


# Filtracja molekularna – wzbogacanie i separacja frakcji komórek nowotworowych

Mariusz Łapiński<sup>1)</sup>, Andrzej Górka<sup>1)</sup>, Zdzisław Bogdanowicz<sup>2)</sup>


Centrum Inżynierii Biomedycznej Instytut Optoelektroniki<sup>1)</sup>, Wydział Mechaniczny<sup>2)</sup>, Wojskowa Akademia Techniczna, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, e-mail: [andrzej.gorka@wat.edu.pl](mailto:andrzej.gorka@wat.edu.pl), [zdzislaw.bogdanowicz@wat.edu.pl](mailto:zdzislaw.bogdanowicz@wat.edu.pl)

## Aparatura i urządzenia


W Pracowni Inżynierii Molekularnej i Zastosowań Grafenu realizowane są badania dotyczące procesów wytwarzania sit molekularnych i aktywnych powierzchni adhezyjnych dla cząstek biologicznych. Realizowane są prace nad uproszczonym laboratoryjnym urządzeniem do jednorazowego wzbogacania populacji krążących komórek nowotworowych (KKN) w pojedynczych próbkach krwi. W celu realizacji powyższych zadań w pracowni zestawiane są laboratoryjne urządzenia do wytwarzania sit molekularnych wraz z oprzyrządowaniem technologicznym. Są to, między innymi, urządzenia laserowej fotolitografii laserowej, do trawienia jonowego, oczyszczania plazmowego, formowania powierzchni aktywnych i do kontroli geometrycznej wytwarzanych sit molekularnych. Ponadto w pracowni zainstalowano aparaturę kontrolno-pomiarową do oceny procesu wytwarzania sit i efektywności procesu wzbogacania KKN w badanych próbkach krwi. Aktualnie zainstalowano już następujące urządzenia:




Urządzenie do bezpośredniej fotolitografii laserowej. Typ: LaserWriter 405B+ firmy MicroTech s.r.l. Urządzenie Laser Writer do bezpośredniej fotolitografii laserowej jest niezbędnym wyposażeniem do formowania wysokorozdzielczych wzorów geometrycznych z rozdzielczością ok. 1,0 mikrometra na podłożach metalowych i półprzewodnikowych przewodzących do procesu trawienia jonowego (DRIE). Jest podstawowym wyposażeniem w procesie wytwarzania molekularnych sit do wzbogacania KKN. Jest techniką elastyczną i dużo tańszą w stosunku do klasycznej fotolitografii oraz pozwala na uzyskanie w bardzo krótkim czasie określonych wysokorozdzielczych wzorów wymaganych do wytwarzania jonowego sit molekularnych.




Urządzenie do głębokiego trawienia jonowego DRIE (Deep Reaction-Ion Etching) Typ: Flaron Series Modelt FLRIE600, firmy Plasmionics Inc. Urządzenie Flaron jest kompaktowym systemem próżniowym do realizacji procesów trawienia jonowego podłożi półprzewodnikowych i metalowych (za wyjątkiem żelaza i jego stopów). Urządzenie jest wyposażone w źródła magnetroneowe oraz źródła plazmy ICP i CCP. Dzięki temu może służyć do nanoszenia cienkich warstw, aktywacji powierzchni oraz trawienia plazmowego. Urządzenie jest niezbędne do wytwarzania molekularnych sit do wzbogacania KKN we krwi.



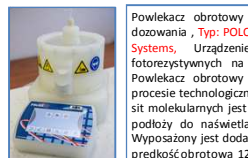
Wysokorozdzielczy skaningowy mikroskop elektrony z spektrometrem EDS do badań preparatów biologicznych. Typ: Quanta 250 FEG firmy FEI. Wysokorozdzielczy skaningowy mikroskop elektrony (SEM - emiter Schottky'go) Quanta 250 FEG z spektrometrem EDS z kompletnym wyposażeniem do badań preparatów biologicznych przewidziany jest do kontroli ilościowej i jakościowej procesu filtracji KKN, realizowanej z wykorzystaniem opracowywanych sit molekularnych oraz prototypowego urządzenia do realizacji badań przesiewowych krwi. Urządzenie Quanta 250 FEG daje możliwość badania preparatów biologicznych przy użyciu znacznie niższych napięć przyspieszających co oznacza, że ma najszersze możliwości w zakresie badania preparatów niekompatybilnych z tradycyjną mikroskopią elektrony (próbki biologiczne, porowate, uwodnione itp.). Poprzez zastosowanie w konfiguracji stołki Peltiera można jest kontrola wilgotności otoczenia badanej substancji poprzez regulację temperatury oraz ciśnienie w komorze. Ponadto urządzenie posiada rozszerzony system niskiej próżni dający możliwość osiągnięcia ciśnienia do 4000 Pa w komorze, a także szereg systemów zabezpieczających jakiegokolwiek zanieczyszczenie mikroskopu. Mikroskop wyposażony jest w spektrometr EDS wraz ze stosownym oprogramowaniem do obróbki danych, na dedykowanym komputerze. W konfiguracji znajdują się również detektory SE i unikalne rozwiązania do detekcji sygnału BSE.




