



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV MIKROELEKTRONIKY

DEPARTMENT OF MICROELECTRONICS

MIKROFLUIDNÍ SYSTÉMY V KŘEMÍKOVÉ TECHNOLOGII

MICROFLUIDIC SYSTEMS IN SILICON TECHNOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dominik Juránek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Imrich Gablech, Ph.D.

BRNO 2022

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Mikroelektronika**

Ústav mikroelektroniky

Student: Bc. Dominik Juránek

ID: 203530

Ročník: 2

Akademický rok: 2021/22

NÁZEV TÉMATU:

Mikrofluidní systémy v křemíkové technologii

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s problematikou mikrofluidních systémů vyrobených v křemíkové technologii, které se využívají k různým analýzám například ve zdravotnictví. Zaměřte se zejména na možnosti uzavírání mikrofluidních struktur a jejich následné připojování na mikrofluidní vedení. Na základě konzultace s vedoucím práce a získaných poznatků realizujte finalizaci mikrofluidního systému pomocí vhodných materiálů pro uzavření struktur a jejich následné napojení na mikrofluidní vedení. Těsnost výsledných struktur otestujte pomocí mikropump.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

Podle doporučení vedoucího práce.

Termín zadání: 7.2.2022

Termín odevzdání: 24.5.2022

Vedoucí práce: Ing. Imrich Gablech, Ph.D.

Konzultant: Ing. Radim Hrdý, Ph.D.

doc. Ing. Lukáš Fojcik, Ph.D.

předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá využitím a funkcí mikrofuidních zařízení. Blíže se potom zaměřuje na jejich práci s krví, kde se mikrofuidní zařízení dají využít k rozřiznutí červených krvinek. První část této práce je věnovaná teorii vzpjaté z mikrofluidikou, stručně uvádí historii mikrofuidních zařízení a materiálů využívaných k jejich integraci, dále hovoří o využívaných metodách při výrobě samotných mikrofuidních zařízení v křemíkovém substrátu. Jako poslední je v této části popsána struktura krve z hlediska jejího složení a vlastností, které jsou pro práci s mikrofuidními zařízeními důležité. Praktická část zahrnuje (výrobní postup) vytvoření mikrofuidního zařízení a testování zařízení, tak aby bylo schopné červené krvinky rozřiznout.

Klíčová slova

mikrofuidní zařízení, mikrofluidika, křemík, DRIE, červené krvinky

Abstract

This thesis is devoted to the topic of microfluidics and the functionality of microfluidic devices when working with blood. It further focuses on the use of microfluidic devices to cut blood cells. The first part of this work is dedicated to the theoretical background of microfluidics, it briefly introduces the history of microfluidic devices and the materials used for their integration, moreover, it talks about the methods used when constructing a microfluidic device in a silicon substrate. Lastly, this section includes a description of blood and its composition and some properties important for working with microfluidic devices. The practical part is concerned with the (manufacturing procedure of) creating a microfluidic and testing of device that can cut red blood cells.

Keywords

microfluidic devices, microfluidics, silicon, DRIE, red blood cells

Bibliografická citace

JURÁNEK, Dominik. *Mikrofluidní systémy v křemíkové technologii* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/142448>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav mikroelektroniky. Vedoucí práce Imrich Gablech.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení studenta:	<i>Bc. Dominik Juránek</i>
VUT ID studenta:	<i>203530</i>
Typ práce:	<i>Diplomová práce</i>
Akademický rok:	<i>2021/22</i>
Téma závěrečné práce:	<i>Mikrofluidní systémy v křemíkové technologii</i>

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

·
V Brně dne: 24. května 2022

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Imrichu Gablechovi, Ph.D. a Ing. Radimovi Hrdému, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne: 24. května 2022

podpis autora

Část práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury CzechNanoLab (ID LM2018110, MŠMT, 2020–2022), CEITEC Vysoké učení technické v Brně.

