



MIKRO- I NANO-SYSTEMY W CHEMII I DIAGNOSTYCE BIOMEDYCZNEJ MNS-DIAG



PROJEKT KLUCZOWY WSPÓLFINANSOWANY PRZEZ UNIĘ EUROPEJSKĄ Z EUROPEJSKIEGO FUNDUSZU ROZWOJU REGIONALNEGO; UMOWA Nr. POIG.01.03.01-00-014/08-00

RAPORT CZĄSTKOWY PROJEKTU MNS DIAG 2B

OPTO-LoC „Lab-on-a-chip” z detekcją optyczną – Apozar

Raport 2B-1. Cele projektu i jego realizacja

R. Walczak, J. Dziuban

Zatwierdził:

Dr inż. Piotr Grabiec, prof. ITE
Koordynator Projektu MNS DIAG

Data: ...31.01.2014....

1. Cele naukowe projektu

Wiarygodna ocena materiału rozrodczego zwierząt hodowlanych jest istotna nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale przede wszystkim gospodarczego. Poprawne przeprowadzenie wszystkich etapów transferu zarodków *in vitro* jak i *in vivo* wiąże się z bardzo dużymi nakładami finansowymi, którymi obciążeni są hodowcy. Koszt ten związany jest z opłatą osób pracujących przy transferze, odpowiednim przygotowaniem zwierząt (leki hormonalne), posiadaniem specjalistycznego sprzętu oraz niezbędnych mediów i pożywek przeznaczonych do hodowli zarodków. Istotnym jest również fakt, że ciężarne zwierzęta hodowlane wymagają podawania specjalnej karmy oraz dozoru weterynarza. Tak przeprowadzony transfer jest dla hodowców dużym ryzykiem inwestycyjnym, ponieważ nowo narodzone zwierzę może być słabej jakości. Dlatego, tak ważna jest ocena materiału rozrodczego przed jego implantacją do matki bioreczni. Wykorzystywana do tej pory przez weterynarzy oraz osoby wyspecjalizowane w tym kierunku, klasyczna metoda oceny żeńskiego materiału rozrodczego polegająca na morfologicznej ocenie komórki nie przynosi jednak pożądanych rezultatów. Według środowiska weterynaryjnego idealna metoda do badania jakości komórek rozrodczych zwierząt powinna być nieniszcząca i dawać wynik analizy w czasie kilku minut, a urządzenie dla takiej metody powinno być tanie, łatwe w transporcie i obsłudze. Istotnym jest również fakt, iż ocena jakości powinna dotyczyć pojedynczej komórki. Możliwe jest to tylko w przypadku, gdy wymiary charakterystyczne celi pomiarowej, w której przeprowadzane jest badanie, są zbliżone do wymiarów komórki. Konieczne jest, aby żeńska komórka rozrodcza i zarodek po przeprowadzonej kwalifikacji były zdolne do dalszego rozwoju.

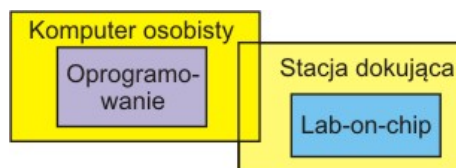
Wspomniane wcześniej uwarunkowania metodologiczne wynikające z wieloletniego doświadczenia weterynaryjnego w przedstawionym tu zagadnieniu powodują, że najkorzystniejsze byłoby połączenie dotychczas stosowanych i nowo opracowanych metod oceny jakości komórek rozrodczych i zarodków. W ramach tego projektu zostanie opracowane od podstaw przenośne instrumentarium wykorzystujące technikę *lab-on-a-chip*, które umożliwi ocenę jakościową żeńskiego materiału rozrodczego i zarodków bez zaburzenia jakości biologicznej badanego materiału oraz umożliwi połączenie metodologiczne wykorzystywanych dotychczas metod klasycznych.

