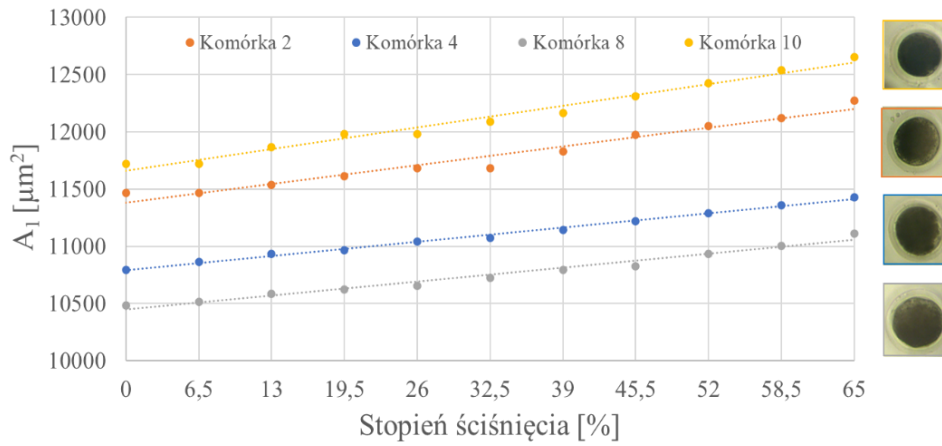


b)

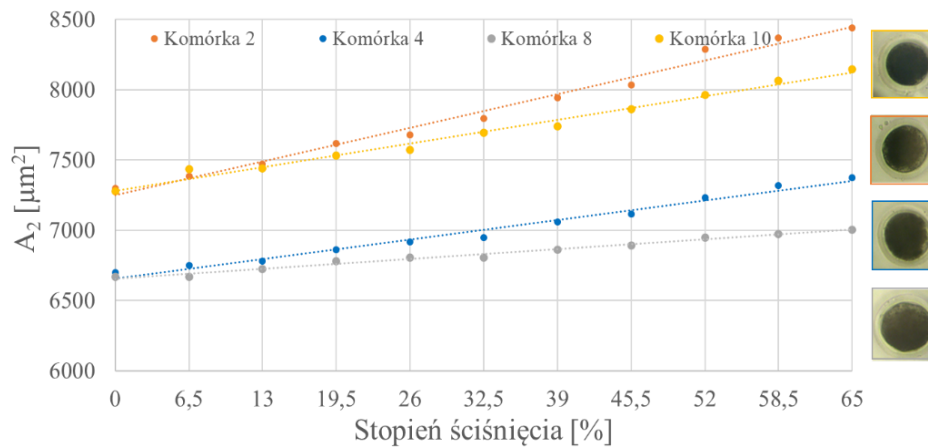


Rysunek 4.9 Przykładowe zależności średnicy zewnętrznej W_{out} (a) i H_{out} (b) oocytów po dojrzewaniu *in vitro* (I klasa jakości) w funkcji ciśnienia (cztery wybrane wyniki)

a)

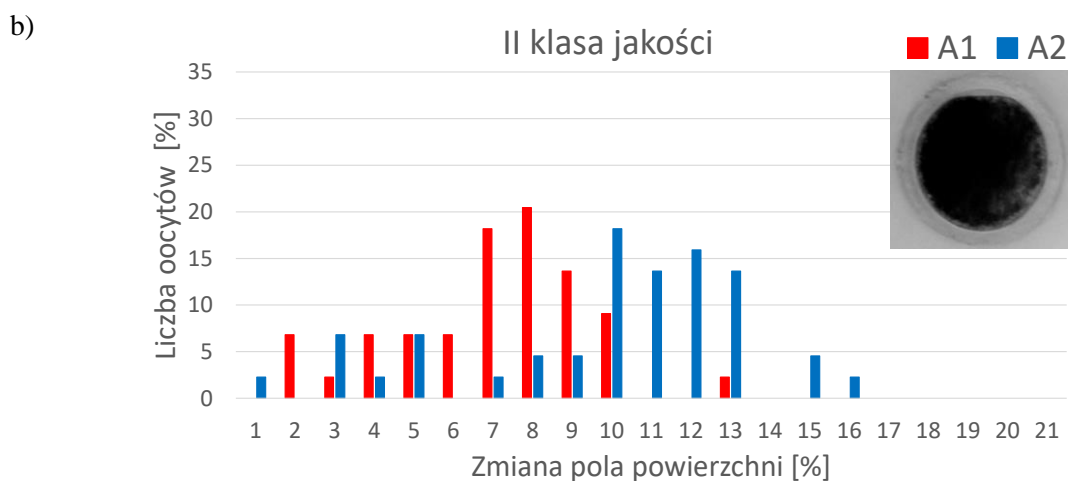
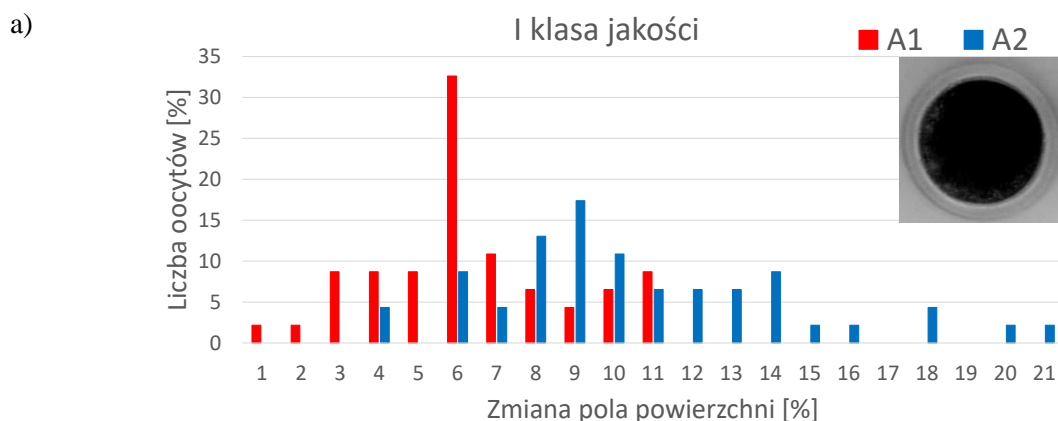


b)

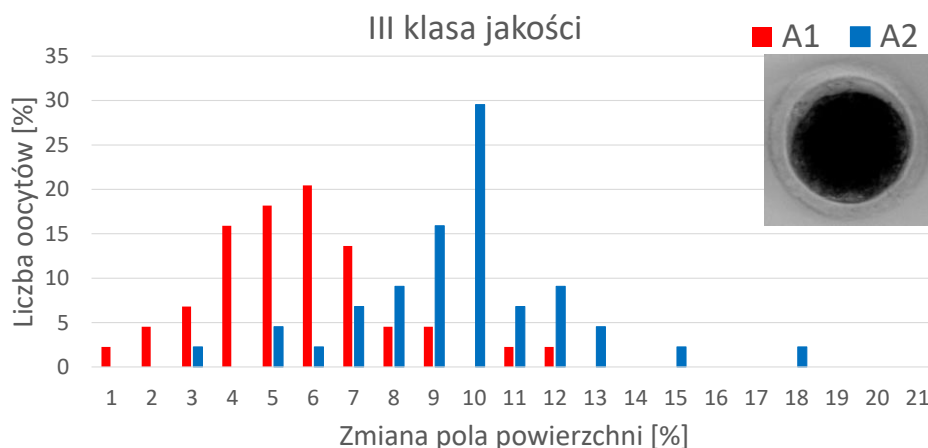


Rysunek 4.10 Przykładowe zależności pola powierzchni A_1 (a) i A_2 (b) oocytów po dojrzewaniu *in vitro* (I klasa jakości) w funkcji ciśnienia (cztery wybrane wyniki)

Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że dojrzałe oocyty wykazują różny stopień odkształcalności w każdej z klas jakości. W pierwszej klasie jakości procentowa zmiana pola powierzchni całego oocytu wynosiła od 1 do 11%, a procentowa zmiana pola powierzchni ooplazmy od 4 do 21% (Rys. 4.11). W każdej klasie jakości oocytów zaobserwowano większą odkształcalność cytoplazmatyczną w odniesieniu do zmiany pola powierzchni całego oocytu. Największą zmianę w powierzchni oocytów zaobserwowano w trzeciej klasie jakości (komórki nieodpowiednie dla IVM). Potwierdzono to morfologią oocytów, gdzie większa przestrzeń periwitelinowa między błoną komórkową, a osłonką przejrzystą pozwoliła najbardziej deformować się ooplazmie ze stosunkowo niewielką zmianą pola powierzchni całego oocytu A₁.



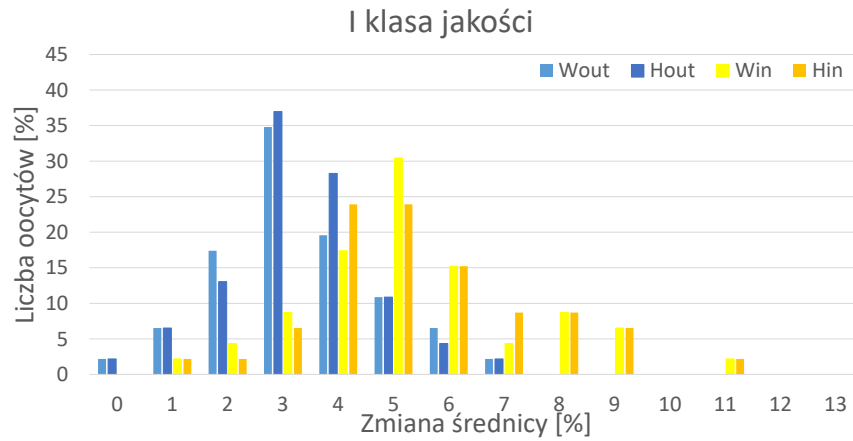
c)



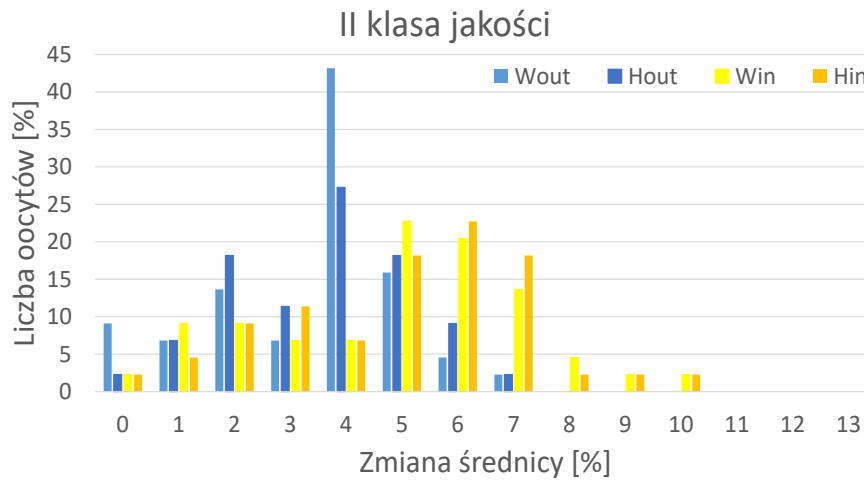
Rysunek 4.11 Histogramy zależności zmiany pola powierzchni komórki A₁ i zmiany pola powierzchni komórki A₂ podczas deformacji dla P = 100 kPa dla a) I klasy jakości, b) II klasy jakości oraz c) III klasy jakości; zmierzone parametry: pole powierzchni (czerwony), cytoplazma (niebieski)

Zbadano również zmiany średnicy oocytów (wewnętrzne W_{in} , H_{in} i zewnętrzne W_{out} , H_{out}). Wykonano dwa pomiary w osiach prostopadłych do siebie, aby zaobserwować stopień odchylenia kształtu oocytu od sfery modelowej. Stwierdzono, że w obrębie każdej klasy jakości zmiana średnicy ooplazmy (W_{in} , H_{in}) jest większa niż dla całego oocytu (W_{out} , H_{out}) (Rys. 4.12). Jest to skorelowane ze zmianą pola powierzchni. Ogólna odkształcalność jest na poziomie kilku procent (średnio 3-4%) dla wszystkich średnic oocytów i 5-6% dla średnic ooplazmy.

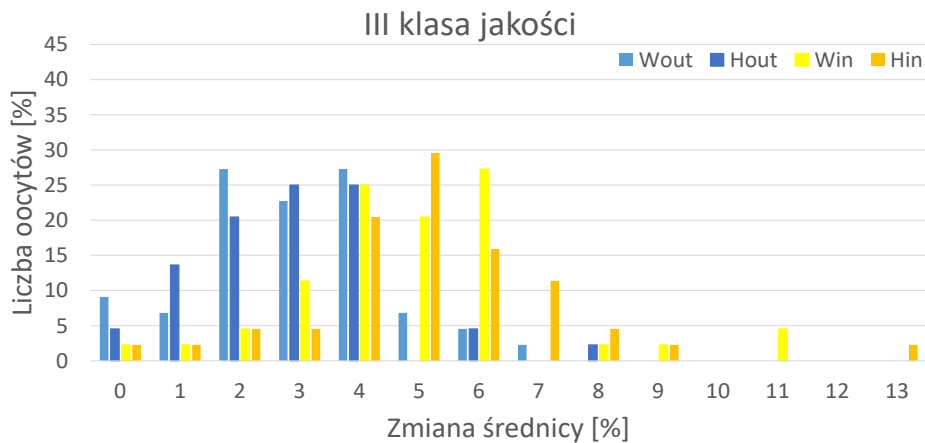
a)



b)