Obsah

1. ÚVOD	11
2. HISTORIE	12
3. MATERIÁLY PRO VÝROBU MIKROFLUIDNÍCH SYSTÉMŮ	14
3.1 ANORGANICKÉ MATERIÁLY	14
3.1.1 <i>Křemík</i>	14
3.1.2 <i>Keramika</i>	15
3.1.3 <i>Sklo</i>	16
3.2 POLYMERY	17
3.2.1 <i>Polydimethylsiloxan</i>	17
3.2.2 <i>Polymethylmethakrylát</i>	18
3.2.3 <i>Polystyren</i>	19
3.2.4 <i>Polyuretan</i>	19
3.3 PAPIR	19
3.4 HYDROGELY	20
3.5 PŘÍKLADY OSTATNÍCH MATERIÁLŮ	21
4. HLOUBKOVÉ REAKTIVNÍ IONTOVÉ LEPTÁNÍ (DRIE)	22
4.1 KRYOGENNÍ PROCES	22
4.2 BOSCH PROCES	23
4.3 SMÍŠENÝ PROCES	24
4.4 VÍCEKROKOVÝ PROCES	25
5. VYUŽITÍ MIKROFLUIDNÍCH SYSTÉMŮ	26
5.1 LABORATOŘ NA ČIPU	26
5.2 ORGÁN NA ČIPU	27
5.3 SEPARACE A TŘÍDĚNÍ BUNĚK	28
6. KREV A MIKROFLUIDIKA	29
6.1 SLOŽENÍ KRVE	29
6.1.1 <i>Červené krvinky</i>	29
6.1.2 <i>Bílé krvinky</i>	29
6.1.3 <i>Krevní destičky</i>	29
6.1.4 <i>Krevní plazma</i>	30
6.2 VYUŽITÍ KRVE V MIKROFLUIDICE	30
7. PRAKTICKÁ ČÁST	31
7.1 NÁVRH MIKROFLUIDNÍHO ČIPU	31
7.2 VÝROBA ČIPŮ	34
7.2.1 <i>Výroba masek</i>	34
7.2.2 <i>Přenos prvního motivu na substrát</i>	34
7.2.3 <i>Příprava na přenos druhého motivu na substrát</i>	35
7.2.4 <i>Přenos druhého motivu na substrát</i>	36
7.2.5 <i>Leptání motivu pomocí DRIE</i>	37
7.2.6 <i>Rozdělení jednotlivých čipů</i>	39

7.2.7	<i>Spojování čipů s krycím sklem</i>	40
7.3	PŘIPOJOVÁNÍ ČIPU NA PŘÍVOD TEKUTIN	42
7.4	ANALÝZA ČIPŮ POMOCÍ SEM	44
7.4.1	<i>První motiv</i>	44
7.4.2	<i>Druhý a třetí motiv</i>	45
7.4.3	<i>Čtvrtý motiv</i>	47
7.4.4	<i>Pátý design</i>	49
7.4.5	<i>Šestý design</i>	50
7.5	PŘÍPRAVA TESTOVACÍ VZORKU S ERYTROCITY	51
7.6	TESTOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH DESIGNŮ	54
7.6.1	<i>Testování prvního designu</i>	55
7.6.2	<i>Testování druhého designu</i>	56
7.6.3	<i>Testování třetího designu</i>	58
7.6.4	<i>Testování čtvrtého designu</i>	59
7.6.5	<i>Testování pátého designu</i>	60
7.6.6	<i>Testování šestého designu</i>	62
7.7	ČIŠTĚNÍ ČIPU	63
8.	ZÁVĚR	64

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mikrofluidní kanálky vytvořené na křemíku.[5]	15
Obrázek 2: Mikrofluidní zařízení realizované pomocí LTCC.[2]	16
Obrázek 3: Mikrofluidní čip realizován na skelném substrátu.[6]	17
Obrázek 4: Vytvoření PDMS mikrofluidního čipu pomocí křemíkové předlohy.[13]	18
Obrázek 5: Mikrofluidní zařízení pro detekci anorganických explozivních materiálů.[12]	20
Obrázek 6: Znárodnění výroby hydrogelového mikrofluidního zařízení pomocí negativní formy.[14]	21
Obrázek 7: Vroubkovaná struktura pořízena pomocí SEM.[37]	24
Obrázek 8: Popis struktury vytvořené Bosch procesem.[22]	24
Obrázek 9: Znárodnění víceokrového Bosch procesu.[27]	25
Obrázek 10: Schéma znázorňující funkci těhotenského testu.[19]	27
Obrázek 11: Diagram člověka na čipu a k čemu se jednotlivé orgány využívají.[26]	28
Obrázek 12: Různé typy mikrofiltrův separace a třídění buněk.[34]	28
Obrázek 13: Návrh prvního motivu pro masku	31
Obrázek 14: Design tvaru čepele.	32
Obrázek 15: Porovnání rozestupů mezi sloupci čepelí u motivů 6 (vlevo) a 5 (vpravo)	32
Obrázek 16: Design prvního motivu masky	33
Obrázek 17: Design druhého motivu masky.	34
Obrázek 18: První skleněná maska s motivem kanálků a čepelemi	35
Obrázek 19: Skleněná maska s druhým motivem otvorů a rozdělovacích kanálků.	37
Obrázek 20: Křemíkový substrát vyleptaný hrubým procesem.	38
Obrázek 21: Vyleptaný křemíkový substrát na podložním substrátu.	39
Obrázek 22: Rozdělování křemíkového substrátu na jednotlivé čipy.	39
Obrázek 23: Pyrexové sklíčko s nadeponovanou vrstvou Parylenu-C (vlevo) křemíkový čip (vpravo)....	40
Obrázek 24: Špatně spojený čip z důvodu otočení sklíčka (vlevo) správně spojený čip (vpravo)	41
Obrázek 25: Čip s defektem způsobený křemíkovou částicí	41
Obrázek 26: Čipy s polyuretanovými fitinkami.	42
Obrázek 27: Adhezni kroužky (vlevo) a fitinka pro připojení k čipu (vpravo).	43
Obrázek 28: Zapojený čip s přírodními hadičkami.	43
Obrázek 29: Detailní snímek celého čipu (vlevo) a detailní snímek pole čepelí (vpravo) prvního motivu.	45
Obrázek 30: Detailní záběr čepele (napravo) a seřazených čepelí (vlevo) u prvního motivu.	45
Obrázek 31: Detailní snímek druhého motivu (vpravo) a detailní snímek třetího motivu (vlevo)	46
Obrázek 32: Detailní záběry čepelí druhého motivu.	46
Obrázek 33: Detailní záběr čepelí třetího motivu.	47
Obrázek 34: Detailní záběr čipu (vlevo) a pole čepelí (vpravo) pro čtvrtý motiv.	47
Obrázek 35: Detailní záběry čepelí u čtvrtého motivu.	48
Obrázek 36: Detailní záběr otvoru pro přívod roztoku u čtvrtého motivu.	49
Obrázek 37: Detailní záběr čipu pátého motivu.	50
Obrázek 38: Detailní záběr čepelí u pátého motivu.	50
Obrázek 39: Detailní záběr čipu šestého motivu.	51
Obrázek 40: Detailní záběr čepelí u šestého motivu.	51
Obrázek 41: Snímek zachycující nezřetěně červené krvinky pod mikroskopem se zvětšení 20x.	52
Obrázek 42: Snímek zachycující červené zřetěně červené krvinky a PBS k poměru 1:10 pod mikroskopem se zvětšením 20x.	53
Obrázek 43: Mikrozkmavky typu Eppendorf zleva nařetěně roztok 1:100 a nařetěně roztok 1:10.	54
Obrázek 44: Pumpa od značky SyringePump.	54
Obrázek 45: Čip umístěný v držáku pod mikroskopem připravený na testování.	55