Zgodnie z głównymi założeniami podprojektu APOZAR, opracowany instrument będzie umożliwiał kwalifikację materiału pochodzenia zwierzęcego, bydłęcego oraz trzody chlewnej. Hodowla tych zwierząt jest szczególnie istotna w warunkach europejskich. Ważnym zagadnieniem jest tu przeprowadzenie badań z wykorzystaniem żywych oocytów i zarodków, tak aby uzyskać wskazania, dotyczące metodologii, przydatne weterynarzom. Oznacza to, że oprócz prac laboratoryjnych będą wykonywane badania w warunkach hodowlanych z zachowaniem pełnej zgodności transferu zarodków.

2. Cele techniczne i gospodarcze projektu

Celem technicznym projektu jest wytworzenie demonstratora APOZAR składającego się z trzech głównych części (Rys. 2.1):

- lab-on-chipa do pomiarów spektrofotometrycznych i fluorymetrycznych,
- stacji dokującej lab-on-chipa,
- komputera przenośnego wraz ze specjalistycznym oprogramowaniem.



Rysunek 2.1 Schemat blokowy demonstratora APOZAR.

Lab-on-chip umieszczany będzie w stacji dokującej będącej podzespołem umożliwiającym „kontakt” lab-on-chipa ze światem zewnętrznym (fluidycznym, elektrycznym, informatycznym). Do komory pomiarowej lab-on-chipa wprowadzany będzie klasyfikowany materiał biologiczny. Należy podkreślić, że procedura wprowadzania/wyprowadzania oocytu/zarodka do lab-on-chipa musi być nieniszcząca, umożliwiającą późniejsze zapłodnienie oocytu lub transfer zarodka do matki-bioreczni, i zgodna z przyzwyczajeniami weterynaryjnego personelu obsługującego demonstrator APOZAR (może to być np. pipetowanie ręczne lub automatyczne). Po prawidłowym wprowadzeniu oocytu/zarodka do komory pomiarowej, co nadzorowane jest przez wbudowaną w stację dokującą system wideo lub/i mikroskop, nastąpi pomiar parametrów optycznych, według procedury wybranej przez operatora. Pomiar optyczny spektrofotometryczny realizowane będą z wykorzystaniem źródła światła widzialnego i miniaturowego spektrometru oraz źródła wzbudzającego fluorescencję i detektora fluorescencji w przypadku pomiaru fluorymetrycznego. Pomiar parametrów optycznych będzie nadzorowany przez komputer wyposażony w odpowiednie oprogramowanie. Po

zakończeniu procedury pomiarowej, co sygnalizowane będzie przez system informatyczny, oocyt/zarodek będzie wyprowadzany z lab-on-chipa. Procedura pomiarowa trwać będzie od kilku do 30 minut w zależności od wybranej przez operatora opcji pomiarowej. Po zakończeniu systemu informatycznego, w zależności od uprawnień operatora, umożliwi wgląd we wszystkie parametry optyczne uzyskane w trakcie pomiaru lub poda jakość badanego materiału biologicznego, wg. ustalonego algorytmu klasyfikacji.

Celem gospodarczym podprojektu APOZAR jest wspomaganie procesu rozrodu zwierząt hodowlanych przez opracowanie nowej metody oceny jakości zarodków i oocytów tych zwierząt. Opracowanie takiej metody powinno zmniejszyć liczbę nieudanych zapłodnień *in vitro* oraz transferów zarodków, a tym samym zwiększyć efektywność finansową tych procesów. Cel społeczny związany jest z upowszechnieniem wiedzy na temat systemów mikrofluidycznych i przełamaniem bariery nowości w środowisku weterynaryjnym przez opisany w tym raporcie demonstrator APOZAR.

3. Realizacja projektu

3.1 Członkowie konsorcjum

Politechnika Wroclawska, Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki, Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki: Jan Dziuban, Rafał Walczak, Partycja Śniadek, Małgorzata Dziuban. Czołowy Zespół badawczy w kraju i Unii Europejskiej zajmujący się badaniami nad technologią oraz aplikacjami mikrosystemów typu lab-chip oraz metodami detekcji optycznej z wykorzystaniem lab-chipów.