Dolnostolkowy mikroskop metalograficzno-badawczy, Typ: HUVITZ HRM-3003D Profiler TRF BD zmontowany firmy Huvitz. Mikroskop badawczy dolno-stolkowy zmontowany do prowadzenia obserwacji w polu jasnym, polu ciemnym, prostej polaryzacji i kontrastie interferencyjnym w świetle odbitym oraz w polu jasnym w świetle przechodzącym. Przeznaczony jest do makro kontroli wymiarowej wykonywanych sit molekularnych i wstępnej oceny procesu filtracji KKN. Posiada oświetlenie halogenowe 100W. W zestawie kamera Lulis HC-30CU i oprogramowanie Panasis 3D Profiler do prowadzenia pomiarów morfometrycznych, profilowania 3D i analizy obrazu. Obiektywy plan semi-apochromatyczne. Zakres powiększeń od 50-1000-krótnych.




Powlekaacz obrotowy (ang. Spin Coater) z systemem automatycznego dozowania, Typ: POLOS Spin 150-NPP firmy SPS Semiconductor Production Systems. Urządzenie do formowania bardzo cienkich powłok fotorezystywnych na potrzeby bezpośredniej fotolitografii laserowej. Powlekaacz obrotowy jest urządzeniem dla pojedynczych podłoży. W procesie technologicznym wytwarzania metalowych i półprzewodnikowych sit molekularnych jest urządzeniem wspomagającym proces przygotowania podłoży do natświetlenia przez urządzenie do fotolitografii laserowej. Wyposażony jest dodatkowo w automatyczny dozownik odczynników. Max. prędkość obrotowa 12000 rpm



Płyta grzejna (ang. Hotplate), Typ: POLOS Hotplate 150S firmy SPS Semiconductor Production Systems, Płyta grzejna do utrwalania ściępnego cienkich powłok fotorezystywnych, formowanych przez powlekaacz obrotowy na potrzeby bezpośredniej fotolitografii laserowej jest niezbędną do utrwalenia nanoszczonych wzorów geometrycznych sit molekularnych przed zasadniczym procesem wytwarzania sit molekularnych, to jest trawienia jonowego. Zakres temperatury pracy: od 50 do 230°C. Programowalna pamięć: 10 programów (tj. temperatura/czas). Powierzchnia grzewcza 180 x 180 mm odpowiednia dla podłoży 1 x 150 mm. Moc max. 1200W (ok. 400W celem podtrzymania temp. ok. 200°C).



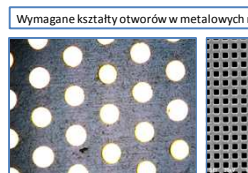
Urządzenie przesiewowe KKN Zgłoszenie patentowe P.406164



Testowe otwory wykonane nanosekundowym laserem Nd:YAG w folii niklowej - znaczne deformacje materiału wokół otworu



Testowe otwory wykonane piko-sekundowym laserem Nd:YAG w folii miedzianej - dopuszczalne deformacje materiału wokół otworu

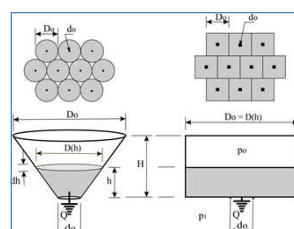


Wymagane kształty otworów w metalowych membranach filtracyjnych wykonywanych w technologii trawienia jonowego

## Model filtra molekularnego

Zasadniczym parametrem membranowego filtra molekularnego jest jego efektywność filtracji. O efektywności filtra decyduje:  
- objętościowe natężenie przepływu filtrowanego medium,  
- stopień transmisji filtra odniesiony do wzorca jednorodnego medium o porównywalnej lepkości i ciężarze właściwym,  
- wielkość, kształt oraz gęstość i forma ułożenia otworów filtracyjnych w membranie, - sposób wymuszenia procesu filtracji, tj. wymuszony lub grawitacyjny, - ilość i morfologia KKN w badanej próbce krwi, - stopień agregacji KKN w badanej próbce krwi, - sparometryzowana aktywność KKN w odniesieniu do rodzaju - zastosowanego na filtr materiału, jego jednorodność i chropowatość powierzchni, - aktywność KKN w polu elektrycznym, magnetycznym, czy w strefie oddziaływania ultradźwiękowego.