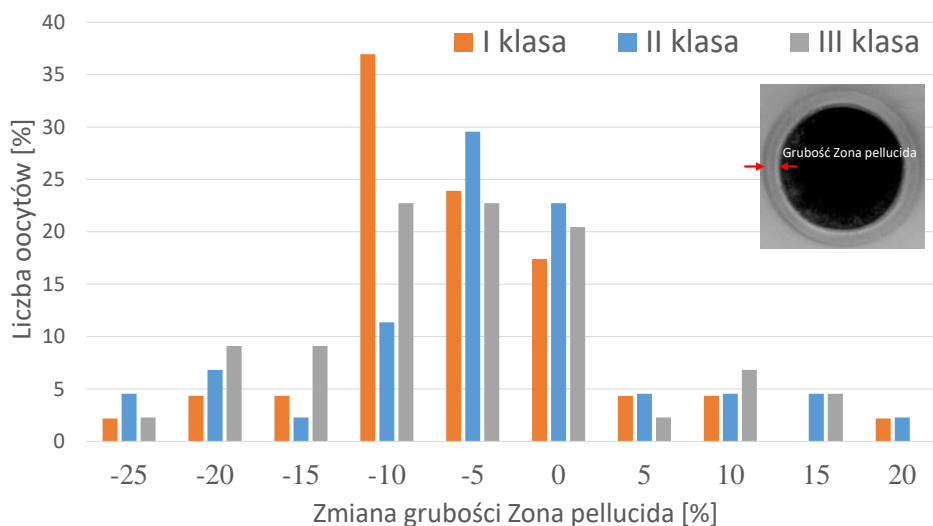
c)



Rysunek 4.12 Histogramy zależności zmian średnicy komórki W_{out} i H_{out} oraz zmian średnicy ooplazmy W_{in} i H_{in} podczas deformacji oocytów dla $P = 100$ kPa dla a) I klasy jakości, b) II klasy jakości, c) III klasy jakości; zmierzone parametry: średnice oocytów (jasny i ciemnoniebieski), średnice ooplazmy (jasny i ciemnopomarańczowy)

Stwierdzono, że *zona pellucida* odgrywa ważną rolę w odkształcalności komórek, ponieważ może zmieniać swoją grubość nawet o $\sim 20\%$ (Rys. 4.13). Podczas deformacji

rozszerzająca się ooplazma powoduje ścieśnienie *zona pellucida*, szczególnie w I klasie jakości oocytów. Gdy homogenność ooplazmy zmniejsza się wraz z klasą jakości, zmiana grubości *zona pellucida* podczas ściskania również maleje.



Rysunek 4.13 Histogram zmiany grubości *zona pellucida* (Z_p) podczas deformacji oocytów dla trzech klas jakości oocytów

Zaobserwowano, że średnia wartość zmiany średnic komórki H_{out} oraz H_{in} jest podobna dla każdej klasy jakości (Tab. 4.5). W przypadku średniej zmiany grubości osłonki przejrzystej $\%Z_p$ nie zaobserwowano podobnej zależności. Oocyty przypisane do drugiej i trzeciej klasy jakości charakteryzowały się wyższą wartością zmian od komórek z pierwszej (najlepszej) klasy jakości.

Tab. 4.5 Wartości średnie procentowych zmian wybranych parametrów oocytów w trakcie ścisknięcia

	śr. z $\%H_{out}$	odchyl. standard.	śr. z $\%H_{in}$	odchyl. standard.	śr. z $\%Z_p$	odchyl. standard.
I klasa (44 szt.)	3,0	1,4	4,9	2,0	-3,6	7,8
II klasa (44 szt.)	2,9	1,9	4,6	2,2	-2,5	9,4
III klasa (44 szt.)	2,1	1,8	4,5	2,4	-3,4	9,3

Przeprowadzone badania deformacji oocytów skupiały się na obserwacji i parametryzacji elementów widocznych w trybie mikroskopii odbiciowej tj. *zona pellucida*, ooplazma i ciało kierunkowe. Ponadto, wykorzystane oprogramowanie do analizy obrazów mikroskopowych umożliwiło wyznaczenie takich parametrów

geometrycznych jak: średnica całej komórki i jej pole powierzchni, średnica ooplazmy i jej pole powierzchni, a także grubość osłonki przejrzystej.

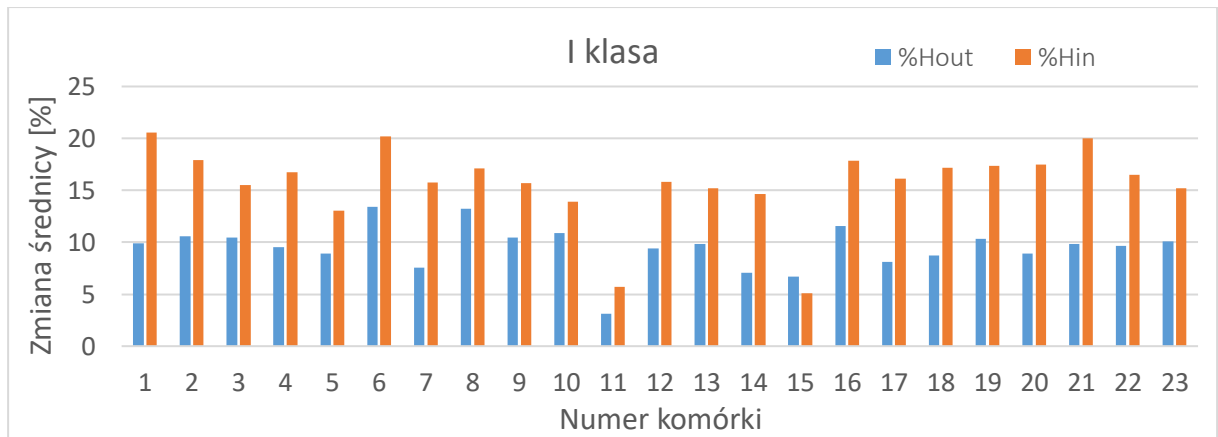
W badaniach zbadano łącznie 132 oocyty poddane procesowi dojrzewania. Zaobserwowano, że zmiany parametrów oocytów wraz ze wzrostem kompresji mają w przybliżeniu charakter liniowy. Zmiany pola powierzchni zdeformowanego oocytu i jego średnic zależą od klasy jakości, co związane jest bezpośrednio z morfologią oocytów. Im bardziej ooplazma „wywiera nacisk” osłonkę przejrzystą, tym bardziej osłonka przeciwdziała deformacji przez zmniejszenie swojej grubości. Zjawisko to zaobserwowano głównie w oocytach I klasy jakości, ponieważ wykazały one najniższą całkowitą zmianę analizowanych parametrów. W przypadku oocytów drugiej i trzeciej klasy jakości deformacja komórek była znacznie większa ze względu na większą przestrzeń pomiędzy ooplazmą, a osłonką. Dlatego nie zaobserwowano istotnych zmian grubości zony pellucidy dla oocytów tych dwóch klas jakości.

Na tym etapie badań nie prowadzono testów przeżyciowych sprawdzających stopień uszkodzenia wewnętrznego oocytów w wyniku ściskania. Nie zaobserwowano natomiast żadnych przerw osłonki, ani trwałych odkształceń, które zmieniłyby wymiary początkowe komórek, gdzie maksymalne ściśnięcie osiągało 65% średnicy komórki.