Prof. dr hab. inż. Jan Dziuban

Profesor zwyczajny Instytutu Technologii Elektronowej w Warszawie, kierownik Zakładu Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Politechniki Wrocławskiej. Autor blisko 200 artykułów naukowych, dwóch książek (w tym jednej w j. angielskim). Zainteresowania badawcze skupione są wokół techniki mikrosystemów (projektowanie, wytwarzanie oraz zastosowanie). Członek komitetów sterujących konferencji krajowych i zagranicznych, doradca programów europejskich. Kierownik oraz wykonawca projektów krajowych oraz realizowanych w ramach programów Unii Europejskiej.

Dr inż. Rafał Walczak

Zatrudniony na stanowisku adiunkta na Politechnice Wrocławskiej, kierownik MEMSLab. Główne zainteresowania badawcze dotyczą metod detekcji optycznej w mikro- i nano-skali, metod wytwarzania oraz aplikacji systemów mikrofluidycznych typu lab-on-a-chip. Autor ponad 100 publikacji, oraz 3 rozdziałów w książkach.

Prowadzone w projekcie badania wymagały multidyscyplinarnej wiedzy z zakresu techniki mikrosystemów oraz rozrodu zwierząt hodowlanych.

Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Instytut Weterynarii: Jędrzej Jaśkowski, Paweł Antosik, Marta Jackowska. Wiodący w kraju zespół zajmujący się badaniem rozrodu zwierząt hodowlanych ze szczególnym uwzględnieniem bydła i trzody chlewnej.

Prof. dr hab. Jędrzej Jaśkowski

Od 2003 roku kierownik (początkowo) Katedry Weterynarii Rolniczej Akademii Rolniczej od 2009 roku Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Główne obszary zainteresowań naukowych koncentrowały się wokół zagadnień związanych z wpływem niedoborów mineralnych na rozród bydła, w późniejszym okresie biotechnikami stosowanymi w rozrodzie – w tym programami synchronizacji rui i owulacji, transferem zarodków, wykorzystaniem ultrasonografii w ginekologii weterynaryjnej, możliwościami przyżyciowej oceny gamet i zarodków, oraz schorzeniami kończyn i palców na rozród bydła. Autor lub współautor ponad 150 publikacji naukowych, 100 monografii, artykułów przeglądowych i ponad 300 doniesień naukowych. Autor lub współautor 4 podręczników. Członek wielu towarzystw naukowych m.in. Europejskiego Stowarzyszenia Embriotransferu.

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN: Anna Chełmońska-Soyta, Joanna Kluger. IITD prowadzi badania w dziedzinie biologii w dyscyplinach biologia i biologia medyczna. Badania naukowe Instytutu obejmują zagadnienia transplantologii, mikrobiologii lekarskiej, genetyki i biologii molekularnej, biotechnologii, immunologii infekcyjnej, wirusologii czy tworzenie nowych substancji o różnorodnych aktywnościach biologicznych. Ścisłym związkiem z praktyką są badania dotyczące terapii

doświadczalnych, zaawansowanej diagnostyki immunologicznej, przesiewowych badań preparatów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej czy terapeutycznego zastosowania bakteriofagów. Uczestniczące w projekcie Laboratorium Immunologii Rozrodu prowadzi badania nad immunobiologicznymi interakcjami pomiędzy zarodkami i organizmem matki.

