

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
WYDZIAŁ ELEKTRONIKI MIKROSYSTEMÓW
I FOTONIKI

PRACA DOKTORSKA

Detekcja optyczna sygnałów w lab-chipie
przeznaczonym do jakościowej oceny
zarodków bydłych

AUTOR:

mgr inż. Patrycja Śniadek

PROMOTOR:

prof. dr hab. inż. Jan Dziuban

WROCŁAW 2011



361080 L/1

*Dziękuję mojemu mężowi oraz najbliższej rodzinie
za wsparcie i zrozumienie.*

Spis treści

1	Wstęp.....	5
2	Klasyczne metody selekcji jakościowej oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych	7
3	Studium metodologicznej oceny jakości żeńskiego materiału rozrodczego wykorzystujące technikę lab-chip z detekcją optyczną.....	16
4	Lab-chip I z detekcją optyczną do oceny jakości oocytów zwierząt hodowlanych.....	32
4.1	Projekt i technologia.....	32
4.2	Układ pomiarowy.....	41
4.3	Metoda spektrofotometryczna – metoda pików – testy laboratoryjne	45
4.3.1	Oocyty bydlęce	45
4.3.2	Oocyty trzody chlewnej.....	50
4.3.3	Analiza wyników	52
4.4	Metoda absorpcyjna – pole jakości – testy laboratoryjne.....	54
4.4.1	Oocyty trzody chlewnej.....	54
4.4.2	Analiza wyników	66
4.5	Podsumowanie	67
5	Lab-chip II z detekcją optyczną do oceny jakości zarodków zwierząt hodowlanych	69
5.1	Projekt, technologia i układ pomiarowy.....	69
5.2	Testy w warunkach laboratoryjnych	77
5.3	Testy w warunkach hodowlanych	79
5.3.1	Zarodki bydlęce.....	79
5.3.2	Zarodki trzody chlewnej.....	83
5.4	Podsumowanie	87
6	Wnioski końcowe i ocena przydatności rozwiązań.....	89
7	Bibliografia	95
	Dodatek A.....	101
	Dodatek B	106
	Dodatek C	111
	Dodatek D	113
	Dodatek E.....	116
	Dodatek F.....	117

Spis akronimów

APD	(<i>Avalanche PhotoDiode</i>) – fotodioda lawinowa
APP	(<i>Absorbance Peak Position</i>) – współczynnik opisujący długość fali dla maksymalnej wartości absorbancji
AR	(<i>Absorbance Ratio</i>) – współczynnik, stosunek wartości absorbancji dla długości fali $\lambda = 550$ nm do wartości absorbancji dla długości fali $\lambda = 850$ nm
BSA	(<i>Bovine Serum Albumin</i>) – albumina z surowicy bydlęcej
CASA	(<i>Computer Aided Sperm Analysis</i>) – system automatycznej analizy ruchliwości i morfologii plemników
CCD	(<i>Charge Coupled Device</i>) – w elektronice to matryca CCD, czyli układ złożony z wielu elementów światłoczułych
CMOS	(<i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>) – układ wielu elementów światłoczułych wykonany w technologii CMOS
COC	(<i>Cumulus-Oocyte-Complex</i>) – komórka jajowa otoczona komórkami ziarnistymi wieńca promienistego
CP	(<i>Cytometria Przepływowa</i>) – metoda diagnostyczna umożliwiająca ocenę wielkości, intensywności zabarwienia i intensywności fluorescencji badanych komórek
DEP	(<i>DiElectroPhoresis</i>) – dielektroforeza
DRIE	(<i>Deep-Reactive-Ion-Etching</i>) – głębokie reaktywne trawienie jonowe
ET	(<i>Embryo Transfer</i>) – sztuczne wprowadzenie zarodka we wczesnej fazie jego rozwoju do jajowodu lub macicy matki biologicznej lub zastępczej
FBS	(<i>Foetal Bovine Serum</i>) – bydlęca surowica płodowa
FFT	(<i>Fast Fourier Transform</i>) – szybka transformata Fouriera
IVC	(<i>In Vitro Cultivation</i>) – hodowla komórek zapłodnionych in vitro
IVF	(<i>In Vitro Fertilization</i>) – sztuczne zapłodnienie
IVM	(<i>In Vitro Maturation</i>) – pozaustrojowe dojrzewanie komórki
IVP	(<i>In Vitro Production</i>) – produkcja komórek zapłodnionych in vitro
LED	(<i>Light Emitting Diode</i>) – dioda elektroluminescencyjna
LOC	(<i>Laboratory-On-a-Chip</i>) – μ TAS o wysokim stopniu złożoności, zminiaturyzowane laboratorium
NIR	(<i>Near-InfraRed</i>) – zakres promieniowania bliskiej podczerwieni
OLED	(<i>Organic Light Emitting Diode</i>) – organiczna dioda elektroluminescencyjna
OPD	(<i>Organic PhotoDetector</i>) – organiczny fotodetektor
OPU	(<i>Ovum-Pick-Up</i>) – metoda aspiracji oocytów z pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą USG z zastosowaniem dopochwowej sondy sprzężonej z igłą punkcyjną
PBS	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>) – bufor fosforanowy

PCB	<i>(Printed Circuit Board)</i> – elektroniczny obwód drukowany
PDMS	<i>(PolyDiMethylSiloxane)</i> – polidimetylosiloksan, tworzywo sztuczne
PIN	<i>(PItrinsicN)</i> – dioda półprzewodnikowa
PMMA	<i>(Poly(Methyl Methacrylate))</i> – polimetakrylan metylu, tworzywo sztuczne
PMT	<i>(Photo Multiplier Tube)</i> – fotopowielacz
POC	<i>(Point-Of-Care)</i> – przenośne, medyczne urządzenie diagnostyczne
PVP	<i>(PolyVinylPyrrolidone)</i> – poliwinylpirolidon, polimer
SEM	<i>(Scanning Electron Microscope)</i> – elektronowy mikroskop skaningowy
SMA	<i>(SubMiniature version A)</i> – typ złącza optycznego lub elektronicznego
SU-8	fotorezyst negatywowy
UV	<i>(UltraViolet)</i> – światło nadfioletowe
VIS	<i>(VISible)</i> – widzialny zakres promieniowania
μTAS	<i>(micro-Total-Analysis-System)</i> – zminiaturyzowane urządzenie do przeprowadzania procesów chemicznych/biologicznych i/lub analiz chemicznych/biologicznych

Spis oznaczeń

A	absorbancja
$I_M(\lambda)$	natężenie światła po przejściu przez celę pomiarową wypełnioną medium
$I_O(\lambda)$	natężenie światła po przejściu przez celę pomiarową wypełnioną medium z badaną komórką
P_C	wyjściowa moc optyczna dla celi wypełnionej wodą
P_S	moc emitowana przez źródło światła
t	czas lub temperatura w °C
U	napięcie bondingu anodowego
λ	długość fali światła
ϕ	średnica
$\Delta A550_D$	średnia absorbancja dla długości fali 550 nm, dla oocytów z dużych pęcherzyków jajnikowych
$\Delta A550_S$	średnia absorbancja dla długości fali 550 nm, dla oocytów ze średnich pęcherzyków jajnikowych
$\Delta A550_M$	średnia absorbancja dla długości fali 550 nm, dla oocytów z małych pęcherzyków jajnikowych
$APP_{\dot{S}R}$	średni współczynnik APP
$AR_{\dot{S}R}$	średni współczynnik AR

1 Wstęp

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad instrumentem typu „lab-on-a-chip” (LOC) służącym do cytometrii przepływowej żywych komórek, a szczególnie oocytów oraz zarodków zwierząt hodowlanych, w celu umożliwienia określenia ich jakości metodami optycznymi. Praca ta wpisuje się w zakres badań nad nową generacją urządzeń analitycznych, umożliwiających określenie właściwości badanej komórki w parametryczny i jednoznaczny sposób. Założono, że zastosowanie technik mikroinżynierskich umożliwi wytworzenie odpowiednich chipów, a wykorzystanie metody detekcji spektrofotometrycznej pozwoli na ocenę jakościową badanego oocyta/zarodka. W niniejszej dysertacji podjęto badania nad opracowaniem lab-chipa przeznaczonego do jakościowej oceny żeńskich komórek rozrodczych zwierząt i zarodków zwierzęcych oraz nad opracowaniem metody analizy optycznego sygnału pomiarowego, umożliwiającej parametryczną analizę badanej komórki. W chwili rozpoczynania pracy nie znano metod badawczych oraz urządzeń, które pozwalałyby na taką ocenę w skali mikro.

Praca ta została podzielona na dwie zasadnicze części. W pierwszej z nich (Rozdział 2, Rozdział 3) zdefiniowano i omówiono zagadnienia badawcze oraz cel pracy. Nakreślono problem naukowo – gospodarczy jakim jest ocena jakości oocytów i zarodków zwierzęcych. Przedstawiono dotychczas stosowane w środowisku weterynaryjnym metody oceny oocytów i zarodków oraz wady tak prowadzonej kwalifikacji. Szczegółowo scharakteryzowano cechy idealnego urządzenia oraz metody badawczej umożliwiającej przeprowadzenie analizy jakościowej oocytów oraz zarodków zwierząt hodowlanych. Następnie scharakteryzowano wybrane, nieliczne przykłady mikrocytometrów, w których podjęto próbę oceny jakości żeńskich komórek rozrodczych ssaków, z krytyczną analizą zaproponowanych rozwiązań.

Druga część rozprawy (Rozdział 4, Rozdział 5, Rozdział 6) zawiera opis koncepcji i wykonania lab-chipów oraz metod analizy sygnału optycznego. W pierwszej kolejności omówiono projekt i wykonanie lab-chipa do badań oocytów bydłych i trzody chlewnej. Zaproponowano dwa modele analizy danych: metodę „pików” oraz metodę „pola jakości”. Pozwoliły one na parametryczną ocenę badanych komórek oraz na wyznaczenie nowych klas jakościowych oocytów trzody chlewnej. Następnie omówiono koncepcje i wykonanie lab-chipa służącego do badań zarodków bydłych oraz trzody chlewnej. Umożliwiło to charakteryzację zarodków w warunkach hodowlanych (obora, chlewnia) w trakcie prowadzenia transferu zarodków. Wydaje się, że efekty niniejszej pracy, mogłyby istotnie

przyczynić się do opracowania nowej metody kwalifikacji jakościowej materiału rozrodczego w hodowli zwierząt. Nowa technika z zastosowaniem lab-chipa i metody optycznej pozwoliła na uzyskanie dobrej zgodności pomiędzy jakością zarodków, a wynikami hodowlanymi. Niemniej jednak stosunkowo mała liczba doświadczeń przeprowadzonych w warunkach rzeczywistych wprowadza pewną nieoznaczoność we wnioskowaniu.

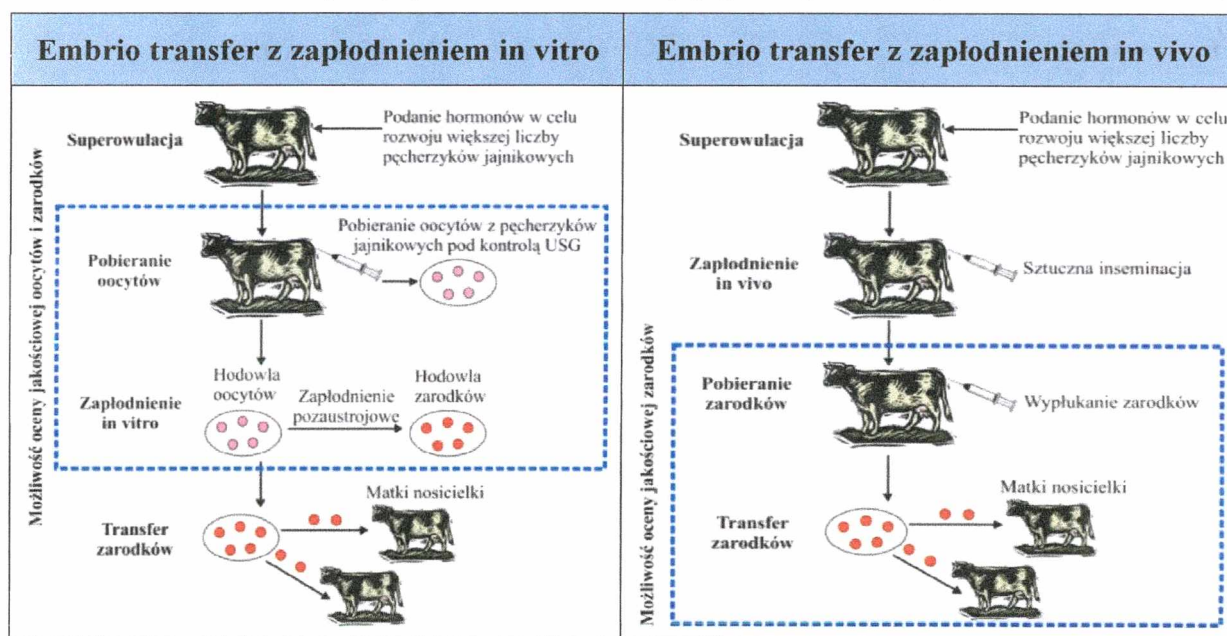
Ze względu na interdyscyplinarność badań, doświadczenia z użyciem materiału biologicznego prowadzone były pod ścisłym nadzorem środowiska weterynaryjnego z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierownictwem prof. dr hab. Jędrzeja Jaśkowskiego, oraz Instytutu Biologii Zwierząt Gospodarczych przy Wydziale Biologii w Dummertorfie w Niemczech, pod kierownictwem prof. dr Klausa Brüssowa.

Potrzebę opracowania instrumentarium i wstępu do metodologii oceny jakościowej oocytów i zarodków zgłosiło środowisko weterynaryjne z Wrocławia i Poznania na przełomie 2006/2007 roku. Realizacja zagadnienia stała się możliwa dzięki finansowaniu ze środków podprojektu 2b APOZAR, w ramach projektu pt.: „Mikro- i Nano-Systemy w Chemii i Diagnostyce Biomedycznej MNS-DIAG” (POIG.01.03.01-00-014/08-00) oraz grantu promotorskiego pt.: „Mikrocytometr typu lab-chip do mikrospektrometrycznej oceny jakości oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych”.

2 Klasyczne metody selekcji jakościowej oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych

Rozwój hodowli zwierząt gospodarczych koncentruje się obecnie na genetycznej poprawie cech użytkowych potomstwa, natomiast liczba hodowanych zwierząt jest istotna, ale nie najważniejsza. Główną przyczyną takiej tendencji jest stale rosnąca konkurencja (zwłaszcza w obrębie wewnętrznego rynku Unii Europejskiej), jak również naturalne dążenie hodowców do poprawy wybranych cech jakościowych stad, szczególnie bydła i trzody chlewnej. W tym celu prowadzi się hodowlę metodami klasycznymi przez dobór reproduktorów o pożądanym cechach. Wykorzystuje się także potencjał genetyczny matki, stosując różne technologie towarzyszące rozrodowi takie jak: superowulację¹, wyflukiwanie i transfer zarodków (ET), produkcję zarodków in vitro (IVP) z pozyskanych poubojowo lub przyżyciowo oocytów (OPU), które przechodzą proces dojrzewania (IVM) i poddawane są inseminacji (IVF), a następnie hodowli (IVC) - (Tab. 2.1).

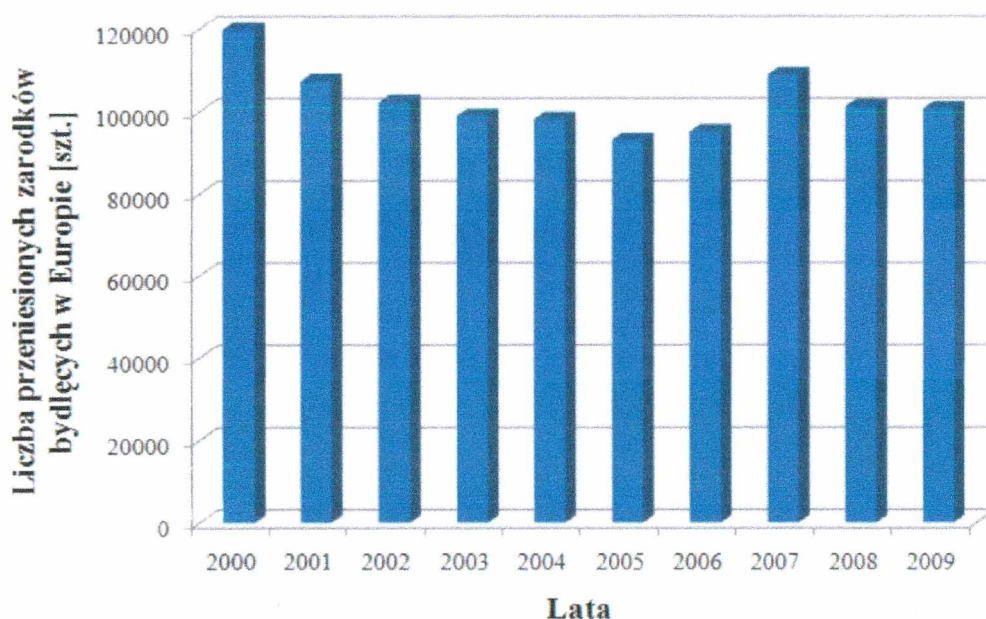
Tabela 2.1 – Wykorzystywane w hodowli zwierząt gospodarczych technologie rozrodo.



¹ Superowulacja (*superovulation*) – jednoczesne uwolnienie z jajnika większej liczby komórek jajowych niż normalnie. Może być wywołane działaniem hormonów, np. u bydła, celem przeniesienia zarodka do matki zastępczej. [81]

W latach 2000 – 2009 liczba przenoszonych zarodków w Europie jest względnie stała i wynosi około 100 tysięcy sztuk rocznie (Rys. 2.1)². Zastosowanie tej techniki w przypadku bydła niesie ze sobą następujące korzyści:

- zwiększenie liczby potomstwa uzyskiwanego od genetycznie cennych matek – dawczyń zarodków,
- ułatwienie międzynarodowej wymiany izolowanego materiału biologicznego,
- możliwość przyspieszenia o 50-80% tempa doskonalenia genetycznego,
- możliwość ratowania materiału genetycznego,
- uzyskanie zdrowego potomstwa od wartościowych matek dotkniętych chorobami zakaźnymi (większość chorób nie jest przenoszona przez zarodki),
- możliwość poznania fizjologii rozrodu.



Rysunek 2.1 – Liczba transferów zarodków bydłych przeprowadzona w Europie w latach 2000-2009.

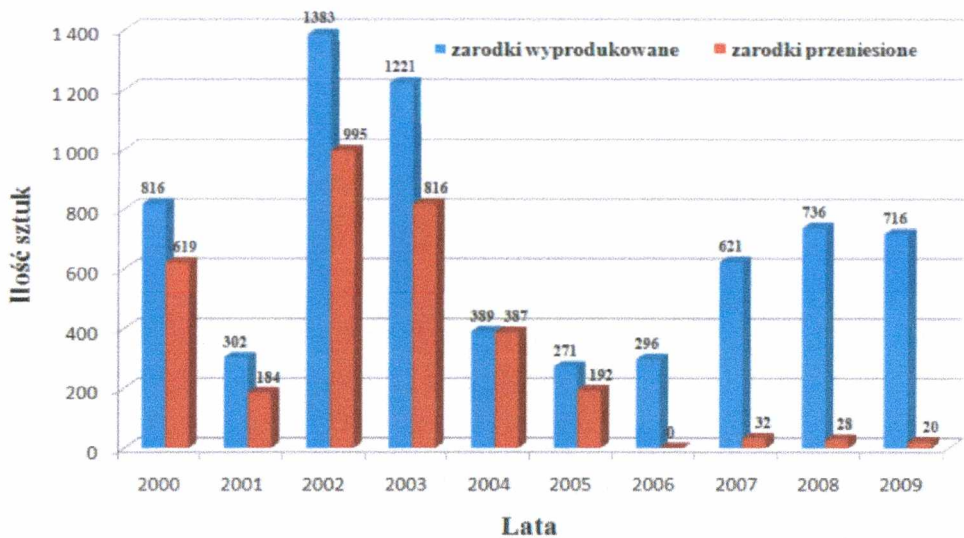
W 2009 roku przeniesiono w Europie 100 678 sztuk zarodków bydła (Tab. 2.2). Najwięcej zabiegów przeprowadzono we Francji, Holandii, Niemczech i Włoszech [1]. Zwraca uwagę fakt, że prawie 90% zarodków było pozyskiwanych metodą in vivo. Tylko 5-8% zarodków produkowano w warunkach laboratoryjnych.

² Na podstawie publikacji naukowych znajdujących się w materiałach konferencji AETE – Association Européenne de Transfert Embryonnaire w latach 2001 - 2010.

Tabela 2.2 – Liczba transferów zarodków bydłych wykonanych w Europie w 2009 roku (dane zebrane z 23 krajów).

Zarodki zapłodnione in vivo [szt.]	Liczba przeniesionych zarodków 90 270 (39 142 świeże/ 51 074 mrożone)
Zarodki zapłodnione in vitro [szt.]	5 808 (2 389 świeże/ 3 419 mrożone)
Liczba przeniesionych zarodków [szt.]	100 678
Procent przeniesionych zarodków IVF	5,8%
Procent przeniesionych zarodków mrożonych	56,7%

Mniejszą rolę odgrywa transfer zarodków u innych zwierząt hodowlanych np. koni, małych przeżuwaczy i trzody chlewnej (Rys. 2.2)³. W przypadku tych ostatnich, transfer zarodków wykonywany jest głównie w celu zapobiegania chorobom zakaźnym (43% zabiegów w USA przeprowadzono w celu stworzenia stad wolnych od pseudowścieklizny), oraz ratowania ras zagrożonych wyginięciem. Generalnie jednak, liczba przenoszonych zarodków trzody chlewnej utrzymuje się na bardzo niskim poziomie, co jest związane z większą inwazyjnością pozyskiwania i przenoszenia zarodków z jednej strony, z drugiej natomiast z wąskim stosunkiem liczby bioreczyń do dawczyń.

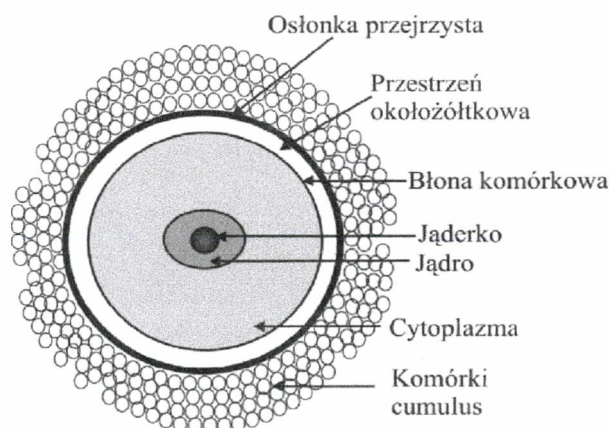


Rysunek 2.2 – Liczba wyprodukowanych i przeniesionych zarodków świń w Europie na przestrzeni lat 2000-2009.

³ Na podstawie publikacji naukowych znajdujących się w materiałach konferencji AETE – Association Europeenne de Transfert Embryonnaire w latach 2001 - 2010.

Jednym z etapów transferu zarodków (zarówno pozyskiwanych *in vivo* jak i produkowanych *in vitro*) jest ich bezkrwawe pozyskanie z macicy matki (dawczyni) i przeniesienie do macicy matki zastępczej (biorczyni). Przed zabiegiem transferu przenoszone zarodki poddawane są ocenie jakościowej. Drugim sposobem pozyskania zarodków jest ich produkcja w warunkach laboratoryjnych. W tym celu wykorzystywane są oocyty pozyskiwane pośmiertnie lub przyżyciowo (OPU) z jajników. Oocyty te, po wstępnej selekcji morfologicznej, poddawane są dojrzewaniu, zapłodnieniu i hodowli *in vitro*.

Oocyt (Rys. 2.3) jest jedną z najdłuższych żyjących komórek w organizmie ssaka. Oocyt pierwszorzędowy składa się z jądra, komórek ziarnistych pomiędzy, którymi gromadzi się płyn oraz osłonki przejrzystej. Otoczony jest on wianuszkiem komórek wzgórka jajonośnego (komórki cumulusa) [2]. Dojrzałość oocytów przed zapłodnieniem należy do ważnych czynników wpływających na implantację zarodków, zdolność do prawidłowego rozwoju płodu, oraz kondycję zdrowotną potomstwa [3]. Uzyskanie tych zdolności wymaga osiągnięcia przez oocyt dojrzałości jądrowej, a także dojrzałości cytoplazmatycznej oraz genomowej [4]. Podczas procesu oogenezy⁴ powstaje prawidłowej jakości oocyt. Jednak uzyskanie przez niego tzw. kompetencji rozwojowej jest osiągane przez niewielką ich grupę. Jedynie 5-10% komórek jajowych zapładnianych *in vitro* jest w stanie przekształcić się w zarodki o wysokim potencjale rozwojowym [5].



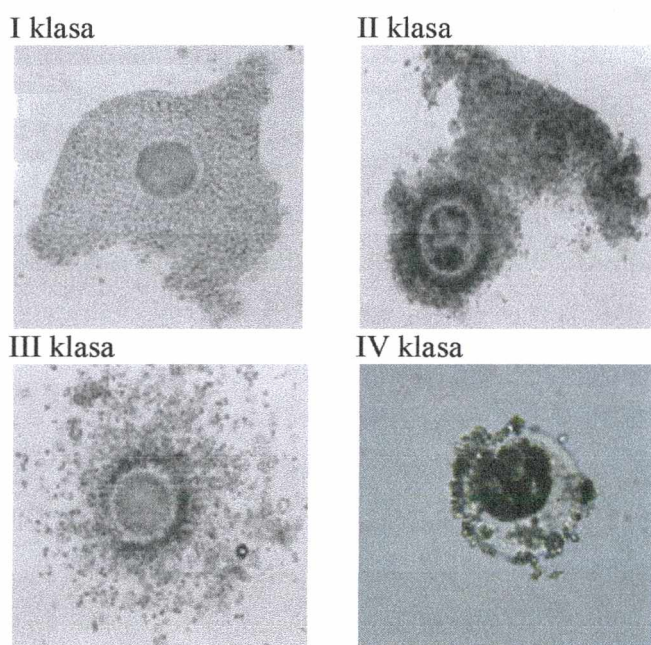
Rysunek 2.3 – Schemat budowy oocytu.

Jak wspomniano wcześniej, jakość oocytów oceniana jest pod mikroskopem stereoskopowym. W oparciu o ilość komórek wzgórka jajonośnego oraz jednorodność i przejrzystość cytoplazmy, wyróżnia się cztery klasy oocytów bydłowych (Rys. 2.4) [6].

⁴ Oogeneza (*oogenesis*) – proces formowania komórek jajowych, obejmujący zachowanie się oocytów w czasie mejozy, witellogenezę i tworzenie błon jaja [81].

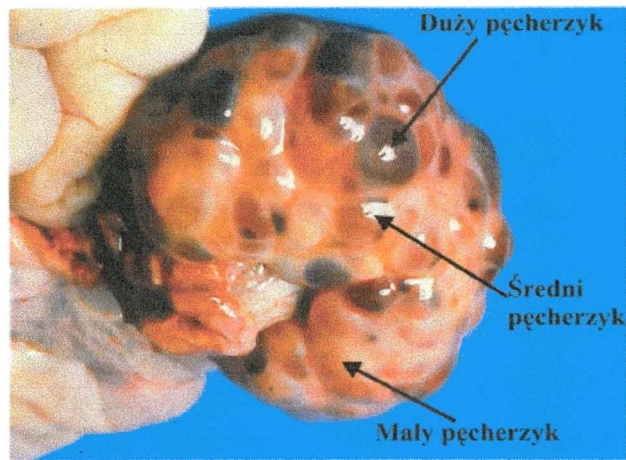
Klasy te uwzględniają również cechy morfologiczne na poziomie ultrastrukturalnym oraz zdolność oocytów do dojrzewania w procesie in vitro. Poszczególne klasy charakteryzują się następującymi cechami:

- I klasa – posiada jednorodną cytoplazmę oraz dużą ilość warstw komórek wzgórka jajonośnego,
- II klasa – posiada lekko niejednorodną cytoplazmę, nie więcej niż pięć warstw ciemniejszych komórek wzgórka jajonośnego,
- III klasa – posiada niejednorodną cytoplazmę, nie więcej niż dwie warstwy komórek wzgórka jajonośnego,
- IV klasa – ma silnie niejednorodną cytoplazmę, częściowo lub całkowicie nieobecne komórki wzgórka jajonośnego.



Rysunek 2.4 – Przykładowe zdjęcia oocytów bydłych reprezentujących poszczególne klasy jakościowe. Źródło: [7].

Często stosowaną metodą selekcji jakościowej oocytów trzody chlewnej jest ich podział ze względu na wielkość pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodzą [8, 9]. Wyróżnione są trzy wielkości pęcherzyków jajnikowych: małe (< 3 mm), średnie (3-5 mm) i duże (> 5 mm) – Rys. 2.5. Duże pęcherzyki jajnikowe są najbardziej dojrzałe i powinny one zawierać oocyty, które posiadają homogeną cytoplazmę oraz zwarty wieniec otaczających je komórek cumulusa. Tym samym oocyty pochodzące z małego pęcherzyka jajnikowego uznawane są za najsłabsze jakościowo.



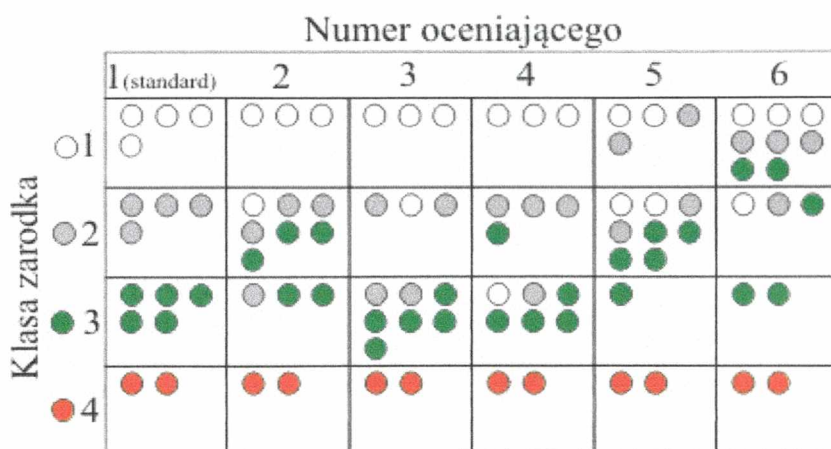
Rysunek 2.5 – Jajnik trzody chlewnej.

Selekcja jakościowa zarodków polega również na ocenie ich właściwości morfologicznych i prowadzona jest pod mikroskopem. W ocenie tej uwzględnione są takie cechy zarodków jak: ciągłość i ewentualne uszkodzenia osłonki przejrzystej, jej kształt i rozmiar, ziarnistość i kolor blastomerów. Ogólnie przyjmuje się, że zarodki powinny charakteryzować się: kulistym lub eliptycznym kształtem, brązowo-żółtym kolorem, oraz jednakowej wielkości blastomerami. Obserwuje się jednak bardzo często odchylenia od założonych norm, które obejmują: nieregularny kształt blastomerów, niejednakowy rozmiar komórki, obecność dużych wakuoli w komórkach, obszary o zatartej strukturze (zdegenerowane), uszkodzenia ciągłości osłonki przejrzystej. Prawie 20-30% zarodków zakwalifikowanych jako dobre, mają widoczne nieprawidłowości morfologiczne, takie jak np. kilka odłączonych blastomerów. W literaturze przedmiotu istnieje szereg podziałów na klasy jakościowe opierające się na ocenie morfologicznej. Różnią się one ilością uwzględnianych klas. Podział na cztery klasy jakościowe (doskonałe, dobre, zadowalające oraz słabo zdegenerowane) przedstawili: Eldsen [10], Schneider [11], Lindner [12], Donaldson [13] oraz Abe [14]. Trzy klasy uwzględnia podział zaproponowany przez: Peixoto (doskonałe, dobre, poprawne) [15] oraz Aguilar (dobre, zadowalające, słabe) [16]. Poniżej zestawiono porównanie klasyfikacji jakościowej zarodków wg Schneidera oraz Eldsena (Tab. 2.3).

Tabela 2.3 – Porównanie wybranych klasyfikacji jakościowych zarodków.

Klasa zarodka	Kwalifikacja wg Schneidera	Kwalifikacja wg Eldsena
Klasa I doskonale	okrągły zarodek z komórkami o takim samym rozmiarze, kolorze i zagęszczeniu blastomerów	doskonale rozwijający się zarodek
Klasa II dobre	nieznaczne nieprawidłowości, na przykład: izolacja jednego blastomeru, nieregularny rozmiar struktury komórkowej w blastomerach	niewielkie niedoskonałości w owalu osłonki przejrzystej, odłączenie kilku małych blastomerów lub lekko asymetryczny kształt
Klasa III zadowalające	więcej nieprawidłowości, niektóre komórki lub blastomery w wolnej przestrzeni, zdegenerowane struktury komórek, granulki w cytoplazmie	zdecydowane, ale nie poważne nieprawidłowości, takie jak umiarkowana ilość odłączonych komórek, niewielki rozmiar, małe ilości degeneratów, do jednego dnia opóźnione w rozwoju
Klasa IV słabe	utrata części blastomerów, zdegenerowane komórki, przerwana błona komórkowa, różny rozmiar komórek, zmiana koloru, część komórek utrzymuje prawidłowy wygląd	znaczna degeneracja, znaczne różnice w wielkości komórek, brak kompaktacji, komórki bardzo małe i / lub opóźnione o dwa dni w rozwoju
Klasa V zdegenerowane	masa komórkowa całkowicie zdegenerowana	silnie zdegenerowany, nie nadaje się do implantacji
Klasa VI niezdolne do zapłodnienia		niezapłodnione lub dwu-/trzykomórkowe

Takie zróżnicowanie w sposobie opisu jakości zarodków bydlęcych prowadzi do niejednoznacznej oceny badanego materiału. Osoby rutynowo zajmujące się oceną jakości zarodków bydlęcych kwalifikują badany materiał biologiczny subiektywnie. Farin i wsp. porównali wyniki oceny morfologicznej 15 zarodków wyprodukowanych in vitro, która została przeprowadzona niezależnie przez sześć zespołów ET [17]. Pierwszy oceniający wyznaczał standard, do którego porównywano rezultaty oceny pozostałych oceniających (Rys. 2.6). Z przeprowadzonych badań wynika, że istniała wprawdzie pewna zbieżność ocen, szczególnie w odniesieniu do zarodków bardzo dobrej i niedostatecznej jakości, nie zmieniało to jednak faktu, że każdy z oceniających kwalifikował zarodki 2 i 3 klasy inaczej. Świadczy to o niejednoznaczności morfologicznej oceny zarodków bydlęcych.



Rysunek 2.6 – Klasyfikacja 15 zarodków pozyskanych metodą in vivo wg 4 klas jakościowych wykonana przez grupę sześciu oceniających. Źródło: [17].

Duży wpływ na uzyskaną ocenę jakościową ma również klasa mikroskopu pod jakim prowadzona jest ocena. Wykonano badania polegające na określeniu jakości zarodka z wykorzystaniem trzech różnych mikroskopów: stereoskopowego, optycznego (pomiar nieinwazyjny) i elektronowego (pomiar inwazyjny) [16]. Ocena zarodków pod mikroskopem stereoskopowym okazała się bardzo subiektywna i zależna w głównej mierze od doświadczenia oceniającego. Prawie 50% zarodków, których jakość określono jako dobrą w rzeczywistości znajdowały się w różnych stadiach degeneracji (Tab. 2.4).

Tabela 2.4 – Klasyfikacja jakościowa zarodków bydłych przeprowadzona z wykorzystaniem trzech mikroskopów. Źródło: [13].

	Dobre (%)	Zadowolające (%)	Słabe (%)	Całkowita ilość przebadanych zarodków
Mikroskop stereoskopowy	40 (51,2)	19 (24,3)	19 (24,3)	78
Mikroskop optyczny	20 (25,6)	25 (32,0)	33 (42,3)	78
Mikroskop elektronowy	19 (24,3)	23 (29,4)	36 (46,1)	78

Zaproponowane i stosowane obecnie na szeroką skalę metody podziału jakościowego oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych oparte na ocenie morfologicznej spełniają tylko częściowo swoje zadanie. Każdy z badających stosuje inne sformułowania i podkreśla ważne wg niego niedoskonałości istotne dla danej klasy. Prowadzi to do niejednoznacznej charakteryzacji poszczególnych klas jakościowych i powoduje pomyłki podczas klasyfikacji. Kolejną przyczyną niskiego stosunku pomiędzy ilością przeprowadzonych transferów

zarodków, a ilością narodzonych zwierząt jest fakt wykorzystywania przez osoby klasyfikujące zróżnicowanych jakościowo mikroskopów. Sprzęt ten wyposażony jest w różnej jakości elementy optyczne, co przekłada się na możliwość niejednoznacznej oceny badanego materiału. Główną jednak przyczyną niskiej skuteczności ET jest subiektywna ocena specjalisty badającego zarodki, która zależy od jego doświadczenia oraz zmiennych predyspozycji psychofizycznych. Wszystkie te czynniki powodują, że kryteria oceny morfologii oocytów/zarodków opierające się na dostępnych metodach badawczych wydają się być niewystarczające, niejednoznaczne, niepowtarzalne, a co najważniejsze nieparametryczne.

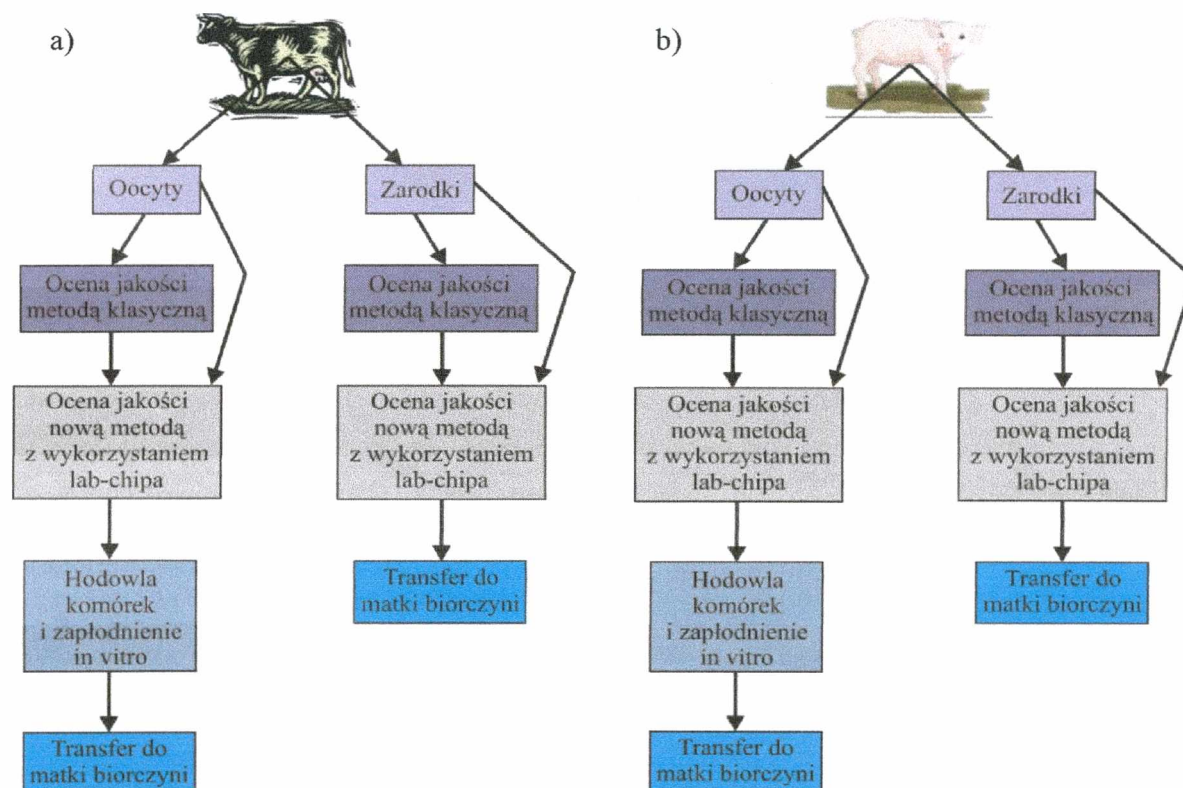
3 Studium metodologicznej oceny jakości żeńskiego materiału rozrodczego wykorzystujące technikę lab-chip z detekcją optyczną

Jak wspomniano wcześniej, 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. Jak wykazano wcześniej, 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 weterynaryjnego⁵ 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. W przypadku komórek rozrodczych bydła i trzody chlewnej, średnica takiej komórki mieści się w zakresie od 90 μm do 130 μm [18, 19]. 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 tej pracy zostanie opracowane od

⁵ Opinie zebrane przez autora pracy wśród weterynarzy oraz biologów z Polski, Niemiec oraz Francji.

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 (Rys. 3.1).



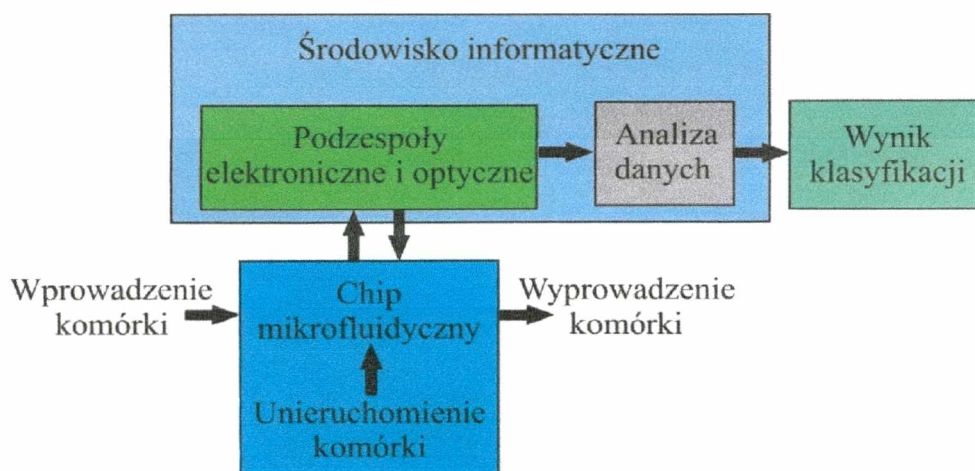
Rysunek 3.1 – Schematy możliwego postępowania w ocenie jakości oocytów oraz zarodków: a) bydła, b) trzody chlewnej z zastosowaniem techniki lab-on-a-chip.

Instrumentarium to powinno zapewnić:

- parametryczną i jednoznaczną ocenę badanego materiału,
- badanie każdego oocytu i zarodka osobno - sztuka po sztuce,
- możliwość używania go poza wyspecjalizowanym laboratorium (np. chlewnia, obora),
- niski koszt pojedynczego badania.

Podstawowym elementem konfiguracji zaproponowanego rozwiązania będzie chip mikrofluidyczny umożliwiający wprowadzanie, unieruchomienie i wyprowadzanie badanego oocytu/zarodka oraz zestaw podzespołów elektronicznych i optycznych umożliwiających przeprowadzenie metrologicznej kwalifikacji jakościowej. Zarządzanie pracą instrumentu oraz obróbkę danych pomiarowych zapewni odpowiednio opracowane środowisko informatyczne (Rys. 3.2). Należy podkreślić, że w chwili rozpoczynania badań przez autora

tej pracy, metrologiczna ocena jakości żeńskich komórek rozrodczych oraz zarodków dla celów hodowlanych nie była znana.



Rysunek 3.2 – Schemat blokowy instrumentarium.

Zgodnie z głównymi założeniami tej pracy, 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.

Główną tezą pracy jest stwierdzenie, że możliwe jest opracowanie instrumentu wykorzystującego technikę lab-on-a-chip do badania oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych (bydłęcych oraz trzody chlewnej), w celu umożliwienia określenia ich jakości metodą optyczną, co mogłoby umożliwić ich selekcję przed wykonaniem sztucznego zapłodnienia jak i w trakcie prowadzenia transferu.

W analizowanym tu rozwiązaniu możliwe jest zastosowanie metod optycznych, spektrofotometrycznych i absorpcyjnych, dla szerokiego zakresu długości fal. Metody spektrofotometryczne wydają się być korzystne ze względu na fakt, że umożliwiają zaobserwowanie różnic pomiędzy badanymi próbkami dla wybranych długości fali na poziomie poszczególnych nanometrów. Pomiary absorpcyjne mogą znaleźć zastosowanie przy określeniu jakości wypełnienia badanej komórki przez cytoplazmę, ponieważ oocyty, których wnętrze jest jednorodnie wypełnione charakteryzują się lepszym potencjałem rozwojowym. Zaproponowane metody pozwalają również na przeprowadzenie szybkiej

kwalifikacji badanego materiału biologicznego, nie uszkadzając przy tym komórki. Istotnym zagadnieniem technicznym będzie tu miniaturyzacja całości układu pomiarowego tak, aby możliwe było jego wykorzystanie w warunkach rzeczywistej hodowli. Głównymi założeniami technicznymi w tym zakresie będzie zastosowanie technik mikroinżynieryjnych, w celu wytworzenia lab-chipa oraz technik światłowodowych, w celu integracji niezbędnych elementów optycznych.