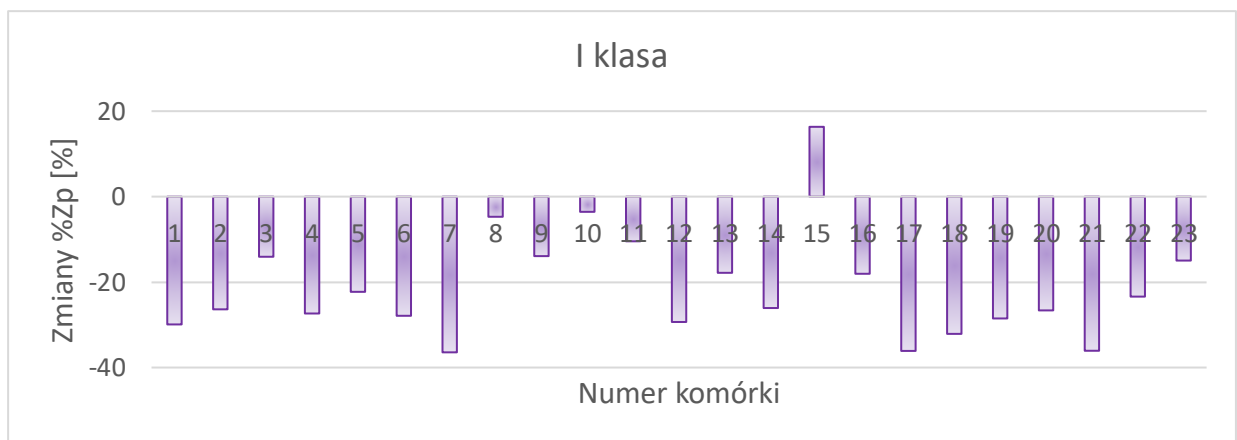
4.4 Analiza i porównanie deformacji oocytów żywych z utrwalonymi - konfiguracja A+B

W celu przeprowadzenia pogłębionej analizy deformacji oocytów porównano ze sobą zmiany zachodzące podczas ściskania w komórkach żywych i utrwalonych. Ściśnięto dodatkowo 23 żywe oocyty I klasy jakości. Każda komórka została ściśnięta o 80% wartości swojej średnicy H_{out} , podobnie jak w przypadku oocytów utrwalonych (Rozdział 4.2).

Podobnie jak w przypadku ściskania oocytów utrwalonych, charakter deformacji komórek żywych jest unikalny dla każdego badanego obiektu w obrębie jednej klasy jakości (Rys. 4.14 oraz Rys. 4.15).



Rysunek 4.14 Histogram zależności zmiany średnic $\%H_{out}$ oraz $\%H_{in}$ podczas 80% deformacji dla 23 oocytów żywych, przypisanych do I klasy jakości



Rysunek 4.15 Histogram zależności zmiany grubości osłonki przejrzystej $\%Z_p$ podczas 80% deformacji dla 23 oocytów żywych, przypisanych do I klasy jakości

Zaobserwować można także podobne zależności pomiędzy badanymi parametrami jak te, opisane dla komórek utrwalonych w Tab. 4.3. Wewnętrzna średnica komórek żywych określająca ooplazmę odznaczała się większą zmianą procentową w stosunku do zmian zachodzących w średnicy całkowitej komórek (Tab. 4.6). Zjawisko to możliwe było dzięki ściśnięciu osłonki przejrzystej oocytów o średnio 20% podczas badania. Oocyty utrwalone charakteryzowały się mniejszymi zmianami w średnich wartościach $\%H_{out}$, $\%H_{in}$ oraz $\%Z_p$ w porównaniu z komórkami żywymi, co może wskazywać na większą sztywność tych komórek.

Tab. 4.6 Wartości średnie procentowych zmian wybranych parametrów oocytów w trakcie ściśnięcia o 80%, przypisanych do I klasy jakości

Stan oocytu	Średnia wartość parametru dla badanej grupy		
	%H _{out}	%H _{in}	%Z _p
żywe	9,5	15,7	-21,3
utrwalone	7,9	10,9	-12,1

Podobnie jak w podrozdziale 4.2, zmierzono zmiany w geometrycznych parametrach komórek (%H_{out}, %H_{in} oraz %Z_p) bezpośrednio (do 10 sekund) po deformacji i porównano je z wartościami przed ściśnięciem (Tab. 4.7). Nie zaobserwowano wyraźnych różnic pomiędzy komórkami żywymi i utrwalonymi w wartościach średnich zmian mierzonych parametrów. Wartość średniej zmiany grubości osłonki oocytu po ściśnięciu nie przekroczyła 2 μm dla komórek utrwalonych. W przypadku komórek żywych zmiany były niezauważalne i zachodziły na granicy błędu pomiaru tj. 0,5 μm.

Tab. 4.7 Wartości średnie wybranych parametrów oocytów żywych i utrwalonych przypisanych do I klasy jakości przed i po ściśnięciu

Stan oocytu	Stopień ściśnięcia	Wartość średnia parametru komórki przed ściśnięciem			Wartość średnia zmiany parametru komórki po ściśnięciu		
		H _{out} [μm]	H _{in} [μm]	Z _p [μm]	H _{out} [%]	H _{in} [%]	Z _p [%]
żywe	80% (23 szt.)	153,5	128,0	12,7	1,6	2,7	3,5
utrwalone	80% (30 szt.)	128,4	104,0	12,2	1,6	2,0	11,8

5 Wnioski końcowe i ocena przydatności rozwiązań

Celem niniejszej pracy było opracowanie oryginalnej i autorskiej konstrukcji, technologii mikrocytometru typu MEMS i metodologii badawczej do badania właściwości mechanicznych ściskanych oocytów. Badania te prowadzono w ramach projektu NCN OPUS 10 pt. „Mikrocytometria odkształceniowa komórek w zintegrowanym systemie mikro-elektro-mechanicznym z aktywacją pneumatyczną i wieloparametryczną detekcją obrazową” (OPUS 10 - 2015/19/B/ST8/01110) przy współpracy z zespołem Pani Prof. Cieślak z Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Wstępny etap prac polegał na szczegółowej analizie danych literaturowych obejmujących klasyczne metody weterynaryjne selekcji jakościowej oocytów oraz metody analityczne, z uwzględnieniem zarówno rozwiązań uznawanych za „tradycyjne”, jak i te wykorzystujące techniki mikroinżynieryjne. Pozwoliło to na zdefiniowanie założeń tej pracy dotyczących funkcjonalności, projektu i technologii mikrocytometru (Tab. 3.1).

Pierwszy etap prac poświęcono opracowaniu, a także charakteryzacji elementów mikromechanicznych, mikrooptycznych i mikrofluidycznych składających się na mikrocytometr. Następnie przeprowadzono integrację mikrostruktur w mikrocytometr odkształceniowy w trzech różnych konfiguracjach. Opracowano układy oraz algorytmy sterowania pneumatycznego i fluidycznego dla mikrocytometru, w wyniku czego powstał układ kontrolno-pomiarowy.