Prof. dr hab. Anna Chelmońska-Soyta

Zatrudniona na stanowisku profesora nadzwyczajnego IITD, kierownik Laboratorium Immunologii Rozrodu, członek rady naukowej IITD a także na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Stopnie i tytuły naukowe

1992 Stopień dr nauk weterynaryjnych na podstawie rozprawy doktorskiej pt: „Adherencja *Haemophilus somnus* do plemników buhaja badana in vitro”

2003 stopień dr habilitowanego na podstawie dorobku i rozprawy habilitacyjnej pt: ”Immunobiologiczne interakcje pomiędzy *Ureaplasma diversum* i zarodkami bydłęcymi w stadium przedimplantacyjnym”,

2012 – tytuł profesora

Główne zainteresowania badawcze dotyczą immuno-endokrynych interakcji w komórkach układu odpornościowego u samic w przebiegu ciąży i u samców.

Prowadzone w projekcie badania wymagały umiejętności pozyskiwania, hodowli i oceny biologicznej zarodków pozyskiwanych od myszy w przedimplantacyjnej fazie ciąży.

3.2. Prace realizowane w ramach projektu

Celem prac zespołu Politechniki Wrocławskiej było opracowanie techniczne i metodologiczne demonstratora systemu APOZAR, a w szczególności opracowanie i wykonanie struktury mikrofluidycznej umożliwiającej optyczną charakteryzację badanego materiału biologicznego, niezbędnych elementów mechanicznych, optycznych i elektronicznych oraz metodologii analizy danych pomiarowych, w tym systemu informatycznego.

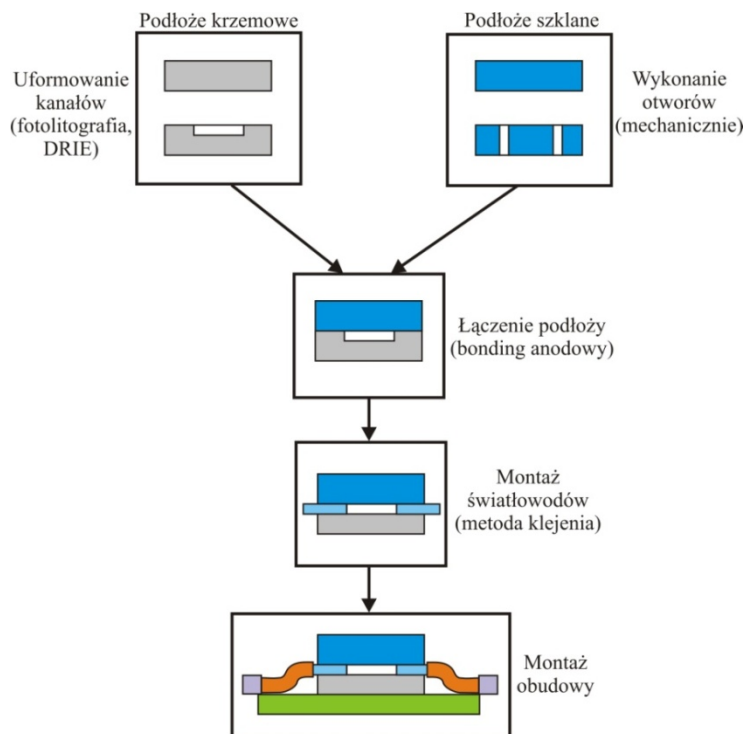
Zespół Uniwersytetu Przyrodniczego prowadził badania wytworzonych mikrosystemów z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej i oceny jakości badanego materiału biologicznego za pomocą nowej metodologii. Natomiast, prace Zespołu z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN ukierunkowane były na badania wytworzonych mikrosystemów z wykorzystaniem detekcji fluorymetrycznej w apoptotycznej metodzie oceny żywotności zarodków małych ssaków.