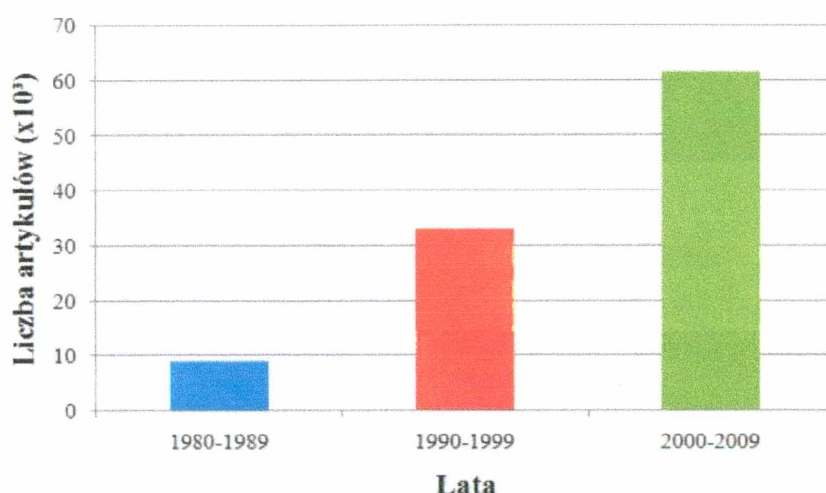
Realizacja tezy pracy wymaga podjęcia wielu działań badawczych. Najważniejsze z nich to:

1. opracowanie i wykonanie lab-chipów mikrofluidycznych,
2. zbudowanie systemu detekcji optycznej z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej z zakresu VIS/NIR (dobór źródeł światła, detektorów i osprzętu optycznego),
3. zbadanie właściwości instrumentu z wykorzystaniem materiału biologicznego (pod nadzorem uprawnionych specjalistów weterynaryjnych) w warunkach laboratoryjnych,
4. opracowanie podstawowych relacji metrologicznych z nawiązaniem do parametryzacji wynikającej z istniejącej metodologii hodowlanej,
5. optymalizacja konstrukcji lab-chipu i układu pomiarowego,
6. badania w warunkach hodowlanych (transfer zarodków bydłęcych oraz trzody chlewnej).

Podając się do tematu oceny jakości materiału biologicznego jakim są oocyty i zarodki, autor tej pracy ma świadomość konsekwencji jakie mogą nieść za sobą takie badania. **Prezentowana tutaj praca podejmuje temat oceny jakościowej oocytów oraz zarodków tylko pochodzenia zwierzęcego i nie będą przeprowadzane żadne próby na materiale ludzkim.** Badania prowadzone z wykorzystaniem materiału ludzkiego nie byłyby zgodne z wyznawanymi przekonaniem i sumieniem autora. Ocena materiału rozrodczego zwierzęcego nie pociąga za sobą takich skutków etycznych.

Zgodnie z przedstawionymi wcześniej założeniami tej pracy instrument do kwalifikacji jakości żeńskich komórek rozrodczych i zarodków składać się będzie z trzech głównych podzespołów: chipa mikrofluidycznego, układu pomiarowego oraz układu informatycznego. Podobne rozwiązania są wykorzystywane w cytometrii przepływowej (CP), która jest precyzyjną i nieinwazyjną techniką badawczą, umożliwiającą wieloparametryczną

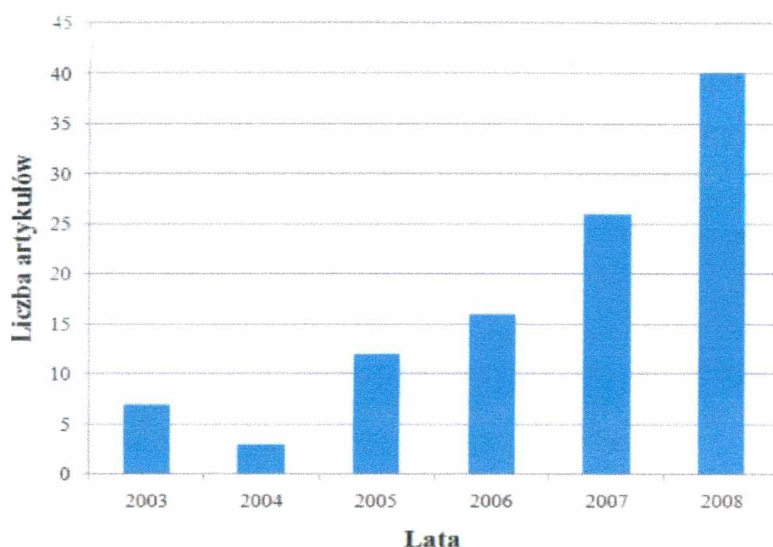
ocenę struktury i funkcji pojedynczych komórek jak i ich grup oraz ich sortowanie [20]. Technika ta jest stosowana powszechnie w naukach biomedycznych i weterynaryjnych. Świadczyć o tym może między innymi ilość publikacji z użyciem słów „flow cytometry” w tytułach oraz abstraktach artykułów zgromadzonych w bazie danych NCBI-Pubmed [21] (Rys. 3.3).



Rysunek 3.3 – Liczba publikacji z użyciem słów „flow cytometry” w tytułach oraz abstraktach artykułów w latach 1980-2009.

Cytometria przepływowa znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce klinicznej człowieka m.in. w: analizach zawartości komórkowego DNA w komórkach nowotworowych, analizie płytek krwi [22], badaniach cytologicznych [23], analizie komórek macierzystych szpiku kostnego, diagnostyce chorób układu krwiotwórczego (białaczka, chłoniaki) [24], diagnostyce immunologicznej, alergologii, diagnostyce zgodności w transplantologii, diagnostyce AIDS [25]. Wykorzystanie tej metody wzrasta również w naukach weterynaryjnych, zwłaszcza w immunologii, onkologii, farmakologii i mikrobiologii. W ocenie jakości materiału rozrodczego – szczególnie w warunkach pozalaboratoryjnych – jest stosowana rzadko. Powodem takiego stanu rzeczy jest mało „przyjazna”, droga i dość duża aparatura, która w dodatku z trudem może być stosowana w warunkach „polowych” (obora, chlewnia). Powyższych wad może być pozbawiona aparatura zminiaturyzowana wykorzystująca technikę mikrosystemów przepływowych. W literaturze przedmiotu notowany jest wzrost

publikacji dotyczących mikrocytometrów (Rys. 3.4)⁶, jednak prace te nie miały charakteru systemowego.



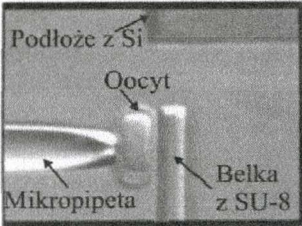
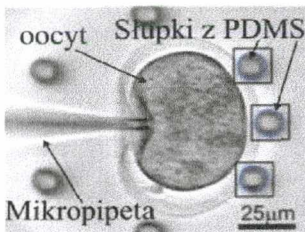
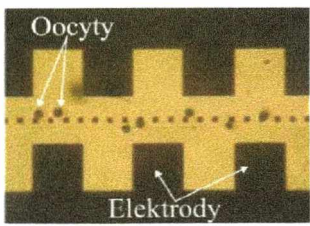
Rysunek 3.4 – Liczba publikacji naukowych z użyciem słowa „microcytometry” w zasobach konferencji μTAS.

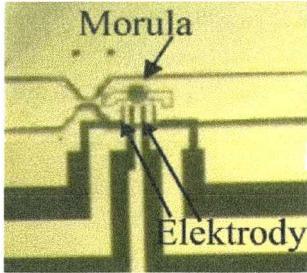
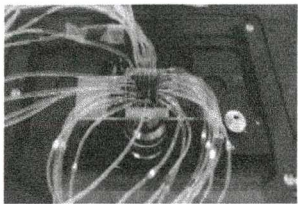
Poszczególne elementy mikrocytometru mogą być w różnym stopniu zminiaturyzowane i zintegrowane, tworząc jedną całość. Mikrokanały cieczowe umożliwiają zastosowanie badanych próbek jak i niezbędnych odczynników chemicznych o bardzo małej objętości. Zaletami takich zminiaturyzowanych rozwiązań jest możliwość taniej masowej produkcji jak również zastosowanie ich jako urządzeń typu poin-of-care (POC) w diagnostyce medycznej. Szczególnie szybko rozwijają się mikrocytometry typu lab-chip, które znalazły zastosowanie m.in. w: analizie układu białokrwinkowego i czerwonych krwinek, badaniach procesu apoptozy, diagnostyce nowotworów [26], ocenie poziomu cytokin, a także badaniu jakości nasienia z możliwością regulacji płci zwierząt hodowlanych [27].

Próby określenia jakości komórek rozrodczych oraz zarodków ssaków (zwierząt i ludzi) prowadzono w lab-chipach z wykorzystaniem różnych metod badawczych (Tab. 3.1) np.: mechanicznych, elektrycznych czy „biochemicznych”.

⁶ Autor wykonał powyższe zestawienie na podstawie publikacji naukowych znajdujących się w materiałach konferencji μTAS - International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences w latach 2003-2009. Jako słowo kluczowe do wyszukania zostało wprowadzone *microcytometry*.

Tabela 3.1 – Mikrocytometry służące do badania oocytów lub zarodków ssaków.

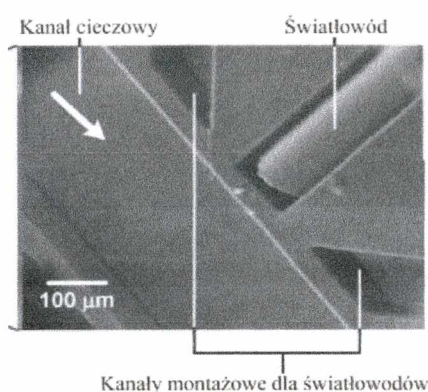
Ilustracje	Opis	Źródło
<i>Metoda mechaniczna</i>		
	Badaniom poddane zostały oocyty ludzkie. Chip wykonany został z dwóch warstw polimeru SU-8 naniesionego na podłoże krzemowe. W celu uwolnienia elastycznej belki z polimeru podłoże krzemowe zostało trawione metodą DRIE. Pomiar polegał na dociskaniu mikropipetą oocytu do belki polimerowej. Deformacji ulegała badana komórka oraz polimerowa belka. Układ detekcji składał się z kamery, która rejestrowała moment ugięcia. Za pomocą technik przetwarzania obrazu oraz znajomości parametrów materiałowych wykreślona została „krzywa deformacji” badanej komórki.	[28]
	Sztywność uszkodzonych i zdrowych oocytów mysich została zbadana podczas przeprowadzania mikronakłucia. Chip został wykonany z polimeru PDMS. Składał się z matrycy wnęk o średnicy 180 µm umożliwiających pomiar pojedynczej komórki. W każdej wnęcie znajdowały się mikrosłupki o małym współczynniku sztywności, które ugięły się pod wpływem naciskania oocytu przez mikropipetę. Jako detektor zastosowana została kamera CCD/CMOS, która rejestrowała pomiar, a dzięki zastosowanemu wizualnemu algorytmowi śledzenia możliwe było wyznaczenie siły nacisku z dokładnością do nanonewtonów. Przyłożenie takiej samej siły do oocytów z dwóch badanych grup powodowało większą deformację uszkodzonych oocytów.	[29]
<i>Metoda elektryczna</i>		
	Jakość oocytów świńskich została określona przy wykorzystaniu metody separacji dielektroforetycznej. Chip wykonano ze szkła, na którym zostały naniesione złote elektrody o wzorze palczastym. Zastosowano napięcia z zakresu 3-10 V. Komórki oocytów o różnej jakości poruszały się w chipie z innymi prędkościami przy zastosowaniu takich samych warunków DEP. Oocyty, które poruszały się szybciej charakteryzowały się lepszym potencjałem rozwojowym.	[30]

	Aktywność zarodków bydłych, znajdujących się w stadium moruli została określona na podstawie zużycia przez nie tlenu. Chip wykonano z PDMSu oraz szkła, na którym osadzono 4 elektrody platynowe. Wykonane elektrody umożliwiły przeprowadzenie pomiarów amperometrycznych jak również posłużyły do transportu badanej komórki w kanale. Przeprowadzone pomiary wykazały, że zarodki różniły się między sobą zużyciem tlenu, który mieścił się w zakresie 1,9 – 3,62 μM.	[31]
Metoda „biochemiczna”		
	Ocena pojedynczego zarodka mysiego została wykonana na podstawie analizy jego profilu metabolicznego. Pomiary były przeprowadzane z wykorzystaniem chipa wykonanego z PDMSu. Analiza profilu metabolicznego jest biochemiczną metodą pośrednią, która polega na analizie płynów metabolicznych pobranych z hodowli zarodka. Badaniu poddawane były takie produkty metabolizmu jak glukoza, pirogronian i mleczan. Czas analizy wynosił 3 godziny.	[32]

Opisane powyżej metody umożliwiają uzyskanie mierzalnych parametrów, które w pewnym stopniu pozwalają na określenie jakości badanej komórki. Jednakże metody te, oprócz pozyskanych informacji, mogą spowodować uszkodzenia badanego materiału. Metoda mechaniczna, za pomocą której badana jest elastyczność komórki, może być wręcz niszcząca ponieważ przyłożenie zbyt dużej siły nacisku na osłonkę przejrzystą może spowodować jej pęknięcie, a tak uszkodzona komórka nie może być wykorzystana do dalszej hodowli. Badania z wykorzystaniem metody elektrycznej bazują na wykonaniu pomiarów dielektroforetycznych oraz amperometrycznych. W czasie wykonywania tych pomiarów badane komórki poddawane są działaniu napięcia elektrycznego oraz generowane jest ciepło wewnątrz kanału cieczowego. Występowanie tych dwóch czynników jednocześnie może powodować uszkodzenia badanej komórki. Najczęściej metoda ta wykorzystywana jest między innymi do badania komórek białaczkowych [33], krwinek czerwonych [34] jak również komórek drożdży [35], gdzie przeżywalność badanego materiału nie ma tak istotnego znaczenia. Natomiast metoda „biochemiczna” jest metodą pośrednią bazującą na analizie płynów, w których zanurzony jest zarodek i wymaga ona skomplikowanego osprzętu analitycznego. Czas jej trwania jest bardzo długi, co również uniemożliwia zastosowanie jej w szybkiej ocenie badanego materiału (np. transfer zarodków). Wydaje się, że jedynie zaproponowana przez autora metoda optyczna, umożliwiająca pomiar charakterystyk

spektralnych materiału biologicznego, może być pozbawiona skutków ubocznych. Możliwa miniaturyzacja oraz integracja elementów optycznych „on-chip” umożliwi mobilność tak wytworzonego instrumentu, a bardzo czułe metody detekcji spektrofotometrycznej zapewnią precyzyjne i jednoznaczne pomiary.

Zespolenie „on-chip” elementów optycznych jest kluczem do rozwoju kompaktowych i przenośnych mikrocytometrów przepływowych, o których tu mowa. Integracja źródeł światła, detektorów i biernych elementów optyki na chipie w znacznym stopniu przyczynia się do miniaturyzacji systemu. Ponadto integracja falowodów, światłowodów, mikrosoczewek prowadzi do poprawy czułości urządzenia oraz stosunku sygnału do szumu. W literaturze przedmiotu można znaleźć wiele przykładów wykorzystania komercyjnie dostępnych włókien światłowodowych w mikrocytometrach zintegrowanych [36 - 38]. Jednym z przykładów może być chip wykonany z PDMSu, połączony z wielomodowymi światłowodami włóknistymi służącymi do wprowadzenia światła wzbudzającego fluorescencję (Rys. 3.5) [39].

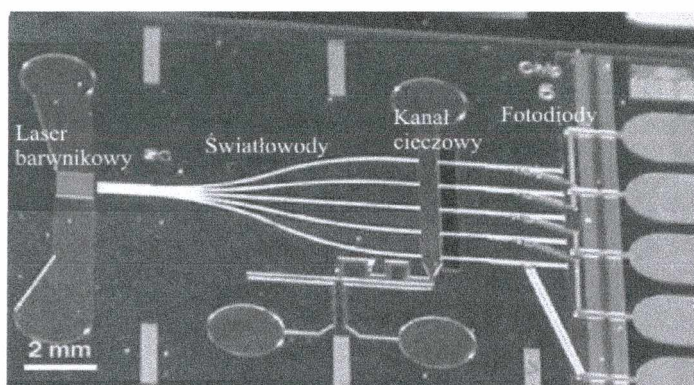


Rysunek 3.5 – Mikrocytometr ze zintegrowanymi szklanymi światłowodami włóknistymi. Źródło: [39].

Jako alternatywę stosuje się światłowody wytwarzane bezpośrednio w mikrourządzeniach z wykorzystaniem optycznie przeźroczystych materiałów lub klei optycznych. Zastosowanie znalazły tu takie materiały jak: PDMS [40, 41], SU-8 [42, 43] czy SiO₂ [44]. Należy jednak pamiętać, że proces wytwarzania światłowodów powinien być precyzyjnie kontrolowany, aby zminimalizować tłumienie sygnału optycznego i utrzymać go na akceptowanym poziomie.

Zwiększenie wydajności optycznej źródeł światła oraz wzmocnienie i selekcja sygnału fluorescencyjnego jest możliwa dzięki zastosowaniu soczewek oraz filtrów optycznych. W celu zmniejszenia złożoności, rozmiaru oraz kosztów mikrocytometru, elementy te można wykonać bezpośrednio na chipie. Mikrosoczewki i filtry można wykonać między innymi z materiałów takich jak SU-8 [45] czy PDMS [46, 47].

Jako źródła światła w mikrocytometrach przepływowych wykorzystywane są między innymi lasery lub diody. W danych literaturowych można znaleźć integrację „on-chip” źródeł światła z wykorzystaniem diod LED i diod barwnikowych. Novak i współpracownicy [48] zaprezentowali miniaturyzację diody LED, filtrów optycznych, lusterek dichroicznych i wzmacniacza, co umożliwiło detekcję sygnału fluorescencyjnego w przepływającej cieczy. Balslev i inni [49] opisują system lab-on-a-chip składający się z różnych komponentów monolitycznie zintegrowanych na jednym podłożu krzemowym. Urządzenie to zawiera optycznie pompowany laser barwnikowy, zintegrowane światłowody z SU-8 oraz fotodiody (Rys. 3.6).

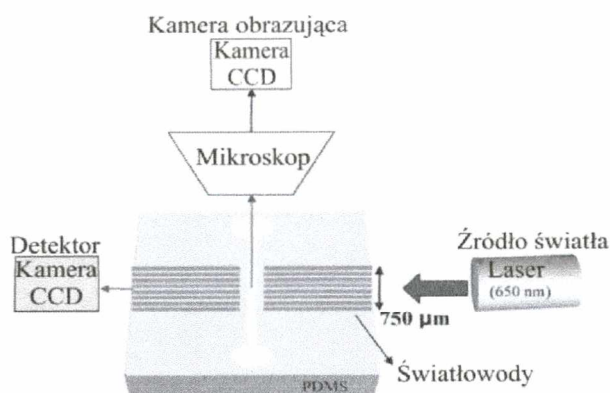


Rysunek 3.6 – Mikrocytometr wykorzystujący zintegrowany laser barwnikowy oraz światłowody wykonane z polimeru SU-8. Źródło: [49].

Intensywny rozwój przeżywają obecnie organiczne źródła światła. Pais ze współpracownikami [50] zaprezentowali chip wykonany z PDMSu ze zintegrowaną zieloną, organiczną diodą LED (OLED) oraz organicznymi fotodiodami (OPD) służącymi jako detektory fluorescencji. Nowością są miniaturowe źródła światła z emisją połową z nanorurek węglowych, które umożliwiają oświetlenie komórek wybranym bardzo wąskim zakresem długości fali, bez konieczności stosowania filtrów optycznych [51].

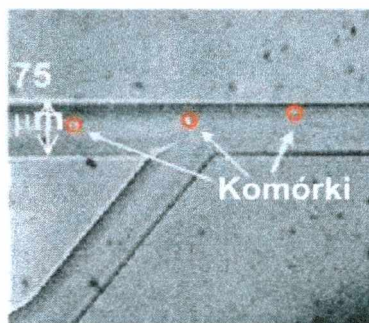
W zależności od źródła światła i intensywności świecenia wykorzystywane są w mikrocytometrach różnego rodzaju detektory: fotopowielacze (PMT), fotodiody lawinowe (APD), kamery CCD, tablice przetwarzające obraz CMOS oraz fotodiody PIN. Tradycyjne PMT i APD są używane w komercyjnych cytometrach. Fotopowielacze w stosunku do fotodiod lawinowych są jednak dużymi urządzeniami i to uniemożliwia ich integrację na chipie. Wadą fotodiody APD jest jej wrażliwość na zmiany temperatury, co wymaga stosowania układów kompensujących. Jednak największym mankamentem obu typów detektorów jest ich koszt [52]. Jednym z detektorów może być fotodioda PIN umożliwiająca pomiary rozpraszania światła [53] oraz fluorescencji [39]. Alternatywnym urządzeniem do

pomiaru sygnału fluorescencji jest kamera CCD, której zastosowanie umożliwiło między innymi pomiar 5 μm kulek fluorescencyjnych w mikrocytometrze wykonanym z PDMSu [54] (Rys. 3.7). Hartley i współpracownicy [55] zaprezentowali możliwości jakie daje sprzęgnięcie macierzy CMOS bezpośrednio z kanałami cieczowymi z zastosowaniem metody flip-chip. Kamery CCD oraz macierze CMOS zostały zastosowane w wielu mikrocytometrach umożliwiając integrację układu detekcyjnego na chipie.



Rysunek 3.7 – Schemat pracy zintegrowanego mikrocytometra wykorzystującego kamerę CCD jako detektor. Źródło: [54].

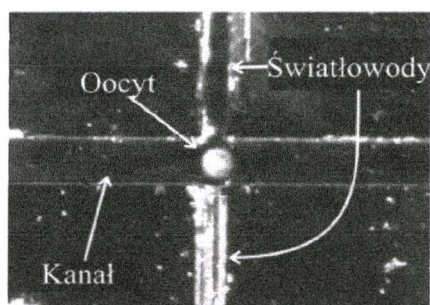
Postępy jakie dokonały się w dziedzinie mikrooptyki i systemów detekcji w mikroskali pozwoliły na skonstruowanie komercyjnych systemów analizujących komórki z wykorzystaniem mikrocytometrii. Jednym z takich urządzeń jest przystosowany cytometr 2100 Bioanalyzer firmy Agilent, który umożliwia analizę komórek oraz ich separację elektroforetyczną, analizę DNA, RNA i białek [56]. Wykorzystuje on szklany chip, w którym kanały cieczowe mają przekrój 27 x 75 μm (Rys. 3.8). Zastosowane zostały tam dwa źródła światła: niebieska dioda LED o długości fali emisji 458-482 nm oraz czerwona dioda laserowa o długości fali emisji 625-645 nm. Został on wykorzystany między innymi do pomiaru apoptozy w komórkach Jurkat.



Rysunek 3.8 – Strumień pojedynczych komórek przepływających w mikrokanale. Źródło: [56].

Inny komercyjny mikrocytometr został opracowany przez firmę Leister Process Technologies. Zawiera on w swojej konstrukcji chip szklano-poliimidowy [57], którego kanały cieczowe mają maksymalny przekrój $40 \times 40 \mu\text{m}$. Umieszczony jest on na plastikowej karcie. Charakteryzacja badanych komórek opiera się na pomiarach impedancji [58]. Wykorzystywany jest on do badań w hematologii, parazytologii, zróżnicowania komórkowego, a także w badaniach dyskryminacji komórek w fazie wzrostu.

Zastosowanie zintegrowanych elementów optycznych (światłowody włókniste) znalazło zastosowanie w przeprowadzonych badaniach w instytucie FEMTO-ST [59] (Rys. 3.9). Pomiar parametrów optycznych umożliwiał określenie dojrzałości oocytu ludzkiego (dojrzały/niedojrzały), a także został wykorzystany jako wskaźnik zapłodnienia. Chip wykonano w technologii krzemowo-szklanej z zastosowaniem mokrego anizotropowego trawienia w roztworze KOH oraz trawienia DRIE. Charakteryzacja materiału biologicznego była oparta na analizie widm transmisji oocytów ludzkich w świetle widzialnym.

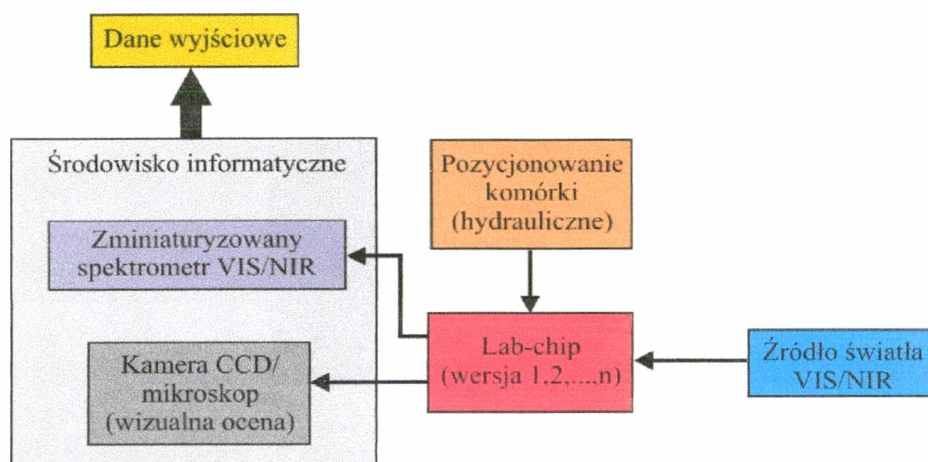


Rysunek 3.9 – Ludzki oocyt w trakcie pomiaru. Źródło: [59].

Jest to jedyny przykład, znany autorowi z literatury przedmiotu, wykorzystujący mikrocytometr oparty na pomiarach parametrów optycznych, zastosowany do charakteryzacji żeńskich komórek rozrodczych ssaków. Jednak do tej pory badania te zostały przeprowadzone na niewielkiej ilości zarodków ludzkich, a przedstawione powyżej rozwiązanie ma charakter typowo laboratoryjny. Nie zostały wykonane badania systematyczne w tym statystyczne, potwierdzające słusność tej metody w warunkach „rzeczywistej” hodowli.

Pomiary oraz ocena jakościowa zarodków przeznaczonych do transferu odbywa się najczęściej w miejscu ich pobrania (obora, chlewnia). Dlatego konieczne jest opracowanie instrumentu weterynaryjnego typu lab-chip w taki sposób, aby możliwy był jego transport i eksploatacja poza laboratorium. Osiągnięcie opisanego celu wymaga opracowania przenośnego stanowiska, które składać się będzie z trzech głównych części: lab-chipa do

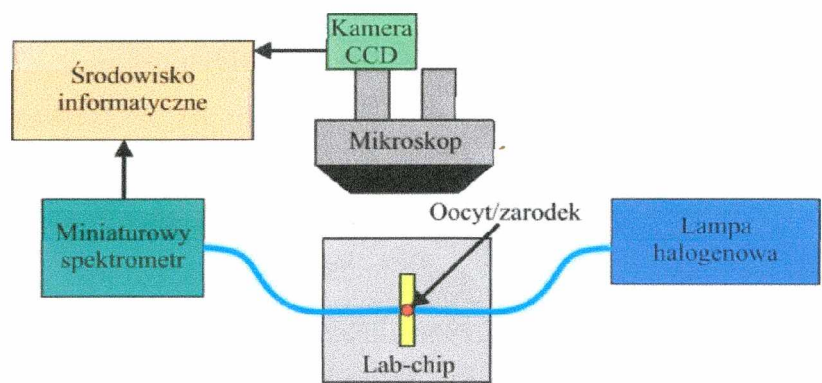
którego wprowadzany zostanie klasyfikowany oocyt/zarodek, źródła światła i detektorów oraz środowiska informatycznego pozwalającego na pomiar i obróbkę sygnałów. W zrealizowanym instrumentarium, po prawidłowym wprowadzeniu oocyty/zarodka do lab-chipa nastąpi pomiar parametrów optycznych. Pomiary spektralne i absorbancyjne realizowane będą z wykorzystaniem źródła światła z zakresu promieniowania widzialnego i detektora, którym może być miniaturowy spektrometr (Rys. 3.10). Pomiar parametrów optycznych będzie nadzorowany przez komputer wyposażony w odpowiednie oprogramowanie. Po zakończeniu procedury pomiarowej oocyt/zarodek będzie wyprowadzony z lab-chipa. Badanie jakości powinno trwać nie dłużej niż kilka minut. Pomiar charakterystyk spektralnych musi być wykonywany w środowisku zapewniającym prawidłowy rozwój i przechowywanie oocytów/zarodków, a jednocześnie nie może on negatywnie wpływać na uzyskane sygnały pomiarowe.



Rysunek 3.10 – Schemat blokowy systemu do pomiarów jakości oocytów/zarodków zwierząt.

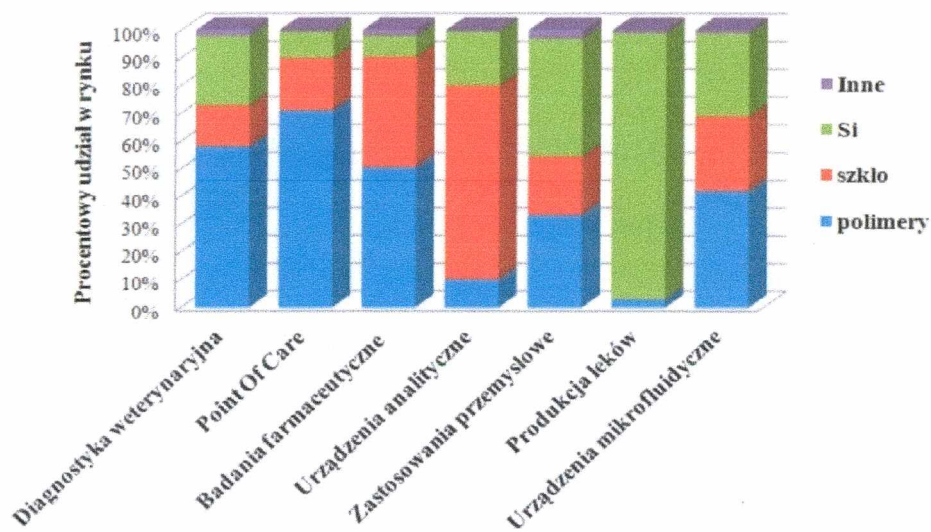
Do pomiarów parametrów spektralnych przewiduje się wykorzystanie jako źródła światła lampy halogenowej o zakresie emisji światła widzialnego i bliskiej podczerwieni z płynną regulacją intensywności światła oraz złączem typu SMA. Jako detektor planuje się zastosować miniaturowy spektrometr umożliwiający pomiar charakterystyk spektralnych w zakresie 350 nm do 850 nm również ze złączem typu SMA oraz podłączeniem do komputera przez złącze USB i odpowiednim oprogramowaniem. Układ pomiarowy przewiduje również możliwość zastosowania mikroskopu oraz miniaturowej kamery CCD, która mogłaby pełnić jednocześnie funkcję rejestratora wideo umożliwiającego ocenę morfologiczną oocyty/zarodka oraz określenie prawidłowej pozycji badanej komórki w czasie pomiarów w lab-chipie. Sygnał wideo z kamery przesyłany będzie do komputera. Ze względu na

konieczną mobilność układu pomiarowego, wszystkie elementy muszą być małych rozmiarów (Rys. 3.11).



Rysunek 3.11 – Schematy układu pomiarowego przeznaczony do badań spektrofotometrycznych.

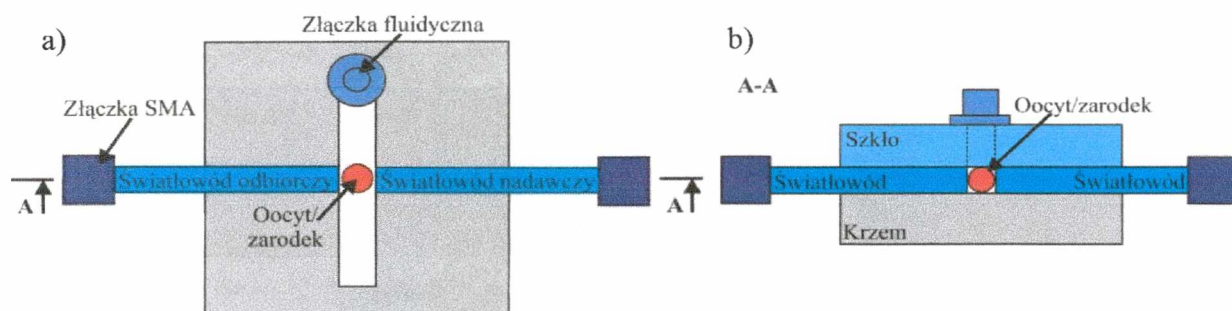
Szczególnie ważnym zagadnieniem jest dobór materiału i technologii wykonania lab-chipa. Literatura przedmiotu wskazuje, że najczęściej stosowanymi materiałami do wytwarzania urządzeń typu lab-on-a-chip są: krzem, szkło oraz polimery np. PDMS - polidimetylosiloxane, PMMA – polymethylmethacrylate (Rys. 3.12). Popularnymi materiałami są polimery ze względu na niski koszt produkcji, łatwą obróbkę mechaniczną, transparentność oraz bioobojętność. Jednak brak odporności na niektóre związki chemiczne powoduje, że równie często wykorzystywanymi materiałami są krzem oraz szkło. Negatywną cechą polimerów (np. SU-8) jest również ich starzenie się w czasie, które powoduje, że lab-chipy wykonane z tego materiału rozszczelniają się i żółkną [60].



Rysunek 3.12 – Procentowy udział poszczególnych materiałów wykorzystanych do konstrukcji lab-on-a-chipów.
Źródło: [61].

Lab-chipy weterynaryjne wytwarzane są najczęściej z polimerów lub krzemu i szkła (Rys. 3.12). Polimery są wykorzystywane w lab-chipach jednorazowego użytku, natomiast chipy wielokrotnego użytku są konstrukcjami szklanymi lub krzemowo-szklanymi. W realizowanym mikrocycymetrze weterynaryjnym zakłada się, że opracowany lab-chip będzie urządzeniem wielorazowego użytku umożliwiającym pomiar właściwości optycznych pojedynczego oocyty/zarodka. Ze względu na wielokrotne wykorzystanie lab-chipa wg założeń tej pracy, do jego budowy, zostanie wykorzystany monokrystaliczny krzem oraz szkło. Właściwości tych materiałów zapewniają bardzo wysoką odporność chemiczną [62] na większość roztworów (oprócz roztworów zawierających kwas fluorowodorowy i pochodne oraz stężone zasady), co ułatwia czyszczenia chipa. Krzem i szkło charakteryzują się wysoką bioobojętnością [63], co jest niezwykle istotne w tego rodzaju badaniach. Ponadto wykorzystując technikę bondingu anodowego, jako metodę łączenia podłoży krzemowych i szklanych, możliwe jest zapewnienie szczelności lab-chipa. Jest to istotne nie tylko w trakcie pomiarów, ale również w przypadku czyszczenia wewnętrznej mikrostruktury chipa.

Wprowadzanie i wyprowadzanie światła realizowane będzie przez dwa szklane światłowody włókniste, których średnica rdzenia wynosi 100 μm , a zakres pracy mieści się w przedziale promieniowania VIS/NIR. Światłowody te zakończone będą złączkami typu SMA. Konstrukcja chipa umożliwi zatrzymanie oocyty/zarodka w strumieniu przepływającego medium dokładnie pomiędzy dwoma czołami światłowodów (Rys. 3.13).



Rysunek 3.13 – Schemat lab-chipa do oceny jakości oocytów/zarodków metodą optyczną a) widok z góry, b) przekrój.

Należy podkreślić, że procedura wprowadzania/wyprowadzania oocyty/zarodka do/z lab-chipa musi być nieniszcząca i zgodna z przyzwyczajeniami personelu weterynaryjnego. Dlatego transport materiału biologicznego z szalki, w której jest on przechowywany do lab-chipa, a następnie komory pomiarowej (i odwrotnie po zakończeniu pomiaru) musi odbywać się z wykorzystaniem sterylnych narzędzi i metod nieniszczących. Założono, że oocyty/zarodki, niezależnie od źródła pozyskania, transportowane będą do komory

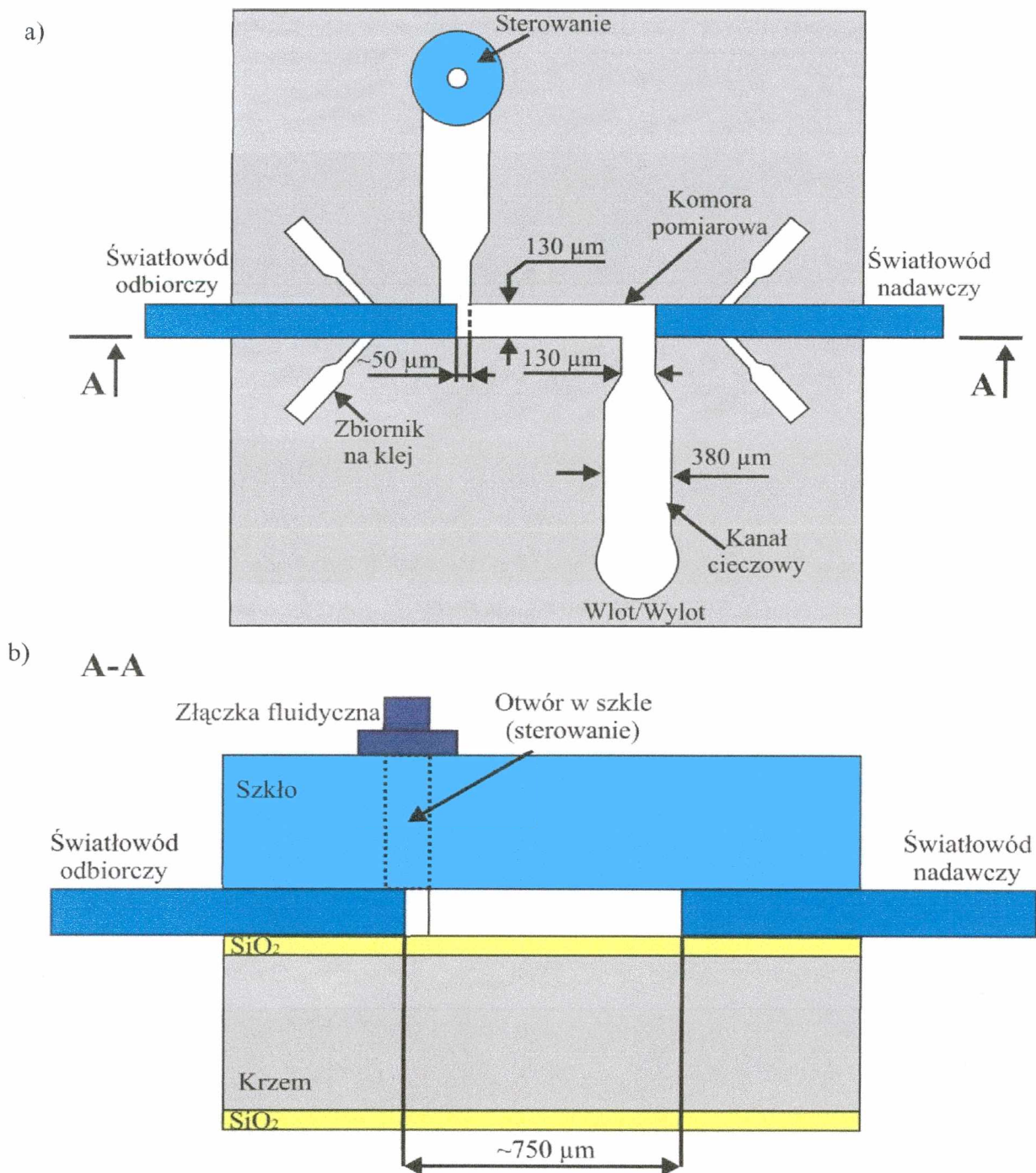
pomiarowej w jednorazowych, sterylnych końcówkach pipet precyzyjnych. Materiał biologiczny wprowadzany będzie przez odpowiednio wyprofilowany otwór wlotowy wykonany w górnej pokrywie szklanej. Oocyt/zarodek kierowany będzie do komory pomiarowej z wykorzystaniem siły kapilarnej i zasysany z wykorzystaniem pipety umieszczonej przy otworze sterującym. Przewiduje się również wykorzystanie w tym celu złączy mikrofluidycznych (np. firmy UpChurch, USA). Wyprowadzenie badanego materiału biologicznego z komory odbywać się będzie za pomocą zassania buforu z materiałem do końcówki pipety.

4 Lab-chip I z detekcją optyczną do oceny jakości oocytów zwierząt hodowlanych

Jak wspomniano wcześniej, przeprowadzone badania będą wykorzystywać metodę detekcji optycznej. Zaprojektowany zostanie lab-chip zgodnie z wcześniej opisanymi założeniami, który wykonany zostanie za pomocą technik mikroinżynieryjnych. Będą to wstępne badania mające na celu sprawdzenie, czy możliwe jest wyznaczenie parametrów pozwalających jednoznacznie i obiektywnie określić jakość komórek rozrodczych.

4.1 Projekt i technologia

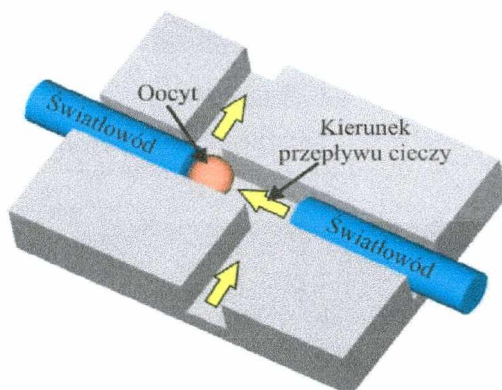
Lab-chip o wymiarach $35 \times 35 \times 1,38 \text{ mm}^3$ składa się z dwóch podłoży: krzemowego i szklanego oraz dwóch szklanych światłowodów wielodomowych o odpowiednio dobranej charakterystyce i wymiarach. W podłożu krzemowym zaprojektowano kanały cieczowe o kształcie zbliżonym do litery S. Środkowy odcinek kanału cieczowego pełni funkcję komory pomiarowej (Rys. 4.1). Początkowy odcinek kanału cieczowego jest szerszy i wynosi $\sim 380 \text{ }\mu\text{m}$, po czym następuje jego zwężenie do $130 \text{ }\mu\text{m}$. Objętość komory pomiarowej wynosi $\sim 14 \text{ nl}$. Lab-chip zawiera również kanały, rozmieszczone po przeciwległych stronach komory pomiarowej, umożliwiające montaż światłowodów. Konstrukcję kanałów montażowych zaprojektowano tak, aby umożliwić samocentrowanie i współosiowość światłowodów na etapie ich montażu. Kanały montażowe zawierają cztery zbiorniki umożliwiające gromadzenie nadmiaru kleju stosowanego do montażu światłowodów. Zastosowano włókna światłowodowe (nadawcze i odbiorcze) o średnicy płaszcza i rdzenia odpowiednio $125/100 \text{ }\mu\text{m}$, z zakończeniem złączkami typu SMA 905. W podłożu szklanym wywiercono otwory: wlotowy oraz sterujący. Otwór sterujący jest zaopatrzony w złączkę mikrofluidyczną firmy UpChurch, która ułatwia pozycjonowanie komórki w komorze pomiarowej. Przedstawiona tu konstrukcja lab-chipa jest podobna do zaprezentowanej w pracy [64] głowicy NIR, wykorzystanej do badań „agresywnych” odczynników chemicznych.



Rysunek 4.1 – Lab-chip krzemowo-szklanego a) widok z góry, b) przekrój.