Drugi etap prac poświęcono badaniu deformowalności oocytów przy użyciu opracowanych mikrocytometrów. W wyniku badań wstępnych zweryfikowano działanie zintegrowanego mikrocytometru, a także opracowanego układu pomiarowo-kontrolnego. Analiza zdjęć mikroskopowych oocytów pozwoliła na sprawdzenie możliwości charakteryzacji deformowanych komórek. Umożliwiło to przeprowadzenie dalszych badań nad wieloparametryczną mechaniczną charakteryzacją komórek obejmującą wyznaczenie wybranych parametrów geometrycznych ściskanej komórki oraz poszukiwanie zależności pomiędzy morfologicznymi cechami komórki, a jej potencjałem biologicznym.

W opracowanych mikrocytometrach możliwe było przeprowadzenie badań nad materiałem biologicznym dzięki uwzględnieniu kwestii biokompatybilności oraz sterylności instrumentu. Wykorzystanie technik mikroinżynieryjnych oraz obserwacji mikroskopowej pozwoliły na badanie i parametryzację oocytów świń o średnicy 110-150

μm . Oocyty ściskane były równomiernie w całej ich objętości, w sposób kontrolowany, a zakres ściskania obejmował do 80% wartości średnicy komórki. Podczas pomiarów oocytów obserwowano potencjalne uszkodzenia komórek oraz badano zmiany geometrycznych parametrów komórki przed i po ściśnięciu. Nie przeprowadzono natomiast testów przeżyciowych sprawdzających stopień uszkodzenia wewnętrznego oocytów w wyniku ściskania ze względu na brak materiału biologicznego. Wszystkie pomiary przeprowadzone zostały w trybie mikroskopii odbiciowej z wykorzystaniem mikrocytometrów w konfiguracji A oraz B. Pozwoliło to na poszukiwanie różnic w deformowalności utrwalonych oraz żywych oocytów, komórek przypisanych do różnych klas jakości, oraz zależności pomiędzy badanymi parametrami deformowanych oocytów. Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych oraz opublikowane w czasopismach naukowych [144-147]. Konfiguracja C mikrocytometru odkształceniowego umożliwiająca prowadzenie pomiaru w trybie mikroskopii fluorescencyjnej nie została jednak wykorzystana do badań ze względu na brak dostępności materiału biologicznego.

Wyniki przeprowadzonych badań oocytów są wartościowym wglądem w deformowalność oocytów i są one prekursorem do pogłębionych badań nad instrumentarium pozwalającym na klasyfikację jakościową oocytów z wykorzystaniem właściwości mechanicznych badanych komórek.

6 Literatura

- [1] Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod.* 2012 Aug;27 Suppl 1:i2-21.
- [2] Yuan Y, Spate LD, Redel BK, et al. Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(29):E5796-E5804.
- [3] Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci.* 2007 Feb 10;3(3):179-84.
- [4] Opiela J, Kątska-Książkiewicz L. Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Cz. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej. *Biotechnologia* 2005;2:151-162.
- [5] da Costa NN, Brito KN, Santana Pd, Cordeiro Mda S, Silva TV, Santos AX, Ramos Pdo C, Santos Sdo S, King WA, Miranda Mdos S, Ohashi OM. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology.* 2016 Jan 15;85(2):323-9.
- [6] Dang-Nguyen TQ, Nguyen HT, Somfai T, et al. Sucrose assists selection of high-quality oocytes in pigs. *Anim Sci J.* 2018;89(6):880-887.
- [7] Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology.* 2003;60(4):767-776.
- [8] Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int J Androl.* 2000;23(1):13-21.
- [9] Kempisty B, Piotrowska H, Walczak R, Śniadek P, Dziuban J, Bukowska D, Antosik P, Jackowska M, Woźna M, Jaśkowski JM. Czynniki warunkujące potencjał rozwojowy oocytów ssaków - w świetle badań molekularnych i mikrofluidycznych. *Medycyna Wet.* 2011;67 (7):435-439.
- [10] Kempisty B, Walczak R, Śniadek P, Dziuban J, Piotrowska H, Zawierucha P, Zaorska K, Antosik P, Bukowska D, Jaśkowski JM, Nowicki M, Zabel M. Ocena kompetencji rozwojowej oocytów oraz zarodków świń na podstawie badań molekularnych i mikrofluidycznych. *Medycyna Wet.* 2011;67(10):673-677.
- [11] Jaśkowski JM, Kempisty B, Woźna M, Walczak R, Szczepańska P, Dziuban J, Jackowska M, Antosik P. Wybrane metody oceny kompetencji rozwojowej oraz selekcji oocytów i zarodków bydłęcych. *Medycyna Wet.* 2010;66 (11):740-744.
- [12] Bianchi S, Macchiarelli G, Micara G, et al. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(9):1343-1358.
- [13] Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000;15(11):2390-2393.
- [14] Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod.* 1997;12(8):1750-1755.
- [15] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod.* 2003;18(6):1294-1298.

- [16] Elsdon RP, Nelson LD, Seidel Jr. GE. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* 1978;9(1):17-26.
- [17] Schneider HJ Jr, Castleberry RS, Griffin JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*. 1980;13(1):73-85.
- [18] Aguilar MM, Galina CS, Merchant H, Montiel F, Canseco R, Márquez YC. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod Domest Anim*. 2002;37(6):341-346.
- [19] Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update*. 2011;17(1):34-45.
- [20] Montag M, Schimming T, Köster M, et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reprod Biomed Online*. 2008;16(2):239-244.
- [21] Gajda B, Mandryk I, Poniedziałek-Kempy K, Rajska I. Dojrzewanie in vitro oocytów świni. Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy. Broszura Nr b-3/2014. (http://www.izoo.krakow.pl/zalaczniki/czasopisma/broszury_instrukcje/2014_broszura_b-3.pdf - dostęp 12.06.2021)
- [22] Liu RH, Li YH, Jiao LH, Wang XN, Wang H, Wang WH. Extracellular and intracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different sizes of follicles. *Zygote*. 2002;10(3):253-260.
- [23] Grabowska R, Błaszczyk B, Stankiewicz T, Banaś T, Hale S, Udała J. Quality of oocytes in prepubertal and pubertal swine. *Turk J Vet Anim Sci* 2016;40:89-94.
- [24] Gad A, Nemcova L, Murin M, et al. microRNA expression profile in porcine oocytes with different developmental competence derived from large or small follicles. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(4):426-439.
- [25] Alvarez GM, Dalvit GC, Achi MV, Miguez MS, Cetica PD. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell*. 2009;33(3):167-177.
- [26] Hiraga K, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Selection of in vitro-matured porcine oocytes based on localization patterns of lipid droplets to evaluate developmental competence. *J Reprod Dev*. 2013;59(4):405-408.
- [27] Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y. Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate?. *Hum Reprod*. 1995;10(5):1189-1193.
- [28] Sauerbrun-Cutler MT, Vega M, Breborowicz A, et al. Oocyte zona pellucida dysmorphology is associated with diminished in-vitro fertilization success. *J Ovarian Res*. 2015;8:5.
- [29] Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2166-2170.
- [30] Di Carlo D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *J Lab Autom*. 2012 Feb;17(1):32-42.
- [31] Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Mol Hum Reprod*. 2017;23(4):257-268.
- [32] Yanez LZ, Camarillo DB. Microfluidic analysis of oocyte and embryo biomechanical properties to improve outcomes in assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod*. 2017;23(4):235-247.