Prace badawcze zrealizowano zgodnie z założeniami projektu i z jego harmonogramem. Prace te skupione był wokół trzech głównych nurtów badawczych obejmujących:

1. badania nad metodologią i instrumentarium (w tym chip mikrofluidyczny) umożliwiającym optyczną (spektrofotometryczną i fluorymetryczną) charakteryzację żywych oocytów i zarodków ssaków (bydła, świń oraz myszy),

- chipy mikrofluidyczne

Chip wykonano metodami obróbki mikroinżynierskiej. Na podłożu krzemowym zastosowano procesy fotolitografii jednostronnej oraz suche trawienie krzemu (DRIE – Deep Reactive Ion Etching), co umożliwiło precyzyjne formowanie kształtów kanałów. W podłożu szklanym wywiercono mechanicznie otwory: wlotowy i sterujący. Połączenie ze sobą podłoża krzemowego i szklanego wykonano metodą bondingu anodowego. Kolejnymi etapami był montaż światłowodów szklanych oraz umieszczenie gotowego lab-chipa w obudowie (Rys. 3.2.1).



Rysunek 3.2.1 – Schemat etapów technologicznych koniecznych do wykonania lab-chipa.

- Instrumentaria pomiarowe umożliwiające pomiary spektralne i fluorymetryczne

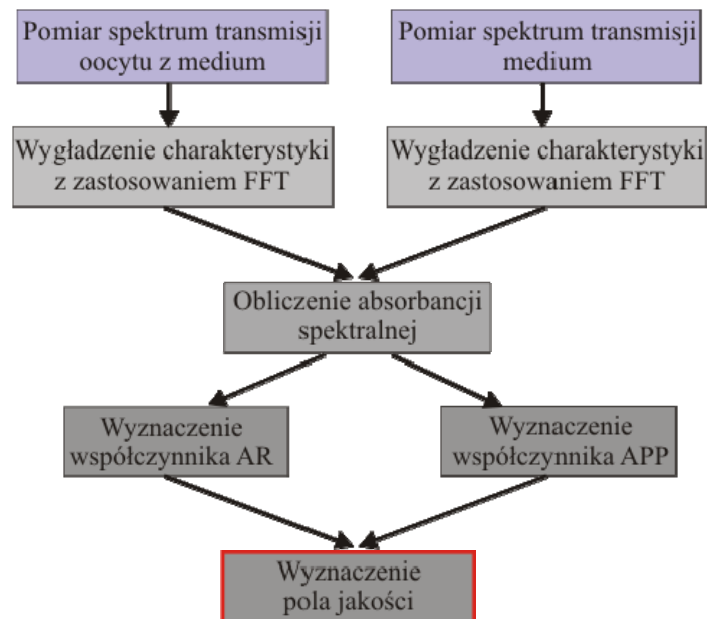
Zestawiono instrumentaria pomiarowe umożliwiające pomiary spektro- i fluorymetryczne (budowę ich podano w punkcie 3.3).

W trakcie prowadzenia właściwych pomiarów spektrofotometrycznych, pojedynczą komórkę umieszczano w celi pomiarowej za pomocą pipety przyłożonej do wlotu lab-chipa. Komórka była zasysana przez siły kapilarne do środka lab-chipa. Światło VIS/NIR z lampy halogenowej transmitowane było światłowodem do celi pomiarowej i oświetlało komórkę, unieruchomioną w strumieniu buforu PBS. Wiązka światła przechodząca przez komórkę była transmitowana drugim światłowodem do miniaturowego spektrometru. Po pomiarach (ok. 2 min.) komórka była wyciągana z lab-chipa i przenoszona do dalszej analizy i hodowli. Uzyskane charakterystyki spektralne były następnie analizowane.

W przypadku badań fluorymetrycznych również opracowano metodologię wprowadzania, unieruchamiania w mikromorze pomiarowej oraz wyprowadzania zarodków do/z lab-chipa cytometrycznego. Badany obiekt wprowadzano za pomocą pipety laboratoryjnej do wlotu lab-chipa, a następnie, kierowano kanałem mikrofluidycznym do mikromorzy pomiarowej. Zebrany przez moduł minikamery obraz w czasie rzeczywistym analizowano w obszarze detekcji określonym przez użytkownika i wynoszącym 30 x 30 pikseli. Określano średnią intensywność fluorescencji z tego obszaru. Intensywność ta, odniesiona do poziomu próby ślepej (mikromorza pomiarowa wypełniona buforem) była podstawą do detekcji apoptozy oraz określenia żywotności materiału biologicznego.