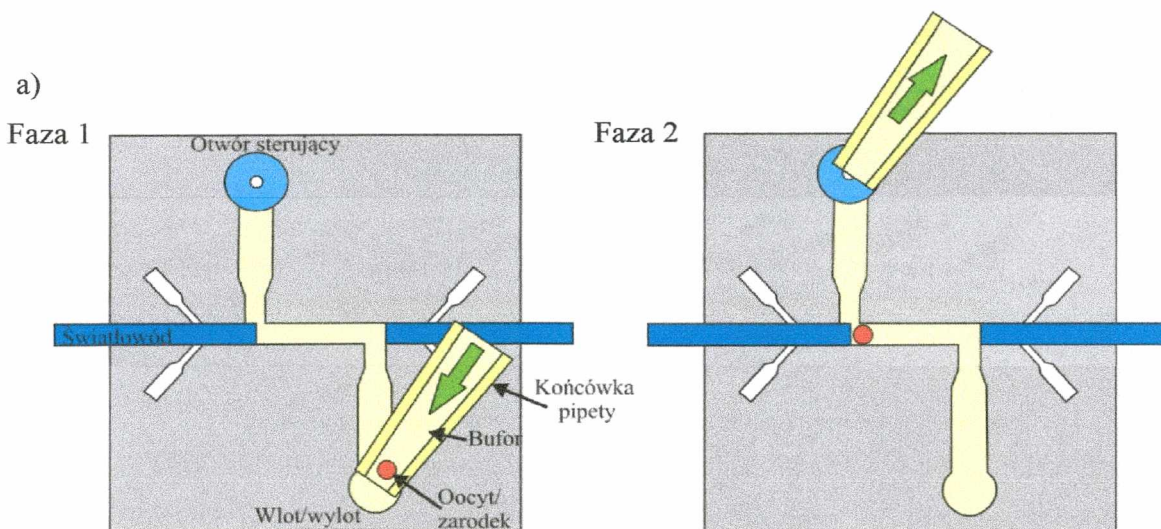
Niezwykle istotnym zagadnieniem jest pozycjonowanie badanej komórki wewnątrz komory pomiarowej, tak aby znalazła się ona dokładnie w torze optycznym. Dlatego komora pomiarowa zawiera w swojej konstrukcji pułapkę mechaniczną, która umożliwi zatrzymanie badanej komórki w strumieniu przepływającego medium pomiędzy dwoma czołami światłowodów (Rys. 4.2). W rozwiązaniu tym światłowód odbiorczy został wprowadzony w

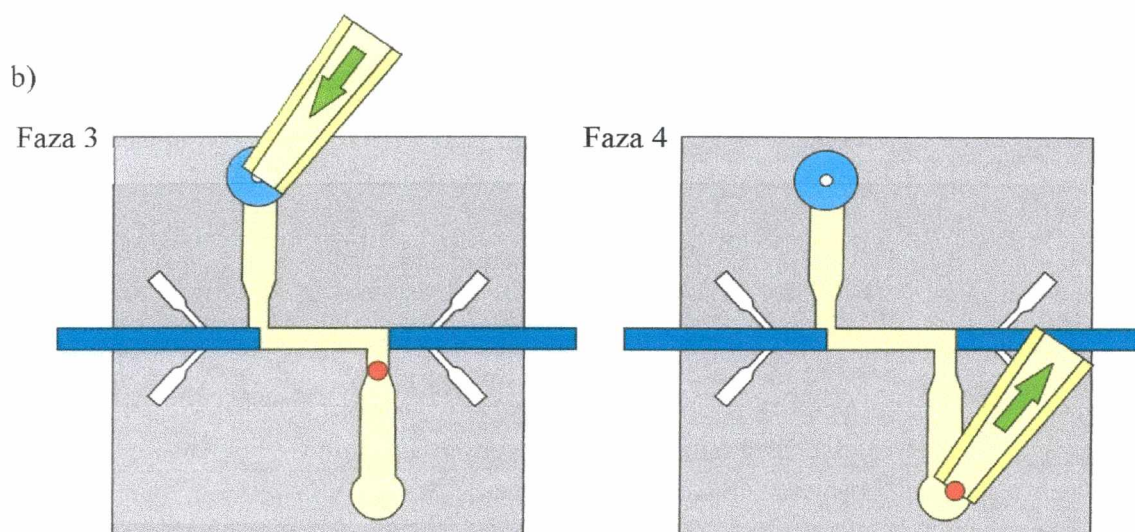
głęb komory pomiarowej, tak by przedostanie się oocytu poza jej obszar było niemożliwe, a przepływ medium odbywał się bez ograniczeń.



Rysunek 4.2 – Schemat pracy pulapki mechanicznej wykorzystanej do unieruchomienia oocytu w czasie pomiaru.

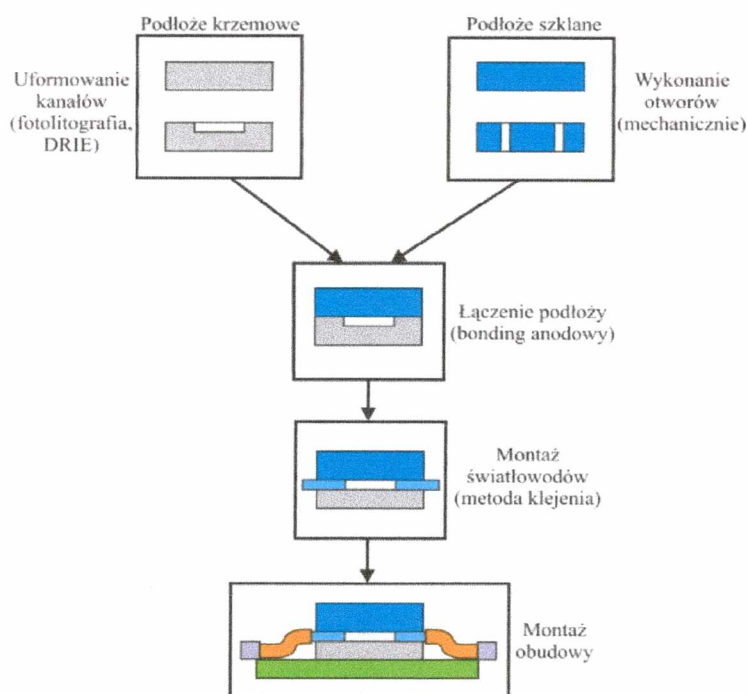
Wprowadzanie i wyprowadzanie badanej komórki wg założeń tu przyjętych przedstawiono na rysunku 4.3. Oocyt wprowadzano do otworu wlotowego za pomocą pipety laboratoryjnej zakończonej sterylnymi końcówkami (faza 1). Następnie pipetę umieszczono przy otworze sterującym i zassano płyn wraz z transportowanym oocytem do komory pomiarowej (faza 2). Wyprowadzenie oocytu następowało w odwrotnej sekwencji; najpierw komórkę wypychano przez ciecz za pomocą pipety przyłożonej do otworu sterującego (faza 3), a następnie oocyt przepchnięto do otworu wlotowego i pobrano przez zassanie do pipety laboratoryjnej (faza 4).





Rysunek 4.3 – Transport oocyty do/z komory pomiarowej z wykorzystaniem standardowych końcówek pipet precyzyjnych: a) wprowadzanie oocyty do komory pomiarowej, b) wyprowadzanie oocyty z komory pomiarowej.

Lab-chip wykonano metodami obróbki mikroinżynieryjnej. Na podłożu krzemowym zastosowano procesy fotolitografii [65] jednostronnej oraz suche trawienie krzemu (DRIE – Deep Reaction Ion Etching) [66], 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 [67]. Kolejnymi etapami był montaż światłowodów szklanych oraz umieszczenie gotowego lab-chipa w obudowie (Rys. 4.4).

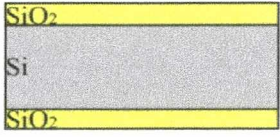
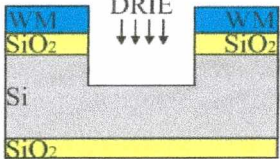
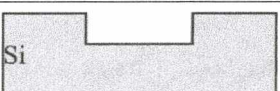
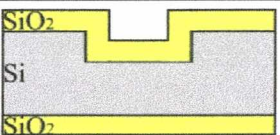
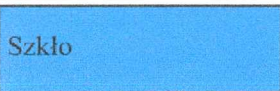
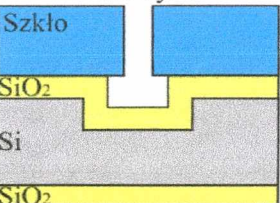


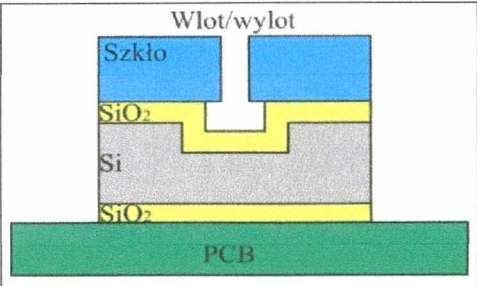
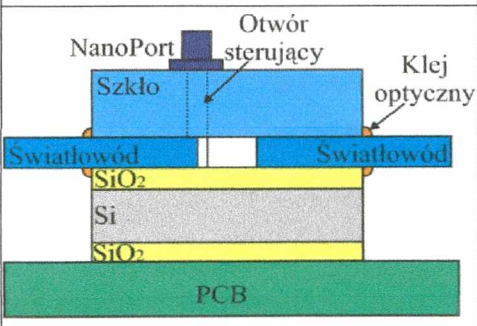
Rysunek 4.4 – Schemat etapów technologicznych koniecznych do wykonanie lab-chipa.

Lab-chip wykonano stosując 3-calowe podłoże krzemowe obustronnie polerowane o orientacji krystalograficznej (100) i grubości 380 μm . W procesie wysokotemperaturowego utleniania w atmosferze pary wodnej, w temperaturze 1050°C wytworzono warstwę SiO_2 o grubości 1,5 μm . Do procesu fotolitografii wykorzystano fotorezyst pozytywowy AZ 1350 oraz maskę chromową. Formowanie przestrzennych struktur kanałów prowadzono w procesie suchego trawienia krzemu – DRIE⁷. Podczas trawienia zastosowano zmodyfikowany proces firmy Bosch (ciśnienie SF_6 : 3,9 – 4,0 Pa, ciśnienie C_4F_8 : 2,5 Pa, średnia szybkość trawienia krzemu 6,3 $\mu\text{m}/\text{min}$). Parametry procesu zoptymalizowano tak, aby ściany trawionej struktury na głębokości 140 μm były gładkie. Po procesie trawienia DRIE warstwę maskującą usunięto, a podłoże krzemowe utleniono ponownie w atmosferze pary wodnej ($t = 1050^\circ\text{C}$) w celu pasywacji powierzchni warstwą SiO_2 o grubości 0,3 μm (Tab. 4.1). W podłożu szklanym (Borofloat® 3.3, Schott, Niemcy) o wymiarach 35x35 mm^2 i grubości 1 mm wywiercono otwory o średnicy $\phi = 0,8$ mm, zgodnie z rozstawieniem otworu wlotowego i sterującego w krzemie. Elementy krzemowe i szklane lab-chipa, przed połączeniem metodą bondingu anodowego, poddano procedurom mycia i aktywacji (hydrofilizacji) powierzchni [68]. Następnie podłoże krzemowe i szklane połączono ze sobą w temperaturze 450°C, przy napięciu polaryzacyjnym 1,5 kV stosując punktową elektrodę metalową i szkło pośrednie [66]. Proces łączenia podłoży krzemowych i szklanych wymaga zachowania szczególnej czystości. Przeprowadzono go na stanowisku, które umieszczone było w komorze laminarnej o klasie czystości 100. Przed zetknięciem krzemu i szkła, na powierzchnie przeznaczone do bondingu, skierowano strumień azotu, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia pyłami.

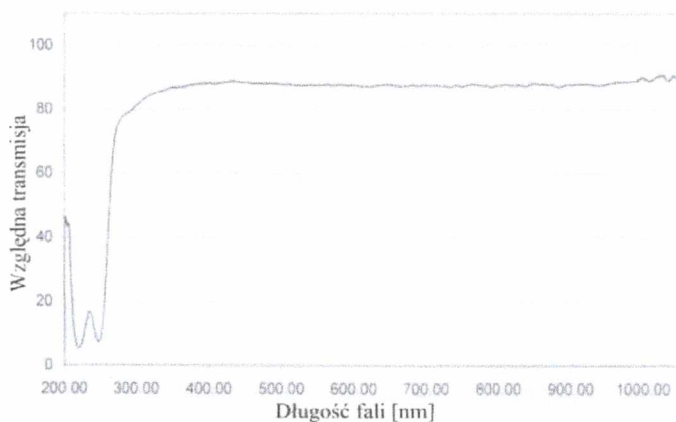
⁷ Procesy dla podłoża krzemowego wykonano w CNRS (procedury technologiczne wykonał dr inż. Sylwester Bargiel) w Instytucie FEMTO-ST, w Besançon, Francja w ramach kooperacji naukowo-badawczej między laboratorium Nano/Mikroinżynierii, a Zakładem Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Politechniki Wrocławskiej.

Tabela 4.1 – Krzemowo-szkłany lab-chip – etapy wytwarzania

Podłoże krzemowe	
	- Podłoże krzemowe 3", typu n, grubość 380 μm
	- Procedura mycia - Utlenianie termiczne ($t = 1050^{\circ}\text{C}$, grubość SiO_2 1,5 μm)
	- Warstwa maskująca (WM) - Fotolitografia jednostronna (AZ 1350, maska chromowa)
	- Trawienie kanałów metodą DRIE (zmodyfikowany proces BOSCH)
	- Usunięcie SiO_2 - Procedura mycia
	- Utlenianie termiczne ($t = 1050^{\circ}\text{C}$, grubość SiO_2 0,3 μm)
Podłoże szklane	
	- Szkło Borofloat 3.3, 35x35 mm², grubość 1 mm
	- Wiercenie otworów w pokrywie szklanej ($\phi = 0,8$ mm)
Łączenie elementów	
	- Mycie i aktywacja powierzchni - Bonding anodowy podłoża krzemowego i szklanego ($t = 450^{\circ}\text{C}$, $U = 1,5$ kV)

	- Montaż struktury na płytce PCB
	- Montaż światłowodów i NanoPortu

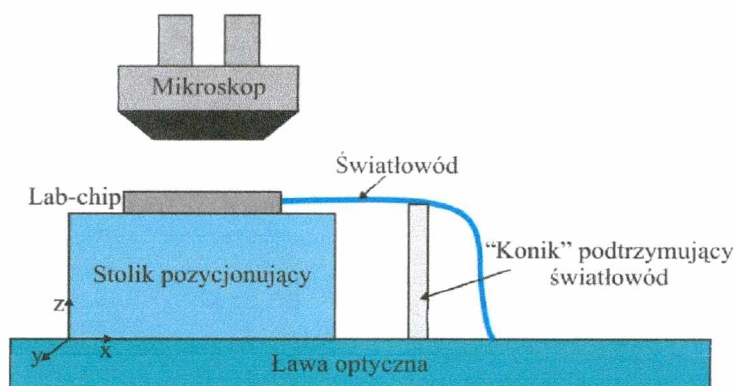
Kolejnym etapem było przyklejenie tak wykonanej struktury krzemowo-szklanej do płytki PCB, która posłużyła do unieruchomienia światłowodów w miejscu wprowadzenia ich do chipa oraz do zamocowania chipa w obudowie metalowej. Do gotowej struktury krzemowo-szklanej wklejono światłowody szklane P100-2-VIS-NIR (firmy OceanOptics) zakończone złączem SMA. Światłowody te posiadają płaską charakterystykę transmisji światła w pożądanym zakresie długości fali od 400 nm do 700 nm (Rys. 4.5)⁸.



Rysunek 4.5 – Charakterystyka względnej transmisji światłowodu szklanego P100-2-VIS-NIR.

Montaż światłowodów wykonano na stanowisku umożliwiającym stabilne umieszczenie i przemieszczanie lab-chipa w trzech płaszczyznach x-y-z oraz obserwację prowadzonych procesów pod mikroskopem (Rys. 4.6).

⁸ Charakterystyka transmisji pochodzi z karty katalogowej producenta światłowodu firmy OceanOptics.



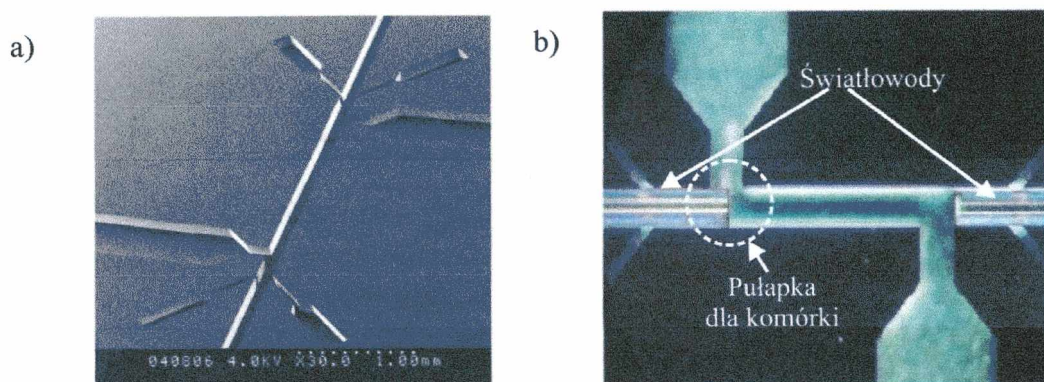
Rysunek 4.6 – Schemat układu wykorzystanego do montażu światłowodów w lab-chipie.

Przed wykonaniem montażu światłowodów konieczne było usunięcie materiałów ochronnych z montażowej części włókna, a w szczególności powłoki poliimidowej otaczającej płaszcz światłowodu. Osłona zewnętrzna, wzmocnienie oraz płaszcz ochronny usunięto metodą mechaniczną. Natomiast powłoka lakiernicza została usunięta chemicznie przez zanurzenie przygotowanego odcinka włókna światłowodowego w gotującym się roztworze PIRANHI ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) na czas 30 minut (Tab. 4.2).

Tabela 4.2 – Etapy przygotowania włókna światłowodowego.

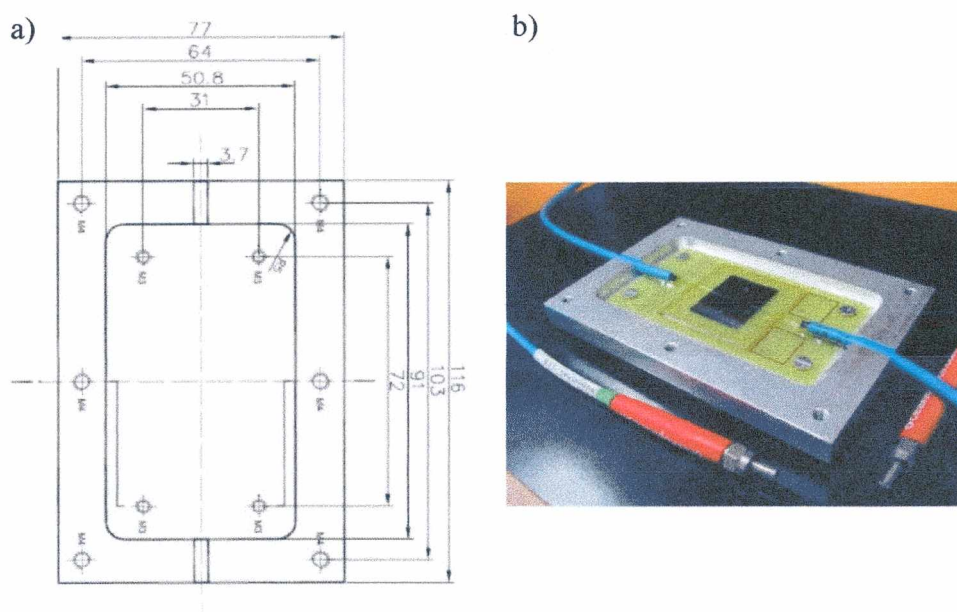
	- Usunięcie materiałów ochronnych z części montażowej włókna
	- Usunięcie powłoki lakierniczej (PIRANHIA, $t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 30\text{ min.}$)
	- Ucięcie światłowodu w przecinarnie światłowodowej

Następnie tak przygotowane włókno zostało ucięte w przecinarnie światłowodowej firmy Fujikura, spozycjonowane i wprowadzone w przygotowany kanał (Rys. 4.7a). W celu stałego unieruchomienia światłowodów w lab-chipie zastosowano klej optyczny NOA 61 (Thorlabs, Niemcy) utwardzany światłem UV. Klej w małej ilości został zaaplikowany do wlotu kanału i przemieszczał się on w głąb kanału, dzięki siłom kapilarnym. Nadmiar gromadził się w specjalnie wytrawionych zbiornikach, dzięki czemu czoło światłowodu nie zostało otoczone warstwą kleju (Rys. 4.7b). Tym sposobem rozwiązano problem odbić światła na utwardzonej warstwie kleju [64]. Po całkowitym wypełnieniu kanału przez klej został on utwardzony światłem UV przez ok. 10 min. Źródłem światła UV była lampa dentystyczna firmy Electro-Lite.



Rysunek 4.7 – Widok struktury: a) kanały mikrofluidyczne i montażowe, zdjęcie SEM, b) krzemowo-szklany lab-on-a-chip z wklejonymi światłowodami.

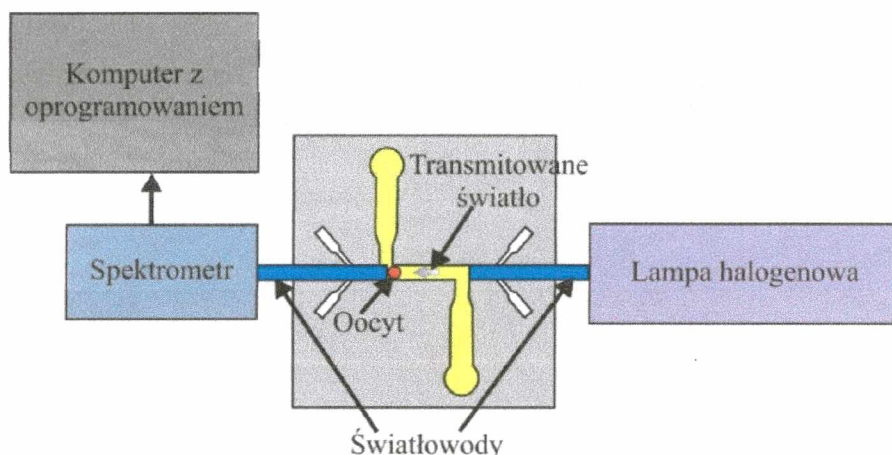
Następnie krzemowo-szklany lab-chip ze światłowodami został umieszczony w metalowej obudowie o wymiarach $77 \times 116 \text{ mm}^2$, ze szczelinami na światłowody oraz otworami M3, dzięki którym możliwe było przymocowanie i unieruchomienie lab-chipa (Rys. 4.8). Obudowa ta zapewnia odporność na wstrząsy i stabilność mechaniczną w trakcie pomiarów. Ostatnim etapem było przyklejenie NanoPortu firmy Upchurch na otwór sterujący. Ułatwiło to sterowanie przepływem oocytu.



Rysunek 4.8 – Obudowa metalowa: a) rysunek wykonawczy, b) widok z zamontowanym lab-chipem.

4.2 Układ pomiarowy

W układzie pomiarowym, oprócz wykonanego lab-chipa, wykorzystano: miniaturowy spektrometr USB4000UV-VIS firmy OceanOptics, miniaturową lampę halogenową HL-2000 również firmy OceanOptics oraz komputer (Rys. 4.9).



Rysunek 4.9 – Schemat układu pomiarowego.

Mikrospektrometr

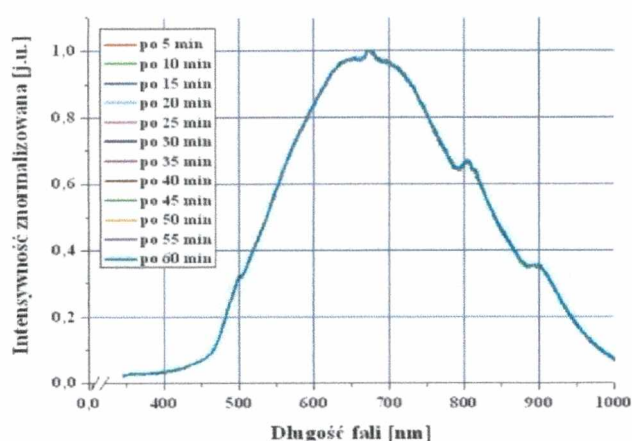
Miniaturowy spektrometr USB4000UV-VIS firmy OceanOptics jest kompaktowym urządzeniem umożliwiającym pomiar charakterystyk spektralnych w zakresie od 200 nm do 850 nm. Urządzenie to wyposażone jest w detektor CCD TCD1304AP firmy Toshiba. Zastosowana 3648 – elementowa matryca linii CCD umieszczona jest na miniaturze optycznej⁹. Spektrometr wyposażony jest w 25 μm szczelinę wejściową, dzięki czemu zapewniona jest rozdzielczość optyczna na poziomie około 1,5 nm. Urządzenie to jest podłączane do komputera przez złącze USB. Producent dostarczył również oprogramowanie umożliwiające konfigurację spektrometru oraz zbieranie i wstępną obróbkę danych pomiarowych.

Źródło światła

Lampa halogenowa firm OceanOptics jest źródłem światła w zakresie długości fali od 360 nm do 2000 nm. Umożliwia ona podłączenie światłowodów zakończonych złączem typu SMA. Urządzenie to posiada płynną regulację intensywności światła wprowadzanego do światłowodu dzięki zastosowanej przesłonie. Przed przystąpieniem do właściwych pomiarów zoptymalizowano pracę źródła światła. Jego nagrzewanie i długa praca mogłyby prowadzić

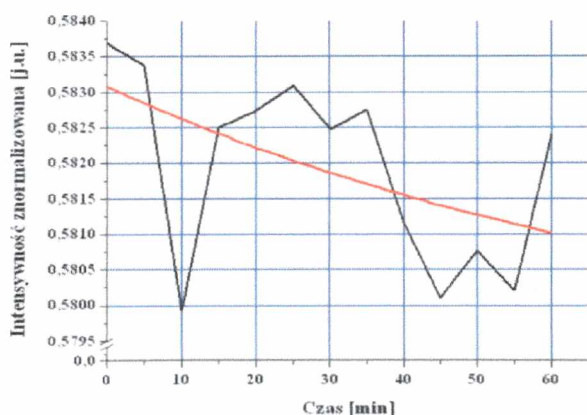
⁹ Dane pochodzą z karty katalogowej producenta mikrospektrometru firmy OceanOptics, www.oceanoptics.com

do niestabilnej emisji światła, co mogło być później przenoszone na uzyskane wyniki pomiarowe. Podczas badania stabilności lampy halogenowej z wykorzystaniem spektrometru OceanOptics, światło z oświetlacza było prowadzone do detektora za pomocą światłowodu o długości 2 metrów i średnicy rdzenia 100 μm , dzięki czemu uzyskano badane charakterystyki spektralne (Rys. 4.10).

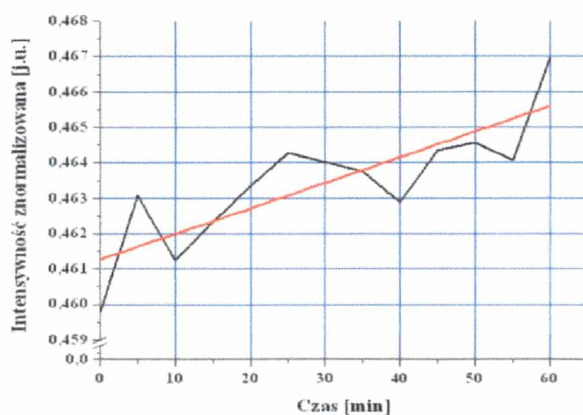


Rysunek 4.10 – Charakterystyki spektralne lampy halogenowej uzyskane w czasie 1 godziny pracy.

Z charakterystyk spektralnych dla długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$ i $\lambda = 850 \text{ nm}$ odczytano wartości intensywności, a następnie wykreślono wartości intensywności w funkcji czasu (Rys. 4.11, Rys. 4.12). Pozwoliło to na oszacowanie względnych zmian intensywności światła w poszczególnych przedziałach czasowych (Tab. 4.3).



Rysunek 4.11 – Intensywność światła w funkcji czasu dla $\lambda = 550 \text{ nm}$ – dane pomiarowe i aproksymacja.



Rysunek 4.12 – Intensywność światła w funkcji czasu dla $\lambda = 850 \text{ nm}$ – dane pomiarowe i aproksymacja.

Tabela 4.3 – Względna zmiany intensywności światła dla wybranych długości fali.

Długość fali	Względna zmiana 0 – 30 min	Względna zmiana 30 – 60 min
550 nm	0,21%	-0,14%
850 nm	0,47%	-0,45%

Z przeprowadzonych pomiarów wynika, że wybrana lampa halogenowa charakteryzuje się bardzo dobrą stabilnością czasową, a uzyskane względne zmiany intensywności świecenia dla wybranych długości fali są na tyle małe, że można je pominąć w trakcie prowadzenia dalszych analiz widmowych.

Testy wstępne

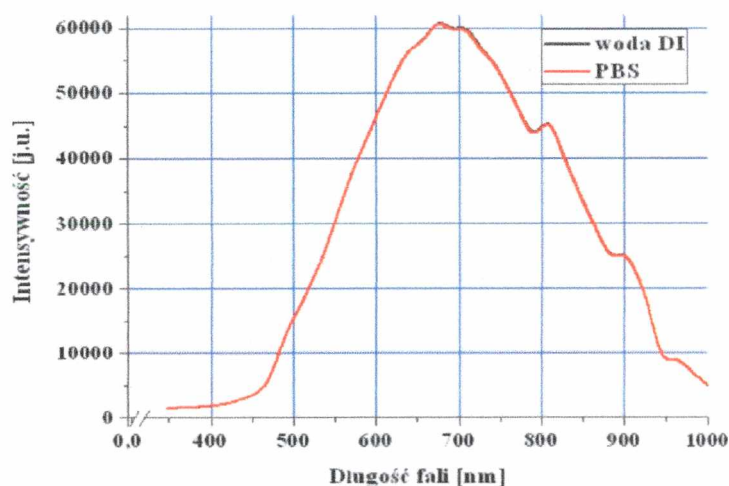
Pomiary testowe wykonanego lab-chipa, na stanowisku pomiarowym jak na rysunku 4.13, przeprowadzono z zastosowaniem dwóch cieczy: wody dejonizowanej oraz buforu PBS (Phosphate Buffered Saline – bufor fosforanowy), w którym transportowano badane oocyty.



Rysunek 4.13 – Mikrocytometr do charakteryzacji oocytów trzody chlewnej oraz bydła.

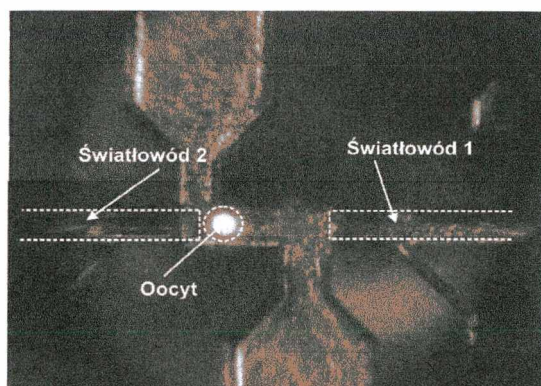
Określono efektywność sprzężenia światła między światłowodem nadawczym i odbiorczym w celi pomiarowej. Źródłem światła była scharakteryzowana wcześniej lampa halogenowa. Moc optyczną mierzono miernikiem mocy OP-2 VIS firmy COHERENT, który umożliwiał pomiary w zakresie długości fali od 0,4 μm do 1,06 μm z dokładnością do 1 nW. Moc emitowana przez źródło światła dla wybranej długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$ wynosi $P_s = -32,68 \text{ dBm}$. Wyjściowa moc optyczna, przy celi wypełnionej wodą, wynosi $P_c = -43,01 \text{ dBm}$. Oszacowano, iż tłumienie celi pomiarowej cytometru weterynaryjnego dla $\lambda = 550 \text{ nm}$ wynosi ok. 10,3 dB/cm. Wyniki uzyskane dla buforu PBS nie różniły się od tych uzyskanych dla wody.

Wykonano również charakteryzację spektralną wody dejonizowanej oraz buforu PBS (Rys. 4.14). Zauważono, że charakterystyka spektralna zaproponowanego buforu nie różni się od charakterystyki spektralnej wody. Można stwierdzić, że wybrane medium nie będzie wprowadzało dodatkowego niepożądanego sygnału w trakcie charakteryzacji spektralnej badanych komórek. Jest to jedno z możliwych do zastosowania mediów. Innym bardzo popularnym buforem jest Holding Medium, które jest często wykorzystywane w trakcie prowadzenia transferów zarodków ze względu na jego właściwości odżywcze. Jednak zastosowanie tego buforu może powodować krystalizację cieczy wewnątrz komory pomiarowej, co jest bardzo niepożądanym efektem, doprowadzającym w końcowym etapie do niedrożności lab-chipa. Z tego powodu zdecydowano się pracować tylko z buforem PBS.



Rysunek 4.14 – Charakterystyki spektralne wody dejonizowanej i buforu PBS.

W trakcie prowadzenia właściwych pomiarów, pojedynczą komórkę umieszczano w celi pomiarowej za pomocą pipety przyłożonej do wlotu lab-chipa. Komórka była zasysana przez siły kapilarne do środka lab-chipa (Rys. 4.15). Światło VIS/NIR z lampy halogenowej transmitowane było światłowodem 1 do celi pomiarowej i oświetlało komórkę, unieruchomioną w strumieniu buforu PBS. Wiązka światła przechodząca przez komórkę była transmitowana światłowodem 2 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.



Rysunek 4.15 – Oocyt podczas pomiaru.

4.3 Metoda spektrofotometryczna – metoda pików – testy laboratoryjne

Przeprowadzone zostały serie pomiarowe na materiale zwierzęcym pochodzącym od bydła oraz trzody chlewnej. Materiał biologiczny został dostarczony i przygotowany przez zespół pracowników z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierownictwem profesora Jędrzeja Jaśkowskiego. Pomiary przeprowadzano w laboratorium biologicznym.

4.3.1 Oocyty bydlęce

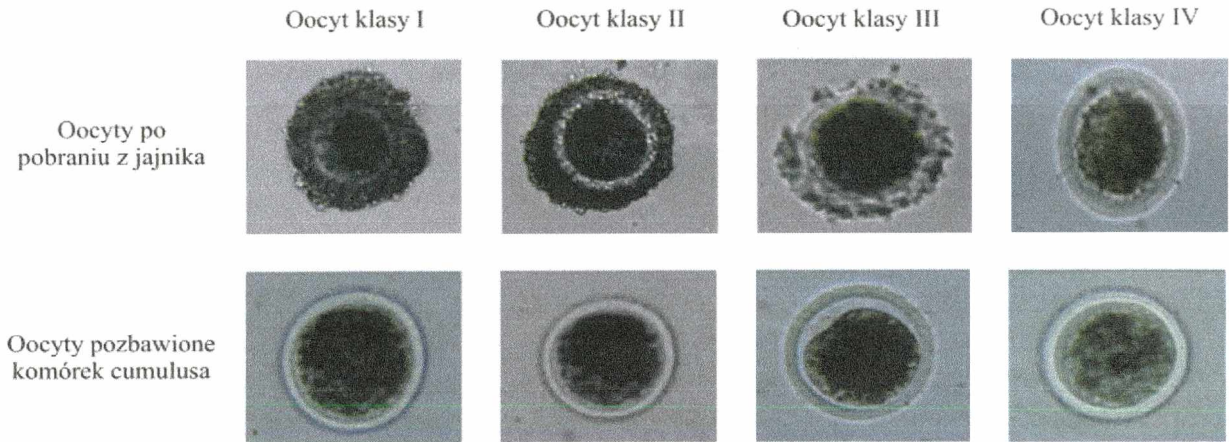
Jajniki bydlęce (Rys. 4.16) zostały odzyskane bezpośrednio po uboju i przetransportowane do laboratorium w ciągu 20 minut w temperaturze 38 °C, w 0,9% NaCl. Następnie jajniki umieszczono w 5% roztworze FBS (Foetal Bovine Serum – bydlęca surowica płodowa).



Rysunek 4.16 – Jajnik bydlęcy.

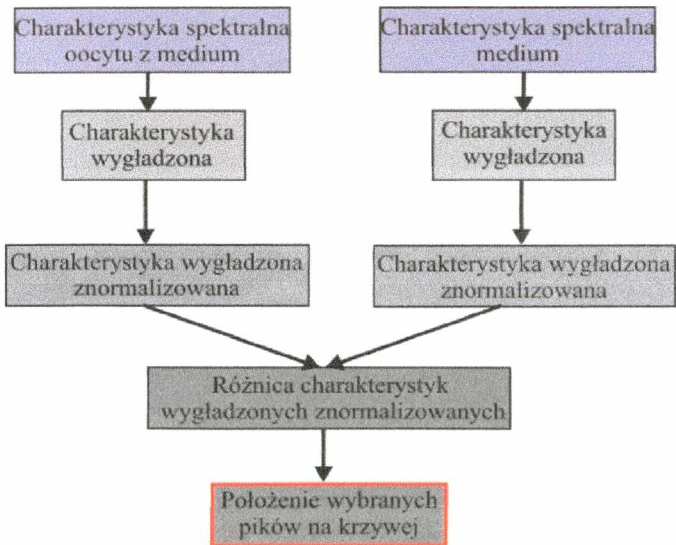
Komórki jajowe pozyskane zostały metodą dysekcji. Ocena morfologiczna i wstępna selekcja oocytów wykonana została podczas obserwacji pod lupą stereoskopową. Do oceny jakościowej została wykorzystana opisana wcześniej metoda klasyfikacji oocytów (str. 11).

Komórki podzielono na cztery klasy morfologiczne wg ilości komórek cumulusa otaczających komórkę, homogenności i stopnia degeneracji cytoplazmy. Oocyty z klasy I uważane są za najlepsze jakościowo i wykazują one największą możliwość udanego zapłodnienia [69]. W kolejnym etapie przeprowadzono odtrawienie komórek cumulusa od oocytu za pomocą roztworu Hialuronidazy (3%) – Rys. 4.17, a następnie wykonano pomiar w lab-chipie.



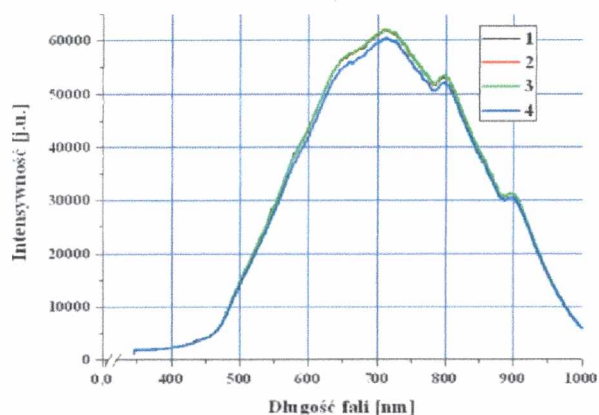
Rysunek 4.17 – Oocyty bydlęce podzielone na cztery morfologiczne klasy jakościowe przed i po usunięciu komórek cumulusa.

Ogółem przebadano 19 komórek przy czym w klasie I przebadano 4 oocyty, natomiast w pozostałych klasach po 5 oocytów. Oocyty bydlęce zostały zmierzone sztuka po sztuce. Schemat zaproponowanego algorytmu obróbki danych pomiarowych przedstawiono na rysunku 4.18. Poniżej przedstawiono pełną analizę danych pomiarowych dla oocytów z I klasy oraz wynik końcowy. Wyniki dla pozostałych klas są zawarte w Dodatku A.

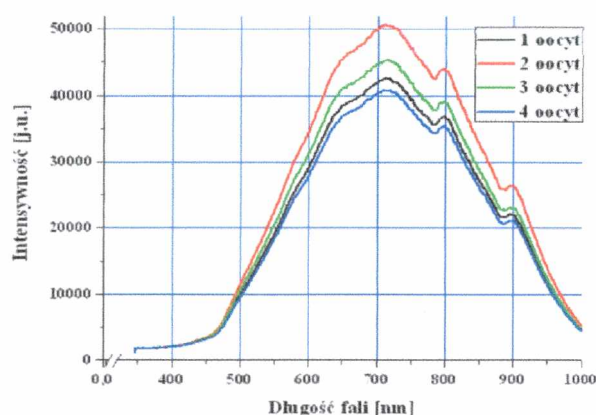


Rysunek 4.18 – Schemat analizy danych pomiarowych – metoda pików.

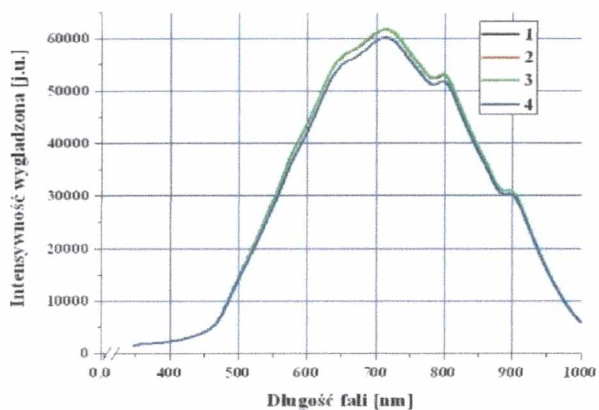
Zaproponowana metoda zakłada pomiar charakterystyk intensywności samego medium (Rys. 4.19) oraz oocytu „zawieszonego” w medium (PBS) – Rys. 4.20. Następnie charakterystyki te poddane są wygładzeniu wykorzystując w tym celu szybką transformatę Fouriera o liczbie próbek 100 (Rys. 4.21, Rys. 4.22). Kolejnym krokiem jest normalizacja otrzymanych charakterystyk do jedynki (Rys. 4.23, Rys. 4.24).



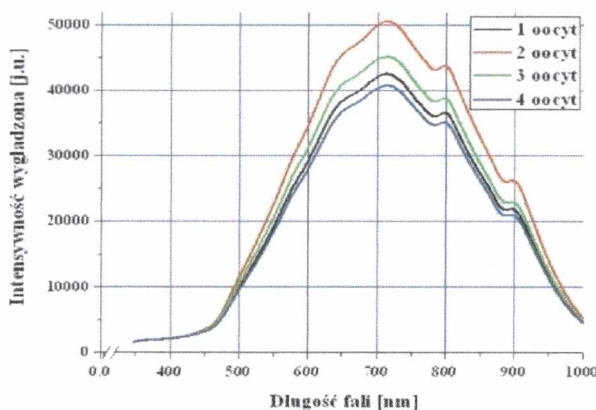
Rysunek 4.19 – Charakterystyki intensywności medium wykonane przed pomiarem każdego oocyta z I klasy.



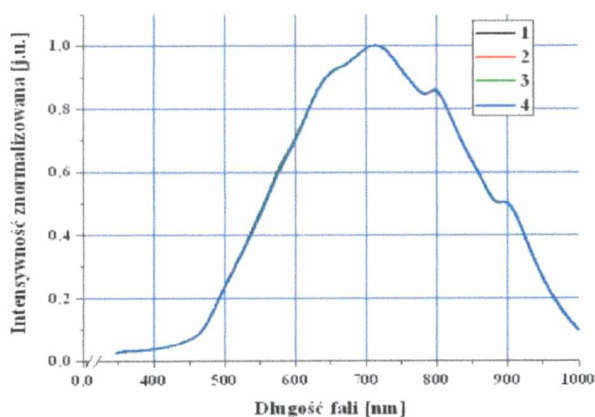
Rysunek 4.20 – Charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów I klasy „zawieszonych” w medium.



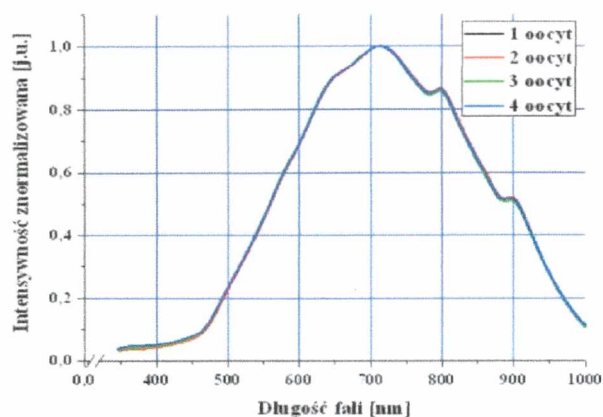
Rysunek 4.21 – Wygładzone charakterystyki intensywności medium wykonane przed pomiarem każdego oocyta z I klasy.



Rysunek 4.22 – Wygładzone charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów I klasy „zawieszonych” w medium.

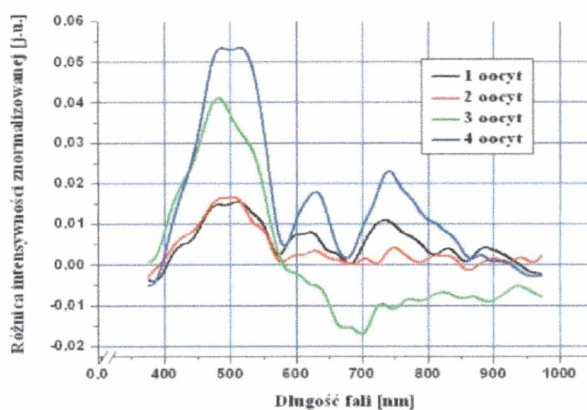


Rysunek 4.23 – Charakterystyki intensywności znormalizowanej medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z I klasy.



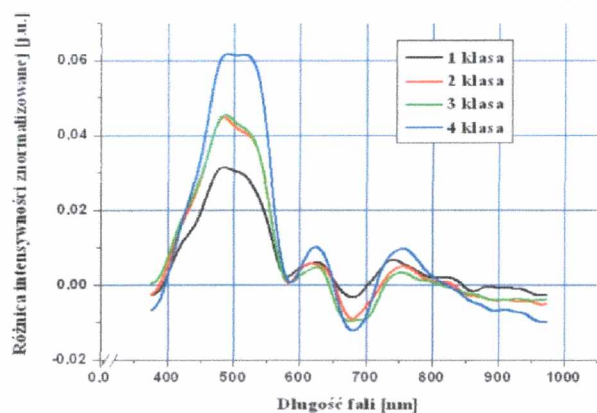
Rysunek 4.24 – Charakterystyki intensywności znormalizowanej poszczególnego oocytu I klasy „zawieszonego” w medium.

Następnym etapem (operacje matematyczne wykonano w programie Origin 7.5) jest odjęcie tak przetworzonej charakterystyki oocytu „zawieszonego” w medium od charakterystyki samego medium. Dzięki temu uzyskano charakterystykę spektralną pojedynczego oocytu (Rys. 4.25).

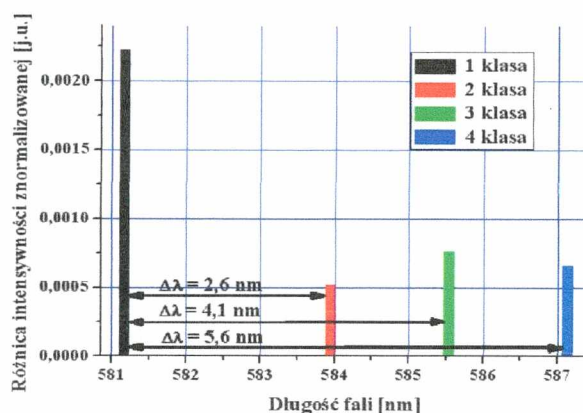


Rysunek 4.25 – Charakterystyki poszczególnych oocytów z I klasy.