- [33] Nikshad A, Aghlmandi A, Safaralizadeh R, et al. Advances of microfluidic technology in reproductive biology. *Life Sci.* 2021;265:118767.
- [34] Coy P, Grullon L, Canovas S, Romar R, Matas C, Aviles M. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction.* 2008;135(1):19-27.
- [35] Lord T, Aitken RJ. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction.* 2013;146(6):R217-R227.
- [36] Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev.* 2003;66(2):143-152.
- [37] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod.* 2003;18(6):1294-1298.
- [38] Lim CT, Zhou EH, Quek ST. Mechanical models for living cells--a review. *J Biomech.* 2006;39(2):195-216.
- [39] West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials.* 2007;28(30):4439-4448.
- [40] Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol Reprod.* 2004;71(4):1303-1308.
- [41] Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. *J Dairy Sci.* 2005;88(12):4326-4333.
- [42] Yu ZT, Aw Yong KM, Fu J. Microfluidic blood cell sorting: now and beyond. *Small.* 2014;10(9):1687-1703.
- [43] Krishnan R, Park JA, Seow CY, Lee PV, Stewart AG. Cellular Biomechanics in Drug Screening and Evaluation: Mechanopharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(2):87-100.
- [44] Chen J, Huang S, Xue C, Fan B, Chen D, Wang J, Wu M. Single-Cell Mechanical Properties: Label-Free Biomarkers for Cell Status Evaluation. *Essentials of Single-Cell Analysis* 2016;213-234.
- [45] Rodriguez ML, McGarry PJ, Sniadecki NJ. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Appl. Mech. Rev.* 2013;65(6): 060801.
- [46] Ahmad IL, Ahmad MR. Trends in characterizing single cell's stiffness properties. *Micro and Nano Syst Lett* 2014;2(8).
- [47] Kim DH, Wong PK, Park J, Levchenko A, Sun Y. Microengineered platforms for cell mechanobiology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:203-233.
- [48] Thoumine O, Ott A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 17):2109-2116.
- [49] Cha S, Shin T, Lee SS, et al. Cell stretching measurement utilizing viscoelastic particle focusing. *Anal Chem.* 2012;84(23):10471-10477.
- [50] Lee LM, Liu AP. The Application of Micropipette Aspiration in Molecular Mechanics of Single Cells. *J Nanotechnol Eng Med.* 2014;5(4):0408011-408016.

- [51] Haase K, Pelling AE. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J R Soc Interface*. 2015;12(104):20140970.
- [52] Ito H, Murakami R, Sakuma S, et al. Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling. *Sci Rep*. 2017;7:43134.
- [53] Faigle C, Lautenschläger F, Whyte G, Homewood P, Martín-Badosa E, Guck J. A monolithic glass chip for active single-cell sorting based on mechanical phenotyping. *Lab Chip*. 2015;15(5):1267-1275.
- [54] Moura DS, Silva DC, Williams AJ, Bezerra MA, Fontes A, de Araujo RE. Automatic real time evaluation of red blood cell elasticity by optical tweezers. *Rev Sci Instrum*. 2015;86(5):053702.
- [55] Yang T, Bragheri F, Minzioni P. A Comprehensive Review of Optical Stretcher for Cell Mechanical Characterization at Single-Cell Level. *Micromachines (Basel)*. 2016;7(5):90.
- [56] Agrawal R, Smart T, Nobre-Cardoso J, et al. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. *Sci Rep*. 2016;6:15873.
- [57] Trotta G, Martínez Vázquez R, Volpe A, et al. Disposable Optical Stretcher Fabricated by Microinjection Moulding. *Micromachines (Basel)*. 2018;9(8):388.
- [58] Polimeno P, Magazzù A, Iati MA, Patti F, Saija R, Esposti B, Cristian D, Donato MG, Gucciardi PG, Jones PH, Volpe G, Maragò OM. Optical tweezers and their applications, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 2018;218:131–150.
- [59] Yao Z, Kwan CC, Poon AW. An optofluidic "tweeze-and-drag" cell stretcher in a microfluidic channel. *Lab Chip*. 2020;20(3):601-613.
- [60] Lee J, Teh SY, Lee A, Kim HH, Lee C, Shung KK. Single beam acoustic trapping. *Appl Phys Lett*. 2009 Aug 17;95(7):73701.
- [61] Xie Y, Nama N, Li P, et al. Probing Cell Deformability via Acoustically Actuated Bubbles. *Small*. 2016;12(7):902-910.
- [62] Hwang JY, Kim J, Park JM, et al. Cell Deformation by Single-beam Acoustic Trapping: A Promising Tool for Measurements of Cell Mechanics. *Sci Rep*. 2016;6:27238.
- [63] Bausch AR, Ziemann F, Boulbitch AA, Jacobson K, Sackmann E. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophys J*. 1998;75(4):2038-2049.
- [64] Kasza KE, Vader D, Köster S, Wang N, Weitz DA. Magnetic twisting cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(4):421–422,
- [65] Zhang Y, Wei F, Poh YC, et al. Interfacing 3D magnetic twisting cytometry with confocal fluorescence microscopy to image force responses in living cells. *Nat Protoc*. 2017;12(7):1437-1450.
- [66] Wang X, Law J, Luo M, et al. Magnetic Measurement and Stimulation of Cellular and Intracellular Structures. *ACS Nano*. 2020;14(4):3805-3821.
- [67] MacQueen LA, Buschmann MD, Wertheimer MR. Mechanical properties of mammalian cells in suspension measured by electro-deformation. *J. Micromech. Microeng*. 2010;20(6):065007.
- [68] Chen J, Zheng Y, Tan Q, et al. Classification of cell types using a microfluidic device for mechanical and electrical measurement on single cells. *Lab Chip*. 2011;11(18):3174-3181.