2. badania nad opracowaną metodologią pola jakości i demonstratorem lab-chip, z rzeczywistym materiałem biologicznym (oocyty i zarodki) w warunkach laboratoryjnych oraz rzeczywistych hodowli zwierząt,

Zaproponowano nowatorską metodę analizy danych pomiarowych, metodę pola jakości, której etapy przedstawiono na Rysunku 3.2.2. W pierwszej kolejności zmierzone zostały charakterystyki spektralne medium – PBS oraz oocytu „zawieszonego” w medium, które następnie zostały wygładzone z wykorzystaniem szybkiej transformaty Fouriera o liczbie próbek 100. Kolejnym etapem było określenie absorbancji poszczególnego oocytu. Następnie wprowadzono dwa współczynniki AR (Absorbance Ratio) – stosunek absorbancji dla długości fali 550 nm do absorbancji dla długości fali 850 nm oraz APP (Absorbance Peak Position) – długość fali dla maksymalnej absorbancji. Na ich podstawie wyznaczane jest tzw. „pole jakości”. Metoda ta jest skorelowana z budową morfologiczną oocytów i umożliwia jednoznaczną, parametryczną ocenę jakości pojedynczej komórki.



Rysunek 3.2.2 – Etapy analizy prowadzonej metodą pola jakości.

3. badania nad opracowaną metodologią detekcji fluorymetrycznej i oceny żywotności zarodków mysich metodą analizy apoptozy w lab-chipie, z rzeczywistym materiałem biologicznym w warunkach laboratoryjnych.

W badaniu mikrocytometrycznym, metodą jednokanałowej fluorymetrycznej detekcji obrazowej wyznaczano intensywność fluorescencji w programowo zdefiniowanym obszarze detekcyjnym zlokalizowanym w mikrokomorze pomiarowej. Intensywność fluorescencji każdego zarodków wyznaczano jako wartość średnią pięciu kolejnych pomiarów związanych z wprowadzaniem/wyprowadzaniem zarodka do mikrokomory pomiarowej. Źródłem światła był moduł LED z diodą niebieską (490 nm) wyposażony w optyczny filtr interferencyjny dolnoprzepustowy 500 nm, co zapewniło wzbudzenie fluorescencji fluorochromu będącego składnikiem typowego zestawu do fluorymetrycznej detekcji apoptozy (Annexin-V-FITC). W torze optycznym minikamery CCD umieszczono górnoprzepustowy filtr interferencyjny 500 nm przepuszczający światło fluorescencji. Jeden ze światłowodów zintegrowanych z lab-chipem sprzęgnięto optycznie z modułem LED. Światło wzbudzające fluorescencje kierowano tym światłowodem do mikrokomory pomiarowej lab-chipa. Obserwowano prawidłowe zmiany intensywności fluorescencji charakterystyczne dla badanych grup zarodków. Obrazy z minikamery CCD były tożsame z obrazami uzyskanymi pod epifluorescencyjnym mikroskopem referencyjnym.

3.3. Główne zakupy urządzeń, wyposażenia i materiałów

Lista zakupów aparaturowych:

- spektrometr zintegrowany wraz z lampą halogenową komputerem osobistym,
- przenośne komputery osobiste (3 szt.),
- mikroskop stereoskopowy z torem wizyjnym i okularom wraz z kamerą,
- skaner i drukarka - urządzenie wielofunkcyjne HP Color Laser Jet,
- uniwersalne stanowisko montażowe - mikrofrezarka Proxxon MF 70,
- uniwersalne stanowisko montażowe - myjka ultradźwiękowa Sonic,
- uniwersalne stanowisko montażowe - lutownica z wyposażeniem,
- system do komputerowej analizy nasienia zwierząt wraz z kamerą,
- mikroskop stereoskopowy wraz z oprogramowaniem i system wizualizacji,
- kontener na ciekły azot.