Charakterystyki te, otrzymane dla poszczególnych klas morfologicznych, zostały uśrednione i porównane (Rys. 4.26). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem jakości klasy oocytu, położenie przypadającego w okolicy $\lambda = 580$ nm minimum lokalnego przesunęło się w stronę krótszych długości fali. Oocyty uznane za najlepsze (1 klasa) charakteryzowane były przez minimum lokalne 581,3 nm, oocyty z 2 klasy przez 584 nm, 3 klasy 585,5 nm, a najgorszej 4 klasy 587,1 nm (Rys. 4.27). Tym samym stwierdzono, że możliwa jest kwalifikacja jakościowa oocytów metodą badania krzywych spektralnych. Wyniki te opublikowano między innymi w: [70, 71].



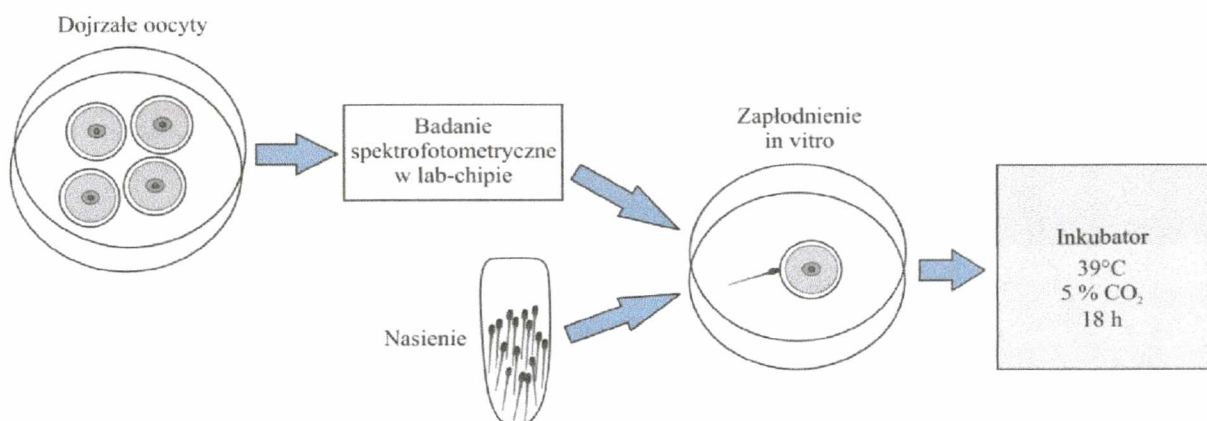
Rysunek 4.26 – Uśrednione charakterystyki różnicy intensywności znormalizowanej dla poszczególnych klas jakościowych.



Rysunek 4.27 – Wartość i położenie minimum lokalnego w zakresie długości fali 580 nm dla czterech klas oocytów.

Wyniki te są istotne, jednakże różnice położenia minimum lokalnego pomiędzy poszczególnymi klasami są bardzo małe. Dlatego tak przeprowadzona klasyfikacja nie może być wykorzystana w pomiarach prowadzonych w warunkach hodowlanych. Ponadto ocena parametryczna oocytów prowadzona jest dla grupy komórek z poszczególnych klas, a nie dla pojedynczego oocytu, co wynika z końcowej metody obróbki danych pomiarowych.

W kolejnych doświadczeniach sprawdzono, czy opisana tu metoda klasyfikacji oocytów z zastosowaniem techniki lab-chip wpływa negatywnie na badaną komórkę. Przeprowadzono w tym celu testy oocytów bydłowych najlepszej I klasy, a następnie poddano je zapłodnieniu in vitro. Procedura pozyskania oocytów jak również procedura pomiarowa były zgodne z opisanymi wcześniej w tej pracy (str. 45). Badania przeprowadzono na grupie 10 oocytów. Najpierw zostały one poddane pomiarom w lab-chipie, a następnie zapłodnione in vitro. Do zapłodnienia zastosowano mrożone w ciekłym azocie nasienie przetrzymywane w tzw. słomkach. Ejakulat z rozmrożonej słomki został zawieszony w medium Sperm Talp (pH 7,4) i poddany 2 krotnemu wirowaniu. Po ilościowej i jakościowej ocenie (wykorzystując do tego celu system CASA) końcowa koncentracja plemników wynosiła 1,5 mln/ml. Dojrzałe komórki jajowe poddane zostały zapłodnieniu in vitro w kroplach pożywki IVF Talp, wzbogaconej o Fat. BSA, antybiotyki oraz heparynę [72]. Płytkę z zaplemnionymi oocytami przechowywano w inkubatorze przez okres 18 godzin w temperaturze 39°C i 5% stężeniu CO₂ (Rys. 4.28). Hodowle zarodków przeprowadzono w pożywce CR1aa z dodatkiem BSA (4 mg/ml) w płytkach czterodołkowych i przykrytych olejem mineralnym. Komórki inkubowano 24 godziny do stadium zygoty w temperaturze 39°C i 5% stężeniu CO₂.



Rysunek 4.28 – Schemat zapłodnienia in vitro oocytów bydlęcych.

Zarodki bydlęce zostały następnie poddane analizie mikroskopowej, która pozwoliła określić, czy nastąpił ich prawidłowy rozwój. Zarodki utrwalono w roztworze paraformaldehydu z dodatkiem PVP i wybarwiono w barwniku Hoechst33342 (Sigma). Analizę preparatu wykonano pod mikroskopem fluorescencyjnym typu Olypmus KX-41. Z przeprowadzonej analizy wynika, że badane zarodki rozwijały się prawidłowo. Świadczyć o tym może wykształcenie się dwóch przedjadrzy (męskiego i żeńskiego) oraz wyrzucenie drugiego ciała kierunkowego (Rys. 4.29). Badania te potwierdziły, że zaproponowana procedura badawcza nie wpływa negatywnie na oocyty i możliwy jest ich późniejsze prawidłowe zapłodnienie i rozwój.

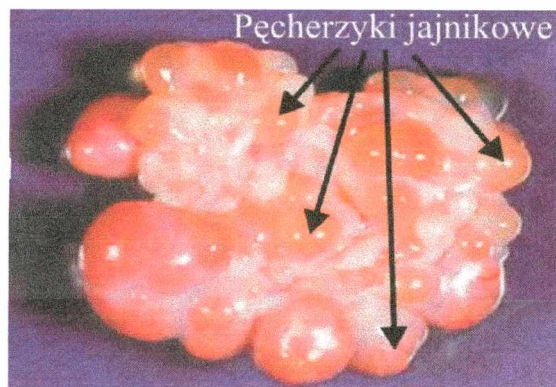


Rysunek 4.29 – Zarodek bydlęcy zapłodniony metodą in vitro – obraz z mikroskopu fluorescencyjnego.

4.3.2 Oocyty trzody chlewnej

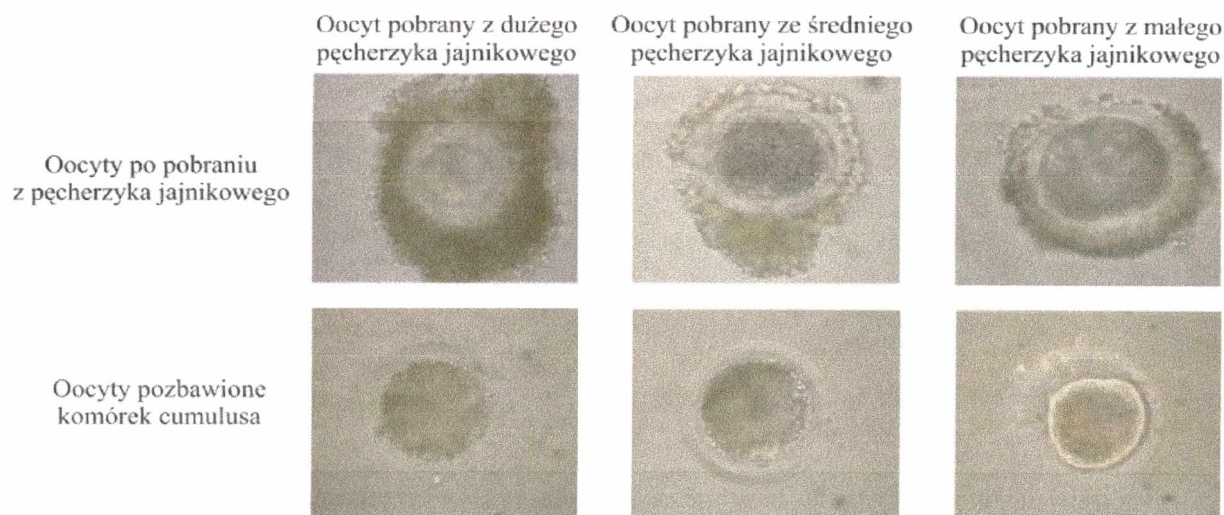
Klasyfikację oocytów trzody chlewnej przeprowadzono, wykorzystując ten sam układ pomiarowy, lab-chipa oraz metodę obróbki sygnału jaką zastosowano dla badań oocytów bydlęcych.

Jajniki trzody chlewnej (Rys. 4.30) zostały odzyskane bezpośrednio po uboju i przetransportowane do laboratorium w ciągu 20 minut w temperaturze 38°C, w 0,9% NaCl. Następnie jajniki umieszczono w 5% roztworze FBS (Foetal Bovine Serum – bydlęca surowica płodowa).



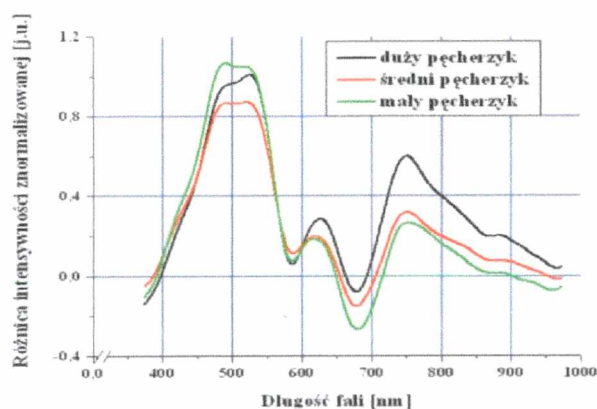
Rysunek 4.30 – Jajnik trzody chlewnej.

Komórki jajowe wraz z otaczającymi je komórkami wzgórka jajonośnego (*cumulus-oocyt complex* - COC) zostały pozyskane z pęcherzyków jajnikowych za pomocą 5 ml strzykawki zakończonej igłą [73]. Oocyty podzielono na trzy grupy jakościowe względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły, zgodnie z metodą opisaną we wcześniejszym rozdziale (str. 11). Zebrane grupy komórek wyszukiwano i oceniano pod lupą stereoskopową firmy Motic, model SMZ168. Oocyty pozbawione zostały otaczających je komórek cumulusa przez przepłukanie w roztworze Hialuronidazy (3%) w czasie 2 minut w temperaturze 38°C (Rys. 4.31) i zbadane w lab-chipie.

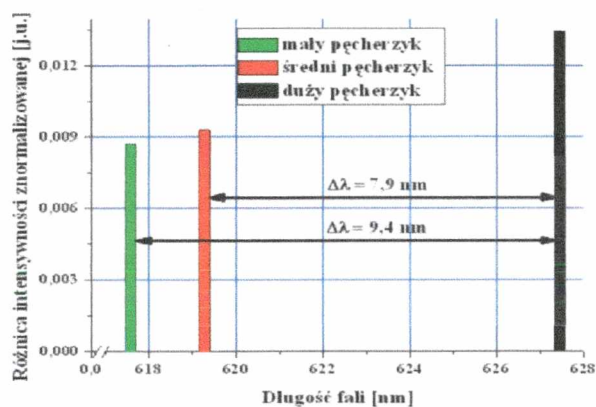


Rysunek 4.31 – Oocyty świńskie pobrane z różnej wielkości pęcherzyków jajnikowych przed i po usunięciu komórek cumulusa.

Przebadano sześć oocytów pochodzących z dużych pęcherzyków jajnikowych i po 10 oocytów z pozostałych dwóch grup. Sposób analizy danych pomiarowych (poszczególne charakterystyki zawarto w Dodatku B) przyjęto taki sam jak dla oocytów bydłowych. Stwierdzono zróżnicowanie sygnałów optycznych, a przede wszystkim zmianę położenia lokalnych maksimum i minimum (Rys. 4.32). Stwierdzono, że dla fali o długości około $\lambda = 620$ nm istnieje zależność pomiędzy grupą oocytu, a położeniem przypadającego tam maksimum lokalnego (Rys. 4.33). Dla oocytów pochodzących z dużego pęcherzyka jajnikowego maksimum lokalne było przesunięte w stronę fal dłuższych [70, 71].



Rysunek 4.32 – Uśrednione charakterystyki różnicy intensywności znormalizowanej dla oocytów pochodzących z różnej wielkości pęcherzyków jajnikowych.



Rysunek 4.33 – Wartość i położenie maksimum lokalnego w zakresie długości fali 620 nm dla trzech grup oocytów.

Tak więc podobnie jak poprzednio, uzyskano znaczącą metrologiczną zależność między położeniem maksimum lokalnego, a jakością badanego oocytu. Jednak przesunięcie maksimum lokalnego pomiędzy danymi grupami było również stosunkowo małe. Tym samym potwierdzono ponownie, że metoda ta – sprawdzająca się w warunkach laboratoryjnych – nie będzie mogła być stosowana w warunkach hodowlanych.

4.3.3 Analiza wyników

W opisywanym w tej części pracy cyklu badawczym skonstruowano układ pomiarowy, wykorzystujący technikę lab-on-a-chip, umożliwiający przeprowadzenie badań spektrofotometrycznych oocytów bydłowych i trzody chlewnej. Przeprowadzone pomiary wykazały, że wykonany lab-chip działa poprawnie, a układ pomiarowy umożliwia stosunkowo łatwe operowanie oocytami i szybkie określenie charakterystyk spektralnych. Wykorzystany do badań materiał biologiczny został przygotowany zgodnie ze stosowanymi obecnie procedurami pozyskiwania oocytów oraz podzielony na odpowiednie klasy/grupy wg wcześniej opisanych klasycznych metod weterynaryjnych. Badaniom poddano oocyty bydłowe

podzielone na cztery klasy jakościowe oraz oocyty trzody chlewnej podzielone na trzy grupy względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły. Pomiar charakterystyk spektralnych wykonany został w środowisku zapewniającym prawidłowy rozwój i przechowywanie oocytów. Wszystkie operacje z udziałem materiału biologicznego, opisane w tym rozdziale, zostały przeprowadzone pod nadzorem uprawnionych do tego osób ze środowiska weterynaryjnego.

Zastosowano własną metodę obróbki sygnału, w której wykorzystano pomiar charakterystyk spektralnych oocytów „zawieszonych” w medium oraz samego medium. Charakterystyki te „odejmowano” następnie od siebie, tak by uzyskać sygnał metrologiczny pochodzący tylko z badanego oocytu. W dalszej kolejności określone zostały charakterystyczne przesunięcia widmowe wybranych punktów krzywych spektralnych. Wykazano, że dla oocytów bydlęcych istnieje zależność pomiędzy klasą morfologiczną badanej komórki, a położeniem minimum lokalnego w obrębie długości fali $\lambda = 580$ nm. Oocyty pochodzące z gorszych klas jakościowych charakteryzowały się przesunięciem minimum lokalnego w stronę fal dłuższych. Podobna analiza wykonana dla oocytów trzody chlewnej wykazała, że taka zależność istnieje również w okolicy długości fali $\lambda = 620$ nm. Zauważono, że oocyty pochodzące z dużych pęcherzyków jajnikowych charakteryzowały się maksimum lokalnym przesunięciem w stronę fal dłuższych.

Przeprowadzono testy mające na celu potwierdzenie nieinwazyjności zaproponowanej procedury badawczej. Stwierdzono, że zastosowane pomiary optyczne nie wpłynęły na strukturę biologiczną oocytów, o czym świadczyć mogą między innymi prawidłowo rozwijające się zarodki bydlęce zapłodnione metodą *in vitro*.

Podsumowując można stwierdzić, że:

- Zastosowana analiza spektralna metodą „pików” pozwala na wstępną ocenę jakości oocytów należących do danych klas/grup jakościowych. Jednak różnice pomiędzy poszczególnymi klasami/grupami są bardzo małe i wahają się na poziomie od 1,5 nm do 9,4 nm, co jest na granicy możliwości pomiarowych przenośnego, miniaturowego spektrometru firmy OceanOptics.
- Końcowa analiza porównawcza wykonywana jest dla wartości średnich obliczonych dla poszczególnych klas/grup. Powoduje to, że uzyskane dane umożliwiają tylko charakteryzację między grupami/klasami, a co za tym idzie niemożliwa jest ocena pojedynczej komórki. Nie jest to jednak szczególnie negatywną cechą, albowiem w

postępowaniu hodowlanym często wykonuje się porównawczą analizę jakości partii oocytów/zarodków przeznaczonych do transferu.

- Opisana powyżej metoda „pików” nie jest możliwa do wykorzystania przy ocenie cennego materiału biologicznego jakim są zarodki ginących zwierząt lub szczególnie cennych linii hodowlanych np. krów, gdzie bardzo ważne jest indywidualne podejście do badanej komórki.

Tak więc, wyniki tu uzyskane nie mogą być podstawą do rozstrzygnięcia czy zastosowana tu optyczna metoda klasyfikacji jakościowej oocytów z wykorzystaniem lab-chipa jest prawidłowa. Dlatego też w dalszych badaniach autora, podjęto próbę klasyfikacji wykorzystującą absorbcję optyczną w zakresie VIS/NIR. Jest to nawiązanie do ogólnych wniosków przedstawionych przez środowisko weterynaryjne, że oocyty, które w całości i równomiernie wypełnione są cytoplazmą oraz charakteryzują się w obrazie mikroskopowym jaśniejszym kolorem, mogą dawać lepszy efekt hodowlany [74].

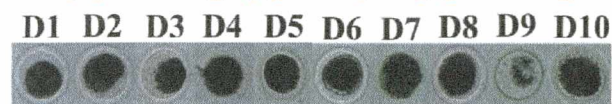
4.4 Metoda absorpcyjna – pole jakości – testy laboratoryjne

Do badań wykorzystano ten sam lab-chip oraz stanowisko pomiarowe, których użyto w trakcie badań spektrofotometrycznych. Z tym, że w przedstawionym poniżej cyklu doświadczeń, skoncentrowano się na badaniu zależności występującej między absorbcją poszczególnego oocytu, a jego jakością. Badaniom poddano oocyty trzody chlewnej.

4.4.1 Oocyty trzody chlewnej

Badano 30 oocytów trzody chlewnej podzielonych na trzy grupy względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły. Oocyty zostały przygotowane według procedury opisanej wcześniej (str. 50). W każdej z badanych grup znajdowało się po 10 komórek (Rys. 4.34) - przyporządkowanie D1 oznacza oocyt numer 1 pobrany z dużego pęcherzyka jajnikowego.

Oocyty z dużego pęcherzyka jajnikowego



Oocyty ze średniego pęcherzyka jajnikowego

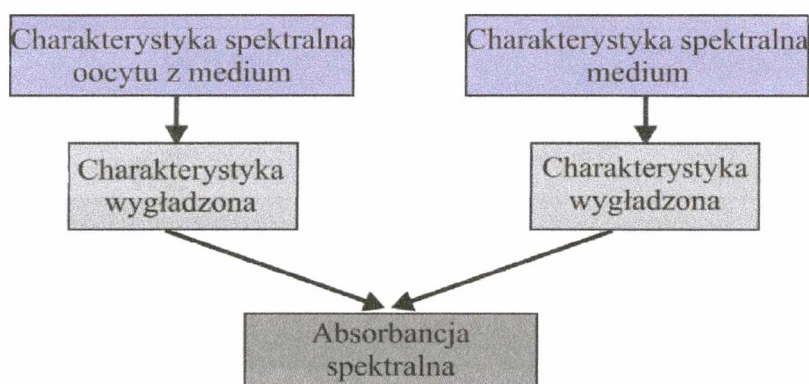


Oocyty z małego pęcherzyka jajnikowego



Rysunek 4.34 – Klasyfikacja oocytów względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodzily.

Oocyty zostały scharakteryzowane pojedynczo w lab-chipie wg sposobu przedstawionego na rysunku 4.35.

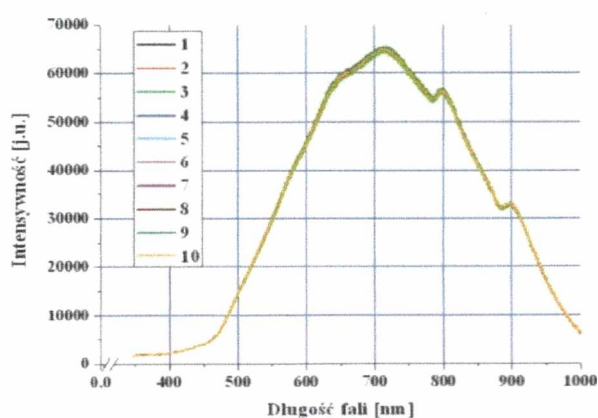


Rysunek 4.35 – Schemat analizy danych pomiarowych.

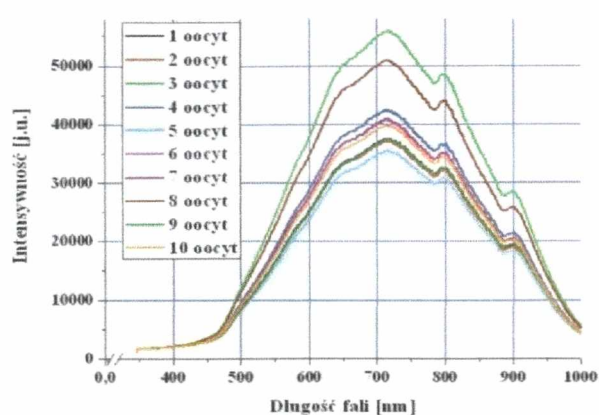
W pierwszej kolejności zmierzone zostały charakterystyki spektralne medium - PBS (Rys. 4.36) oraz oocytu „zawieszonego” w medium (Rys. 4.37), które następnie zostały wygładzone z wykorzystaniem szybkiej transformaty Fouriera o liczbie próbek 100 (Rys. 4.38, Rys. 4.39). Kolejnym etapem było określenie absorbancji A poszczególnego oocytu wg wzoru:

$$A = \log \frac{I_M(\lambda)}{I_O(\lambda)} \quad (4.1)$$

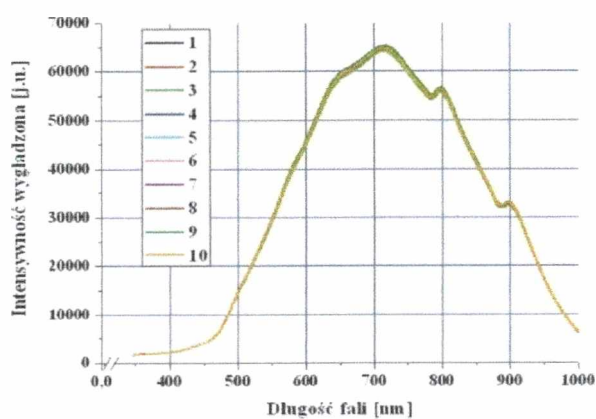
gdzie $I_M(\lambda)$ to natężenie światła po przejściu przez celę pomiarową wypełnioną medium, a $I_O(\lambda)$ to natężenie światła po przejściu przez celę pomiarową wypełnioną medium z badaną komórką. Krzywe ilustrujące kolejne etapy obróbki danych, otrzymano dla oocytów pochodzących z dużych pęcherzyków jajnikowych, przedstawiono na rysunkach 4.36 ÷ 4.39. Taki sam sposób analizy zastosowano dla pozostałych grup jakościowych, a szczegółowe dane zawarto w Dodatku C.



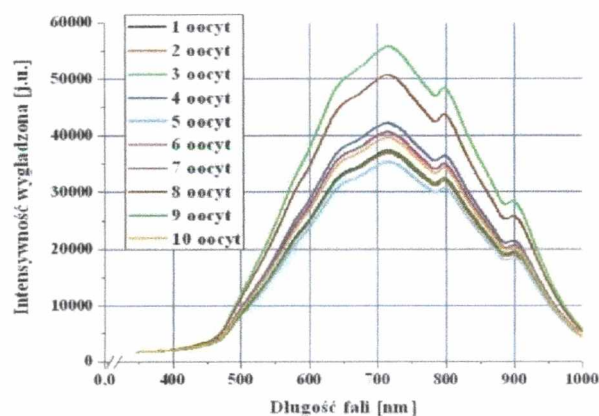
Rysunek 4.36 – Charakterystyki intensywności medium.



Rysunek 4.37 – Charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów z dużego pęcherzyka jajnikowego „zawieszonych” w medium.

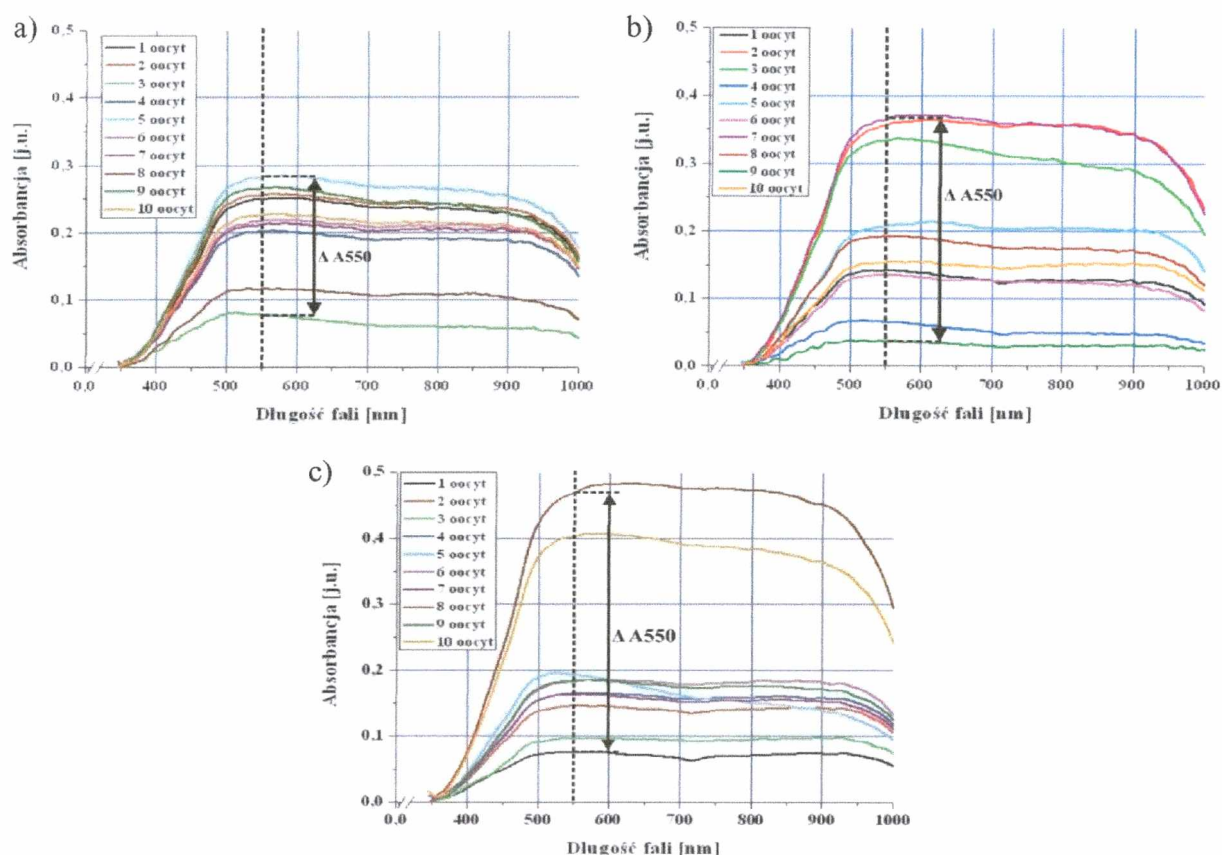


Rysunek 4.38 – Wygładzone charakterystyki intensywności medium.



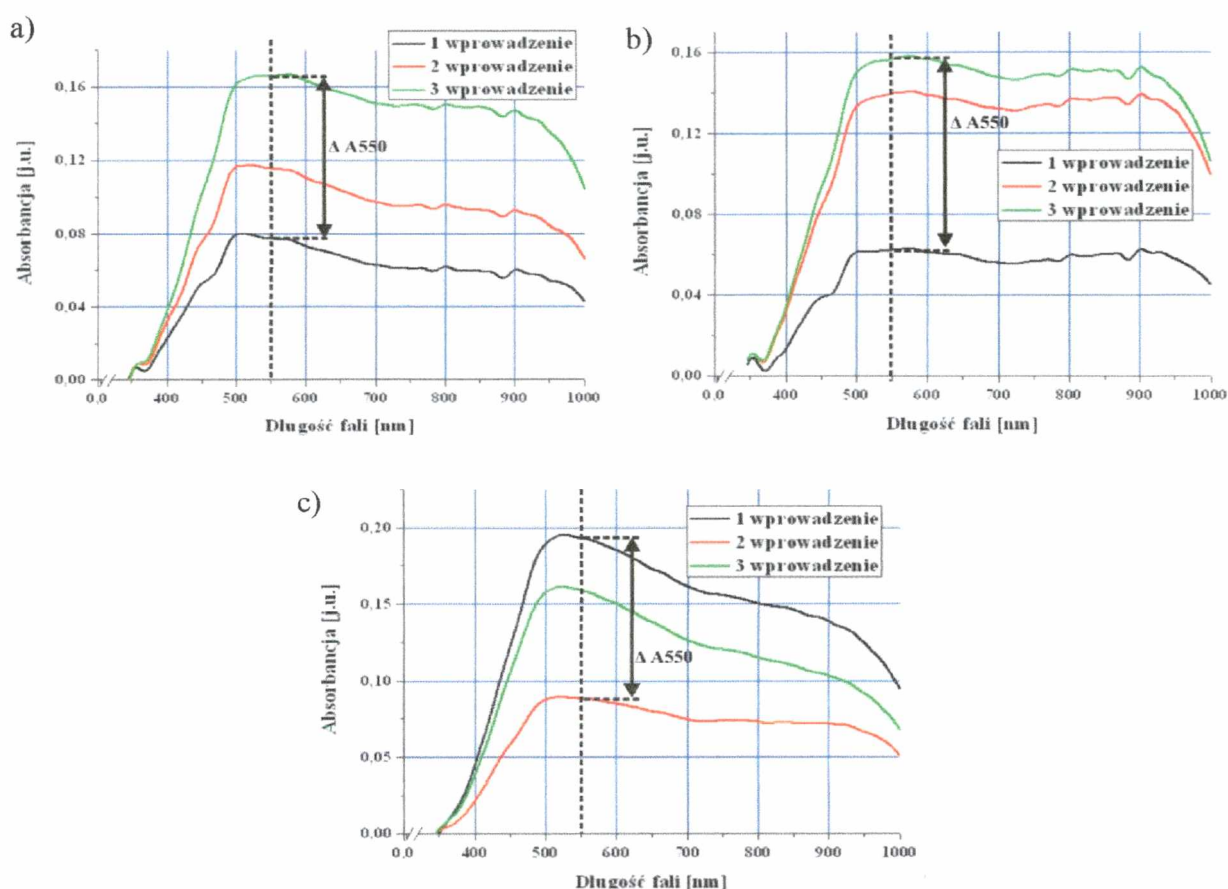
Rysunek 4.39 – Wygładzone charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów z dużego pęcherzyka jajnikowego „zawieszonych” w medium.

Zauważono, że w obrębie danej grupy jakościowej występował znaczny rozrzut absorpcji (Rys. 4.40). Szczegółową analizę rozrzutu absorpcji, dla każdej z badanych grup, przeprowadzono dla fali o długość $\lambda = 550$ nm, leżącej w okolicach maksimum. Absorbancja oocytów pochodzących z dużych pęcherzyków jajnikowych mieściła się w zakresie od 0,077 do 0,281 ($\Delta A_{550D} = 0,204$), oocytów ze średnich pęcherzyków od 0,036 do 0,365 ($\Delta A_{550S} = 0,329$), a pochodzących z małych jajników od 0,075 do 0,469 ($\Delta A_{550M} = 0,394$). Stwierdzono, że największy rozrzut absorpcji występuje dla oocytów pochodzących z małych pęcherzyków jajnikowych.



Rysunek 4.40 – Charakterystyki absorpcji oocytów trzody chlewnej podzielone względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły: a) duży, b) średni, c) mały.

W celu znalezienia przyczyny takiego stanu rzeczy, losowo wybrane oocyty zostały pojedynczo wprowadzone do komory pomiarowej kilkakrotnie. Stwierdzono, że wartość absorpcji dla tego samego oocytu wprowadzonego trzykrotnie do celi pomiarowej, różniła się znacznie od siebie (Rys. 4.41). W tym przypadku również największą różnicę wartości maksymalnej absorpcji zaobserwowano dla oocytu pobranego z małego pęcherzyka jajnikowego i wynosiła ona $\Delta A_{550_{M5}} = 0,105$. Dla oocytów z pozostałych grup różnica ta wynosiła odpowiednio: średni $\Delta A_{550_{S10}} = 0,094$ oraz duży $\Delta A_{550_{D3}} = 0,088$.

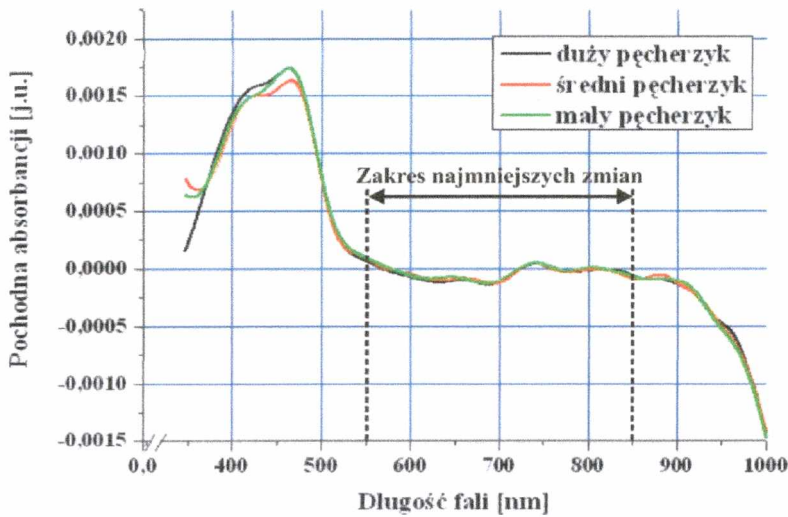


Rysunek 4.41 – Charakterystyki absorpcji pojedynczych oocytów trzody chlewnej pochodzących z: a) dużego pęcherzyka, oocyt nr 3, b) średniego pęcherzyka, oocyt nr 10, c) małego pęcherzyka, oocyt nr 5, wprowadzanych trzykrotnie do celi pomiarowej.

Może to być spowodowane wieloma czynnikami. Pierwszy z nich to prawdopodobnie niejednorodność oocytów (ziarnistość cytoplazmy). Kolejnym jest umiejscowienie w komórce cytoplazmy, która nie zawsze przyjmowała postać kulistą w centrum oocytu, co mogło skutkować przypadkową jej pozycją w stosunku do drogi optycznej. Następnym czynnikiem mogła być głębokość celi pomiarowej w lab-chipie. Kanał cieczowy w obszarze drogi optycznej był większy o ok. 10 - 15 μm od średnicy badanej komórki, co mogło spowodować niepowtarzalne umiejscowienie oocytu w stosunku do osi optycznej przy każdym pomiarze.

Ze względu na uzyskane duże rozrzuty absorpcji znalezienie bezpośredniej korelacji pomiędzy wartością absorpcji, a cechami morfologicznymi badanej komórki nie powiodło się. Oznacza to, że nie można było wykorzystać bezpośrednio pomiarów absorpcyjnych do oceny jakościowej oocytów. Dlatego należało poszukać innych zależności, które jednoznacznie umożliwiłyby taką klasyfikację.

W pierwszej kolejności uśredniono charakterystyki absorpcji każdej z badanych grup. Następnie otrzymane charakterystyki wygładzono z wykorzystaniem szybkiej transformaty Fouriera o zadanej liczbie próbek 100. Po czym obliczona została pochodna uśrednionej absorpcji dla każdej z badanych grup (Rys. 4.42). Zauważono, że w zakresie długości fal od 550 nm do 850 nm uzyskane charakterystyki są płaskie, co świadczy o najmniejszych zmianach absorpcji w tym zakresie.

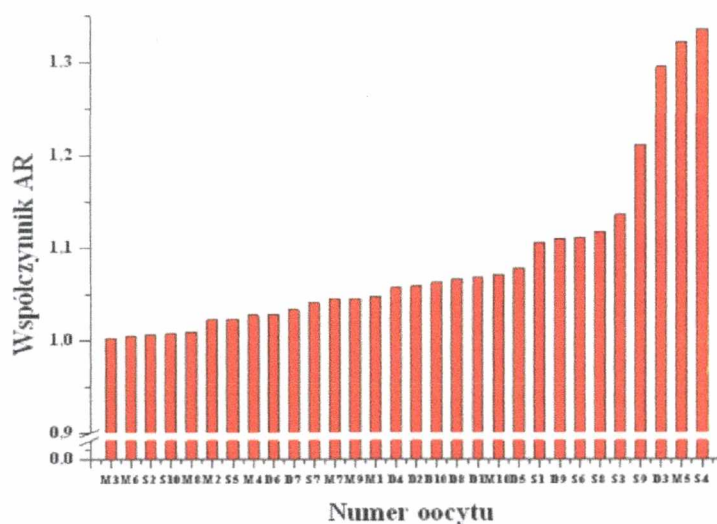


Rysunek 4.42 – Pochodna absorpcji dla oocytów pochodzących z trzech grup jakościowych.

Dla takiego zakresu długości fal wyznaczono współczynnik AR – Absorbance Ratio, osobno dla każdego z badanych oocytów:

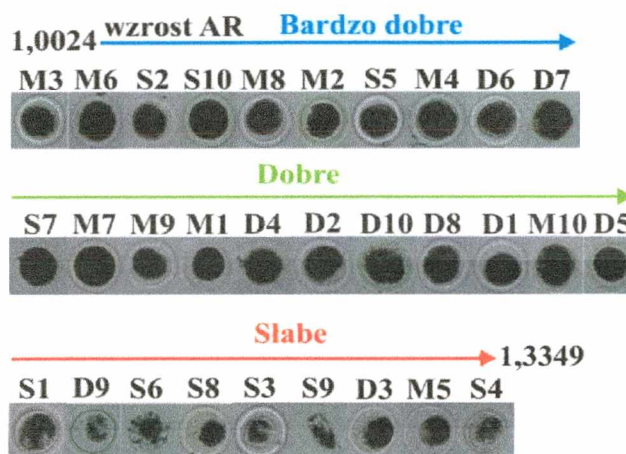
$$AR = \frac{A_{550}}{A_{850}} \tag{4.2}$$

gdzie A_{550} to wartość absorpcji dla długości fali $\lambda = 550$ nm, a A_{850} to wartość absorpcji dla długości fali $\lambda = 850$ nm. Stwierdzono, że nie ma bezpośredniej korelacji pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych, a współczynnikiem AR (Rys. 4.43).



Rysunek 4.43 – Wartość współczynnika AR dla badanych oocytów.

Jednakże, porównanie współczynnika AR z obrazami badanych oocytów wykazało, że oocyty bardziej zdegenerowane charakteryzowały się wyższym współczynnikiem (Rys. 4.44). Na podstawie tych wyników, po konsultacjach weterynaryjnych wyróżniono trzy nowe klasy badanych oocytów świńskich: bardzo dobre – charakteryzujące się współczynnikiem AR mniejszym od 1,04, dobre – zakres AR od 1,04 do 1,09, oraz słabe – AR powyżej 1,09.

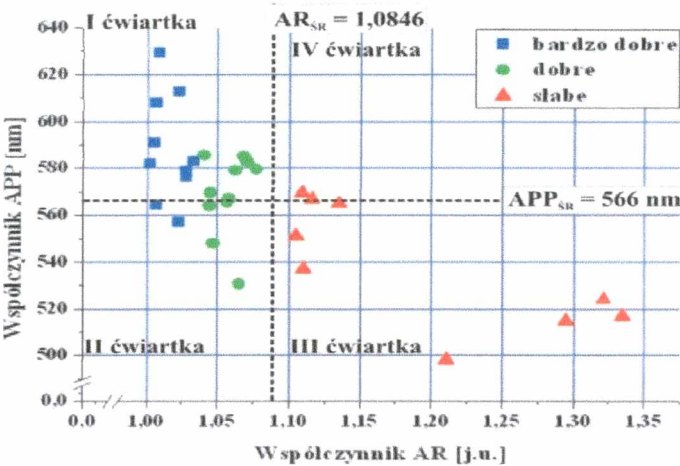


Rysunek 4.44 – Zestawienie obrazów oocytów względem rosnącego współczynnika AR.

W badanej grupie oocytów średnia wartość współczynnika (AR_{SR}) wynosiła 1,0846. Niższym współczynnikiem AR od średniej charakteryzowało się 70% przebadanych oocytów, w tym 38% stanowiły oocyty pobrane z dużych pęcherzyków jajnikowych, 19% ze średnich, a 43% z małych.

Zauważono ponadto, że różnice morfologiczne i jakość oocytów można powiązać z długością fali, dla której występuje maksymalna absorbancja. Tą długość fali nazwano

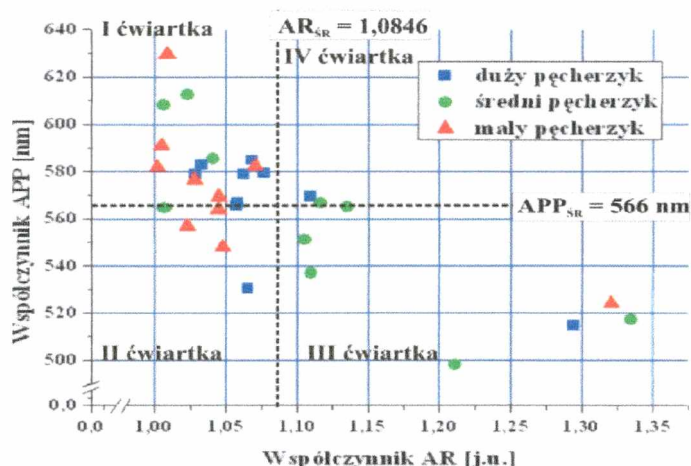
współczynnikiem APP – Absorbance Peak Position, a następnie wyznaczono jego wartość średnią APP_{SR} , która wynosiła 566 nm. Powyżej średniej znajdowało się 17 oocytów, z czego oocyty bardzo dobre stanowiły 47,1%, dobre 41,15%, słabe 11,75%. Następnie powiązano ze sobą współczynnik AR i APP przez zobrazowanie położenia poszczególnych oocytów w układzie kartezjańskim (Rys. 4.45). Taki sposób przedstawiania nazwano polem jakości. Pole to podzielono względem średnich wartości współczynnika AR_{SR} i APP_{SR} na cztery ćwiartki.



Rysunek 4.45 – Pole jakości oocytów podzielonych na nowo wyznaczone klasy jakościowe.

Stwierdzono, że w I ćwiartce znajdowało się około 50% zbadanych oocytów i były to komórki charakteryzujące się kulistą i jednorodną cytoplazmą oraz prawidłowym rozwojem. Oocyty te zakwalifikowano jako bardzo dobre i dobre. Ćwiartka II zawierała również oocyty bardzo dobre i dobre, ale w mniejszej ilości. Oocyty zdegenerowane, które charakteryzowały się słabą oceną parametrów morfologicznych znajdowały się w III i IV ćwiartce. Wyniki badań zostały opublikowane m. in. w: [75].

W celu porównania nowej metody klasyfikacji z dotychczas stosowanym podziałem weterynaryjnym wykreślone zostało pole jakości z zastosowaniem wyznaczonych współczynników AR i APP, ale z zastosowaniem klasycznego podziału oocytów na grupy względem wielkości pęcherzyka jajnikowego (Rys. 4.46).



Rysunek 4.46 – Pole jakości oocytów podzielonych względem wielkości pęcherzyka jajnikowego.

Stwierdzono, że nie można jednoznacznie powiązać wysokiej (wg metody klasycznej) jakości oocytu z jego ułożeniem tylko w I ćwiartce. Znalazły się tam również oocyty, które wg metod weterynaryjnych klasyfikowano jako słabe jakościowo. Oznacza to, że nowa metoda klasyfikacji, opisana tu jako pole jakości, może rozwiązać sprzeczność jaką obserwuje się w dotychczas stosowanych jakościowych metodach klasyfikacji. Wiadomo bowiem, że przy pełnym transferze embrionów, bardzo dobre wyniki hodowlane otrzymano również dla oocytów klasyfikowanych jako złe.