Obrázek 46: První motiv při průtoku roztoku 50 nl/min.	56
Obrázek 47: Druhý motiv při průtoku roztokem 50nl/min.	57
Obrázek 48: Druhý motiv při průtoku roztoku 100nl/min.	57
Obrázek 49: Testování třetího motivu při průtoku roztoku 100nl/min.....	58
Obrázek 50: Testování třetího motivu při průtoku roztokem 200nl/min.....	59
Obrázek 51: Testování čtvrtého motivu při průtoku roztoku 200nl/min.	60
Obrázek 52: Testování pátého motivu při průtoku roztoku 200 nl/min.	61
Obrázek 53: Testování pátého motivu při průtoku roztoku 500 nl/min.	61
Obrázek 54: Detailní záběr konce kanálku při průtoku roztoku 500nl/min.	62
Obrázek: 55: Testování čipu s průtokem roztoku 600nl/min.	63
Obrázek 56: Průběh čištění čipu isopropyl alkoholem s průtokem 1μl/min.....	63

1. ÚVOD

Pod názvem mikrofluidní zařízení si mnozí lidé často nedokáží, představit o co přesně se jedná, ale každý se s těmito zařízeními už ve svém životě pravděpodobně setkal.

Jak sám název napovídá, jedná se o zařízení, jejichž velikosti se pohybují v řádech mikrometrů, a která pracují s tekutinami. Část názvu je odvozena z anglického slova *fluid* označující tekutinu nebo kapalinu.

Přestože jsou mikrofluidní čipy známy již od druhé poloviny 60. let 20. století, do značného povědomí se dostaly až na přelomu 20. a 21. století. To mu napomohl zejména vývoj ekonomicky příznivějších materiálů a jejich uplatnění v medicíně a biologii. Byla to především tato dvě odvětví, která napomohla zásadnímu rozvoji technologie a využití mikrofluidních zařízení.

V dnešní době mají mikrofluidní zařízení celou řadu využití. V běžném životě se s nimi člověk setká hlavně tam, kde jsou součástí různých testovacích zařízení, jako jsou například těhotenské testy, kolometrické testy, které určující zastoupení látek v testovaném vzorku, nebo složitější biologicko-medicínské přístroje. Vzhledem k tomu, že pořizovací cena je příznivá, dají se taková testovací zařízení využívat téměř po celém světě. Další, stejně tak důležitou výhodou jsou jejich malé rozměry, jenž umožňují jednoduchý transport i do odlehlých oblastí, a dokonce i do oblastí bez přístupu elektřiny.