Materiały zakupione w ramach projektu to: odczynniki chemiczne i biotechnologiczne, elementy optyczne, optomechaniczne i elektroniczne. Kwatery, szkło laboratoryjne. Źródła światła i detektory w zakresie VIS NIR, hot-plate, kamery CCD. Osprzęt mikrofluidyczny, złączki, przewody itp. Drobnny sprzęt laboratoryjny. Wyposażenie uzupełniające dla linii technologicznej: gazy technologiczne, filtry, obwody PCB z montażem SMD i przewlekanym powietrza, regulatory i mierniki środowiskowe, gazy technologiczne, filtry, chromofory,

RAPORT MNS-DIAG

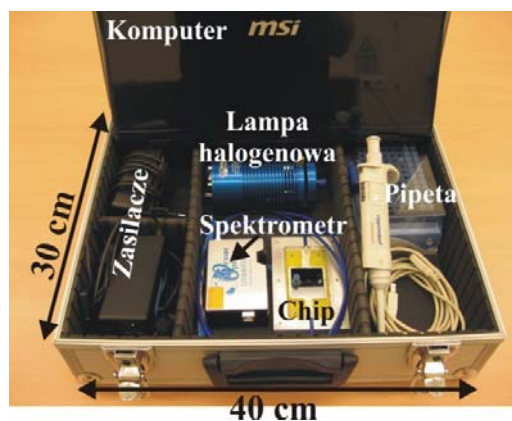
zestawy apotypyczne. Myszy dawcy zarodków. Odczynniki chemiczne do hodowli zarodków w tym media hodowlana. Odczynniki chemiczne do wykrywania apoptozy w tym koniugaty z fluorochromami. Plastikowe naczynia hodowlane, pipety, probówki, igły strzykawkowe i inne

W ramach realizacji projektu MNS-DIAG, 2B, APOZAR, z wykorzystaniem zakupionej aparatury i sprzętu, utworzone zostały następujące stanowiska pomiarowe:

1. Mikrocytometr do charakteryzacji oocytów trzody chlewnej oraz bydła z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej. W układzie pomiarowym, oprócz wykonanego lab-chipa, wykorzystano: miniaturowy spektrometr USB4000UV-VIS firmy OceanOptics, miniaturową lampę halogenową HL-2000 również firmy OceanOptics oraz komputer.



2. Mikrocytometr do charakteryzacji zarodków zwierząt hodowlanych z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej. Układ pomiarowy składał się ze źródła światła - lampa halogenowa HL-2000 firm OceanOptics, detektora - miniaturowy spektrometr USB4000UV-VIS firmy OceanOptics oraz lab-chipa. Wykorzystane zostało również oprogramowanie dostarczone przez producenta sprzętu umożliwiające konfigurację spektrometru oraz zbieranie i zapisywanie danych pomiarowych. W skład wyposażenia tego przenośnego instrumentu wchodziła również pipeta z zestawem jednorazowych końcówek za pomocą, której badaną komórkę umieszczano przy wlocie do kanału cieczowego. Instrument wstawiono do przenośnej walizki, co umożliwiało łatwy transport.



3. Mikrocytometr do charakteryzacji zarodków mysich z wykorzystaniem fluorymetrycznej metody detekcji. Instrumentarium optoelektroniczne współpracujące z lab-chipem składa się z miniaturowego modułu LED będącego źródłem światła wzbudzającego fluorescencję, mikroskopu optycznego, w którym w jednym z torów umieszczono miniaturową kamerę CCD wraz z filtrem optycznym, oraz komputera przenośnego wyposażonego w moduł przechwyty obrazu i specjalizowane oprogramowanie do jego analizy.

RAPORT MNS-DIAG