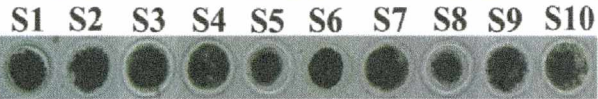
Wstępna weryfikacja metody

W celu potwierdzenia metody pola jakości wykonano pomiar kolejnej partii oocytów trzody chlewnej. Badane oocyty podzielone zostały również na trzy grupy jakościowe względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły, zgodnie z przedstawionymi wcześniej procedurami (str. 50). Przebadano 8 oocytów pochodzących z dużego pęcherzyka jajnikowego, natomiast w pozostałych 2 grupach było po 10 badanych komórek (Rys. 4.47).

Oocyty z dużego pęcherzyka jajnikowego



Oocyty ze średniego pęcherzyka jajnikowego

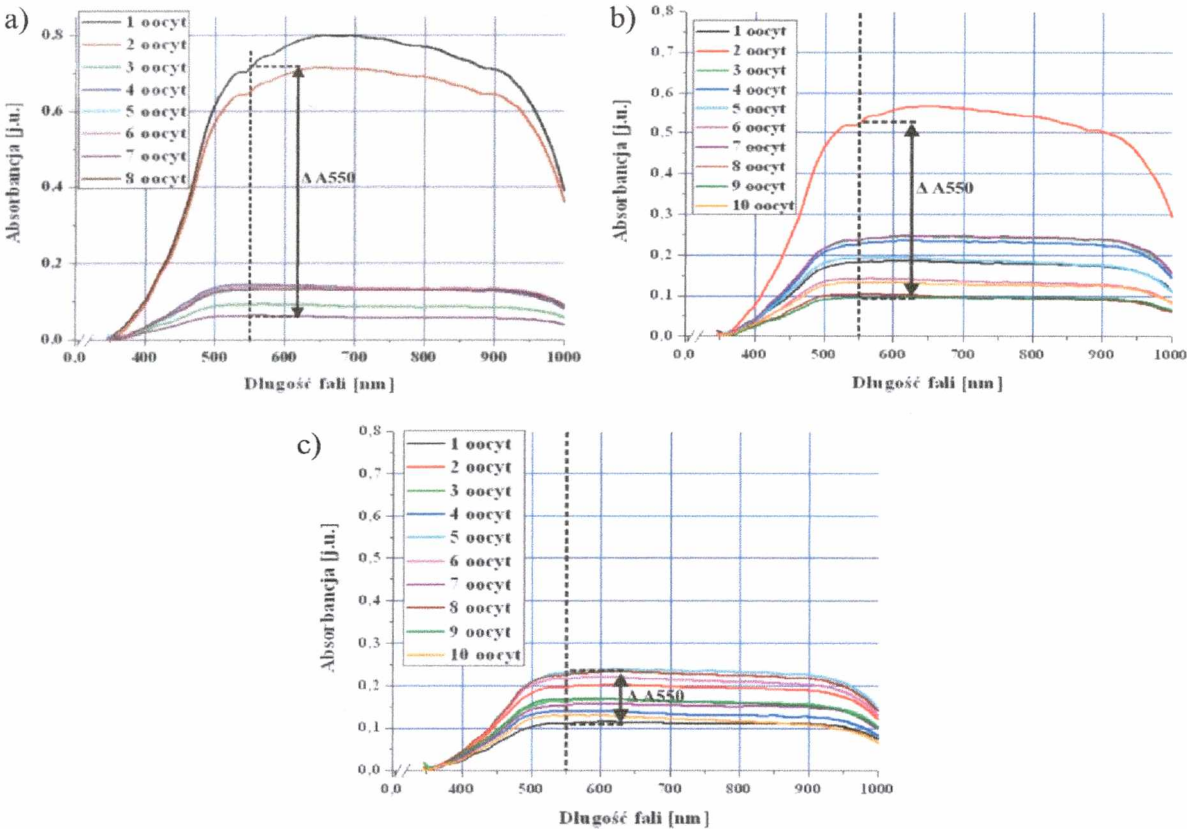


Oocyty z małego pęcherzyka jajnikowego



Rysunek 4.47 – Zestawienie obrazów oocytów względem wielkości pęcherzyka jajnikowego z którego pochodziły.

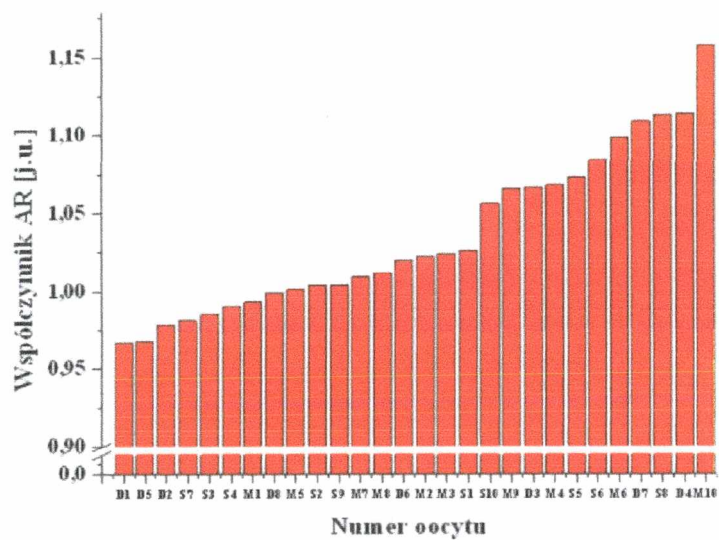
Podobnie jak poprzednio (str. 55) najpierw zostały zebrane charakterystyki medium oraz oocytów „zawieszonych” w medium i poddane wygładzeniu – szczegółowe dane w Dodatku D. Następnie wykreślono zależność absorbancji (zgodnie z 4.1) badanych oocytów w funkcji długości fali (Rys. 4.48).



Rysunek 4.48 – Charakterystyki absorbancji oocytów trzody chlewnej podzielone względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły: a) duży, b) średni, c) mały.

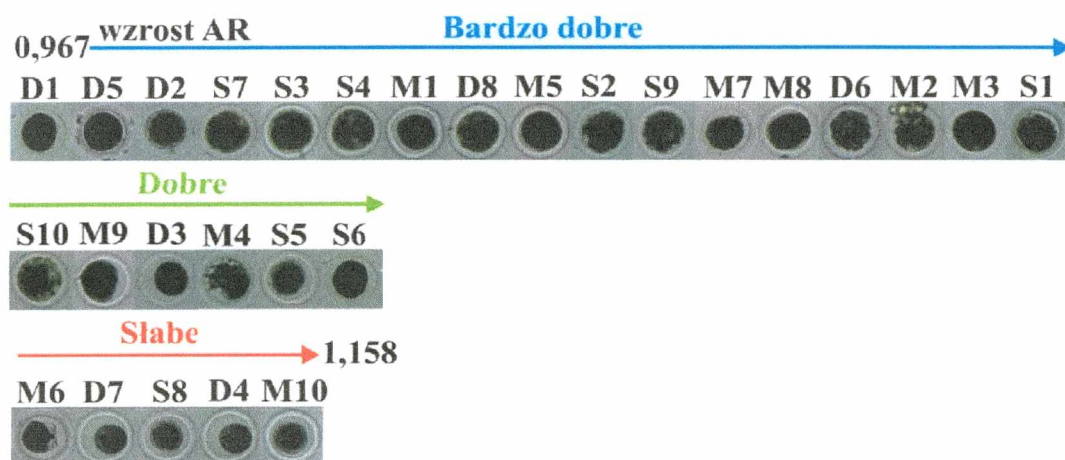
Do szczegółowej analizy wartości absorpcji wybrano ponownie długość fali $\lambda = 550$ nm. Stwierdzono, że dla oocytów pochodzących z dużych pęcherzyków jajnikowych wartość absorpcji mieściła się w zakresie od 0,062 do 0,712 ($\Delta A_{550D} = 0,65$), dla średnich od 0,094 do 0,523 ($\Delta A_{550S} = 0,429$), dla małych od 0,109 do 0,228 ($\Delta A_{550M} = 0,119$).

Podobnie jak poprzednio obliczono współczynnik AR zgodnie ze wzorem 4.2 i przyporządkowano do poszczególnego oocytu (Rys. 4.49).



Rysunek 4.49 – Wartość współczynnika AR dla badanych oocytów.

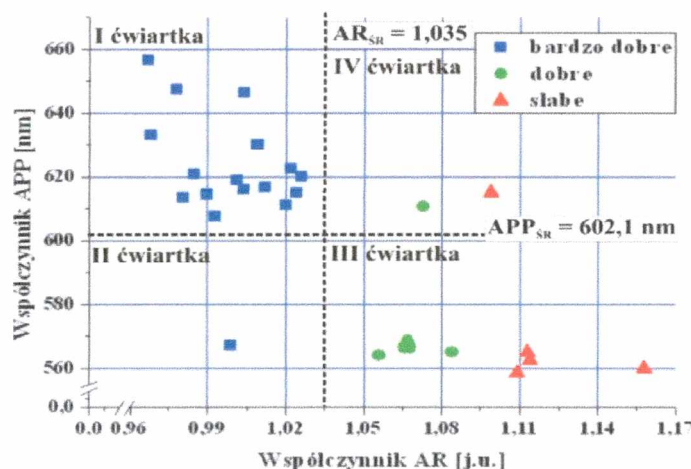
Kolejnym krokiem było przyporządkowanie współczynnika AR do morfologicznego obrazu poszczególnych oocytów (Rys. 4.50). Ponownie zaobserwowano, że oocyty charakteryzujące się wyższym współczynnikiem AR były gorszej jakości. Na podstawie porównania cech morfologicznych oraz wyznaczonego współczynnika zakwalifikowano oocyty świnińskie do trzech klas jakościowych: bardzo dobre (współczynnik AR mniejszy od 1,04), dobre (AR w zakresie od 1,04 do 1,09), słabe (AR powyżej 1,09). Zastosowano taki sam podział na nowe klasy względem wartości współczynnika AR jak w trakcie przeprowadzania pierwszej analizy.



Rysunek 4.50 – Zestawienie obrazów oocytów względem rosnącego współczynnika AR.

Średni współczynnik AR_{SR} wynosił 1,035 i był on niższy od średniej uzyskanej w poprzednich pomiarach, co może świadczyć o ogólnie lepszej jakości badanej partii oocytów. Wszystkie oocyty charakteryzujące się współczynnikiem niższym od średniej należały do klasy bardzo dobrej i stanowiły około 60% przebadanych komórek.

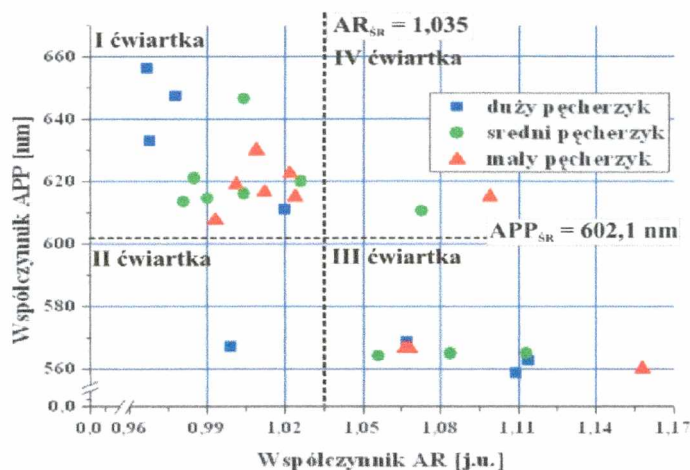
W następnym etapie analizy wyznaczono drugi współczynnik APP, który mieścił się w zakresie od 558,5 nm do 656,5 nm. Średni współczynnik dla zmierzonych oocytów wynosił $APP_{SR} = 602,1$ nm. Oocyty powyżej średniej stanowiły 64,3% wszystkich zbadanych komórek, z czego bardzo dobrych było 88,8%, dobrych 5,6%, słabych 5,6%. Wykreślono ponownie pole jakości i podzielono je na cztery ćwiartki (Rys. 4.51).



Rysunek 4.51 – Pole jakości oocytów podzielonych na nowo wyznaczone klasy jakościowe.

Stwierdzono, że w I ćwiartce znalazły się tylko oocyty zakwalifikowane do grupy bardzo dobrej. W ćwiartce III i IV znalazły się oocyty, które zostały zakwalifikowane jako dobre lub słabe.

Wykreślono drugie pole jakości z podziałem na cztery ćwiartki, które wykorzystywało stosowaną do tej pory klasyfikację oocytów względem wielkości pęcherzyka jajnikowego (Rys. 4.52).



Rysunek 4.52 – Pole jakości oocytów podzielonych względem wielkości pęcherzyka jajnikowego.

Ułożenie oocytów w polu jakości podobnie jak poprzednio tylko częściowo odpowiada ich „klasycznej” jakości. W I ćwiartce znajdowało się 29,4% oocytów pobranych z dużych pęcherzyków jajnikowych, 35,3% ze średnich i 35,3% z małych. Natomiast ćwiartkę III charakteryzowały oocyty prawie w równym stopniu pochodzące z trzech klasycznych grup jakościowych.

4.4.2 Analiza wyników

Badania przeprowadzone w tej części pracy doprowadziły do opracowania nowej metody oceny jakości oocytów, wykorzystującej badania absorbancji poszczególnych oocytów w zakresie światła VIS/NIR. W pierwszej kolejności każda partia badanego materiału (oocyty trzody chlewnej) została podzielona na trzy grupy jakościowe wg wielkości pęcherzyków jajnikowych. Następnie zmierzono, stosując opisywany wcześniej lab-chip i układ pomiarowy, charakterystyki spektralne oocytów i wykreślono ich absorbancję. Stwierdzono, że w zakresie widmowym 550 ÷ 850 nm pochodna absorbancji w funkcji długości fali jest praktycznie stała. Ten zakres widmowy został uznany za obszar, w którym absorbancja słabo zależy od długości fali i może on charakteryzować jakość oocytów. Bardziej szczegółowa analiza danych wyklucza bezpośrednie powiązanie absorbancji z „klasyczną” jakością oocytów. Dlatego zaproponowano nową metodę oceny pojedynczego oocytu na podstawie

badania charakterystyk absorpcji, z uwzględnieniem oceny morfologicznej komórki, którą nazwano metodą pola jakości. W metodzie tej wyznaczono dwa współczynniki:

- AR – czyli, stosunek wartości absorpcji dla długości fali $\lambda = 550$ nm do wartości absorpcji dla długości fali $\lambda = 850$ nm,
- APP – czyli, długość fali dla maksymalnej wartości absorpcji.

Zaobserwowano bardzo dobrą korelację między wyznaczonym współczynnikiem AR, a cechami morfologicznymi badanych komórek. Stwierdzono, że im jest niższa wartość współczynnika AR tym bardziej homogeny jest oocyt, niezależnie od wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodził. Następnie wykreślono tzw. pole jakości w układzie kartezjańskim, gdzie rzędną był współczynnik APP, a odciętą AR. Następnie podzielono pole jakości na cztery części względem średnich wartości wyznaczonych współczynników. Stwierdzono, że w I ćwiartce zawsze znajdowały się oocyty zakwalifikowane jako bardzo dobre. Natomiast w ćwiartce III znajdowały się oocyty słabe. Oocyty dobre mieściły się w większości w ćwiartce I lub III, w zależności od jakości badanej partii materiału.

Ocenę jakościową, wg metody opracowanej w tej części pracy, przeprowadzono dla dwóch niezależnie pobranych partii oocytów. Otrzymane wyniki powiązano z klasyczną oceną jakościową przez wykreślenie pola jakości, na którym uwzględniono powszechnie uznawane klasy. Stwierdzono, że w ćwiartce I znalazły się zarówno dobre jak i złe (wg klasycznej metodologii oceny jakościowej) oocyty. Oznacza to, że metoda pola jakości może lepiej uwzględniać korzystne cechy oocytów, co prowadzić może do lepszej oceny ich jakości.

Jest oczywiste, że bez potwierdzenia hodowlanego wnioski powyższe nie są całkowicie pewne. Dlatego też w dalszej części pracy przeprowadzono serię klasyfikacji materiału rozrodczego wg pola jakości i porównano wyniki kwalifikacji z efektem hodowlanym.

4.5 Podsumowanie

Zaprojektowano, wykonano oraz zbadano właściwości lab-chipa przeznaczonego do pomiarów oocytów bydłych i trzody chlewnej. Jako materiał do konstrukcji chipa zastosowano krzem oraz szkło ze względu na wysoką odporność chemiczną, bioobojętność oraz możliwość precyzyjnego łączenia tych dwóch podłoży. Wytrawione w podłożu krzemowym metodą DRIE kanały cieczowe i montażowe dla światłowodów były dopasowane rozmiarem do wymiarów badanej komórki. Konstrukcja chipa zapewniała

możliwość wprowadzenia/wyprowadzenia badanego materiału biologicznego do/z celi pomiarowej przy pomocy precyzyjnej pipety laboratoryjnej bez naruszenia stanu badanej komórki. Wykonana została również pułapka mechaniczna umożliwiająca unieruchomienie oocytu w trakcie prowadzenia pomiarów. Integracja światłowodów szklanych (125/100 μm) z mikrokanalem cieczowym typu S oraz zastosowanie jako źródła światła lampy halogenowej i spektrofotometru jako detektora, pozwoliły na przeprowadzenie pomiarów charakterystyk spektralnych w zakresie promieniowania światła widzialnego. Zostały zaproponowane dwa postępowania obróbki sygnału wykorzystujące metodę pików oraz metodę pola jakości.

1. Ocena jakości oocytów bydłych i trzody chlewnej metodą pików pozwoliła zauważyć, że istnieje pewna zależność pomiędzy klasą/grupą morfologiczną, a uzyskanymi charakterystykami spektralnymi. W tej analizie charakterystyczną długością fali dla oocytów bydłych okazała się $\lambda = 580 \text{ nm}$, natomiast dla oocytów trzody chlewnej $\lambda = 620 \text{ nm}$. Jednak różnice pomiędzy długościami fali charakteryzującymi poszczególne grupy/klasy okazały się być niewielkie, co ograniczyło wiarygodność tej metody. Kolejnym minusem metody pików jest fakt, że analizie końcowej poddane zostały wartości średnie uzyskanych charakterystyk spektralnych z poszczególnych klas/grup. Powoduje to, że nie uzyskano oceny jakości pojedynczej komórki. Wszystkie te czynniki powodują, że przedstawiona metoda może być wykorzystywana jedynie do statystycznych porównań laboratoryjnych, natomiast jej zastosowanie w warunkach hodowlanych jest niemożliwe.
2. Metoda pola jakości opierała się na powiązaniu absorbancji badanej komórki z jej cechami morfologicznymi. W metodzie tej wprowadzono dwa współczynniki AR oraz APP, które pozwoliły na wykreślenie pola jakości badanych oocytów i prawidłową ich klasyfikację.

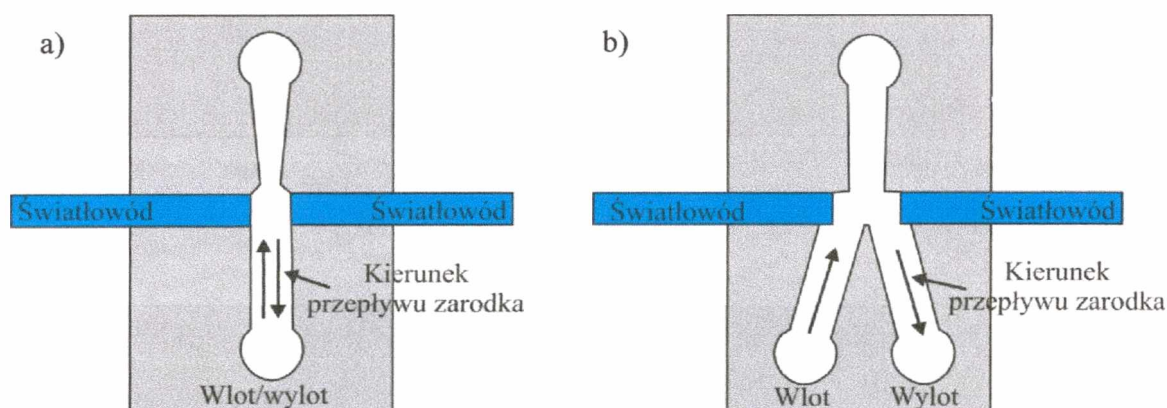
Szczególnie obiecująca jest parametryzacja jakościowa oocytów wg metody pola jakości, która jak się wydaje powinna umożliwić badania jakościowe również w transferze i hodowli, co stało się tematem rozważań następnej części tej pracy.

5 Lab-chip II z detekcją optyczną do oceny jakości zarodków zwierząt hodowlanych

Dotychczasowe badania, z wykorzystaniem I wersji lab-chipa, na oocytach zwierząt hodowlanych pozwoliły stwierdzić, że możliwa jest parametryczna ocena jakości komórek rozrodczych. Jednak testem przydatności instrumentarium i nowo opracowanej metody pola jakości będą wyniki otrzymane z transferu zarodków. Specyfiką badania zarodków zwierząt gospodarczych w trakcie transferu jest fakt wykonywania klasyfikacji jakościowej w warunkach hodowlanych (obora, chlewnie). Dlatego konieczne było zoptymalizowanie konstrukcji lab-chipa i konsolidacja instrumentarium, tak aby było możliwe przetransportowanie systemu pomiarowego z laboratorium do obory i przeprowadzenie tam wiarygodnych badań jakości.

5.1 Projekt, technologia i układ pomiarowy

Wytworzono i przetestowano dwie konstrukcje lab-chipów. Pierwsza z nich umożliwiła wprowadzanie i wyprowadzanie badanej komórki różnymi kanałami, a w chipie zastosowano zawory Tesli. Druga konstrukcja zapewniła wprowadzanie i wyprowadzanie zarodka tym samym kanałem cieczowym – lab-chip prosty (Rys. 5.1).

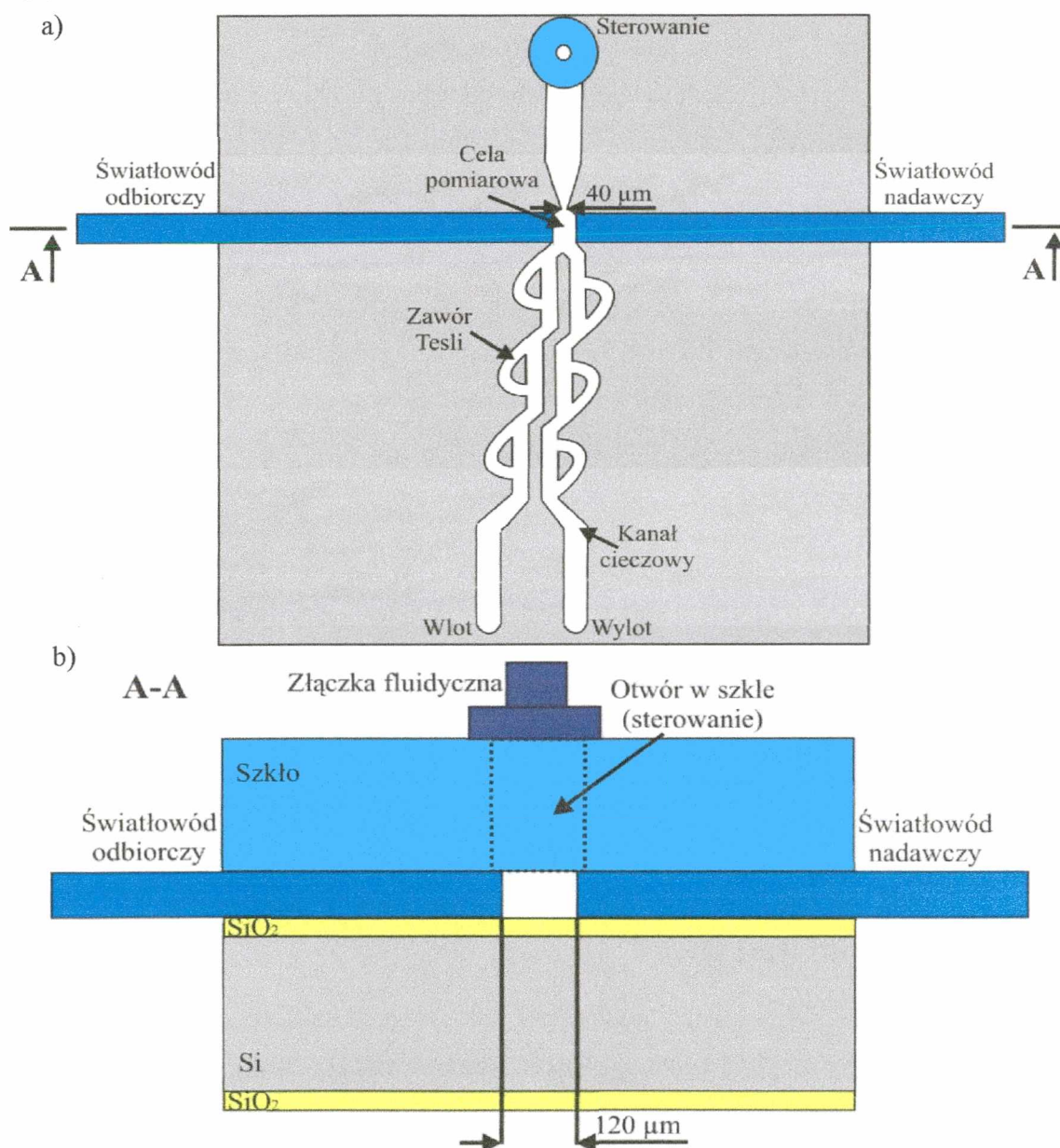


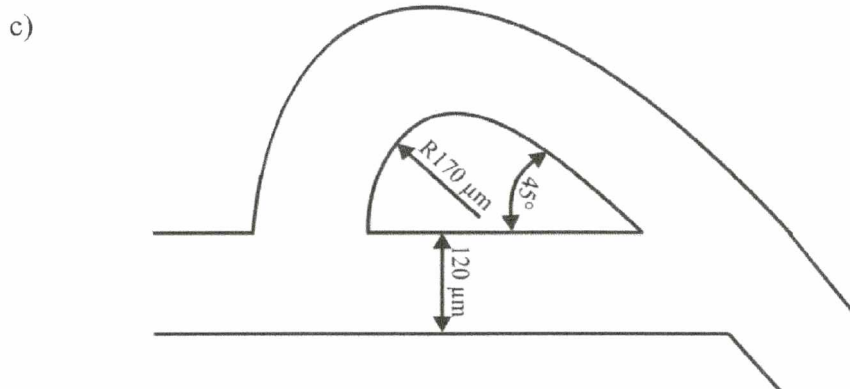
Rysunek 5.1 – Schematy: a) lab-chip z zaworami Tesli, b) lab-chip prosty.

Lab-chip z zaworami typu Tesla

Lab-chip składa się z dwóch podłoży: krzemowego i szklanego, których wymiary wynoszą 35x35 mm² oraz dwóch szklanych światłowodów wielomodowych. Kanały cieczowe oraz montażowe dla światłowodów zaprojektowano w podłożu krzemowym (Rys. 5.2a, b). W konstrukcji tej założono wykonanie osobnych kanałów do wprowadzania

i wyprowadzania zarodka, które na swojej drodze będą zawierać jednokierunkowe, kaskadowo ułożone zawory Tesli [76, 77] (Rys. 5.2c). Na połączeniu kanałów wlotowego i wylotowego znajduje się cewa pomiarowa, której objętość wynosi $\sim 1,73$ nl. Kanały montażowe dla światłowodów rozmieszczono po przeciwległych stronach celi pomiarowej. Kanały te zaprojektowano tak, aby na etapie montażu umożliwić samocentrowanie i współosiowość światłowodów. Wykorzystano włókna światłowodowe o średnicy rdzenia $100\text{ }\mu\text{m}$, i płaszczu $125\text{ }\mu\text{m}$. W podłożu szklanym wywiercono otwory: wlotowy, wylotowy oraz sterujący. Do lab-chipa przyklejono złączkę mikrofluidyczną, która ułatwi sterowanie przepływem komórki w kanałach cieczowych.

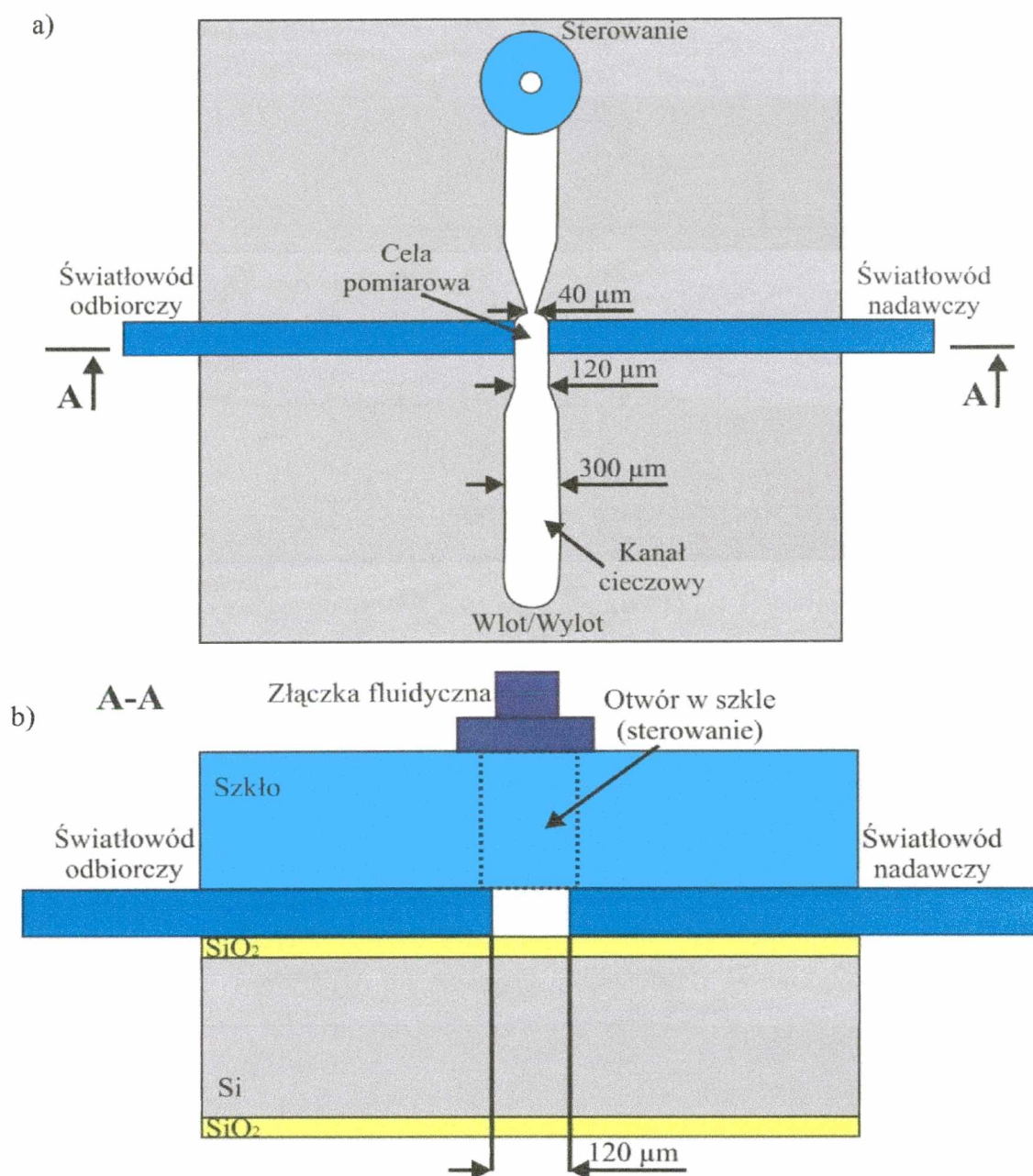




Rysunek 5.2 – Schemat budowy lab-chipa z zaworami Tesli: a) widok z góry, b) przekrój, c) zawór Tesli.

Lab-chip prosty

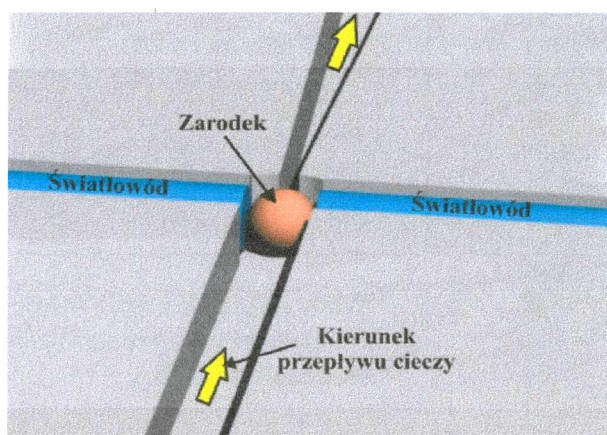
Do konstrukcji tej wersji lab-chipa zastosowano również podłoża szklane i krzemowe o wymiarach $35 \times 35 \text{ mm}^2$ oraz dwa szklane światłowody wielomodowe. W podłożu krzemowym zaprojektowano kanał cieczowy w kształcie litery I (Rys. 5.3). W połowie długości kanału cieczowego zaprojektowano celę pomiarową, w której umieszczano zarodek w trakcie badania. Objętość celi pomiarowej jest taka sama jak w lab-chipie z zaworami Tesli. Początkowy odcinek kanału wprowadzającego/wyprowadzającego jest szerszy i wynosi 300 μm , a następnie zwęża się do 120 μm . Po przeciwległych stronach celi pomiarowej zaprojektowano kanały montażowe dla światłowodów o wymiarach średnicy płaszczka i rdzenia odpowiednio $125/100 \text{ μm}$ zakończone złączkami typu SMA 905. W podłożu szklanym wywiercono otwory: wlotowy/wylotowy oraz sterujący. Podobnie jak w poprzednich projektach lab-chip wyposażono w złączkę mikrofluidyczną.



Rysunek 5.3 – Schemat budowy lab-chipa prostego: a) widok z góry, b) przekrój.

W obydwu wersjach lab-chipów, konstrukcja celi pomiarowej umożliwiła unieruchomienie badanego zarodka w czasie pomiaru w strumieniu przepływającego buforu. W celi pomiarowej zaprojektowano ostre zwężenie kanału cieczowego (ze $120\ \mu\text{m}$ do $40\ \mu\text{m}$) oraz wygładzenie i zaokrąglenie ścian górnych, dzięki czemu wykonana pułapka mechaniczna przybiera kształt „koszyeczka”, którego boczne ściany stanowią czoła światłowodów (Rys. 5.4) [78]. Długość drogi optycznej wynosi $120\ \mu\text{m}$ i jest ściśle dopasowana do średnicy badanych komórek. Tak wykonana pułapka uniemożliwiła przedostanie się badanego zarodka

na drugą stronę kanału cieczowego i zapewniła jego jednoznaczne położenie w torze optycznym.



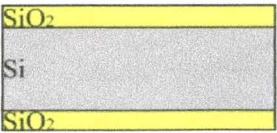
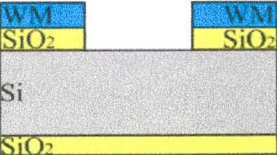
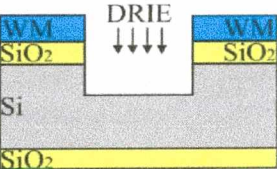
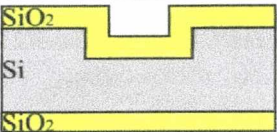
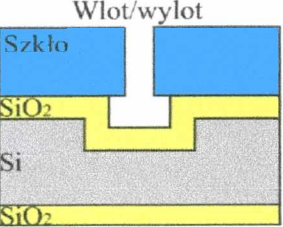
Rysunek 5.4 – Schemat pracy „koszykowej” pułapki mechanicznej wykorzystanej do unieruchomienia zarodka.

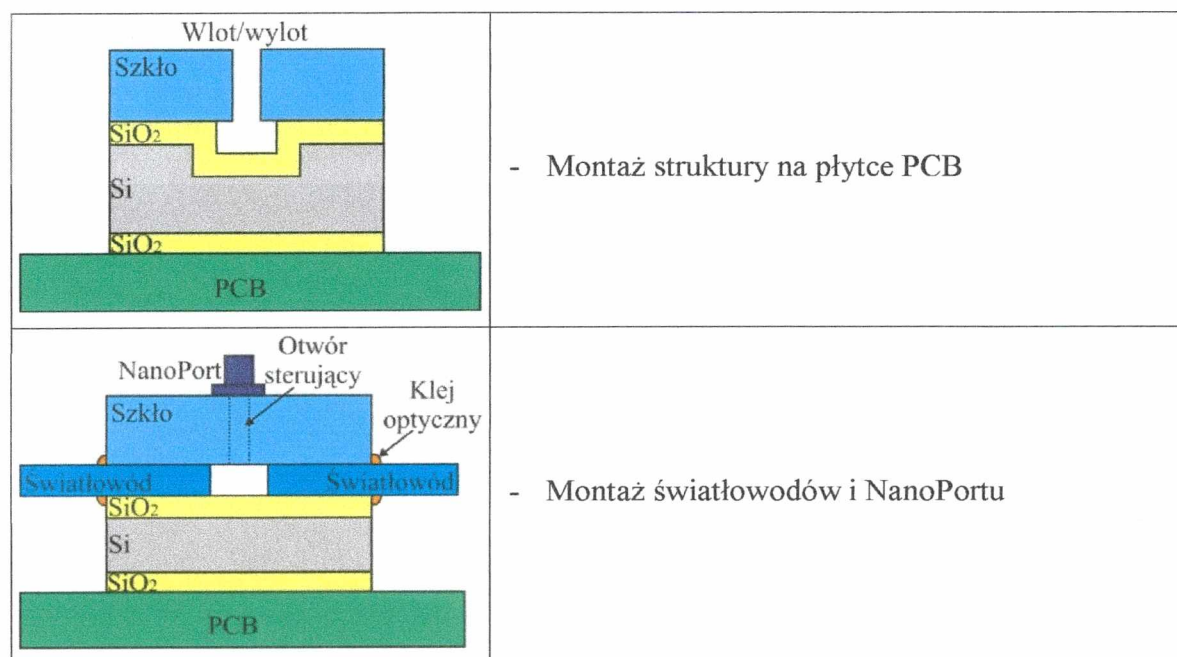
Technologia

Powyższe lab-chipy wykonano na 3-calowym podłożu krzemowym obustronnie polerowanym. Warstwę maskującą SiO_2 o grubości $1,5 \mu\text{m}$ wytworzono w procesie wysokotemperaturowego utleniania w atmosferze pary wodnej w temperaturze 1050°C . W procesie fotolitografii zastosowano fotorezyst pozytywowy Shipley 1818 oraz maskę chromową. Kanały cieczowe oraz montażowe dla światłowodów uformowano w podłożu krzemowym wykorzystując w tym celu procesy trawienia DRIE¹⁰ wykonane na urządzeniu Adixen AMS 100 z zastosowaniem standardowego procesu Bosch (użyte gazy: $\text{SF}_6/\text{C}_4\text{F}_8$). Głębokość wytrawionych kanałów oraz szerokość celi pomiarowej wynosiła $120 \mu\text{m}$. Po procesie DRIE usunięto warstwę maskującą, a następnie wytworzono warstwę pasywującą SiO_2 o grubość $0,3 \mu\text{m}$ w procesie utleniania termicznego. Jako podłoże szklane wykorzystano szkło Borofloat® 3.3, Schott, Niemcy, w którym wywiercone zostały zgodnie z rozstawieniem otwory o średnicy $\phi = 0,8 \text{ mm}$. Podłoża krzemowe oraz szklane połączono ze sobą metodą bondingu anodowego. Przed wykonaniem tego procesu, podłoża poddano procedurom mycia i hydrofilizacji powierzchni. Następnie przeprowadzono bonding anodowy przygotowanych podłoży ($t = 450^\circ\text{C}$, $U = 1,5 \text{ kV}$), który zapewnił całkowitą szczelność lab-chipa (Tab. 5.1).

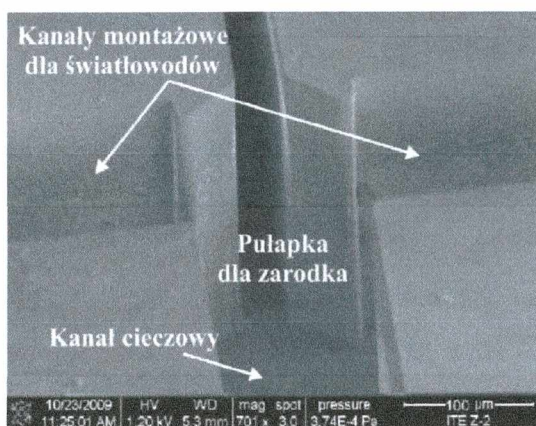
¹⁰ Procesy trawienia dla podłoża krzemowego wykonano w Instytucie Technologii Elektronowej w Warszawie w ramach wspólnych prac nad projektem MNS-DIAG, podprojekt 2B APOZAR.

Tabela 5.1 – Etapy wytwarzania krzemowo-szklanego lab-chipa.

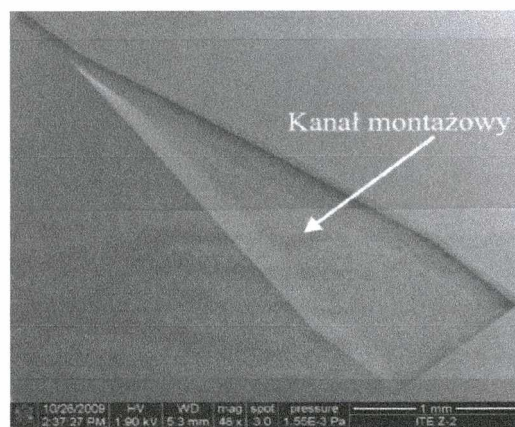
Podłoże krzemowe	
	- Podłoże krzemowe 3", typu n, grubość 380 μm
	- Procedura mycia - Utlenianie termiczne ($t = 1050^\circ\text{C}$, grubość SiO_2 1,5 μm)
	- Warstwa maskująca (WM) - Fotolitografia jednostronna (Shipley 1818, maska chromowa)
	- Trawienie kanałów metodą DRIE (proces Bosch)
	- Usunięcie warstwy SiO_2 - Procedura mycia
	- Procedura mycia - Utlenianie termiczne ($t = 1050^\circ\text{C}$, grubość SiO_2 0,3 μm)
Podłoże szklane	
	- Szkło Borofloat 3.3, 35x35 mm^2 , grubość 1 mm
	- Wiercenie otworów w pokrywie szklanej ($\phi = 0,8 \text{ mm}$)
Łączenie elementów	
	- Bonding anodowy podłoża krzemowego i szklanego ($t = 450^\circ\text{C}$, $U = 1,5 \text{ kV}$)



Tak wykonane lab-chip przyklejono (każdy z osobna) do płytek PCB, co umożliwiło późniejszy ich montaż w obudowie metalowej oraz unieruchomienie światłowodów wklejanych do struktury. Następnie wklejono szklane, wielomodowe światłowody firmy Ocean Optics o średnicy rdzenia 100 μm , natomiast płaszczu 125 μm (P100-2-VIS-NIR) – scharakteryzowane w poprzednim rozdziale (str. 38). Proces przygotowania włókien światłowodowych był zgodny z wcześniej opisaną procedurą (str. 38). Głębokość i szerokość kanałów montażowych wynosiła 120 μm dlatego konieczne było strawienie części płaszczu światłowodu, tak aby możliwy był ich montaż w chipie. Po wykonaniu procesu trawienia w 40% HF w czasie 4 min średnica światłowodu wynosiła $\sim 117 \mu\text{m}$. Ostatnim etapem przygotowania włókien światłowodowych było precyzyjne ucięcie czoła światłowodu w przecinacze światłowodowej firmy Fujikura. Kolejnym etapem było wklejenie tak przygotowanych światłowodów do chipa (Rys. 5.5). Kanały montażowe do wprowadzenia światłowodów były szersze przy części wejściowej (1000 μm), po czym łagodnie się zwężały do szerokości 120 μm (Rys. 5.6). Dzięki temu ułatwione zostało wprowadzenie włókna do środka kanału. Montaż włókien został przeprowadzony na specjalnie przygotowanym stanowisku, które umożliwiała przemieszczanie się chipa w trzech płaszczyznach x, y, z oraz obserwację wykonywanych czynności pod mikroskopem (zgodnie z str. 39). Światłowód unieruchomiono za pomocą kleju optycznego NOA 61 (Thorlabs, Niemcy), który przemieszczał się w głąb kanału dzięki siłom kapilarnym. Klej został utwardzony światłem UV (lampa dentystyczna firmy Electro-Lite) przez ok. 10 minut.

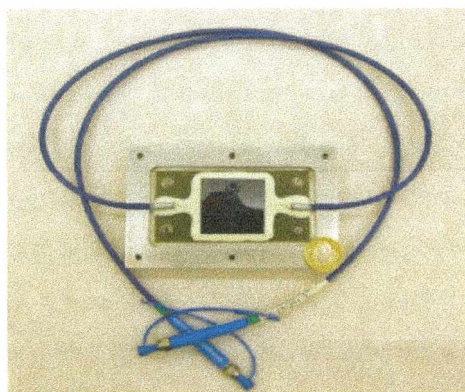


Rysunek 5.5 – Obraz SEM celi pomiarowej.



Rysunek 5.6 – Obraz SEM kanału montażowego dla światłowodów.

Następnie lab-chipy umieszczono w metalowej obudowie o wymiarach 77 mm x 116 mm, ze specjalnie wyprofilowanymi przerwami na światłowody oraz precyzyjnie spozycjonowano i przyklejono NanoPorty firmy Upchurch na otwory sterujące (Rys. 5.7).