V profesionální sféře se s mikrofluidními zařízeními můžeme setkat v o to větší míře. A to například při zhotovování prostředí pro pěstování buněk, kde často nahrazují Petriho misky, nebo v rámci testovacích procesů u nových léků, kde mikrofluidní zařízení dokáží simulovat jednotlivé orgány a díky tomu zjistit účinek léků, a tak urychlit vývoj a schvalovací proces léků.

Mikrofluidní zařízení jsou vysoce perspektivní a lze očekávat, že jejich uplatnění bude nadále růst spolu s novými technologiemi a nově přichozími materiály vhodnými k jejich integraci.

V této práci se vytváří mikrofluidní čip, který rozřezává červené krvinky. V budoucnu by takto kompletní čip měl zachytávat glutathion a tím určit hodnotu tohoto antioxidantu v místě pacienta.

2. HISTORIE

Historie mikrofluidiky je spjatá s vývojem mikroelektroniky, a tím tedy i integrovaných obvodů. Zejména šlo o vývoj fotolitografie v 50. letech 20. století a mikroobrábění, které umožnili vznik a vývoj samotné mikrofluidiky.

Za počátek mikrofluidiky samotné pak můžeme považovat rok 1965, kdy se Richardu Sweetovi podařilo vyvinout tiskový mechanismus, který dokázal inkoust rozdělit na jednotlivé kapičky, které pak nasměroval tak, aby dopadly na určité místo na papíru. Toho docílil protlačením inkoustu přes malou vibrující trysku o průměru 35 μm . Tryska propustila inkoust ve formě malých kapiček, které pak byly nabity vstupní elektrodou. Nabité kapky propadly stejnosměrným elektrickým polem, které je předtím, než dopadly na papír vychýlilo v závislosti na jejich náboji.

Další vývoj pokračoval pod IBM, kde v roce 1977 dokázali pomocí fotolitografie vytvořit pole trysek na křemíkové desce. Díky tomu bylo možné vytvořit spolehlivé a zároveň cenově dostupné inkoustové tiskárny a dostat je mezi širokou veřejnost. Tento pokrok mimo jiné také nastínil možnost použití křemíku jako vhodného materiálu pro výrobu mikrofluidních zařízení.[1]

V 70. letech 20. století realizoval Stephen Terry ze Standfordské univerzity první malou plynovou chromatografii vytvořenou na křemíkové desce. Tento malý plynový chromatograf se skládal ze zdroje nosného plynu, dávkovače neboli injektoru na vstřikování vzorku, kapilární kolony a miniaturního výstupního detektoru tepelné vodivosti, odborně nazývaným katharometr. Toto zařízení se začalo považovat ze první jako první Laboratoř na čipu neboli Lab-on-a-chip (LOC).

Koncem 80. let 20. století byly představeny první mikropumpy a mikroventilky vytvořené na křemíkovém substrátu pomocí mikroobrábění. Tyto nové komponenty umožnily přesně kontrolovat kapaliny v systému a zároveň dovolily větší miniaturizaci systémů.

To, že byly v této době mikrofluidní čipy většinou vytvářeny na křemíku na sebe vázalo určité technologické nároky, což vedlo k vysoké nákladnosti nejen na výrobu ale i na vývoj. To však změnil příchod měkké litografie na konci 80. let 20. století. Měkká litografie nahradila klasickou fotolitografii, u které byla problematická práce s nevodivými materiály jako je sklo nebo polymery. Hlavní rozdíl spočíval v tom, že měkká litografie umožnila využít k přenosu motivu elastomerní formu na rozdíl od tuhé fotomasky.

Díky dalšímu vývoji měkké litografie bylo poprvé možné využít i polymery, kde mezi nejznámější patří například Polydimethylsiloxan, označován zkratkou PDMS. PDMS byl poprvé objeven a popsán anglickým chemikem Frederickem Stanley Kippingem v roce 1927. Tento materiál se ukázal být vyhovující alternativou křemíku. Na rozdíl od křemíku je PDMS opticky průhledné, biokompabilní a hlavně ekonomicky přijatelný. Díky těmto přednostem se koncem 90. let 20. století dočkal velké obliby.

Později, roce 2006 byl však představen další vhodný materiál, který svou cenovou dostupností předčil své předchůdce – papír. Díky papíru je tak možné využívat mikrofluidní

čipy k testování i v méně vyvinutých zemích a odlehlých oblastech, včetně oblastí bez zavedené elektřiny.