- [69] Doh I, Lee WC, Cho YH, Pisano AP, Kuypers FA. Deformation measurement of individual cells in large populations using a single-cell microchamber array chip. *Appl Phys Lett*. 2012;100(17):173702-1737023.
- [70] Du E, Dao M, Suresh S. Quantitative Biomechanics of Healthy and Diseased Human Red Blood Cells using Dielectrophoresis in a Microfluidic System. *Extreme Mech Lett*. 2014;1:35-41.
- [71] Leung SL, Lu Y, Bluestein D, Slepian MJ. Dielectrophoresis-Mediated Electrodeformation as a Means of Determining Individual Platelet Stiffness. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(4):903-913.
- [72] Teng Y, Pang M, Huang J, Xiong C. Mechanical characterization of cancer cells during TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition using an electrodeformation-based microchip. *Sensors and Actuators B* 2017;240:158-167.
- [73] Zheng Y, Nguyen J, Wei Y, Sun Y. Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization. *Lab Chip*. 2013;13(13):2464-2483.
- [74] Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:137-145.
- [75] Haase K, Pelling AE. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J R Soc Interface*. 2015 Mar 6;12(104):20140970.
- [76] Style RW, Boltynskiy R, German GK, et al. Traction force microscopy in physics and biology. *Soft Matter*. 2014;10(23)
- [77] Andolfi L, Masiero E, Giolo E, et al. Investigating the mechanical properties of zona pellucida of whole human oocytes by atomic force spectroscopy. *Integr Biol (Camb)*. 2016;8(8):886-893.
- [78] Daily B, Elson EL, Zahalak GI. Cell poking. Determination of the elastic area compressibility modulus of the erythrocyte membrane. *Biophys J*. 1984;45(4):671-682.
- [79] Hochmuth RM. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech*. 2000 Jan;33(1):15-22.
- [80] Guo Q, Park S, Ma H. Microfluidic micropipette aspiration for measuring the deformability of single cells. *Lab Chip*. 2012;12(15):2687-2695.
- [81] Kim W, A Microaspirator Chip using Vacuum Expanded Microchannels for High Throughput Mechanical Characterization of Biological Cells. Dissertation, A&M University, Texas (2012).
- [82] Byfield FJ, Aranda-Espinoza H, Romanenko VG, Rothblat GH, Levitan I. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys J*. 2004 Nov;87(5):3336-43.
- [83] Tan SC, Pan WX, Ma G, Cai N, Leong KW, Liao K. Viscoelastic behaviour of human mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol*. 2008 Jul 22;9:40.
- [84] Thoumine O, Ott A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci*. 1997 Sep;110 (Pt 17):2109-16.
- [85] Desprat N, Richert A, Simeon J, Asnacios A. Creep function of a single living cell. *Biophys J*. 2005 Mar;88(3):2224-33.
- [86] Fabry B, Maksym GN, Butler JP, et al. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2003;68(4 Pt 1):041914.
- [87] Desprat N, Guiroy A, Asnacios A. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Review of Scientific Instruments* 2006;77:055111.

- [88] Ellis EF, McKinney JS, Willoughby KA, Liang S, Povlishock JT. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes. *J Neurotrauma*. 1995 Jun;12(3):325-39.
- [89] Beningo KA, Wang YL. Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends Cell Biol*. 2002 Feb;12(2):79-84.
- [90] Sniadecki NJ, Chen CS. Microfabricated silicone elastomeric post arrays for measuring traction forces of adherent cells. *Methods Cell Biol*. 2007;83:313-328.
- [91] Pelham RJ Jr, Wang YI. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13661-5.
- [92] Gov NS. Traction forces during collective cell motion. *HFSP J*. 2009;3(4):223-227.
- [93] Saez A, Anon E, Ghibaudo M, du Roure O, Di Meglio JM, Hersen P, Silberzan P, Buguin A, Ladoux B. Traction forces exerted by epithelial cell sheets. *J Phys Condens Matter*. 2010 May 19;22(19):194119.
- [94] Wang K, Sun X, Zhang Y, et al. Microfluidic Cytometry for High-Throughput Characterization of Single Cell Cytoplasmic Viscosity Using Crossing Constriction Channels. *Cytometry A*. 2020;97(6):630-637.
- [95] Lee LM, Liu AP. A microfluidic pipette array for mechanophenotyping of cancer cells and mechanical gating of mechanosensitive channels. *Lab Chip*. 2015 Jan 7;15(1):264-73.
- [96] Mak M, Erickson D. A serial micropipette microfluidic device with applications to cancer cell repeated deformation studies. *Integr Biol (Camb)*. 2013 Nov;5(11):1374-84.
- [97] Luo YN, Chen DY, Zhao Y, Wei C, Zhao XT, Yue WT, Long R, Wang JB, Chen J. A constriction channel based microfluidic system enabling continuous characterization of cellular instantaneous Young's modulus, *Sensors and Actuators B* 2014;202:1183–1189.
- [98] Zeng NF, Mancuso JE, Zivkovic AM, Smilowitz JT, Ristenpart WD. Red Blood Cells from Individuals with Abdominal Obesity or Metabolic Abnormalities Exhibit Less Deformability upon Entering a Constriction. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156070.
- [99] Han X, Liu Z, Zhao L, Wang F, Yu Y, Yang J, Chen R, Qin L. Microfluidic Cell Deformability Assay for Rapid and Efficient Kinase Screening with the CRISPR-Cas9 System. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Jul 18;55(30):8561-5.
- [100] Ito H, Murakami R, Sakuma S, et al. Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling. *Sci Rep*. 2017;7:43134.
- [101] Ma D, Wang R, Chen S, Luo T, Chow YT, Sun D. Microfluidic platform for probing cancer cells migration property under periodic mechanical confinement. *Biomicrofluidics*. 2018;12(2):024118.
- [102] Holmes D, Whyte G, Bailey J, Vergara-Irigaray N, Ekpenyong A, Guck J, Duke T. Separation of blood cells with differing deformability using deterministic lateral displacement(†). *Interface Focus*. 2014 Dec 6;4(6):20140011.
- [103] Masaeli M, Gupta D, O'Byrne S, Henry T. K. Tse, Gossett DR, Tseng P, Utada AS, Jung HJ, Young S, Clark AT, Di Carlo D. Multiparameter mechanical and morphometric screening of cells, *Sci Rep* 2016;6:37863.

- [104]Fregin B, Czerwinski F, Biedenweg D, Girardo S, Gross S, Aurich K, Otto O. High-throughput single-cell rheology in complex samples by dynamic real-time deformability cytometry. *Nat Commun.* 2019 Jan 24;10(1):415.
- [105]Xiang N, Wang J, Li Q, Han Y, Huang D, Ni Z. Precise Size-Based Cell Separation via the Coupling of Inertial Microfluidics and Deterministic Lateral Displacement. *Anal Chem.* 2019 Aug 6;91(15):10328-10334.
- [106]Bow H, Pivkin IV, Diez-Silva M, Goldfless SJ, Dao M, Niles JC, Suresh S, Han J. A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. *Lab Chip.* 2011 Mar 21;11(6):1065-73.
- [107]Huang LR, Cox EC, Austin RH, Sturm JC. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science.* 2004;304(5673):987-990.
- [108]Beech JP, Holm SH, Adolfsen K, Tegenfeldt JO. Sorting cells by size, shape and deformability. *Lab Chip.* 2012 Mar 21;12(6):1048-51.
- [109]Sun Y, Wan KT, Roberts KP, Bischof JC, Nelson BJ. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003 Dec;2(4):279-86.
- [110]Liu X, Fernandes R, Jurisicova A, Casper RF, Sun Y. In situ mechanical characterization of mouse oocytes using a cell holding device. *Lab Chip.* 2010 Aug 21;10(16):2154-61.
- [111]Kim J, Kim J. Viscoelastic characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013 Feb;60(2):569-75.
- [112]Murayama Y, Yoshida M, Mizuno J, Nakamura H, Inoue S, Watanabe Y, Akaishi K, Inui H, Constantinou CE, Omata S. Elasticity Measurement of Zona Pellucida Using a Micro Tactile Sensor to Evaluate Embryo Quality. *J. of Mammalian Ova Research* 2008;25(1):8-16.
- [113]Andolfi L, Masiero E, Giolo E, Martinelli M, Luppi S, Dal Zilio S, Delfino I, Bortul R, Zweyer M, Ricci G, Lazzarino M. Investigating the mechanical properties of zona pellucida of whole human oocytes by atomic force spectroscopy. *Integr Biol (Camb).* 2016 Aug 8;8(8):886-93.
- [114]Boccaccio, A., Lamberti, L., Papi, M., De Spirito, M., Douet, C., Goudet, G., & Pappalettere, C. (2014). A hybrid characterization framework to determine the visco-hyperelastic properties of a porcine zona pellucida. *Interface focus*, 4(2), 20130066.
- [115]Zhao Q, Wu M, Cui M, Qin Y, Yu J, Sun M, Zhao X, Feng X. A novel pneumatic micropipette aspiration method using a balance pressure model. *Rev Sci Instrum.* 2013 Dec;84(12):123703.
- [116]Luo Z, Guven S, Gozen I, et al. Deformation of a single mouse oocyte in a constricted microfluidic channel. *Microfluid Nanofluidics.* 2015;19(4):883-890.
- [117]Nakahara K, Sakuma S, Hayakawa T, Arai F. On-Chip Transportation and Measurement of Mechanical Characteristics of Oocytes in an Open Environment. *Micromachines* 2015;6:648-659.
- [118]Dittmann J, Dietzel A, Böl M. Mechanical characterisation of oocytes - The influence of sample geometry on parameter identification. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;77:764-775.
- [119]Shen T, Benet E, Sridhar SL, Abadie J, Piat E, Vernerey FJ. Separating the contributions of zona pellucida and cytoplasm in the viscoelastic response of human oocytes. *Acta Biomater.* 2019;85:253-262.