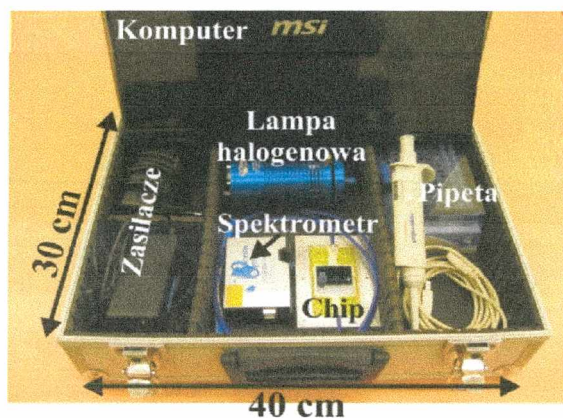


Rysunek 5.7 – Lab-chip w obudowie metalowej.

Układ pomiarowy

Wykorzystany został układ pomiarowy podobny do przedstawionego w rozdziale 4. Składał się on ze źródła światła - lampa halogenowa HL-2000 firm OceanOptics, detektora - miniaturowy spektrometr USB4000UV-VIS firmy OceanOptics oraz lab-chipa. Zastosowane urządzenia zostały szczegółowo scharakteryzowane w poprzednim rozdziale pracy (str. 41-43). 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 (Rys. 5.8), co umożliwiałoby łatwy transport.



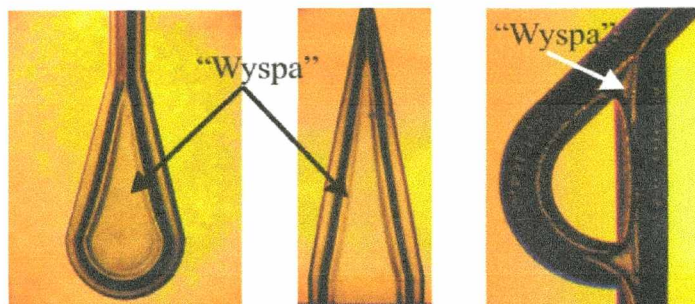
Rysunek 5.8 – Przenośny układ pomiarowy.

5.2 Testy w warunkach laboratoryjnych

Przed przystąpieniem do badań w warunkach hodowlanych przeprowadzono wstępne testy laboratoryjne obydwu wykonanych lab-chipów. Określona została efektywność sprzężenia światła między światłowodem nadawczym i odbiorczym. Jako źródło światła wykorzystano opisaną wcześniej lampę halogenową, natomiast miernikiem mocy optycznej był czujnik OP-2 VIS firmy COHERENT. Badania przeprowadzono dla wybranej długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$. Moc emitowana przez źródło światła wynosi $P_S = -32,68 \text{ dBm}$, natomiast moc wyjściowa dla celi wypełnionej wodą, zarówno dla chipa z zaworami Tesli jak i dla chipa z jednym kanałem cieczowym, wynosi $P_C = -41,55 \text{ dBm}$. Oszacowano, że tłumienie obydwu celi pomiarowych wynosi ok. $8,87 \text{ dB/cm}$.

Wykonano również testy sprawdzające jakość wprowadzania badanej komórki do celi pomiarowej w obu lab-chipach. W tym celu wykorzystano oocyty świnię jako komórki modelowe. W trakcie prób wprowadzania oocytu do lab-chipa zaobserwowano utrudnione zasysanie niektórych większych komórek do celi pomiarowej. Przyczyną tego było występowanie „wysp” w zagłębieniach wlotowych oraz po środku kanału cieczowego na całej jego długości, co uniemożliwiło płynne wprowadzanie badanej komórki (Rys. 5.9). Dlatego też przeprowadzono dodatkowy proces podtrawienia kanałów we wstępnie zmontowanych lab-chipach. Możliwe było podtrawienie tylko kanału wlotowego w początkowym jego odcinku, tak aby roztwór trawiący nie wchodził w obszar celi pomiarowej, w której znajdowały się zamontowane światłowody. Jeśli roztwór doszedłby do światłowodów całość uległaby zniszczeniu. Proces trawienia przeprowadzono wykorzystując $\text{HF} : \text{HNO}_3$ (6:1).

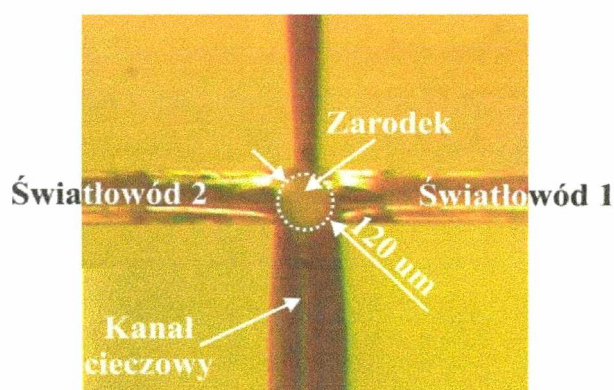
Następnie lab-chip dokładnie wypłukano wodą dejonizowaną i ponownie wykonano próbę wprowadzenia oocytu.



Rysunek 5.9 – „Wyspy” uniemożliwiające swobodny przepływ komórki.

Zaobserwowano, że w lab-chipie z prostym kanałem wprowadzająco/wyprowadzającym wszystkie badane komórki swobodnie docierały w obszar celi pomiarowej. Natomiast w lab-chipie z zaworami Tesli problem nie ustąpił i nadal komórki charakteryzujące się większą średnicą nie mogły być zassane do celi pomiarowej. Dlatego zdecydowano, że do pomiarów w terenie zostanie wykorzystany lab-chip z jednym kanałem służącym do wprowadzania i wyprowadzania zarodka.

W trakcie prowadzenia pomiarów w warunkach hodowlanych zarodek był zasysany do środka celi pomiarowej. Światło z lampy halogenowej docierało do celi pomiarowej światłowodem 1 i oświetlało unieruchomiony zarodek. Po przejściu przez badaną komórkę wiązka światła była transmitowana światłowodem 2 do spektrometru (Rys. 5.10). Czas wykonania pomiaru trwał ok. 2 minuty. Następnie zbadany zarodek był przenoszony do odpowiednich pożywek, a w końcowym etapie do matki bioreczni.



Rysunek 5.10 – Zarodek w trakcie pomiaru.

5.3 Testy w warunkach hodowlanych

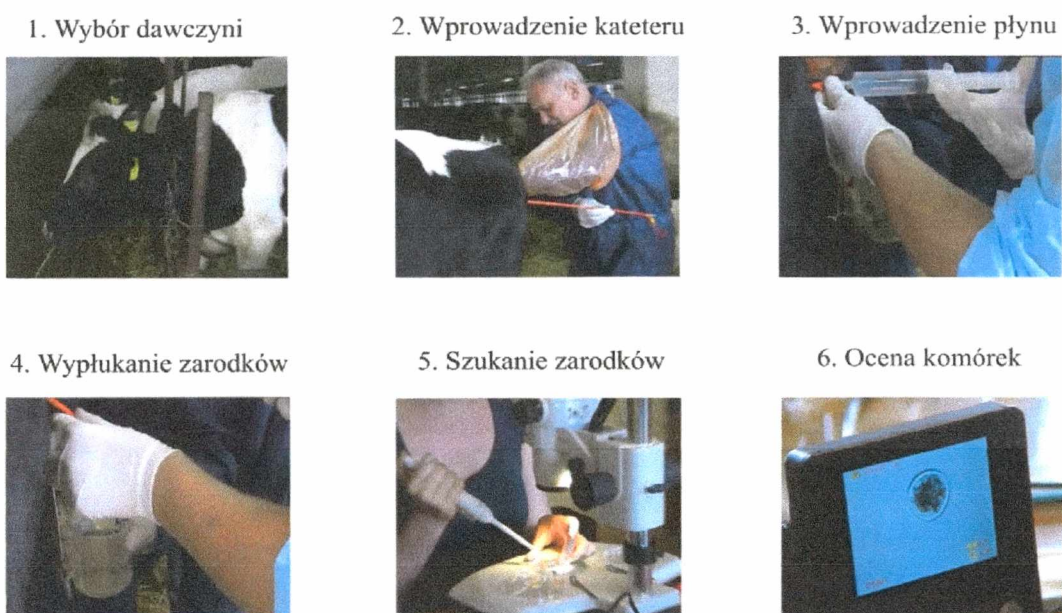
Badano zarodki pochodzące od bydła oraz trzody chlewnej. Pomiarów zarodków bydlęcych odbywały się w trakcie prowadzonego transferu na terenie stacji doświadczalnych w Kterach i w Dłoniach pod nadzorem profesora Jędrzeja Jaśkowskiego. Transfer zarodków trzody chlewnej był przeprowadzony w Instytucie Biologii Zwierząt Gospodarczych przy Wydziale Biologii Rozrodu w Dummerstorfie w Niemczech pod kierownictwem profesora Klausa Brüssowa. Zarodki bydlęce oraz trzody chlewnej zostały zbadane pojedynczo w lab-chipie. Analiza danych pomiarowych została przeprowadzona z zastosowaniem metody jakości pola, a wszystkie operacje matematyczne zostały wykonane w programie Origin 7.5.

5.3.1 Zarodki bydlęce

Zarodki bydlęce w stadium moruli zostały pozyskane w 6-7 dniu po zapłodnieniu [79]. Wykorzystano w tym celu metodę niechirurgiczną, która przebiega następująco (Rys. 5.11):

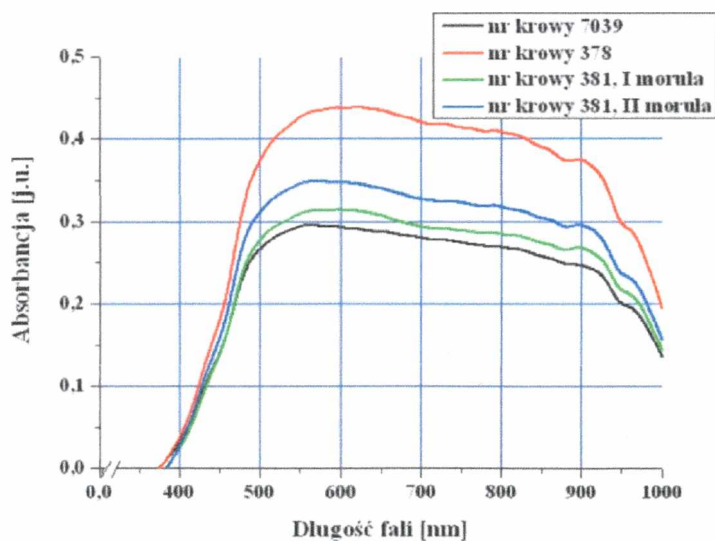
1. przygotowanie hormonalne dawczyń i biorczyń; synchronizacja cyklu płciowego,
2. wprowadzenie kateteru do jednego z rogów macicy, wstrzyknięcie powietrza do balonu uszczelniającego,
3. wprowadzenie do jednego z rogów macicy w kilkukrotnych powtórzeniach 250 - 1000 ml płynu do wypłukiwania zarodków (Dubleco Medium), podgrzanego do temp. 37°C,
4. odzysk do butelki wprowadzonego płynu pod wpływem działania siły grawitacji,
5. po zakończeniu wypłukiwania z jednego rogu macicy zabieg zostaje wykonany na drugim rogu,
6. sedymentacja zarodków „zawieszonych” w roztworze Dubleco przez okres 45-60 min,
7. wyszukiwanie zarodków pod lupą stereoskopową w temp. 18-25 °C,
8. pozyskane zarodki „zawieszono” w Holding Medium (Boniche), roztworze zapewniającym optymalne warunki dla przetrzymywania embrionów poza układem rozrodczym samicy.

Zarodki poddano ocenie morfologicznej, odrzucano komórki z widocznymi oznakami degeneracji. W trakcie badania poszczególny zarodek został przeniesiony do buforu PBS.



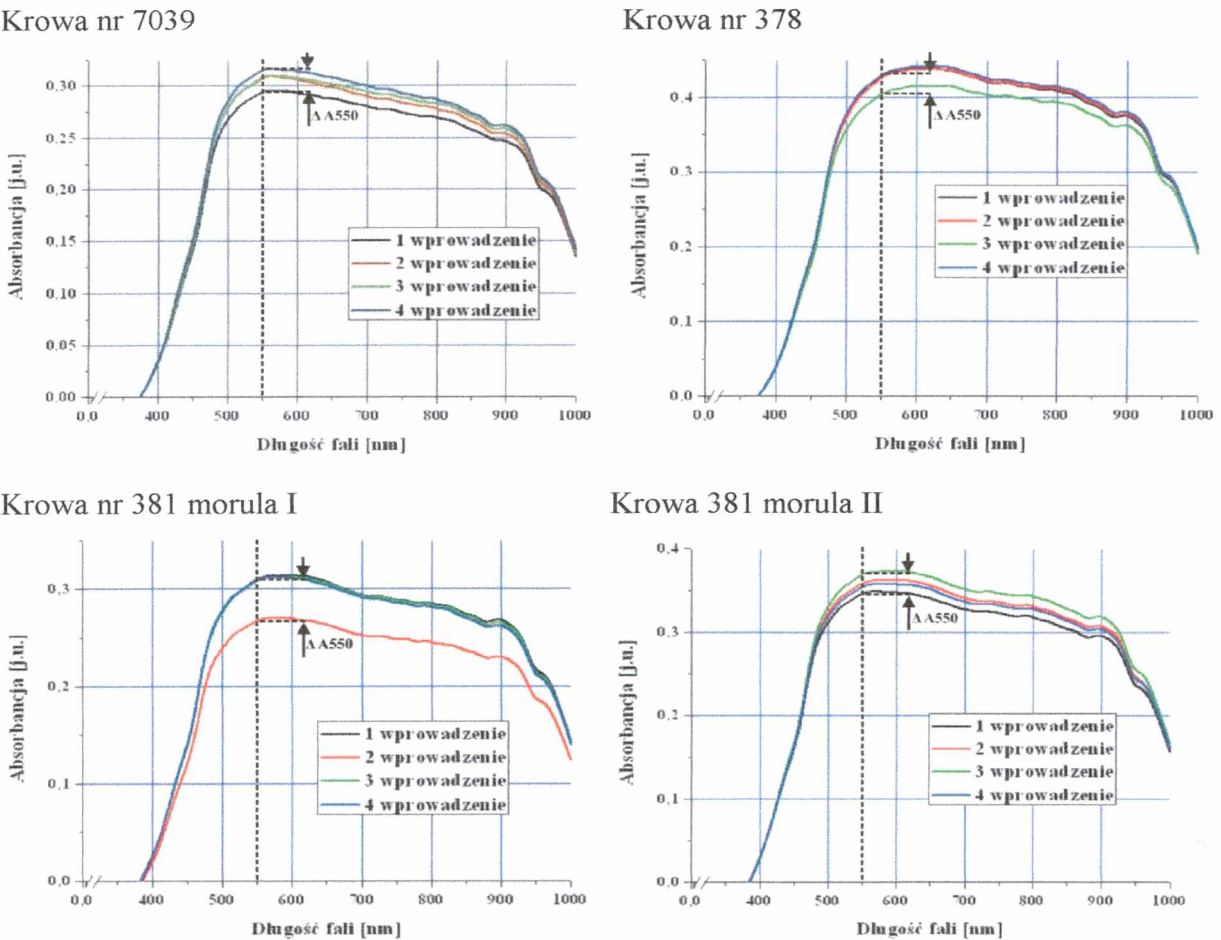
Rysunek 5.11 – Etapy pozyskiwania zarodków bydłych.

Specyfiką transferu tych zarodków jest fakt, że od specjalnie przygotowanej matki dawczyni można uzyskać od jednego do kilku zarodków. Matka biorczyni natomiast otrzymuje zawsze tylko jeden zarodek. Badano 4 zarodki wypłukane z trzech krów dawczyń o numerach: 7039, 378 i 381. Z krowy 381 wypłukano dwa zarodki. Wypłukane komórki znajdowały się w stadium rozwoju moruli. Każdy z uzyskanych zarodków wg oceny morfologicznej był dobry i spełniał kryteria transferu. Dla każdej komórki została wykreślona charakterystyka absorbancji (Rys. 5.12) – poszczególne kroki obróbki danych metrologicznych zawarte są w Dodatku E.



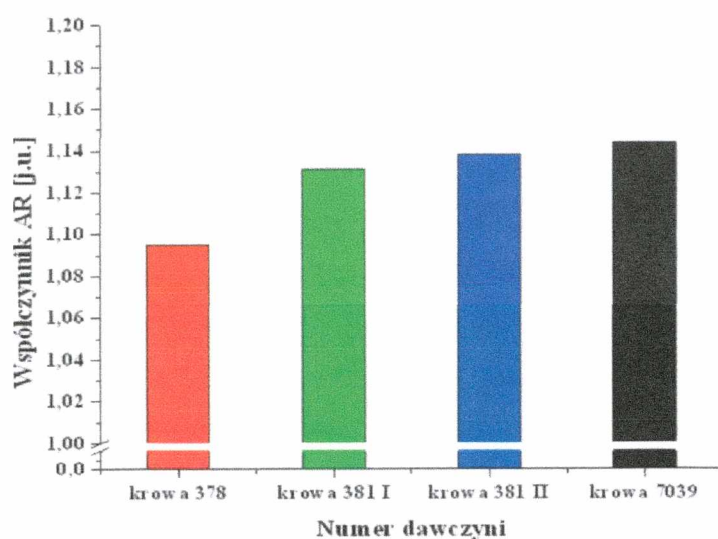
Rysunek 5.12 – Charakterystyki absorbancji zarodków bydłych.

Zarodki zostały wprowadzane do celi pomiarowej czterokrotnie w celu sprawdzenia, czy zastosowana w tej konstrukcji lab-chipa krótsza droga optyczna i precyzyjniejsza pułapka pozwoli uzyskać wartości absorbancji na zbliżonym poziomie przy wielokrotnym wprowadzaniu tej samej komórki (Rys. 5.13). Szczegółową analizę przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$. Stwierdzono, że największą różnicę wartości absorbancji zaobserwowano dla moruli I pobranej z krowy nr 381 i wynosiła ona $\Delta A_{550_{381I}} = 0,042$. Dla pozostałych zarodków wynosiła ona odpowiednio: krowa nr 7039 $\Delta A_{550_{7039}} = 0,02$, krowa nr 378 $\Delta A_{550_{378}} = 0,025$, krowa nr 381 morula II $\Delta A_{550_{381II}} = 0,023$. Tym samym można zauważyć, że uzyskane różnice absorbancji dla wybranej długości fali w trakcie wielokrotnego wprowadzania tej samej komórki są o ponad 50% mniejsze niż dla lab-chipa z dłuższą drogą optyczną. Wynika z tego, że optymalizacja konstrukcji nowego lab-chipa została przeprowadzona prawidłowo. Następnie, tak przebadane zarodki zostały przeniesione do matek biorczyń.



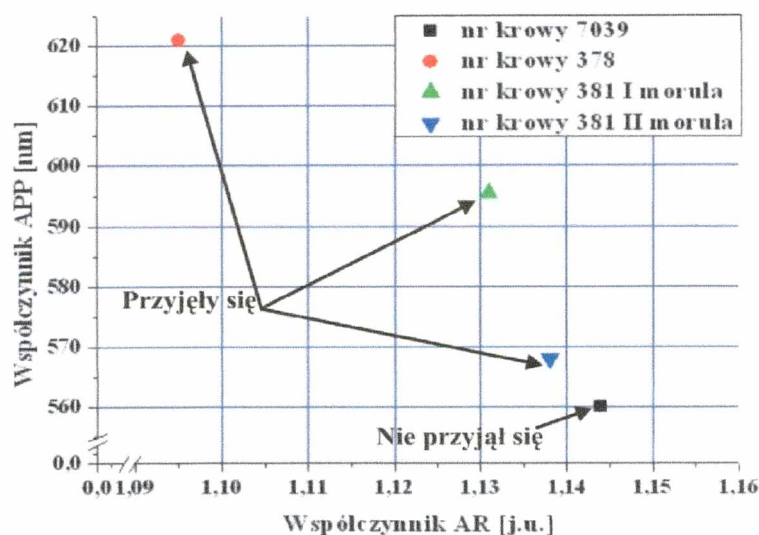
Rysunek 5.13 – Charakterystyki absorbancji pojedynczych zarodków bydlęcych pochodzących z krów dawczyń, wprowadzanych czterokrotnie do celi pomiarowej.

Kolejnym etapem było wykonanie analizy metodą pola jakości. Jako pierwszy został obliczony współczynnik AR dla każdego zarodka (Rys. 5.14).



Rysunek 5.14 – Wartość współczynnika AR dla poszczególnego zarodka.

W następnym etapie analizy wyznaczono współczynnik APP, który przyjmował wartości od 560 nm do 621 nm. Na podstawie wyznaczonych dwóch współczynników AR oraz APP zostało wykreślone pole jakości badanych zarodków (Rys. 5.15).

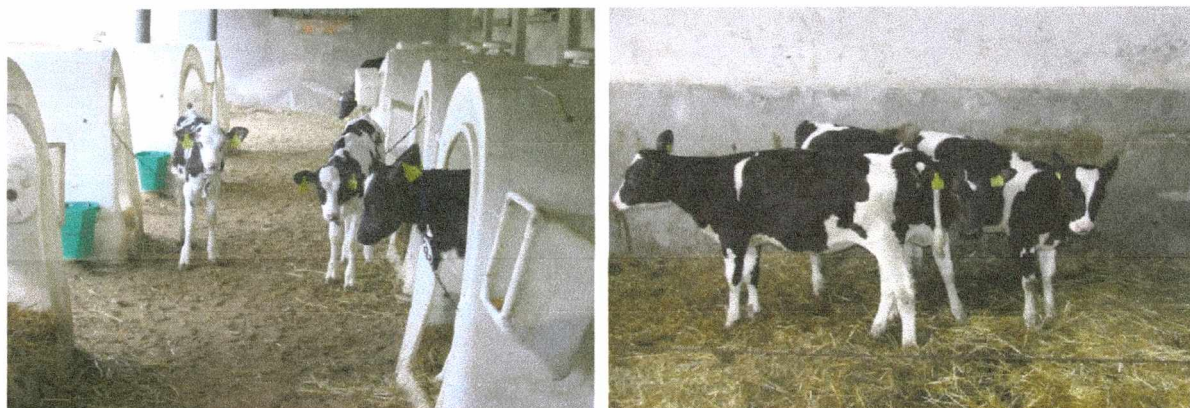


Rysunek 5.15 – Wyznaczone pole jakości zarodków bydłych.

Współczynniki AR_{SR} i APP_{SR} wyznaczone dla zarodków z krowy nr 7039, 381 morula I i 381 morula II wynoszą odpowiednio 1,137 i 574,5 nm. Zarodek z krowy nr 378 znacząco odbiegał od pozostałych. Na podstawie ułożenia zarodków można przyjąć, iż 3 z nich (pochodzące z krów nr: 378, 381 morula I i II) są „dobre”, a zarodek z krowy nr 7039 „zły”.

Wszystkie zarodki zostały przeniesione do matek biorecipientów. Trzy z nich, ocenione jako dobre, prawidłowo zagnieżdżyły się, co zaowocowało narodzinami trzech zdrowych cieląt (Rys. 5.16).

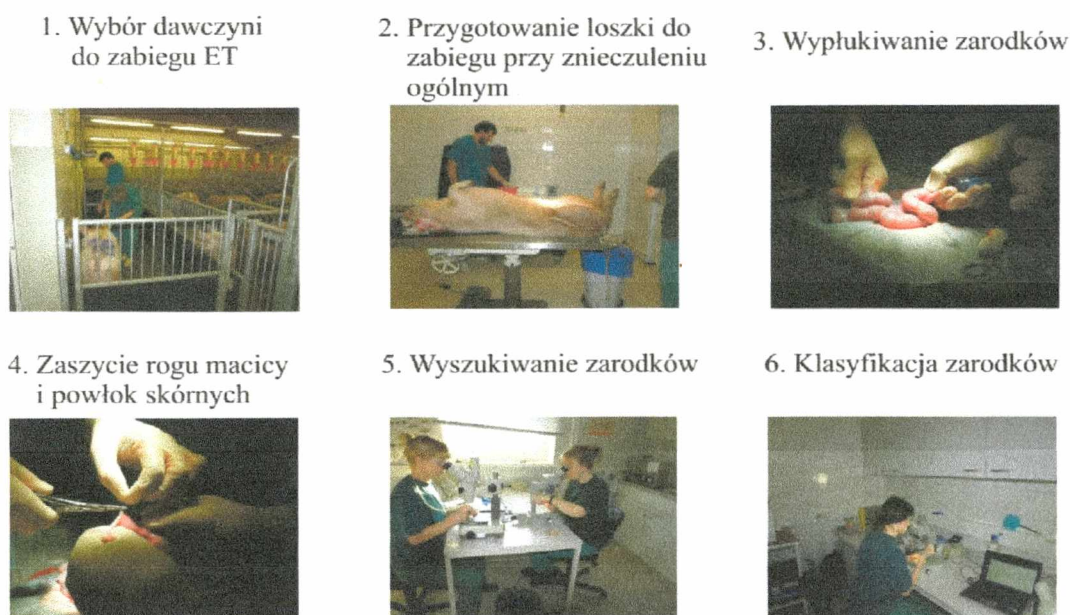
Na podstawie uzyskanego wyniku (ze względu na małą liczbę transferów) trudno wnioskować, czy metoda pola jakości może stać się podstawą metodologii klasyfikacji zarodków bydłych. Niemniej jednak, uzyskany wynik wskazuje, że jest to możliwe. Potwierdzenie tego wniosku wymaga przeprowadzenia dalszych licznych transferów, co z uwagi na ograniczenia czasowe i finansowe nie było możliwe w tej pracy. Wyniki badań potwierdzają, że wybrana optyczna metoda detekcji nie jest niszcząca dla badanej komórki, a zastosowana obróbka sygnału może w przyszłości posłużyć do stworzenia nowej klasyfikacji jakościowej zarodków bydłych.



Rysunek 5.16 – Cielaki narodzone z zarodków poddanych ocenie jakościowej w lab-chipie.

5.3.2 Zarodki trzody chlewnej

Zarodki trzody chlewnej pozyskano metodą operacyjną [80]. Zabieg został wykonany w znieczuleniu ogólnym (Rys. 5.17). Polegał on na wstrzyknięciu ok. 100 ml ogrzanego do temperatury 37°C roztworu PBS do końcowego odcinka rogu macicznego, przepłukaniu rogów macicy, a następnie zebraniu z naprzeciwległego rogu płynu wraz z „zawieszonymi” w nim zarodkami. Następnie odzyskany roztwór podlegał 15-20 min. sedymentacji w temperaturze pokojowej. Po tym etapie pobrano niewielką ilość płynu z dolnej części butelki, w której znajdowały się zarodki trzody chlewnej. Następnie dokonano selekcji, odrzucając zdegenerowane komórki, oraz te, które nie osiągnęły stadium moruli. W kolejnym etapie zarodki zostały zbadane w lab-chipie.

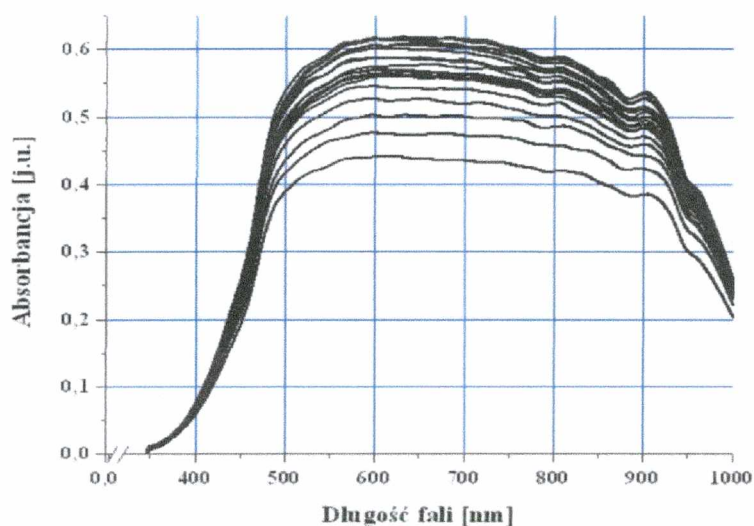


Rysunek 5.17 – Etapy pozyskiwania zarodków trzody chlewnej.

Transfer zarodków przeprowadzono w trakcie kilku sesji. W początkowym stadium doświadczeń nie uzyskano pozytywnego efektu hodowlanego. Wszystkie badane zarodki nie przyjęły się. Przyczyną takiego stanu rzeczy były najprawdopodobniej trzy czynniki:

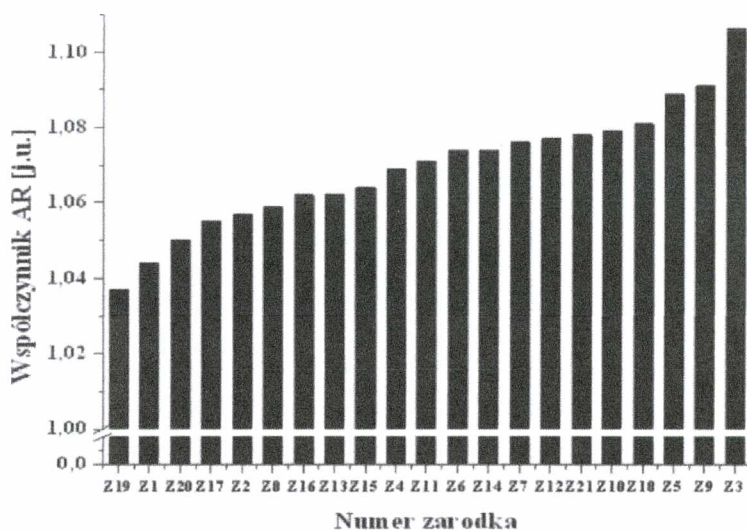
- *zbyt duża moc światła w torze optycznym lab-chipu (co nie szkodziło zarodkom bydlęcym),*
- *zbyt długi czas trwania transferu. W zastosowanej tu metodologii transferu zarodki odbierane były od kilku świń dawczyń, następnie oceniane jakościowo w lab-chipie i przenoszone do matek biorczyni, co łącznie zajmowało około 6h,*
- *problem natury biologicznej np. chora matka biorczyni.*

W kolejnej sesji zredukowano moc światła do $P_s = -35$ dBm dla fali o długości $\lambda = 550$ nm. Pobrano zarodki w stadium moruli i po wykonaniu oceny morfologicznej zakwalifikowano je do transferu. Partia 21 zarodków została oceniona jakościowo przy pomocy lab-chipa metodą pola jakości. Dla każdego zbadanego w lab-chipie zarodka wykreślono zależność absorbancji w funkcji długości fali (Rys. 5.18) - szczegółową analizę danych pomiarowych zawarto w Dodatku F.



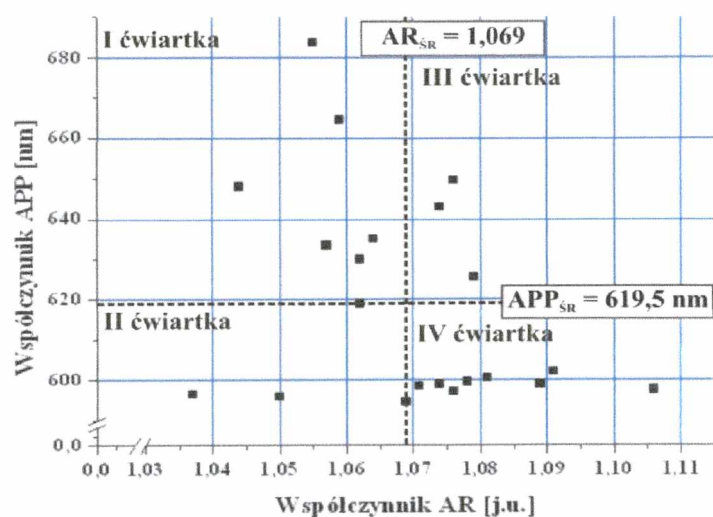
Rysunek 5.18 – Charakterystyki absorbancji zarodków trzody chlewnej.

Wyznaczono współczynniki AR oraz APP. Współczynnik AR mieścił się w zakresie od 1,037 do 1,106 (Rys. 5.19). Średni współczynnik wynosił $AR_{\text{SR}} = 1,069$.



Rysunek 5.19 – Wartość współczynnika AR dla poszczególnych zarodków.

Współczynnik APP mieścił się w zakresie od 594,5 nm do 683,5 nm, a średni współczynnik dla wszystkich zmierzonych zarodków wynosił $APP_{\text{SR}} = 619,5$ nm. Poniżej APP_{SR} znajdowało się około 57% wszystkich zbadanych zarodków (Rys. 5.20).



Rysunek 5.20 – Pole jakości zarodków trzody chlewnej.

Stwierdzono, że w I i II ćwiartce pola jakości, wyznaczonych na lewo od średniego współczynnika AR_{SR} znajduje się 9 zarodków, które zgodnie z poprzednim rozłożeniem klasyfikacji wg pola jakości, uznano za „dobre”. Odpowiednio w ćwiartkach III i IV znajdowało się 11 zarodków uznanych za „złe”, a na granicy między ćwiartkami II i IV jeden zarodek uznany za „dobry”. Tak więc, liczba zarodków uznanych za „dobre” wynosiła 10, a uznanych za złe 11. Tym samym zarodki dobre stanowiły 47,6% w badanej puli 21 zarodków. W relacjonowanym postępowaniu badawczym urodziło się 10 zdrowych prosiąt (Rys. 5.21), co dokładnie odpowiada przyjętej kwalifikacji jakościowej.

Uzyskana tutaj zgodność jest niezwykle interesująca i zaświadcza, że pole jakości może być dobrą metodą kwalifikacji jakościowej trzody chlewnej w metodzie transferu. W świetle uzyskanych wyników można stwierdzić, że jest możliwa optyczna ocena jakości zarodków trzody chlewnej w lab-chipie oraz, że metoda pola jakości będzie mogła być prawdopodobnie upowszechniona w praktyce weterynaryjnej. Należy jednak podkreślić, że wniosek powyższy wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach transferu zwierząt hodowlanych dla znacznie liczniejszej próby.



Rysunek 5.21 – Prosiaki narodzone z zarodków przebadanych w lab-chipie, zakwalifikowanych do I grupy.

5.4 Podsumowanie

W badaniach opisanych w tym podrozdziale zaprojektowano, wykonano oraz zbadano właściwości dwóch lab-chipów przeznaczonych do pomiarów zarodków bydłych i trzody chlewnej. Konstrukcja pierwszego zakładała wykonanie osobnych kanałów cieczowych służących do wprowadzania i wyprowadzania badanej komórki, na których drodze znajdowały się zawory typu Tesla. Natomiast drugi lab-chip charakteryzował się jednym kanałem służącym zarówno do wprowadzania jak i wyprowadzania zarodka do/z celi pomiarowej. Kanały cieczowe oraz montażowe dla światłowodów zostały wykonane w podłożu krzemowym, stosując techniki głębokiej obróbki mikromechanicznej. Podłoże szklane oraz krzemowe połączono ze sobą metodą bondingu anodowego, co zapewniło doskonałą szczelność i trwałość połączenia. Zaprojektowane kanały cieczowe były dopasowane do wymiarów badanych zarodków. Ich konstrukcja zawierała w sobie mechaniczną pułapkę, która zapewniała unieruchomienie badanej komórki w trakcie wykonywania pomiarów. Zastosowana pułapka „koszyczkowa” z drogą optyczną równą średnicy badanej komórki pozwoliła również na zmniejszenie różnic w uzyskanych wynikach pomiarowych podczas wielokrotnego wprowadzania tego samego zarodka do celi pomiarowej. W chipie zostały zintegrowane światłowody szklane o wymiarach 125/100 μm . Głębokość kanału montażowego dla światłowodów wynosiła 120 μm , dlatego konieczne było strawienie części płaszcza światłowodu, tak aby możliwy był jego montaż w chipie. Przed wykonaniem badań docelowych przeprowadzono testy wstępne pozwalające ocenić pracę obydwu lab-chipów. Stwierdzono, że dno kanałów cieczowych po trawieniu DRIE nie jest gładkie i występują na nim wyspy, które uniemożliwiają swobodne wprowadzenie większych komórek do celi pomiarowej. Dlatego przeprowadzono proces podtrawienia w początkowym fragmencie kanałów wlotowych. Po wykonaniu trawienia lab-chip z zaworami Tesli nadal

umożliwiał wprowadzanie tylko mniejszych komórek. Dlatego do pomiarów w terenie wykorzystano lab-chipa z jednym, prostym kanałem wprowadzającym. Istotnym założeniem projektowym był fakt, że pomiary wykonywane były w rzeczywistych warunkach hodowlanych. Dlatego lab-chip został umieszczony w metalowej obudowie, a zastosowany sprzęt pomiarowy charakteryzował się małymi rozmiarami, co umożliwiło zamknięcie go w małej walizce transportowej. Pomiar charakterystyk spektralnych został przeprowadzony w środowisku zapewniającym prawidłowy rozwój zarodków. Badaniom zostały poddane zarodki bydlęce oraz zarodki trzody chlewnej z zastosowaniem metody pola jakości do obróbki sygnału pomiarowego.

Przyjęta metoda analizy wykorzystywała pomiar charakterystyk spektralnych medium oraz zarodków „zawieszonych” w medium. Poszczególnymi krokami analizy było wygładzenie krzywych spektralnych, a następnie obliczenie wartości absorbancji dla każdego zarodka i wyliczenie współczynników AR oraz APP. Przebadano cztery zarodki bydlęce, z czego trzy prawidłowo zagnieżdżyły się u matki biorczyni, co zaowocowało narodzinami zdrowych cieląt. Zarodki, które się przyjęły charakteryzowały się współczynnikiem APP powyżej 565 nm oraz współczynnikiem AR poniżej 1,14. Zbadano 21 zarodków trzody chlewnej, a w wyniku przeprowadzonego transferu urodziło się 10 prosiąt. Otrzymano bardzo dobrą zgodność oceny jakościowej z wynikiem hodowlanym.

Wyznaczone wartości współczynników zarówno dla zarodków bydlęcych jak i trzody chlewnej nie mogą obecnie zostać zastosowane jako wyznaczniki nowych standardów jakościowych ze względu na zbyt małą liczbę przeprowadzonych transferów. Jednak uzyskane wyniki pokazują możliwości jakie daje zastosowanie metody optycznej do klasyfikacji zarodków zwierząt hodowlanych. Potwierdzona została nieinwazyjność zaproponowanej metody oraz zastosowanie obróbki sygnału pomiarowego, które w przyszłości może zostać wykorzystane do stworzenia nowej klasyfikacji jakościowej.

6 Wnioski końcowe i ocena przydatności rozwiązań

Prawidłowa selekcja oocytów i zarodków jest istotnym zagadnieniem gospodarczym i naukowym. Tradycyjna metoda klasyfikacji jakościowej oocytów i zarodków zwierząt polega na ocenie ich cech morfologicznych podczas obserwacji pod mikroskopem optycznym. Brane są pod uwagę między innymi kształt i regularności, ziarnistość i kolor komórki. Wiadomo jednak, że klasyfikacja morfologiczna nie jest wystarczająca.

Założeniem tej pracy było stwierdzenie, że prawidłowa klasyfikacja jakościowa oocytów/zarodków jest możliwa przez badanie ich właściwości optycznych w specjalnym lab-chipie fluidycznym.

Analiza danych literaturowych wykazała, że w chwili rozpoczynania pracy, nie istniały lab-chipy, które umożliwiałyby taką parametryczną ocenę jakościową żeńskich, zwierzęcych komórek rozrodczych oraz zarodków metodami optycznymi. Nie znano również metod służących do analizy uzyskanych danych pomiarowych z wyznaczonymi współczynnikami charakteryzującymi poszczególne klasy jakościowe.

Wstępny etap prac polegał na analizie zgodności zaproponowanej metodologii badawczej z powszechnie stosowanymi metodami klasycznymi. Bardzo ważnym aspektem był tu fakt, że badania prowadzone były na żywych komórkach, które następnie poddane zostały hodowli rozwojowej (oocyty) lub transferowi do matki biorczyni (zarodki). W związku z tym zastosowane metody badawcze oraz rozwiązania konstrukcyjne nie mogły w sposób negatywny wpływać na badaną komórkę. Materiałem do konstrukcji lab-chipów były podłoża krzemowe oraz szklane, które charakteryzują się wysoką odpornością chemiczną i bioobojętnością, a zastosowanie metody trawienia DRIE zapewniło uformowanie gładkich kanałów cieczowych i montażowych. Natomiast wykorzystanie techniki bondingu anodowego odpowiednio przygotowanych podłoży zapewniło szczelność lab-chipa. Konstrukcja kanałów cieczowych wykonanych w krzemie, zapewniała swobodny przepływ badanego oocyty/zarodka, ale jednocześnie zawierała w swojej konstrukcji pułapkę mechaniczną umożliwiającą zatrzymanie badanej komórki „zawieszoną” w strumieniu cieczy na czas pomiarów. Badany materiał był wprowadzany do lab-chipa przy użyciu standardowych pipet precyzyjnych z nałożonymi sterylnymi końcówkami. Pomiar charakterystyk spektralnych transmisji i absorpcji był realizowany w środowisku płynnym, zapewniającym prawidłowe przechowanie oocyty/zarodka i nie wpływał negatywnie na stan

biologiczny badanego materiału. Źródłem światła była lampa halogenowa z zakresu promieniowania widzialnego, natomiast detektorem był zminiaturyzowany spektrometr. W pracach własnych badano dwie konfiguracje układu pomiarowego. W pierwszym z nich zastosowano lab-chip, który umożliwiał prowadzenie wstępnych pomiarów dla oocytów bydłych i trzody chlewnej. Zastosowano tu krzemowo-szklany lab-chip z kanałem cieczowym w kształcie litery „S” oraz dwoma zintegrowanymi światłowodami szklanymi, których średnica była dopasowana do wielkości badanych oocytów (125/100 μm). Droga optyczna wynosiła 750 μm . W drugim układzie zastosowano zoptymalizowany lab-chip ze skróconą drogą optyczną i pułapką mechaniczną, która umożliwiała unieruchomienie komórek w trakcie pomiarów. To rozwiązanie wykorzystano do badań pozalaboratoryjnych w transferze zarodków.

W pracy zaproponowano dwie metody oceny jakości oocytów bydłych i trzody chlewnej, czyli metodę „pików” oraz „pola jakości”. Oocyty bydłe przed wykonaniem pomiarów zostały podzielone na cztery klasy jakościowe, według dotychczas stosowanej klasycznej metody oceny jakości, natomiast oocyty trzody chlewnej na trzy grupy względem wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego pochodziły. W pierwszej z metod mierzono charakterystyki spektralne samego medium, w którym był umieszczony oocyt oraz oocytu „zawieszonego” w medium. Każda ze zmierzonych charakterystyk została wygładzona, a następnie znormalizowana. Kolejnym krokiem było „odjęcie” charakterystyki oocytu „zawieszonego” w medium od charakterystyki samego medium. Dzięki temu otrzymano charakterystyki spektralne poszczególnych oocytów. Następnie wyznaczono położenie charakterystycznych minimów i maksimów na krzywej różnicowej, które powiązano z „klasyczną” jakością oocytów. Minima na krzywej spektralnej odpowiadające klasom jakościowym oocytów bydłych obserwowano dla światła o długości fali zbliżonej do $\lambda = 580 \text{ nm}$, natomiast dla oocytów świńskich były to maksima w okolicach $\lambda = 620 \text{ nm}$ (Tab. 6.1). Uzyskano dobrą zgodność nowej metody i metody klasycznej, lecz stwierdzono jednak, że metoda „pików” nie może być stosowana w warunkach pozalaboratoryjnych. Badania wykazały, że sposób postępowania z badanym materiałem biologicznym jak i sama metoda optyczna nie wpływają negatywnie na oocyty. Zostało to potwierdzone przez prawidłowy rozwój zarodków, otrzymanych z zapłodnionych in vitro oocytów przebadanych w lab-chipie.

Tabela 6.1 – Charakterystyczne długości fali dla poszczególnych klas/grup oocytów uzyskane metodą pików.

Oocyty bydłęce				
	I klasa	II klasa	III klasa	IV klasa
Charakterystyczna długość fali	~ 581 nm	~ 584 nm	~ 585,5 nm	~ 587 nm
Oocyty trzody chlewnej				
	Mały pęcherzyk	Średni pęcherzyk	Duży pęcherzyk	
Charakterystyczna długość fali	~ 617,5 nm	~ 619 nm	~ 627,5 nm	

Drugą, zaproponowaną metodą analizy była metoda „poła jakości”. W tej metodzie również wykonano pomiar charakterystyk transmisji światła przez medium oraz przez oocyt „zawieszony” w medium. Otrzymane charakterystyki zostały wygładzone, a następnie określona została absorbancja spektralna danego oocytu. W kolejnym etapie wprowadzono dwa współczynniki: AR, czyli stosunek wartości absorbancji dla długości fali $\lambda = 550$ nm do wartości absorbancji dla długości fali $\lambda = 850$ nm oraz APP, czyli długość fali dla, której przypada maksymalna wartość absorbancji. Następnie w tzw. polu jakości przedstawiono graficznie „położenia” oocytów, w układzie kartezjańskim AR-APP. Stwierdzono, że oocyty sklasyfikowane morfologicznie jako poprawne znajdowały się poniżej wartości 1,04 współczynnika AR (Tab. 6.2).

Tabela 6.2 – Współczynniki charakteryzujące nowe klasy jakościowe.