Ze względu na różnorodność morfologiczną KKN w modelu założono, że:  
- o kierunku migracji cząstek w symetrycznej komórce zalewowej decyduje rozkład sił wywołany przez uśredniony ciężar właściwy filtrowanej cieczy (w tym przypadku krwi), - ciężar właściwy separowanych cząstek krwi nie różni się od uśrednionego ciężaru właściwego cieczy, - lepkość i siły napięcia powierzchniowego na granicach faz nie wpływają na ruch cząstek w opóźnionej komórce zalewowej, - ilość odfiltrowanych cząstek ani i ich wielkość nie wpływają na zmianę natężenia filtracji, - natężenie filtracji zależy głównie od wysokości słupa filtrowanej cieczy w zbiorniku zalewowym, od wielkości i gęstości rozmieszczenia otworów filtracyjnych w membranie oraz różnicy ciśnienia w zbiorniku zalewowym i odpływowym.



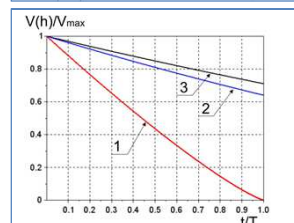
$$T_k = \frac{2 \cdot D_o^2 \cdot H}{Q_o}$$

$$T_c = \frac{\pi \cdot D_o^2 \cdot H}{2 \cdot Q_o}$$

$$T_s = \frac{\pi \cdot D_o^2 \cdot H}{10 \cdot Q_o}$$

$$Q_o = v \cdot U_o \cdot A_o$$

Całkowity czas opróżnienia filtrowanej krwi T.  
Oznaczenia:  
k – prostopadłościan  
c – cylinder  
s – stożek  
Qo – objętościowe natężenie przepływu krwi w początkowej fazie filtracji  
v – współczynnik przepływu zależny od typu filtra  
Ao – powierzchnia otworu wypływowego  
Uo – prędkość zmiany poziomu krwi w początkowej fazie filtracji

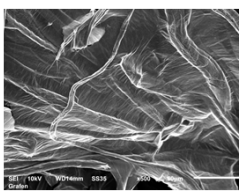


Zależność bezwymiarowej funkcji zmiany objętości w kanale wypływowym od bezwymiarowego czasu trwania procesu dla kanału w kształcie:  
1- stożka (s);  
2- cylindra (c);  
3- prostopadłościanu (k).

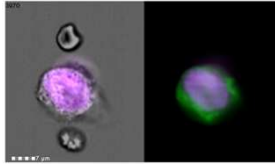
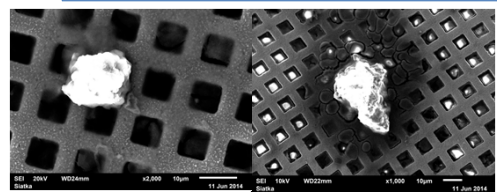
**W praktycznych badaniach porównawczych procesu filtracji najlepiej opisuje zarówno zmiany natężenia przepływu jak i czas filtracji stożkowy model filtracji.**

## Wybrane wyniki z badań

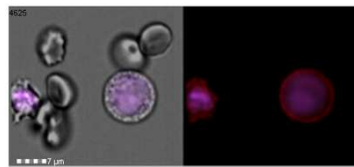
Grafen osadzony na strukturze włóknistej



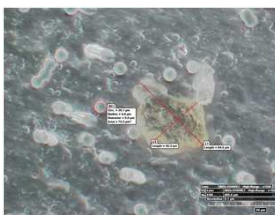
Komórki nowotworowe osadzone na membranie miedzianej. Standardowa mikroskopia skaningowa (SEM)



Fotocytometr przepływowy ImageStream MKII, Światłokrzyskie Centrum Onkologii Kielce



Duża komórka nowotworowa o dużym jądrze na tle erytrocytów jako odniesienia wielkości. Pozytywna fluorescencja Ep-CAM (zielona), SCO Kielce.



Duży limfocyt na tle Erytrocytów, SCO Kielce



Komórki nowotworowe osadzone na filtrach celulozowych. Optyczna mikroskopia cyfrowa.

Widok 3D filtra celulozowego z uwidocznioną silnie przytwierdzoną komórką nowotworową (kolor czerwony) po procesie filtracji i po intensywnym płukaniu filtra membranowego. Jasne plamy - otwory filtracyjne. Widoczna silna deformacja filtra.

Membrana filtracyjna pokryta grafenem