V dnešní době vývoj mikrofluidních čipů směřuje například ke složitějším LOC nebo k člověku na čipu, který dokáže simulovat jednotlivé orgány pro testování léků.[1][28]

3. MATERIÁLY PRO VÝROBU MIKROFLUIDNÍCH SYSTÉMŮ

Využití a rozsah aplikací mikrofluidních systémů je široké, tudíž je potřeba spousta materiálu pro jejich výrobu. Jednotlivé materiály se vybírají tak, aby co nejlépe splňovaly podmínky a bylo možné docílit stanovených výsledků pro dané aplikace. Stále se hledají a vyvíjí nové materiály tak, Vývoj nových materiálů probíhá neustále, aby byly zajištěny podmínky stále složitějších a citlivějších systémů a zároveň se redukovala cena jednotlivých systémů.[2]

3.1 Anorganické materiály

Jako první se pro mikrofluidní systémy začaly využívat anorganické materiály. Zejména šlo o křemík a sklo, protože ty se již v podobných aplikacích dříve využívaly při stejných procesech jako je například výroba integrovaných obvodů. Při výrobě byla využita fotolitografie – na substrát byla nanášena tenká vrstva fotorezistu, ta pak byla osvětlena a vyvolána a díky tomu byl vytvořen požadovaný motiv. Tím byly kanálky a struktury odhaleny a následně vyleptány. Všechny fotorezisty byl poté odstraněn a substrát uzavřen pomocí skla či jiného materiálu.[2]

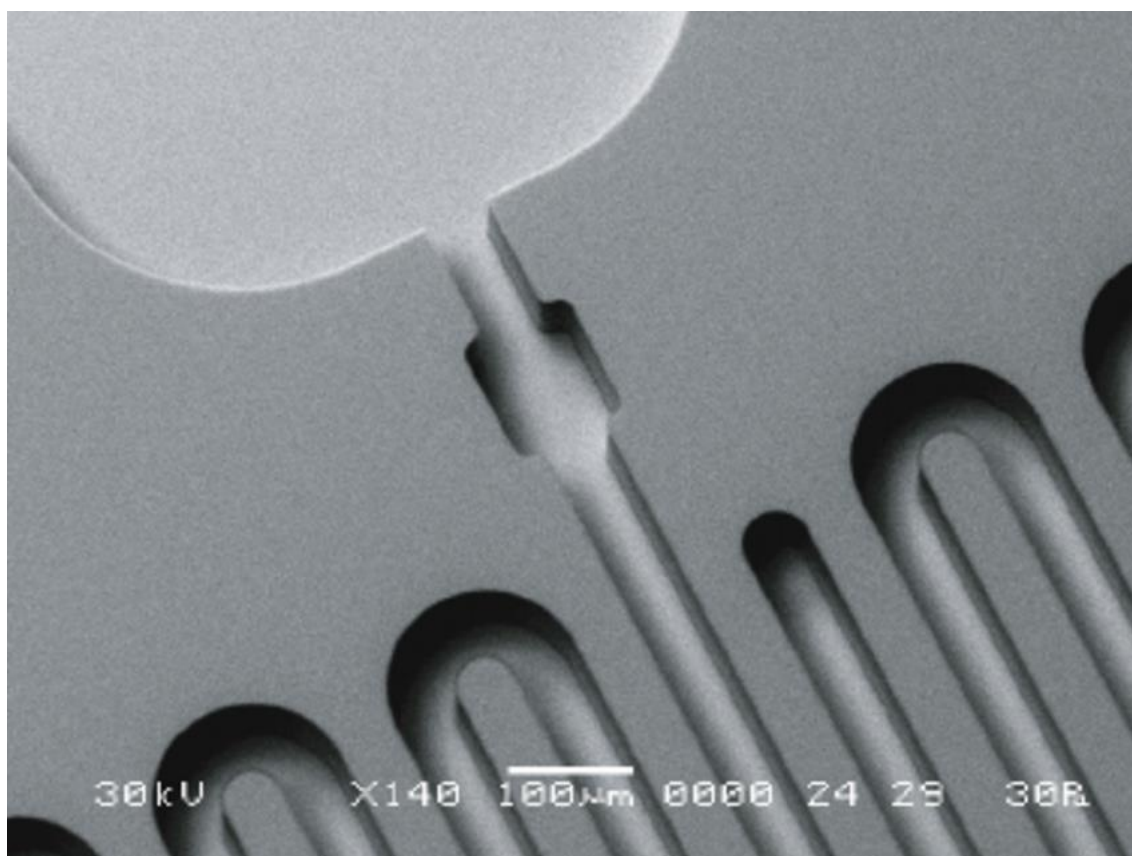
3.1.1 Křemík

Za jeden z nejstarších materiálů využívaných v mikrofluidice můžeme považovat křemík. Technologie výroby byla již známa z výroby integrovaných obvodů a mikro elektro mechanických systému, zkráceně MEMS. V dnešní době se v mikrofluidice přešlo k jiným materiálům, a to hlavně k polymerům, jmenovitě pak PDMS, které jsou nejen rychlejší na vývoj zejména díky rychlejšímu vytváření, a také i levnější na výrobu. Přestože křemík není tak hojně využíván, nabízí mnoho zásadních výhod oproti ostatním materiálům. U PDMS či jiných materiálů je problém vytvořit kanálky s vysoce rozdílnou výškou a šířkou. Tyto kanálky mohou být realizovány právě na křemíkových substrátech, kde můžeme vytvořit úzké, avšak hluboké kanálky. U některých aplikací je potřeba zajistit vysokou teplotní odolnost (např. chemická syntéza), což křemík narozdíl od polymerů zajišťuje. Velkou výhodou je také integrace elektrod či přímo elektrického obvodu na substrát. [2][3]