Badany współczynnik	Bardzo dobre	Dobre	Słabe
AR	< 1,04	<1,04; 1,09>	> 1,09
APP	> 560 nm	> 540 nm	< 560 nm

W trakcie badań sprawdzono również powtarzalność wykonywanych pomiarów. Badane oocyty były wprowadzane do celi pomiarowej wielokrotnie i za każdym razem mierzono ich charakterystyki spektralne. Stwierdzono, że sposób wprowadzania komórki silnie wpływa na absorbancję spektralną. Było to spowodowane niedopasowaniem geometrycznym kanału i badanej komórki oraz nieprecyzyjnie działającą pułapką mechaniczną. W kolejnych wersjach lab-chipów ta wada konstrukcyjna została poprawiona.

Jak wspomniano wcześniej, drugi układ pomiarowy posłużył do badania zarodków bydłęcych i trzody chlewnej w warunkach hodowlanych. Zastosowano w nim dwie konstrukcje lab-chipów. Pierwsza posiadała osobny kanał wlotowy i wylotowy dla badanej

komórki, a wzdłuż kanałów cieczowych wykonane zostały zawory Tesli, które miały na celu precyzyjne sterowanie przepływem zarodka. W drugim lab-chipie (tzw. lab-chip prosty) zaprojektowano jeden kanał wprowadzająco-wyprowadzający. Obydwa chipy zostały wykonane w podłożu krzemowym przy zastosowaniu metody trawienia DRIE. Chipy zawierały w swojej konstrukcji pułapkę mechaniczną przypominającą kształtem koszyczek, którego ściany boczne stanowiły światłowody o średnicy płaszcza i rdzenia odpowiednio 125/100 μm . Wymiary zastosowanej pułapki były dopasowane do rozmiarów badanych zarodków tak, aby w pełni unieruchomić je w czasie wykonywania pomiarów. Zmniejszona została również długość drogi optycznej do 120 μm . Z powodów technologicznych chip z zaworami Tesli nie mógł być zastosowany (błędy procedury głębokiego trawienia kanałów metodą DRIE). W chipie prostym, błędy trawienia zostały skorygowane i przeprowadzono z jego użyciem serię eksperymentów w warunkach pozalaboratoryjnych. Badano jakość (metodą jakości pola) zarodków bydlęcych i trzody chlewnej w procedurze transferu embrionalnego. Przebadano łącznie 4 zarodki bydlęce i 21 zarodków trzody chlewnej. Zarodki bydlęce charakteryzujące się współczynnikiem AR poniżej 1,14 oraz współczynnikiem APP powyżej 565 nm prawidłowo zagnieździły się u matki biorczyny, w wyniku czego narodziły się trzy zdrowe cielaki. Z kolei 10 zarodków trzody chlewnej, które uznano za dobre, rozwijały się prawidłowo, co zaowocowało porodem 10 zdrowych prosiąt. W obydwu próbach otrzymano dobrą zgodność pomiędzy kwalifikacją, a wynikami transferu.

Istotnym wnioskiem wypływającym z przeprowadzonych badań jest fakt, że zastosowanie metod absorpcyjnych oraz odpowiednich metod obróbki sygnałów umożliwiło parametryczną ocenę jakości oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych, jednocześnie nie wpływając negatywnie na badaną komórkę.

Podsumowując wyniki tej pracy, można stwierdzić, że jest możliwa optyczna kwalifikacja jakościowa oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych z zastosowaniem instrumentu wykorzystującego technikę lab-chip. Niemniej jednak, stosunkowo mała liczba prób (szczególnie w transferze) nie pozwala na stwierdzenie, czy opracowana w tej pracy metoda pola jakości będzie mogła stać się nowym standardem w kwalifikacji jakościowej oocytów i zarodków zwierząt hodowlanych. Odpowiedź na tak postawione pytanie badawcze leży po stronie środowiska weterynaryjnego, co znacząco wybiega poza ramy tej dysertacji.

W dalszych pracach autor przewiduje zoptymalizowanie konstrukcji lab-chipa (układ dwukierunkowy z zaworami Tesli wydaje się być bardzo obiecujący) oraz wprowadzenie układu umożliwiającego automatyczne pobieranie (zasysanie) oocytów/zarodków ze zbiornika, w którym są one przechowywane (ograniczyłoby to ilość obecnie wykonywanych manipulacji mechanicznych pipetą). Celowe jest również opracowanie oprogramowania umożliwiającego otrzymanie w czasie rzeczywistym wyników klasyfikacji metodą pola jakości.

Podziękowania

Dziękuję:

- Koleżankom i Kolegom z Wydziałowego Zakładu Mikroinżynierii i Fotowoltaiki na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej,
- Panu dr inż. Sylwestrowi Bargielowi z Instytutu FEMTO-ST w Besançon za wykonanie trawienia DRIE struktur krzemowych,
- Koleżankom i Kolegom z Instytutu Technologii Elektronowej w Warszawie za wykonanie trawienia DRIE struktur krzemowych,
- Koleżankom i Kolegom z Instytutu Biologii Zwierząt Gospodarczych przy Wydziale Biologii w Dummertorfie w Niemczech za przygotowanie materiału biologicznego

Szczególne podziękowania pragnę skierować do:

- Pana dr inż. Rafała Walczaka za pomoc i wsparcie w realizacji badań,
- Paniom mgr Marcie Jackowskiej i mgr Magdalenie Woźnej oraz Panu dr Bartoszowi Kempistemu z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za izolację materiału biologicznego
- Panu prof. dr hab. Jędrzejowi Jaśkowskiemu z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za cenne konsultacje z zakresu weterynarii

7 Bibliografia

- [1] materiały konferencyjne, *26th Annual Meeting Association Europeenne de transfer embryonnaire*, Finlandia, 2010
- [2] A. Bielański, M. Tischner, *Biotechnologia rozrodu zwierząt udomowionych*, Wydawnictwo i Drukarnia Drukpol S.C., Kraków, 1997
- [3] G. Coticchio, E. Sereni, L. Serrao, S. Mazzone, I. Iadarola, A. Borini, *What criteria for the definition of oocyte quality?*, The New York Academy of Sciences, 1034, 2004, 132-144
- [4] J. Opiela, L. Kątska-Książkiewicz, *Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego, Cz. II: Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej*, Biotechnologia, 69, 2005, 151-162
- [5] T. Stankiewicz, B. Błaszczuk, J. Udała, *Wybrane aspekty dojrzewania oocytów świni w warunkach fizjologicznych pozaustrojowych*, Medycyna Weterynaryjna, 64, 2008, 400-403
- [6] F. De Loos, P. Van Maurik, T. Van Beneden, T.A.M. Kruip, *Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro*, Molecular reproduction and Development, 31, 1992, 208-214
- [7] A.A.C. de Wit, Y.A. Wurth, Th.A. Kruip, *Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex*, Journal of Animal Science, 78, 2000, 1277-1283
- [8] P. Antosik, B. Kempisty, D. Bukowska, M. Jackowska, R. Włodarczyk, J. Budna, K.P. Brüssow, M. Lianeri, P.P. Jagodziński, J.M. Jaśkowski, *Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts*, The Journal of Reproduction and Development, 2009, 55, 588-593
- [9] P. Antosik, B. Kempisty, M. Jackowska, M. Woźna, D. Bukowska, K.P. Brüssow, A. Bryja, J.M. Jaśkowski, *Are the levels of Cdk4 and Cx43 proteins of porcine oocytes associated with follicular size?*, Animal Biology, 2011, 61, 211-224
- [10] R.P. Eldsen, L.D. Nelson, G.E. Seidel Jr, *Superovulating cow with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin*, Theriogenology, 9, 1978, 17-26
- [11] H.R. Schneider Jr, R.S. Castleberry, J.L. Griffin, *Commercial aspects of bovine embryo transfer*, Theriogenology, 13, 1980, 73-85
- [12] G.M. Lindner, R.W. Wright Jr, *Bovine embryo morphology and evaluation*, Theriogenology, 20, 1983, 407-416
- [13] L.E. Donaldson, *Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle*, Veterinary record, 24, 1986, 661-663
- [14] H. Abe, S. Matsuzaki, H. Hoshi, *Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation*, Theriogenology, 52, 2002, 1273-1283
- [15] M.G.C.D. Peixoto, J.A.G. Bergmann, E. Suyama, M.R.S. Carvalho, V.M. Penna, *Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of Bos indicus embryos into Bos indicus X Bos taurus heifers*, Theriogenology, 67, 2007, 287-292

- [16] M.M. Aguilar, C.S. Galina, H. Merchant, F. Montiel, R. Canseco, Y.C. Marquez, *Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos*, Reproduction in domestic animals, 37, 2002, 341-346
- [17] P.W. Farin, B.D. Slenning, J.H. Britt, *Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro*, Theriogenology, 52, 1999, 659-670
- [18] P. Pawlak, N. Renska, E. Pers-Kamczyc, E. Warzych, D. Lechniak, *The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt*, Reproductive biology, 11, 2011, 1-18
- [19] H. Taketsuru, A. Takajo, R.M. Bao, A. Hamawaki, M. Yoshikawa, T. Miyano, *Bovine oocytes in secondary follicles grow in medium containing bovine plasma after vitrification*, Journal of Reproduction and Development, 57, 2011, 1, 99-106
- [20] D. Iżycki, *Zastosowanie cytometrii przepływowej w klinicznej diagnostyce laboratoryjnej*, Voice, 14, 2006, 8-17
- [21] V. Litwin, P. Marder, *Flow cytometry in drug discovery and development*, John Wiley & Sons, New Jersey-Hoboken, 2011
- [22] M.M. Jiménez, M.J.A. Guedan, L.M. Martin, J.A.S. Campos, I.R. Martinez, C.T. Vilella, *Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombocytopoietic marker*, European Journal of Internal Medicine, 17, 2006, 541-544
- [23] F. Brignole-Baudouina, A.C. Ottb, J.M. Warneta, C. Baudouin, *Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies*, Experimental Eye Research, 78, 2004, 473-481
- [24] J. Woźniak, A. Krzywdzińska, A. Ejduk, G. Pałynyczko, *Wykrywanie choroby resztkowej w ostrej białaczce limfoblastycznej dorosłych metodą cytometrii przepływowej tzw. „pustych pól”*, Postęp Nauk Medycznych, 7-8, 2007, 315-321
- [25] J. Baran, *Nowa epoka cytometrii przepływowej - współczesne cytometry i ich zastosowanie*, Diagnosta Laboratoryjny, 14, 2007, 10-14
- [26] J. Micuń, I. Bissenik, J. Sokołowska, M. Żmudzka, A. Winnicka, R. Lechowski, E. Malicka, *Zastosowanie biopsji chirurgicznej węzłów chłonnych i cytometrii przepływowej w rozpoznawaniu chłoniaków wieloogniskowych u psów*, Medycyna Weterynaryjna, 65, 2009, 340-343
- [27] U. Lisiecka, K. Kostro, Ł. Jarosz, *Zastosowanie cytometrii przepływowej w medycynie weterynaryjnej*, Medycyna Weterynaryjna, 63, 2007, 1040-1044
- [28] B. Wacogne, C. Pieralli, C. Roux, T. Gharbi, *Measuring the mechanical behaviour of human oocytes with a very simple SU-8 micro-tool*, Biomed Microdevices, 10, 2008, 411-419
- [29] X. Liu, R. Fernandes, A. Jurisicova, R.F. Casperb, Y. Su, *In situ mechanical characterization of mouse oocytes using a cell holding device*, Lab Chip, 10, 2010, 2154-2161
- [30] W. Choi, J. Kim, D. Lee, K. Lee, D. Koo, J. Park, *Dielectrophoretic oocyte selection chip for in vitro fertilization*, Biomed Microdevices, 10, 2008, 337-345
- [31] C. Wu, T. Saito, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Abec, H. Hoshi, T. Matsue, *Microfluidic chip integrated with amperometric detector array for in situ estimating oxygen*

- consumption characteristics of single bovine embryos*, Sensors and Actuators B, 125, 2007, 680-687
- [32] J.P. Urbanski, M. T. Johnson, D. D. Craig, D. L. Potter, D. K. Gardner, T. Thorsen, *Noninvasive Metabolic Profiling Using Microfluidics for Analysis of Single Preimplantation Embryos*, Analytical Chemistry, 17, 2008, 6500-6507
- [33] S.K. Kim, J.H. Kim, K.P. Kim, T.D. Chung, *Continuous low-voltage dc electroporation on a microfluidic chip with polyelectrolytic salt bridges*, Analytical Chemistry, 79, 2007, 7761-7766
- [34] K.B. Kim, H.Chun, H.C. Kim, T.D. Chung, *Red blood cell quantification chip using polyelectrolytic gel electrodes*, Electrophoresis, 30, 2009, 1464-1469
- [35] R. Rodriguez-Trujillo, O. Castillo-Fernandes, M. Arundell, J. Samitier, G. Gomila *Yeast cells detection in a very fast and highly versatile microfabricated cytometer*, International conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences, San Diego, 2008, 1888-1890
- [36] L.M. Fu, R.J. Yang, C.H. Lin, Y.J. Pan, G.B. Lee, *Electrokinetically driven micro flow cytometers with integrated fiber optics for on-line cell/particle detection*, Analytica Chimica Acta, 507, 2004, 163-169
- [37] M.H. Wu, J.Wang, T. Taha, Z. Cui, J.P.G. Urban, Z. Cui, *Study of on-line monitoring of lactate based on optical fibre sensor and in-channel mixing mechanism*, Biomed Microdevices, 9, 2007, 167-174
- [38] M.H. Wu, J.L. Lin, J. Wang, Z. Cui, Z. Cui, *Development of high throughput optical sensor array for on-line pH monitoring in micro-scale cell culture environment*, Biomed Microdevices, 11, 2009, 265-273
- [39] Y.C. Tung, M. Zhang, C.T. Lin, K. Kurabayashi, S.J. Skerlos, *PDMS-based optofluidic micro flow cytometer with two-color, multi-angle fluorescence detection capability using PIN photodiodes*, Sensors and Actuators B, 98, 2004, 356-367
- [40] D.A. Chang-Yen, R.K. Eich, B.K. Gale, *A monolithic PDMS waveguide system fabricated using soft-lithography techniques*, Journal of Lightwave Technology, 23, 2005, 2088-2093
- [41] J.S. Kee, D.P. Poenar, P. Neuzil, L. Yobas, *Monolithic integration of poly(dimethylsiloxane) waveguides and microfluidics for on-chip absorbance measurements*, Sensors and Actuators B, 134, 2008, 532-538
- [42] G.T. Roman, R.T. Kennedy, *Fully integrated microfluidic separations systems for biochemical analysis*, Journal of Chromatography A, 1168, 2007, 170-188
- [43] D. Barat, G. Benazzi, M.C. Mowlem, J.M. Ruano, H. Morgan, *Design, simulation and characterisation of integrated optics for a microfabricated flow cytometer*, Optics Communications, 283, 2010, 1987-1992
- [44] A. Cleary, S. Garcia-Blanco, A. Glidle, J.S. Aitchison, P. Laybourn, J.M. Cooper, *An integrated fluorescence array as a platform for lab-on-a-chip technology using multimode interference splitters*, IEEE Sensors Journal, 5, 2005, 1315-1320
- [45] J.N. Kuo, C.C. Hsieh, S.Y. Yang, G.B. Lee, *An SU-8 microlens array fabricated by soft replica molding for cell counting applications*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 17, 2007, 693-699

- [46] S. Park, Y. Jeong, J. Kim, K. Choi, H.C. Kim, D.S. Chung, K. Chun, *Fabrication of polydimethylsiloxane (PDMS) microlens for cell detection by light scattering*, International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2006, 1253-1255
- [47] H.C. Hunt, J.S. Wilkinson, *Optofluidic integration for microanalysis*, Microfluid Nanofluid, 4, 2008, 53-79
- [48] L. Novak, P. Neuzil, J. Pipper, Y. Zhang, S. Lee, *An integrated fluorescence detection system for lab-on-a-chip applications*, Lab chip, 7, 2007, 27-29
- [49] S. Balslev, A.M. Jorgensen, B. Bilenberg, K.B. Mogensen, D. Snakenborg, O. Geschke, J.P. Kutter, A. Kristenses, *Lab-on-a-chip with integrated optical transducers*, Lab chip, 6, 2006, 213-217
- [50] A. Pais, A. Banerjee, D. Klotzkin, I. Papautsky, *High-sensitivity, disposable lab-on-a-chip with thin-film organic electronics for fluorescence detection*, Lab chip, 8, 2008, 794-800
- [51] B. Cichy, A. Górecka-Drzazga, P. Szczepańska, R. Walczak, W. Posadowski, J.A. Dziuban, *Miniature field emission light sources associated with silicon-glass microcytometer for measurements of quality of oocytes*, 22nd International Vacuum Nanoelectronics Conference, Hamamatsu, 2009, 317-318
- [52] D.A. Ateya, J.S. Erickson, P.B. Howell Jr, L.R. Hilliard, J.P. Golden, F.S. Ligler, *The good, the bad, and the tiny: a review of microflow cytometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 2008, 1485-1498
- [53] T. Kamei, B.M. Paegel, J.R. Scherer, A.M. Skelley, R.A. Street, R.A. Mathies, *Integrated hydrogenated amorphous Si photodiode detector for microfluidic bioanalytical devices*, Analytical Chemistry, 75, 2003, 5300-5305
- [54] C.H. Chen, F. Tsai, V. Lien, N. Justis, Y.H. Lo, *Scattering-based cytometric detection using integrates arrayed waveguides with microfluidics*, IEEE Photonics Technology Letters, 19, 2007, 441-443
- [55] L. Hartley, K.V.I.S. Kaler, O. Yadid-Pecht, *Hybrid integration of an active pixel sensor and microfluidics for cytometry on a chip*, IEEE Transactions on Circuits and Systems, 54, 2007, 99-110
- [56] T. Preckel, G. Luedke, S.D.H. Chan, B.N. Wang, R. Dubrow, C. Buhlmann, *Detection of cellular parameters using a microfluidic chip-based system*, Journal of the Association for Laboratory Automotion, 7, 2002, 85-89
- [57] K. Cheung, S. Gawad, P. Renaud, *Impedance spectroscopy flow cytometry: on-chip label-free cell differentiation*, Cytometry Part A, 65A, 2005, 124-132
- [58] C. Lancaster, M. Kokoris, M. Nabavi, J. Clemmens, P. Maloney, J. Capadanno, J. Gerdes, C.F. Battrell, *Rare cancer cell analyzer for whole blood applications: Microcytometer cell counting and sorting subcircuits*, Methods, 37, 2005, 120-127
- [59] R. Zeggari, B. Wacogne, C. Pieralli, C. Rouxb, T. Gharbi, *A full micro-fluidic system for single oocyte manipulation including an optical sensor for cell maturity estimation and fertilisation indication*, Sensors and Actuators B, 125, 2007, 664-671
- [60] P. Szczepańska, R. Walczak, A. Wolff, J. Dziuban, *SU-8 planar waveguides for real-time PCR chips*, Eurosensors XXII, 2008, 383-386

- [61] Raport Yole Developpement, *Emerging markets for microfluidic applications in life sciences and in-vitro diagnostics*, 2009, www.yole.fr
- [62] W.-Ch. Tian, E. Finehout, *Microfluidics for Biological Applications*, Springer Science+Business Media, New York, 2008
- [63] R. Fischer, S. Steinert, U. Frober, D. Voges, M. Stubenrauch, G.O. Hofmann, H. Witte, *Cell Cultures in Microsystems: Biocompatibility Aspects*, Biotechnology and Bioengineering, 108, 2011, 687-693
- [64] S. Bargiel, J. A. Dziuban, R. Walczak, P. Knapkiewicz, Ł. Nieradko, A. Grzegorska, B. Latecki, *Optimized optical microsensor for near-infrared spectroscopy of chemically aggressive fluids in microreactors*, International conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences, Paryż, 2007, 1664-1666
- [65] N.T. Nguyen, S.T. Wereley, *Fundamentals and Applications of Microfluidics*, Artech House, Boston, 2006
- [66] V. Lindroos, M. Tilli, A. Lehto, T. Motooka, *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies*, Elsevier Publishers, 2010
- [67] J.A. Dziuban, *Technologia i zastosowanie mikromechanicznych struktur krzemowych i krzemowo-szklanych w technice mikrosystemów*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2004,
- [68] J.A. Dziuban, *Bonding in Microsystem Technology*, Holandia, Springer, 2006
- [69] C.I. Kim, J.E. Ellington, R.H. Foote, *Maturation, fertilization and development of bovine oocytes in vitro using TCM199 and a simple defined medium with co-culture*, Theriogenology, 33, 1990, 433-440
- [70] P. Szczepańska, R. Walczak, J. Dziuban, M. Jackowska, B. Kempisty, J. Jaśkowski, S. Bargiel, *Lab-on-chip quality classification of porcine/bovine oocytes*, Procedia Chemistry, 1, 2009, 341-344
- [71] P. Szczepańska, R. Walczak, J. Dziuban, B. Kempisty, M. Jackowska, P. Antosik, J. Jaśkowski, *Ocena jakości komórek rozrodczych zwierząt hodowlanych z wykorzystaniem mikrocytometru typu lab-chip*, Elektronika, 51, 2010, 93-96
- [72] K. Papis, O. Poleszczuk, E. Wenta-Muchalska, J.A. Modliński, *Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration*, Journal of Pineal Research, 43, 2007, 321-326
- [73] B. Kempisty, M. Jackowska, H. Piotrowska, P. Antosik, M. Woźna, D. Bukowska, K.P. Brussow, J.M. Jaśkowski, *Zona pellucida glycoprotein 3(pZP3) and integrin B2 (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test*, Theriogenology, 78, 2011, 1524-1525
- [74] B.R Hill, L.F. Kuehner, *Bovine donor blood cholesterol, embryo colour and embryo freezability*, Theriogenology, 49, 1998, 168
- [75] P. Śniadek, R. Walczak, J. Dziuban, M. Jackowska, J. Jaśkowski, J. Kluger, A. Chelmońska-Soyta, *Optical characterization of oocyte of farm animals and small mammalian embryos*, 4th International Workshop On Multianalyte Biosensing Device, Ateny, 2011

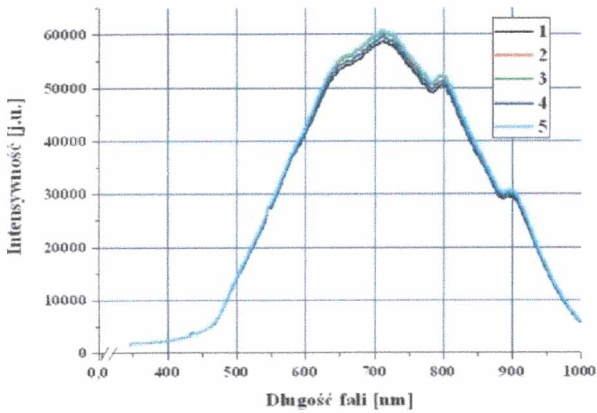
- [76] M. Turowski, Z. Chen, A. Przekwas, *Automated Generation of Compact Models for Fluidic Microsystems*, Analog Integrated Circuits and Signal Processing, 29, 2001, 27-36
- [77] A. Fadl, Z. Zhang, S. Geller, J. Tolke, M. Krafczyk, D. Meyer, *The effect of the microfluidic diodicity on the efficiency of valve-less rectification micropumps using Lattice Boltzmann Method*, Microsystem Technologies, 15, 2009, 1379–1387
- [78] P. Szczepańska, R. Walczak, J. Dziuban, B. Kempisty, A. Chałmońska-Soyta, J. Kluger, M. Jackowska, J. Jaśkowski, *Quality and viability assessment of oocytes/embryos of animals by optical characterization in lab-on-a-chip device*, 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen, 2010, 959-961
- [79] J. Jaśkowski, *Transfer of bovine embryos in Poland – scale and efficiency of the method*, Medycyna Weterynaryjna, 56, 2000, 29-31
- [80] J. Jaśkowski, K. Brüssow, P. Antosik, *Development of embryotransfer methods in swine*, Medycyna Weterynaryjna, 61, 2005, 730-734
- [81] R. C. King, W. D. Stanfield, *Słownik terminów genetycznych*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych Polska Akademia Nauk, Poznań, 2002

Dodatek A

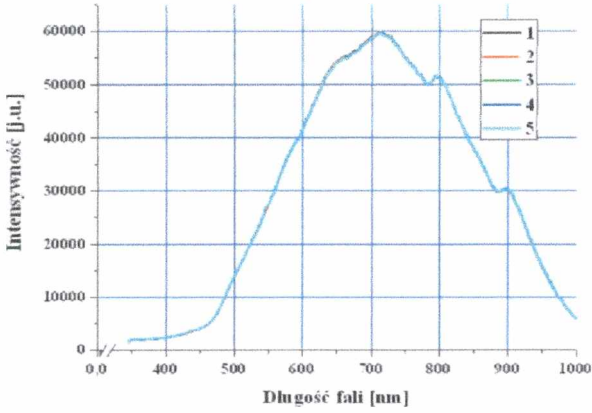
Do podrozdziału 4.3.1 strona 46 - oocyty bydłące

- Charakterystyki medium

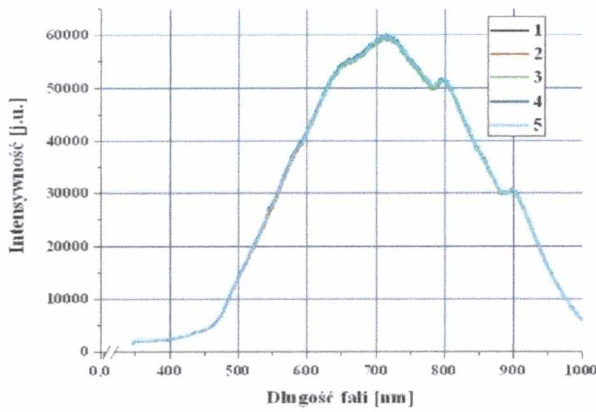
II klasa



III klasa



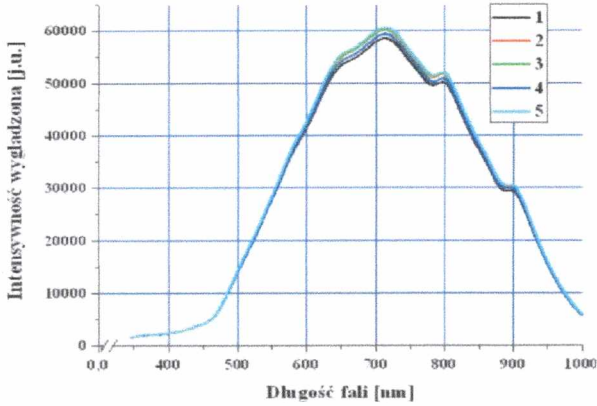
IV klasa



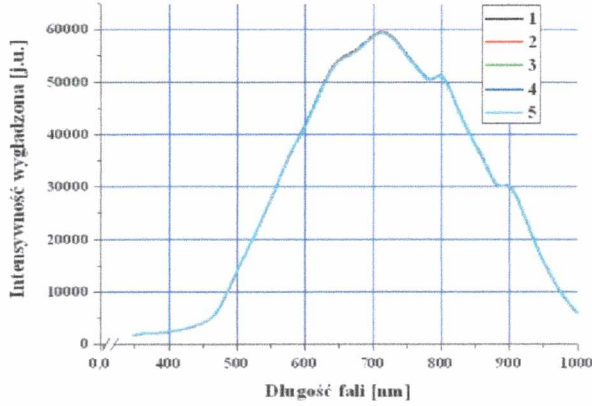
Rysunek 1 – Charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej klasy.

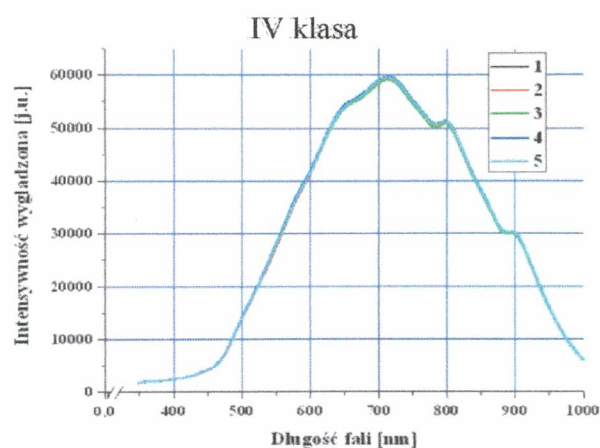
- Wygładzone charakterystyki medium

II klasa



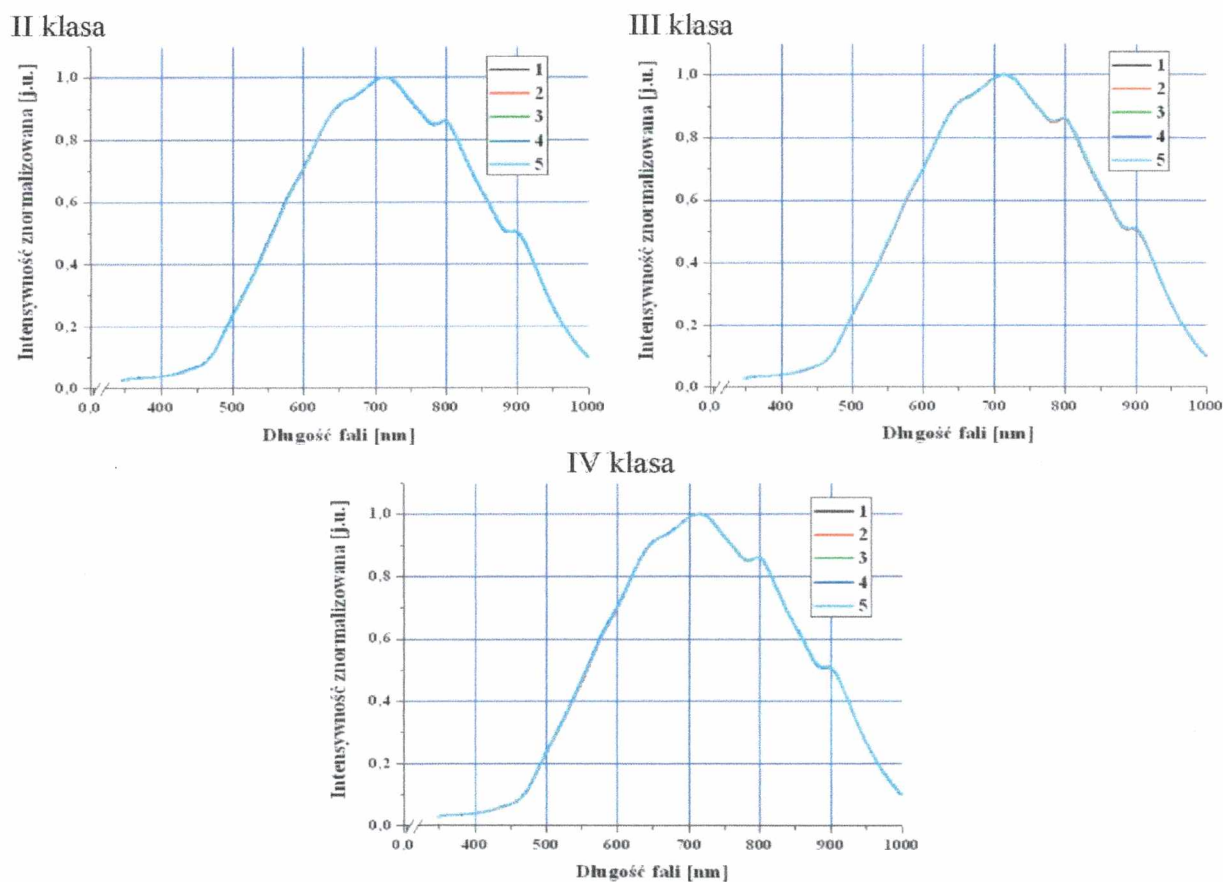
III klasa





Rysunek 2 - Wygładzone charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej klasy.

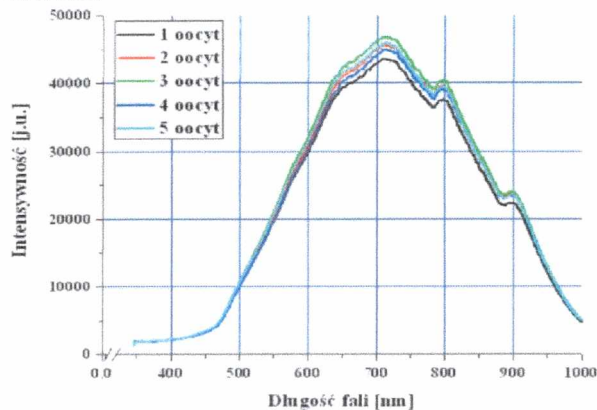
- Znormalizowane charakterystyki medium



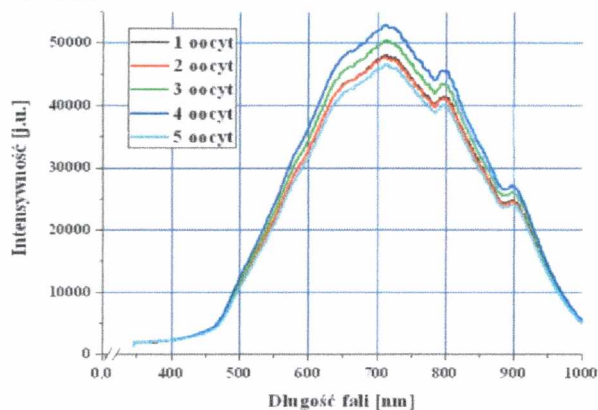
Rysunek 3 - Charakterystyki intensywności znormalizowanej medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej klasy.

- Charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

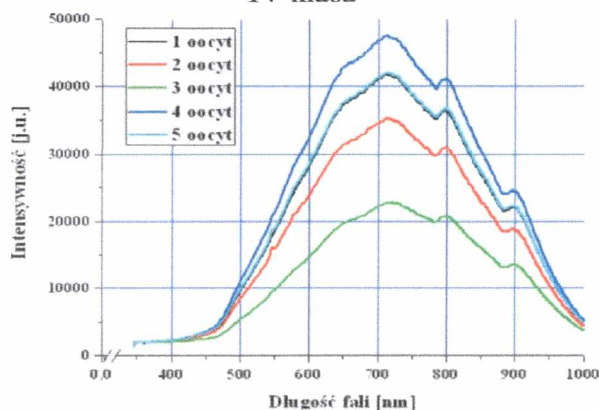
II klasa



III klasa



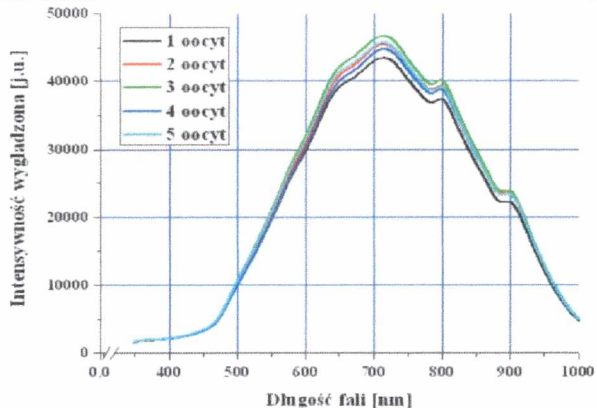
IV klasa



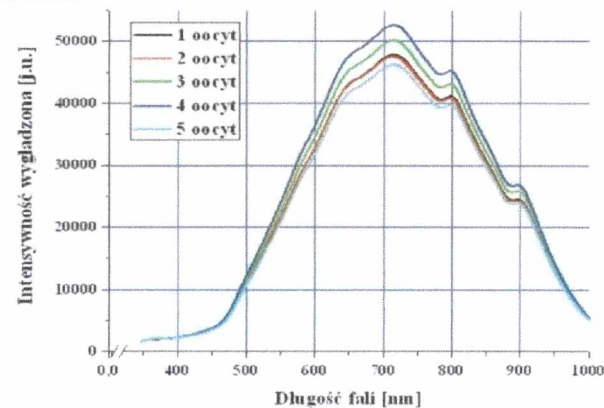
Rysunek 4 - Charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej klasy morfologicznej.

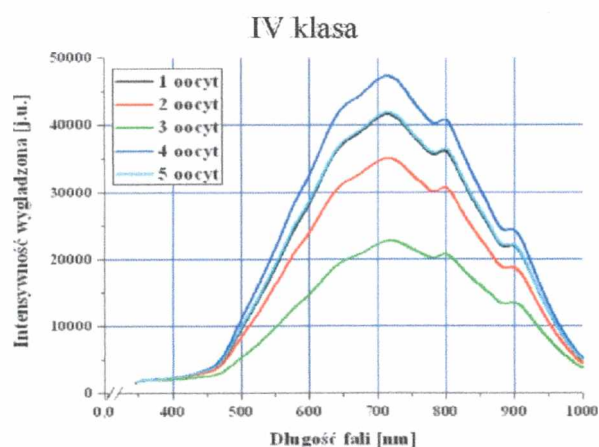
- Wygładzone charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

II klasa



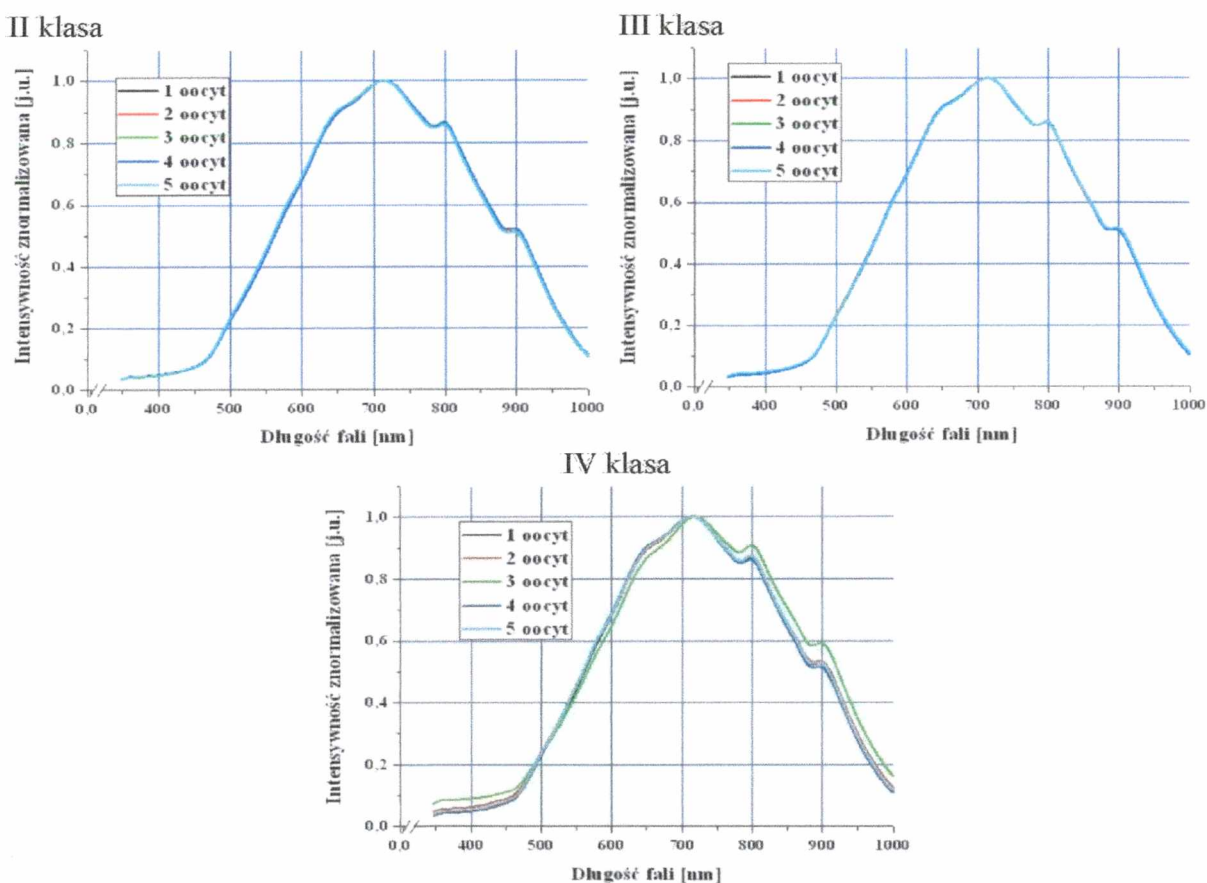
III klasa





Rysunek 5 - Wyglądzone charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej klasy morfologicznej.

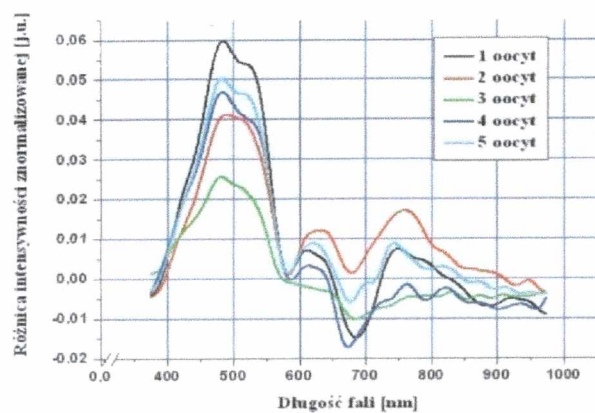
- Znormalizowane charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium



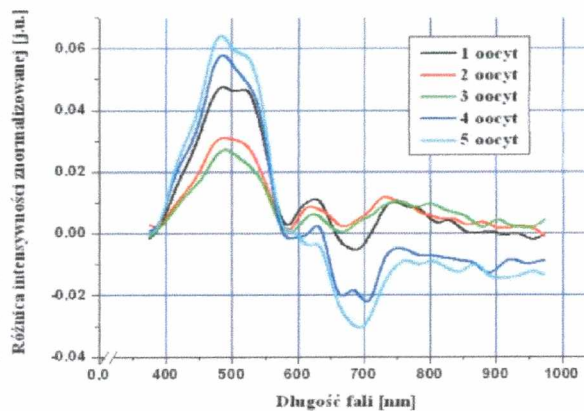
Rysunek 6 - Charakterystyki intensywności znormalizowanej poszczególnego oocytu „zawieszonego” w medium przyporządkowane do poszczególnych klas morfologicznych.

- Charakterystyki oocytów

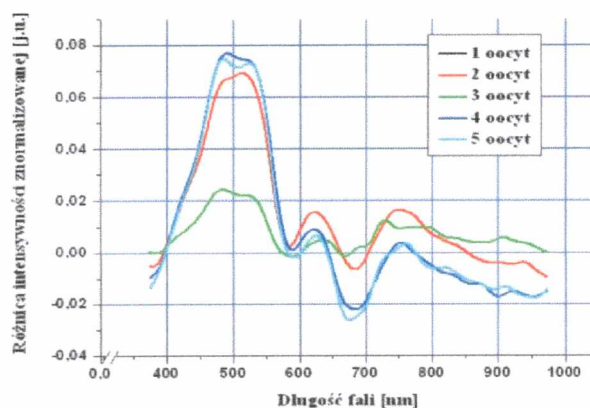
II klasa



III klasa



IV klasa

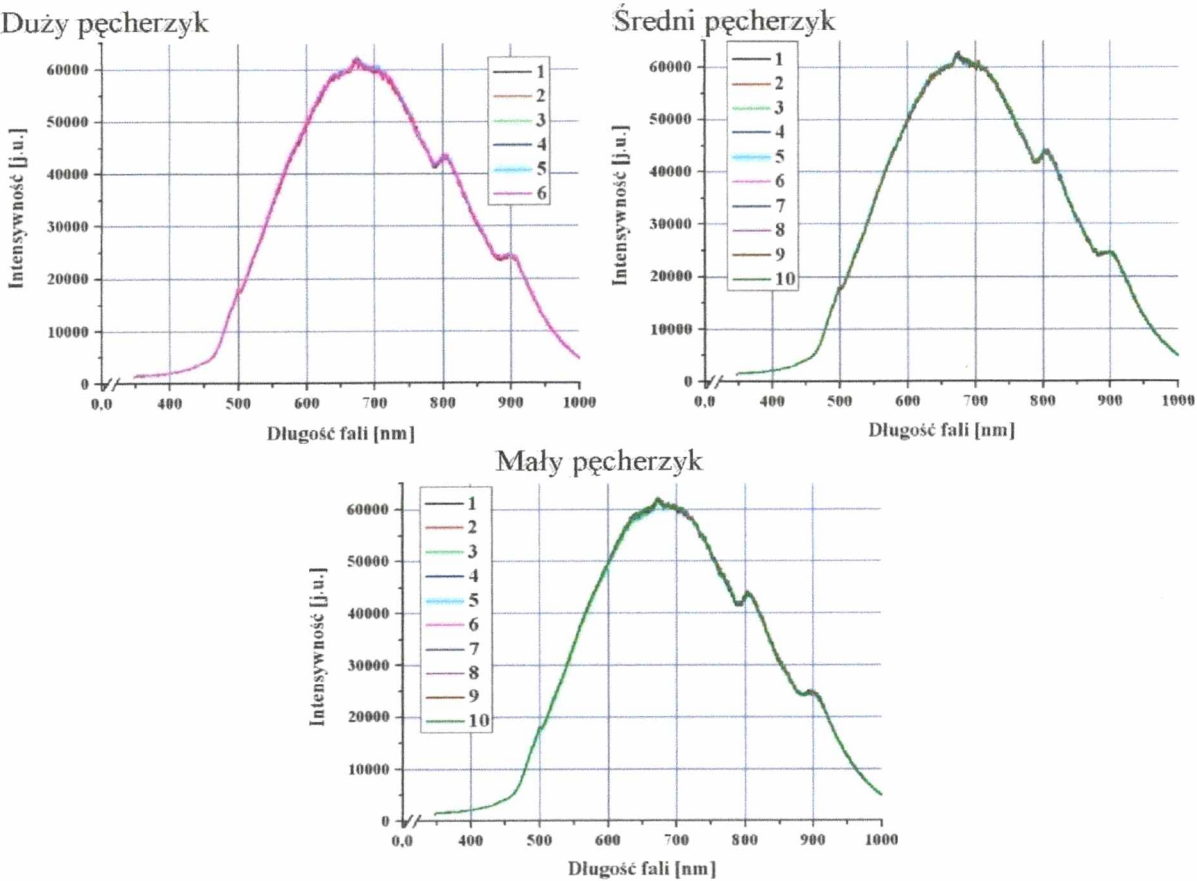


Rysunek 7 – Charakterystyki poszczególnych badanych oocytów pochodzących z różnych klas morfologicznych.