- [120] Abadie J, Roux C, Piat E, Filiatre C, Amiot C. Experimental Measurement of human oocyte mechanical properties on a micro and nanoforce sensing platform based on magnetic springs. *Sens Actuators B Chem* 2014; 90:429-438.
- [121] Iwasaki W, Yamanaka K, Sugiyama D, et al. Simple separation of good quality bovine oocytes using a microfluidic device. *Sci Rep.* 2018;8(1):14273.
- [122] Dziuban J, *Technologia i zastosowanie mikromechanicznych struktur krzemowych i krzemowo-szklanych w technice mikrosystemów*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2004.
- [123] Walczak R, *Laboratoria chipowe z detekcją optyczną: konstrukcja, technologia i przykłady wykorzystania*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2014.
- [124] Wang HS, Xiao FN, Li ZQ, et al. Sensitive determination of reactive oxygen species in cigarette smoke using microchip electrophoresis-localized surface plasmon resonance enhanced fluorescence detection. *Lab Chip.* 2014;14(6):1123-1128.
- [125] Werts M, Raimbault V, Loumagne M, Griscom L, Francois O. Optical microscopy and spectroscopy of analyte-sensitive functionalized goldnanoparticles in microfluidic systems. *Proc. SPIE* 2013;8595:85950W.
- [126] Walczak R. Fluorescence detection by miniaturized instrumentation based on non-cooled CCD minicamera and dedicated for lab-on-a-chip applications. *BioChip Journal* 2011;5(3):271-279.
- [127] Walczak R, Kubicki W, Dziuban J. Low cost fluorescence detection using a CCD array and image processing for on-chip gel electrophoresis. *Sensors and Actuators B* 2017;240:46–54.
- [128] Kamuri MF, Zainal Abidin Z, Yaacob MH, Hamidon MN, Md Yunus NA, Kamarudin S. Separation and Detection of Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae Using a Microfluidic Device Integrated with an Optical Fibre. *Biosensors (Basel)*. 2019;9(1):40.
- [129] Bliss CL, McMullin JN, Backhouse CJ. Rapid fabrication of a microfluidic device with integrated optical waveguides for DNA fragment analysis. *Lab Chip.* 2007;7(10):1280-1287.
- [130] Walczak R, Śniadek P, Dziuban JA, Kluger J, Soyta AC. Supravital fluorometric apoptosis detection in a single mouse embryo using lab-on-a-chip. *Lab Chip.* 2011;11(19):3263-3268.
- [131] Kim CH, Sohn IB, Lee YJ, Byeon CC, Kim SY, Park HY, Lee H. Fabrication of a fused silica based mold for the microlenticular lens array using a femtosecond laser and a CO2 laser. *Opt. Mater. Express* 2014;4:2233-2240.
- [132] Luo Y, Yu F, Zare RN. Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab Chip.* 2008;8(5):694-700.
- [133] Zhou T, Liu X, Liang Z, Liu Y, Xie J, Wang X. Recent advancements in optical microstructure fabrication through glass molding process. *Front. Mech. Eng.* 2017;12:46–65.
- [134] Schneckenburger H. Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(1):13-18.
- [135] Baza danych współczynników załamania (<https://refractiveindex.info/?shelf=glass&book=SCHOTT-BK&page=N-BK7>), dostęp 12.06.2021
- [136] Cao G, Wang X, Xu Y, Liu S. A Micromachined Piezoresistive Pressure Sensor with a Shield Layer. *Sensors.* 2016; 16(8):1286.

- [137] Tran AV, Zhang X, Zhu B. Mechanical Structural Design of a Piezoresistive Pressure Sensor for Low-Pressure Measurement: A Computational Analysis by Increases in the Sensor Sensitivity. *Sensors*. 2018; 18(7):2023.
- [138] MEMS Capacitive Pressure Sensors: A Review on Recent Development and Prospective. *International Journal of Engineering and Technology* 2013;5(3):2734-2746.
- [139] Knapkiewicz P, Augustyniak I, Sareło K, Gorecka-Drzazga A, Dziuban J. High-dose radiation sensor with wireless optical detection. *Measurement Science and Technology*, 2017;28(5).
- [140] Sareło K, Górecka-Drzazga A, Dziuban J. Optical detection system for MEMS-type pressure sensor. *J. Micromech. Microeng.* 2015; 25:074009.
- [141] Podwin A, Kubicki W, Dziuban JA. Study of the behavior of *Euglena viridis*, *Euglena gracilis* and *Lepadella patella* cultured in all-glass microaquarium. *Biomed Microdevices*. 2017 Sep;19(3):63.
- [142] Oficjalna strona firmy Elveflow (<https://www.elveflow.com/microfluidic-products/microfluidics-flow-control-systems/ob1-pressure-controller/>) dostęp 12.06.2021
- [143] Lizanets D, Walczak R. Cell detection and tracking in lab-on-a-chip devices by image processing. *Optica Applicata* 2018; 48(1):15-24.
- [144] Pokrzywnicka A, Śniadek P, Małyszka N, Lizanets D, Kubicki K, Pawlak P, Walczak R. MEMS cytometer for porcine oocyte deformation measurement. *J MICROMECH MICROENG.* 2019;29(9):1-11.
- [145] Pokrzywnicka A, Walczak R. Integrated microprisms matrix for coupling a laser beam in microfluidic systems. *Proceedings*. 2018;2(13.):1-4.
- [146] Pokrzywnicka A, Lizanets D, Śniadek P, Małyszka N, Walczak R. Multiparametric porcine oocyte deformation characterization by novel MEMS-type cytometer. *Proceedings*. 2018;2(13):1-4.
- [147] Walczak R, Pokrzywnicka A. Mikrocytometria odkształceniowa wykorzystująca technikę mikrosystemów. *Elektronika* 2017;58(2):27-30.