Jak již bylo řečeno, vytvoření velmi tenkých struktur lze na křemíku vcelku jednoduše realizovat, což je jedna z velkých výhod. Velmi tenké membrány umožňují redukovat teplotní hmotnost, a tak můžeme dosáhnout velmi rychlých teplotních náběhů. Díky mechanickým vlastnostem křemíku, ho pak můžeme využít k výrobě pump, ventilů, ale také složitých 3D struktur, jako mikroreaktorů či komůrek pro růst buněk. Za takových případů lze opomenout jeho vysoké náklady na vytvoření onoho mikrofluidního zařízení.[3]

Mikrofluidika na křemíku je časově, a hlavně ekonomicky náročná od samotného substrátu až po zařízení na jeho zpracování. Ke zpracování křemíku je možno přistoupit z mnoha směrů. Tím základním je fotolitografie, u které přeneseme zvolený motiv na fotocitlivou vrstvu, která byla předem nanesena na substrát. Po vyvolání je možné použít jednu ze dvou metod leptání. Pro leptání velkých struktur s relativně malou přesností lze využít mokré leptání, a to v NaOH nebo KOH, které nám zajišťuje anizotropní leptání, tedy leptání v jednom směru. Pro složité struktury, u kterých je potřeba vysoká přesnost, se pak využívá suché leptání do hloubky neboli DRIE (Deep Reactive Ion Etching)/Bosch proces nebo RIE (Reactive Ion Etching) reaktivní iontové leptání, které leptá také anizotropně. V případě, že by bylo nutné využít izotropního leptání, leptání stejné ve všech směrech, je pak nutné použít leptání například s fluoridem xenonovým (XeF_2). Tento typ leptání se většinou využívá k poleptání struktur.[3][36]

Na Obrázku 1 můžeme vidět realizované mikrofluidní kanálky na křemíku, které jsou zvětšeny pomocí elektronového mikroskopu.



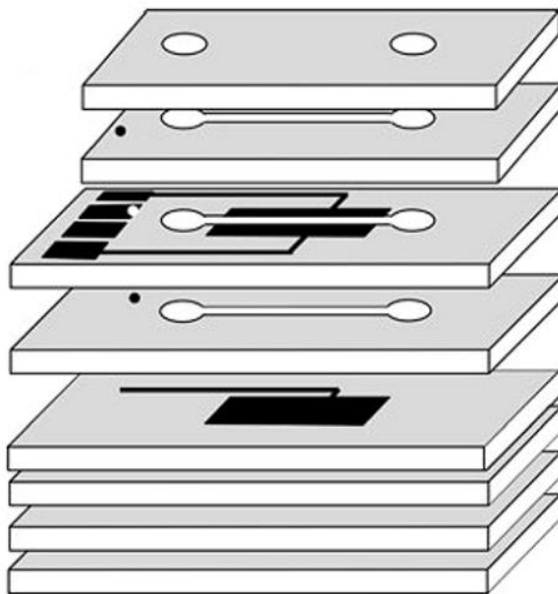
Obrázek 1: Mikrofluidní kanálky vytvořené na křemíku.[5]

3.1.2 Keramika

Nízkovýpalová keramika (LTCC) se používá obzvláště ve vysokofrekvenční technice, armádě či kosmickém průmyslu, v menší míře její uplatnění nalezneme i v mikrofluiditice. Do LTCC, umístěné v jednotlivých listech, je vytvořen motiv a poté jsou jednotlivé vrstvy zalaminovány a vypáleny. Díky tomu, že celková struktura je tvořena z mnoha dílčích vrstev je možné vytvářet

komplexní 3D struktury. Avšak hlavní výhodou je možnost vytváření elektrod, vodivých cest či elektrických obvodů přímo na substrátu jako u křemíku, navíc oproti křemíku jsou takové struktury ekonomicky výhodnější. K podstatnému využití této technologie dochází při výrobě detekčních systémech. Jako nevýhodu lze zmínit pronikání keramiky do různých kapalin, zvláště kyselin.[2][4]

Na Obrázku 2 můžeme vidět, jak je mikrofluidní zařízení skládáno z jednotlivých vrstev korundové keramiky, kterou jsou později nalaminovány.