Dodatek B

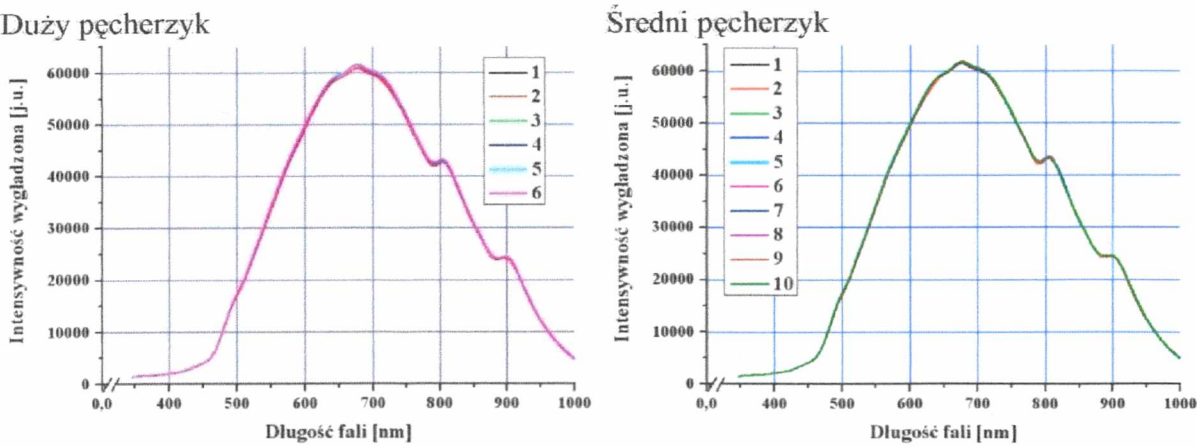
Do podrozdziału 4.3.2 strona 52 - oocyty trzody chlewnej

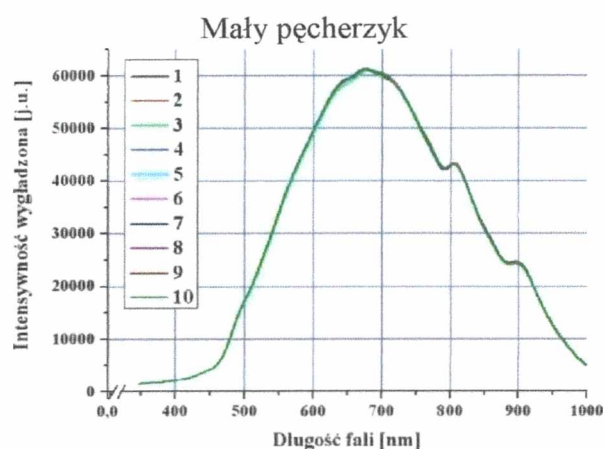
- Charakterystyki medium



Rysunek 1 - Charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

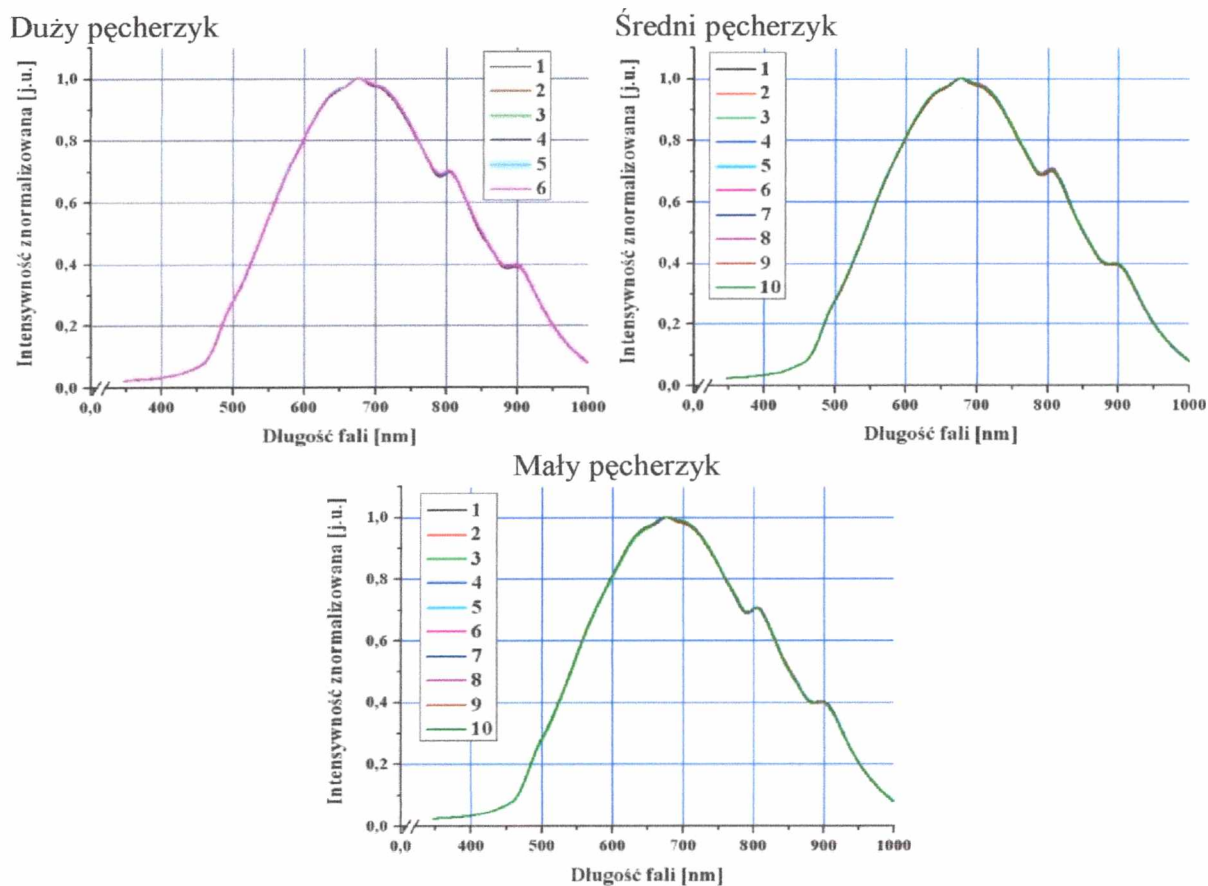
- Wygładzone charakterystyki medium





Rysunek 2 - Wyglądzone charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

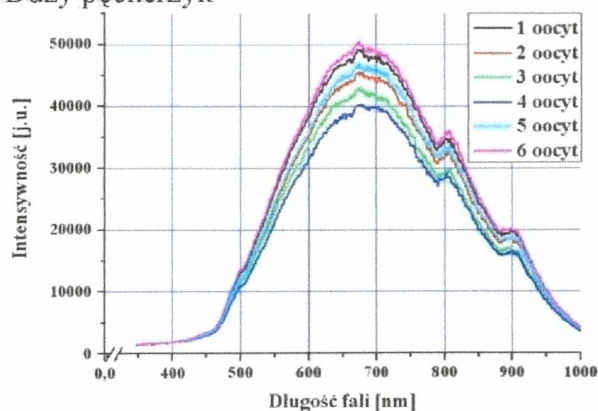
- Znormalizowane charakterystyki medium



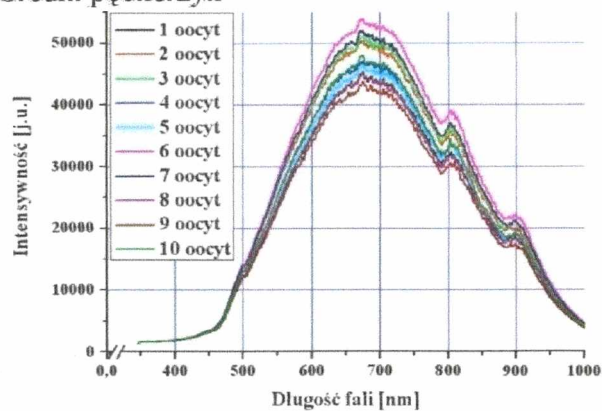
Rysunek 3 - Charakterystyki intensywności znormalizowanej medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

- Charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

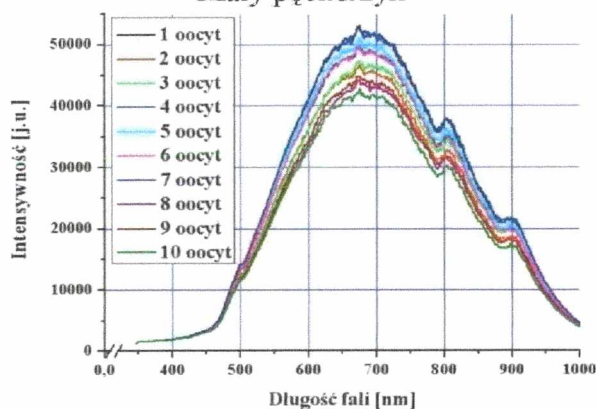
Duży pęcherzyk



Średni pęcherzyk



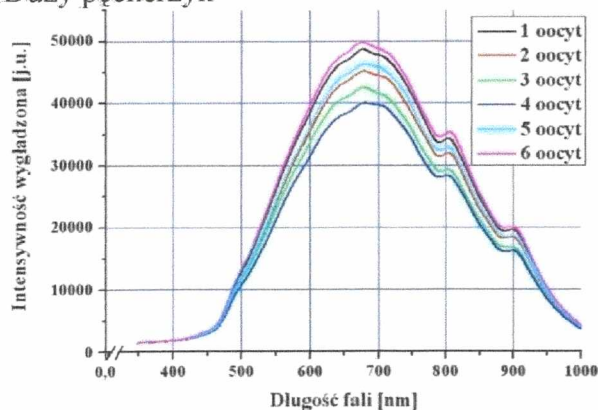
Mały pęcherzyk



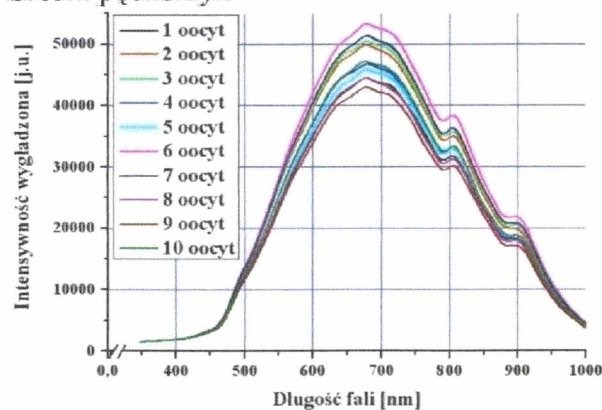
Rysunek 4 - Charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej grupy.

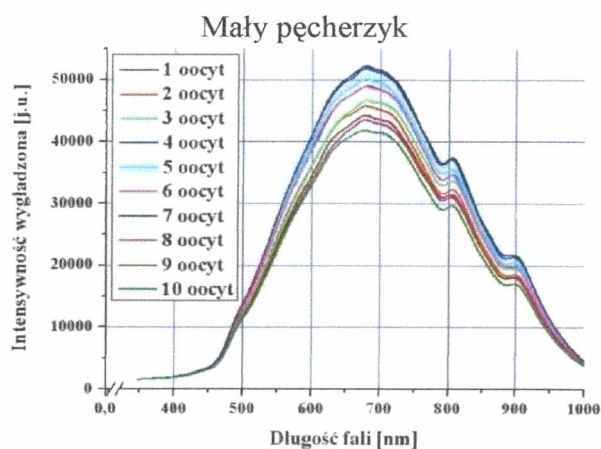
- Wygładzone charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

Duży pęcherzyk



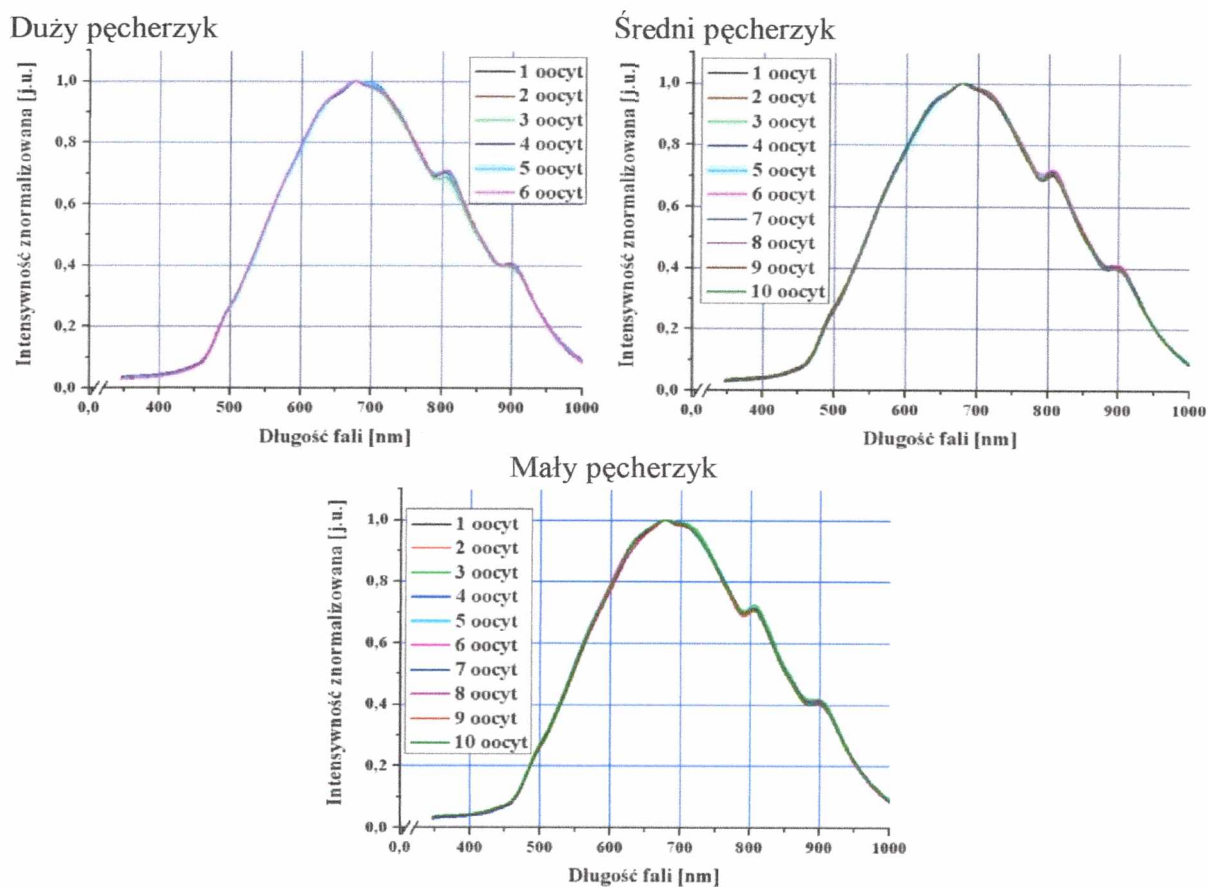
Średni pęcherzyk





Rysunek 5 - Wyglądzone charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej grupy.

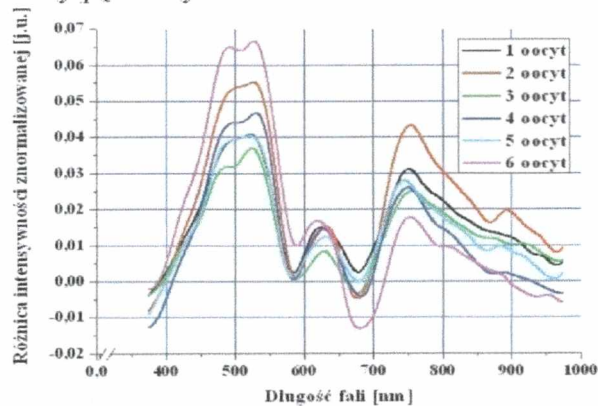
- Znormalizowane charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium



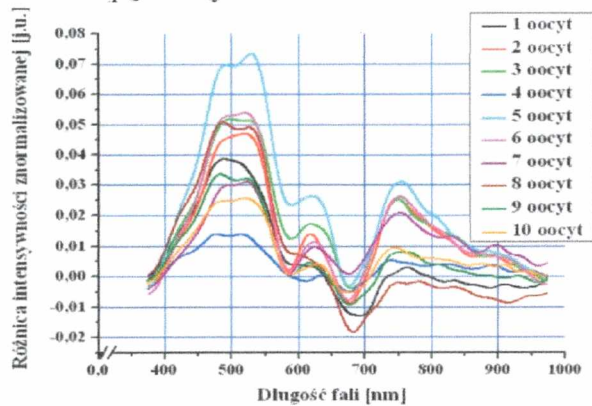
Rysunek 6 - Charakterystyki intensywności znormalizowanej poszczególnego oocytu „zawieszonego” w medium przyporządkowane do poszczególnych grup.

- Charakterystyki oocytów

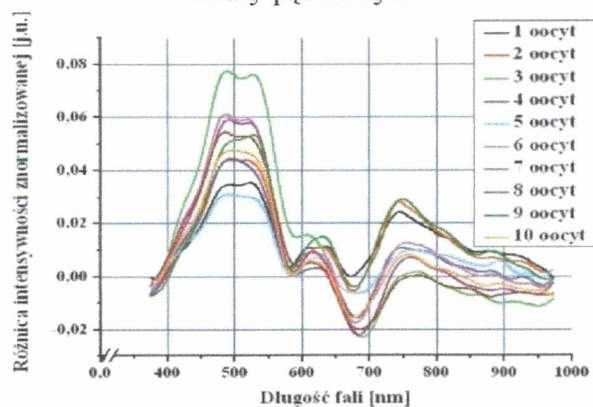
Duży pęcherzyk



Średni pęcherzyk



Mały pęcherzyk

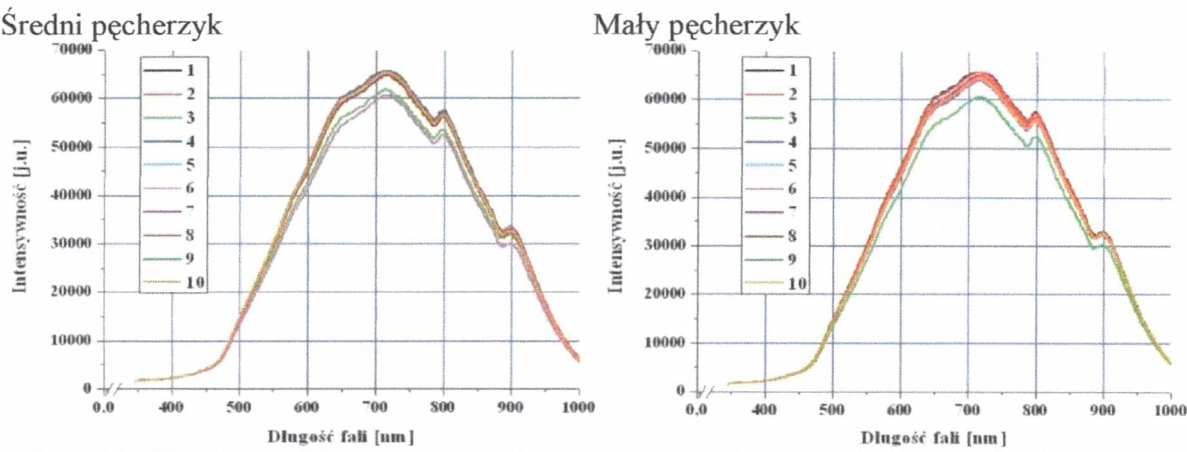


Rysunek 7 - Charakterystyki poszczególnych badanych oocytów pochodzących z różnej wielkości pęcherzyków jajnikowych.

Dodatek C

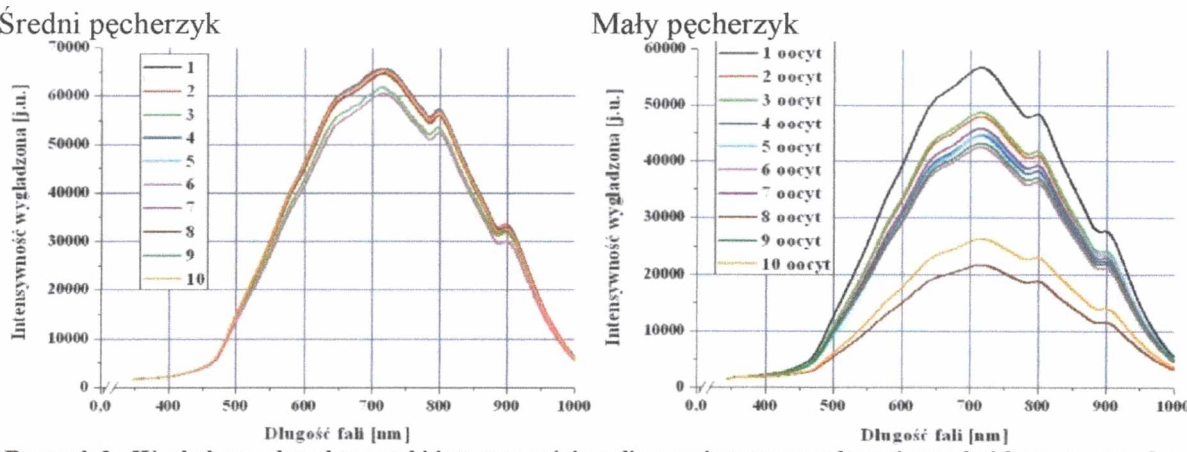
Do podrozdziału 4.4.1 strona 55 - oocyty trzody chlewnej

- Charakterystyki medium



Rysunek 1 - Charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

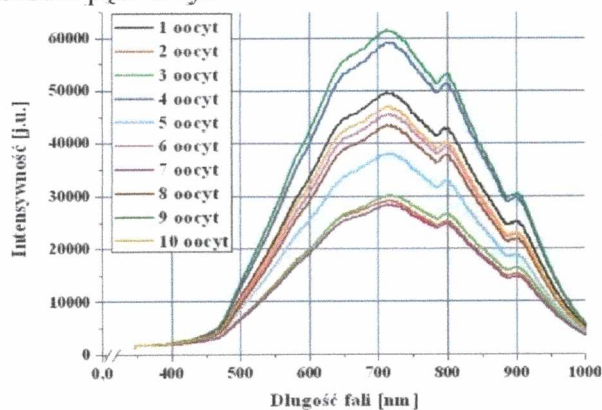
- Wyglądzone charakterystyki medium



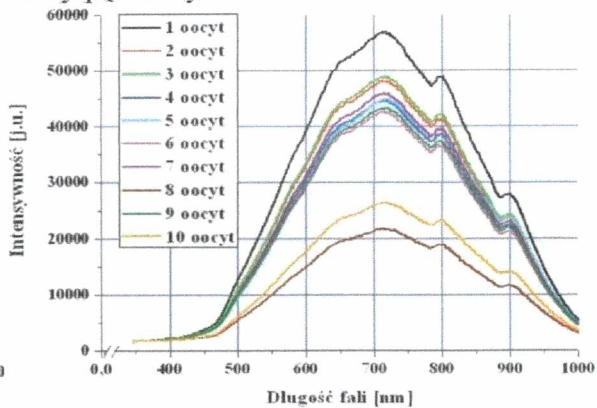
Rysunek 2 - Wyglądzone charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

- Charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

Średni pęcherzyk



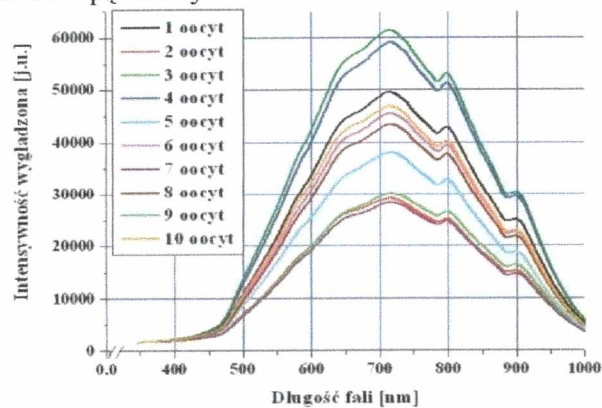
Mały pęcherzyk



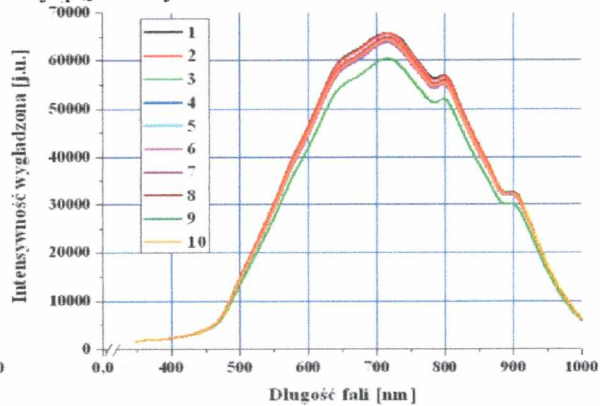
Rysunek 3 - Charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej grupy.

- Wyglądzone charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

Średni pęcherzyk



Mały pęcherzyk

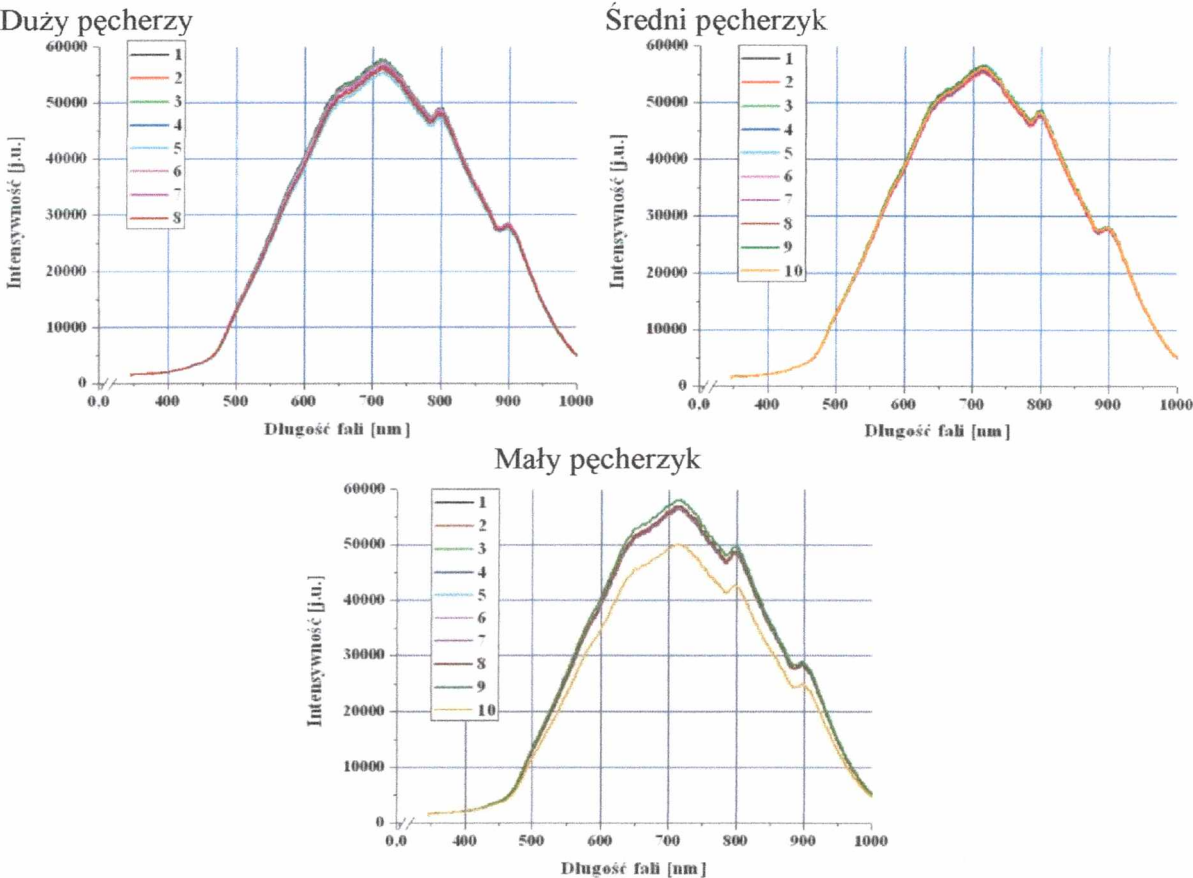


Rysunek 4 - Wyglądzone charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej grupy.

Dodatek D

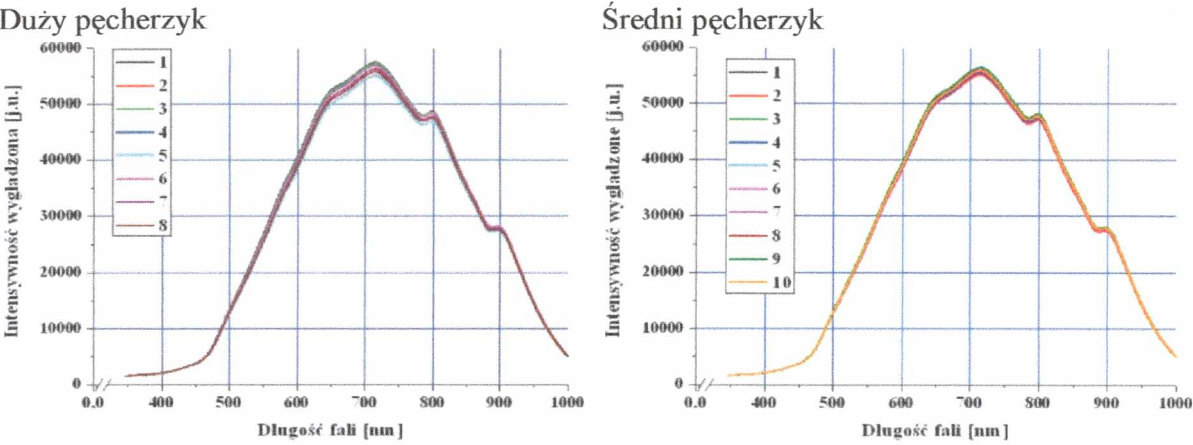
Do podrozdziału 4.4.1 strona 63 - oocyty trzody chlewnej

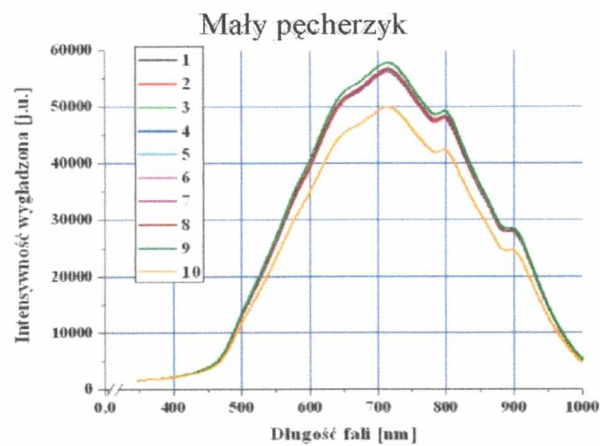
- Charakterystyki medium



Rysunek 1 - Charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

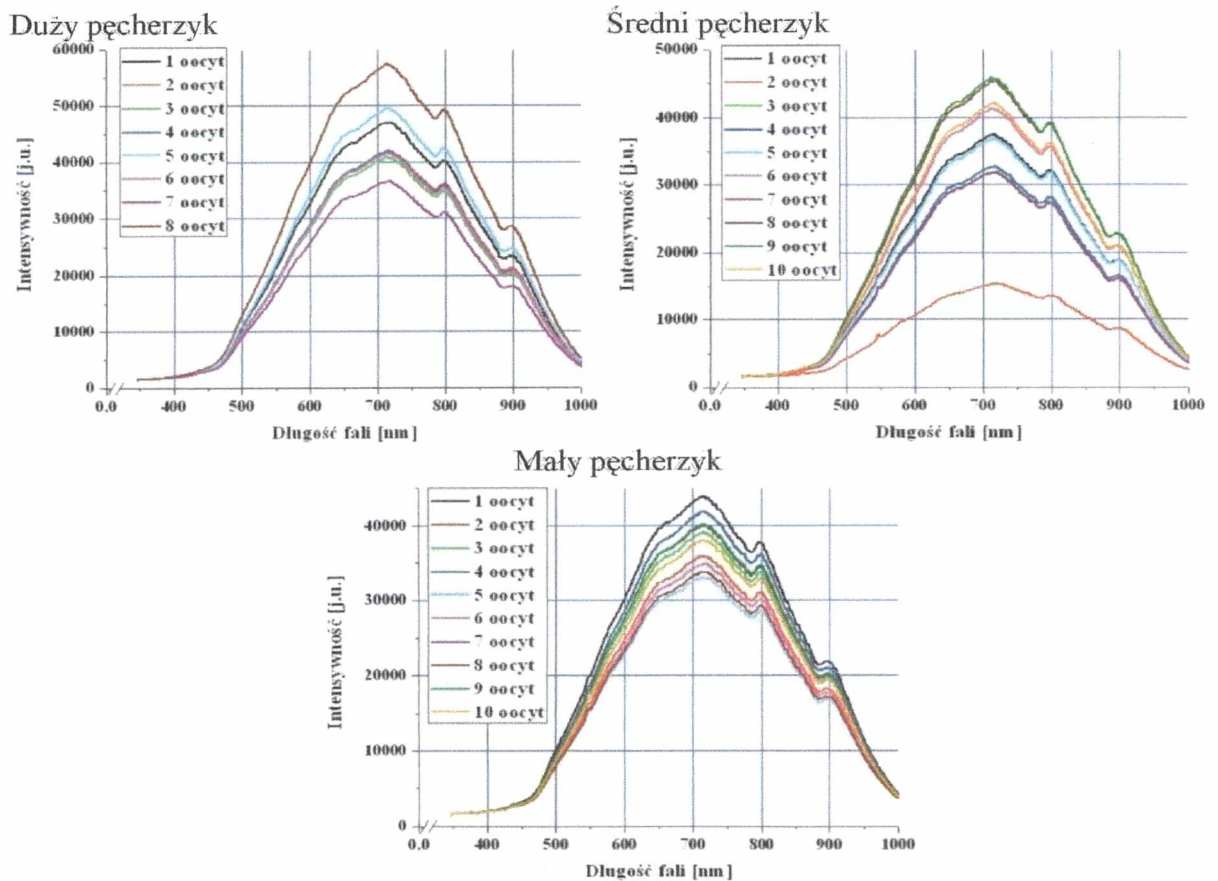
- Wygładzone charakterystyki medium





Rysunek 2 - Wygładzone charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego oocytu z danej grupy.

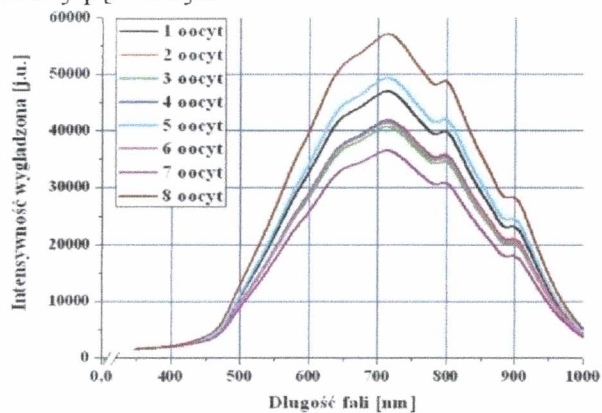
- Charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium



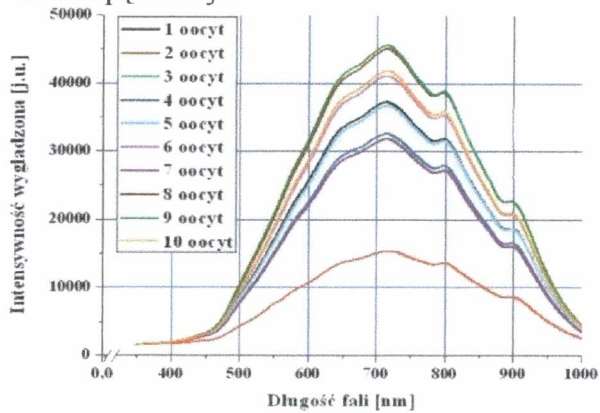
Rysunek 3 - Charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej grupy.

- Wygładzone charakterystyki oocytów „zawieszonych” w medium

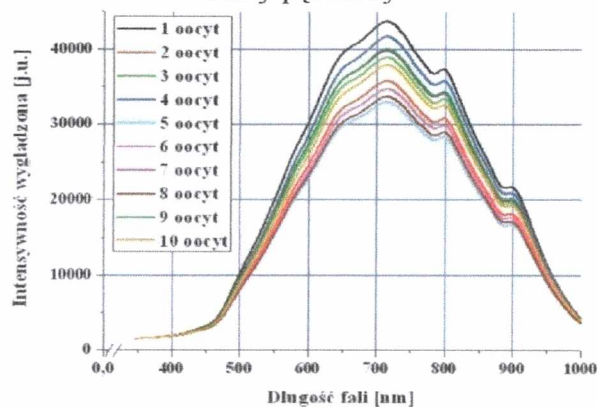
Duży pęcherzyk



Średni pęcherzyk



Mały pęcherzy

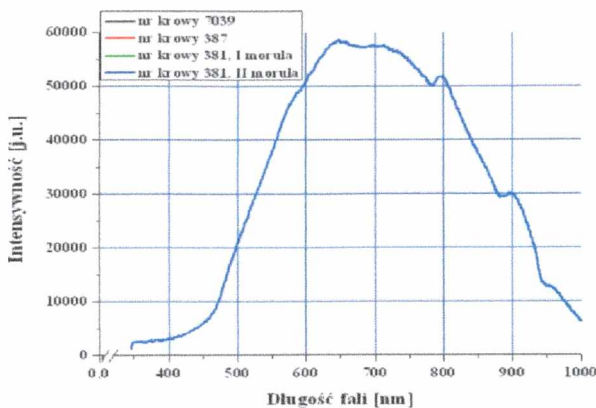


Rysunek 4 - Wygładzone charakterystyki intensywności poszczególnych oocytów „zawieszonych” w medium przyporządkowanych do danej grupy.

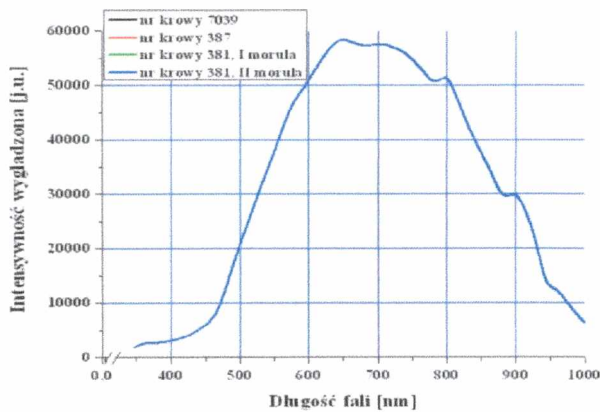
Dodatek E

Do podrozdziału 5.3.1 strona 80 - zarodki bydłące

- Charakterystyki medium

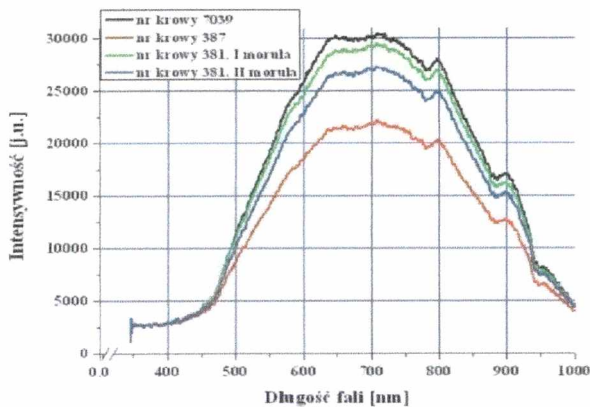


Rysunek 1 – Charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego zarodka.

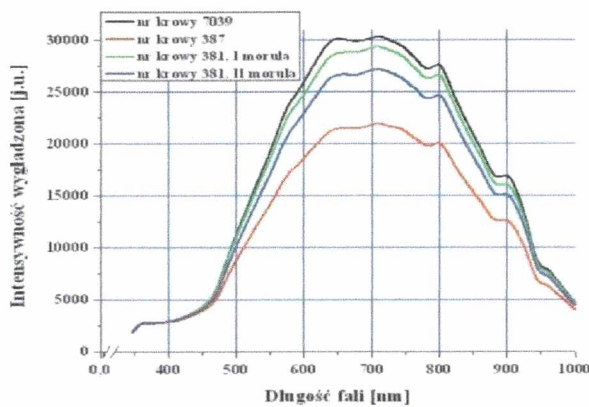


Rysunek 2 – Wyglądzone charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego zarodka.

- Charakterystyki zarodków bydłących „zawieszonych” w medium



Rysunek 3 – Charakterystyki intensywności poszczególnych zarodków „zawieszonych” w medium.

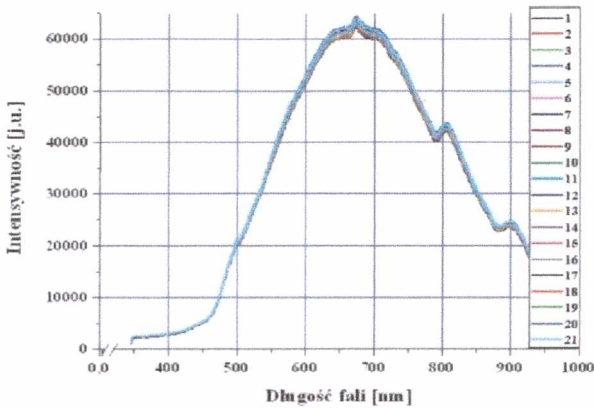


Rysunek 4 – Wyglądzone charakterystyki intensywności poszczególnych zarodków „zawieszonych” w medium.

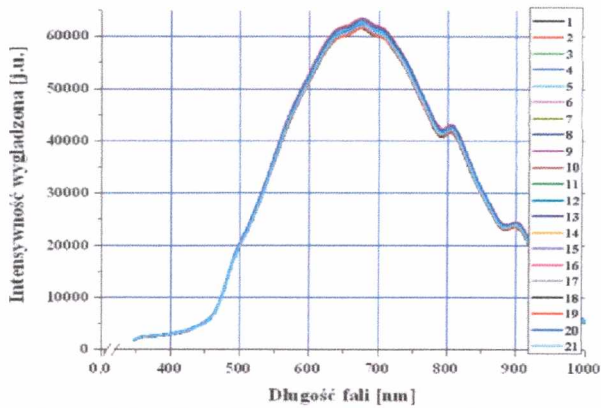
Dodatek F

Do podrozdziału 5.3.2 strona 84 - wyniki pomiarowe zarodków trzody chlewnej

- Charakterystyki medium

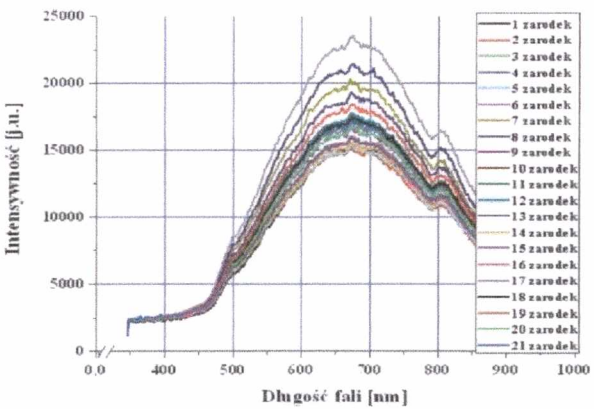


Rysunek 1 – Charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego zarodka.

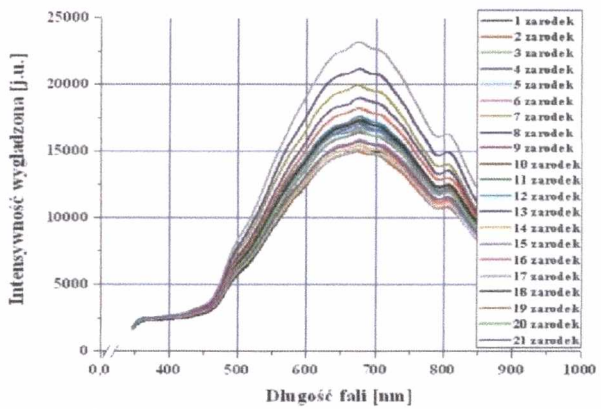


Rysunek 2 – Wygładzone charakterystyki intensywności medium zmierzone przed pomiarem każdego zarodka.

- Charakterystyki zarodków trzody chlewnej „zawieszonych” w medium



Rysunek 3 – Charakterystyki intensywności poszczególnych zarodków „zawieszonych” w medium.



Rysunek 4 – Wygładzone charakterystyki intensywności poszczególnych zarodków „zawieszonych” w medium.