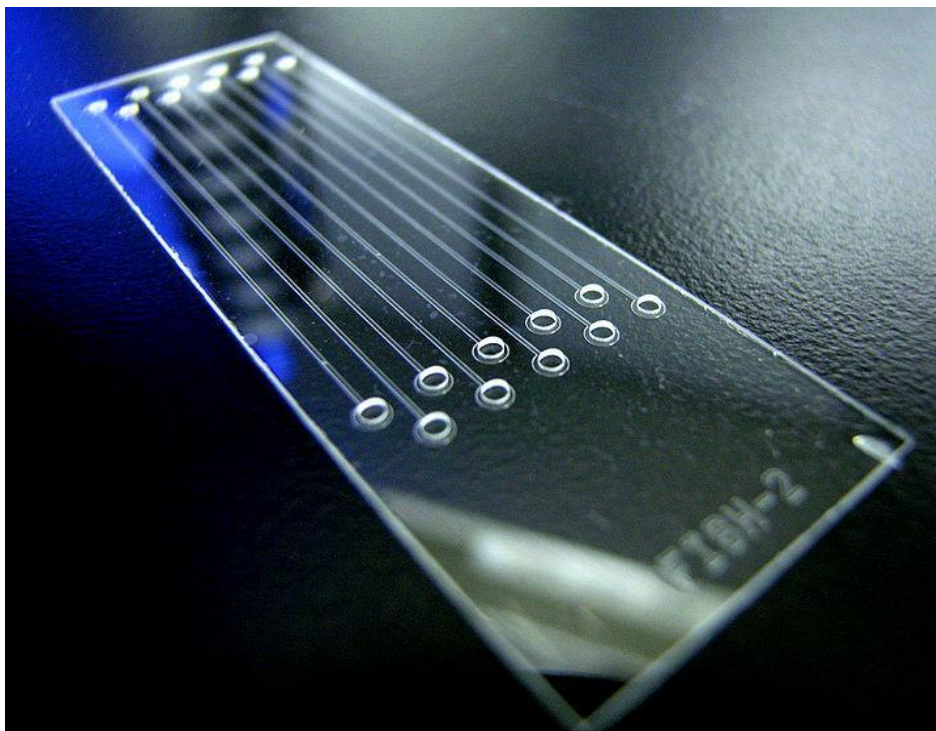
Obrázek 2: Mikrofluidní zařízení realizované pomocí LTCC.[2]

3.1.3 Sklo

Již krátce po prvních pokusech vytváření mikrofluidiky sklo na nějakou dobu nahradilo dosavadní křemík. Vytváření kanálků a mikrostruktur u skla je stejné jako u křemíku, rovněž tu jde o suché a mokré leptání. To bohužel stejně i v tomto případě zásadně zvyšuje cenu zařízení, která se dá jen v některých případech přehlédnout. Sklo je nevhodnější pro aplikace, kde potřebujeme sledovat kapalinu procházející kanálky, a to je u skla možné díky jeho průhlednosti ve viditelném spektru. Mimo jiné, je sklo velmi dobrý elektrický izolant a oproti křemíku má nižší teplotní vodivost a nedistribuuje teplo rovnoměrně po celé délce, čehož se dá dobře využít u vysokých teplotních náběhů.[2][4]

Sklo tedy využíváme hlavně při zpracování biologických materiálů. Díky propustnosti materiálů máme možnost zpracovávat dokonce plyny, nedá se však využít k dlouhodobé buněčné kultuře. V mikrofluidice se můžeme setkat se sklem obzvlášť při kapilární elektroforéze.[2][4]

Na Obrázku 3 lze vidět mikrofluidní čip realizován na skle. Čip je oproti ostatním anorganickým materiálům průhledný, což umožňuje zpracování látek, u kterých je potřeba proces sledovat či monitorovat.



Obrázek 3: Mikrofluidní čip realizován na skelném substrátu.[6]

3.2 Polymery

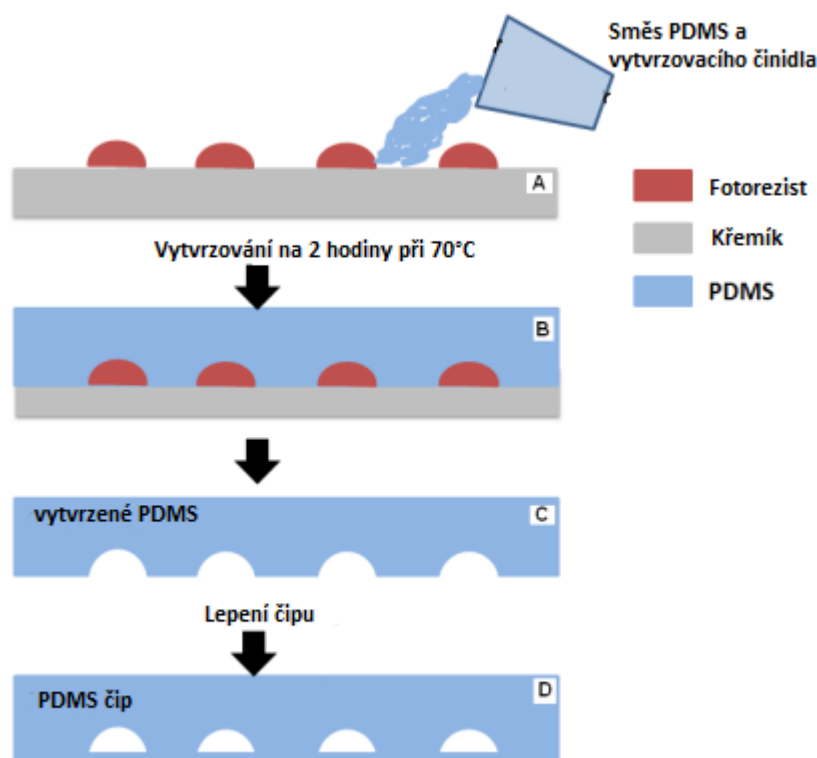
Polymery jsou organické materiály, které nabyly popularity v mikrofluidice koncem 90. let. Hlavními výhodami oproti anorganickým materiálům je způsob jejich zpracování a cena. Díky tomu, že polymery nemají tak vysoké nároky na zpracování, se jejich využití značně rozšířilo. U polymerů je značně jednodušší masová produkce (Lisování za tepla, vstřikování do forem, 3D tisk atd.)[2]

3.2.1 Polydimethylsiloxan

Polydimethylsiloxan, také označován zkratkou PDMS, patří mezi nejvíce rozšířené polymery, spadající pod skupinu elastomerů. Vzhledem k jeho rozumné ceně se poměrně rychle uchytil. Jeho nejdůležitější výhodou, je schopnost tvořit několik vrstev na sobě, což umožňuje vznik komplexních struktur. PDMS je propustný pro vzduch, a proto využitelný ke kultivaci dlouhodobých buněčných kultur. Stejně jako sklo, PDMS je opticky transparentní, což umožňuje pozorování či mikroskopii. To je výhodou při práci s buněčnými strukturami, které lze pak sledovat v reálném čase. Avšak i tento materiál má určité nevýhody, a to zejména špatnou chemickou stabilitu při využití určitých roztoků. To lze do značné míry omezit při aplikování ochranných vrstev (např. teflon). Mimo to se u materiálu také projevuje absorpce malých molekul do substrátu.[7][2]

PDMS mikrofluidní čipy se vytvářejí za použití forem. Výrobu PDMS čipu lze vidět na Obrázku 4. Formy jsou nejčastěji z křemíku nebo skleněného substrátu, na kterém je vytvořena negativní předloha. Po namíchání PDMS a vytvrzovacího činidla, se zde musí odsát vzduch,

aby nevznikly bublinky. Pokud by bubliny nebyly odstáté, tak vznikne vadné zařízení. Po namíchání se vzduchu (a tedy bublinek) můžeme zbavit jeho odsátím anebo jej odstředit na odstředivce a pak teprve směs slít do formy. Forma je pak vložena do pece, kde se vytvrdí. Po vytvrzení je PDMS substrát odstraněn z formy. Díky elastičnosti PDMS (zejména částí o tloušťce menší jak 1 mm) je pak doporučeno substrát spojit se sklem. Takové spojení zajistí větší pevnost. Nakonec jsou k substrátu připojeny hadičky.[7][2]



Obrázek 4: Vytvoření PDMS mikrofluidního čipu pomocí křemíkové předlohy.[13]

3.2.2 Polymethylmethakrylát

V mikrofluidice se můžeme často setkat s materiálem PMMA, neboli Polymethylmethakrylát, a to zejména v jednorázových produktech a to nejen díky jeho přívětivé ceně. PMMA má dobré mechanické vlastnosti, výbornou optickou průhlednost a je kompatibilní s elektroforézou.

Při vysoké teplotě se PMMA rozkládá na MMA, což nabízí možnost recyklace a tudíž i ospravedlňuje jednorázové použití. Výroba je podobná jako u ostatních polymerů, ale díky vlastnostem PMMA může navíc použít mikroobrábění, nebo CO₂ laser. Využití PMMA nachází při DNA sekvencích a elektroforézách. [4]

3.2.3 Polystyren

Polystyren, zkráceně PS, je materiál, který je v mikrofluidice používán jako alternativa k PDMS. PDMS mohou obsahovat nezesíťované monomery, u kterých může docházet k pronikání do buněčných kultur. Polystyren je proto lepší volbou, je více hydrofobní a tím i více biologicky kompatibilní. Vyrábění Polystyrenu může probíhat buď nákladnějším způsobem, a to tepelnou ražbou (Hot embosing), levnější metodu výroby pomocí tzv. Shrinky-Dinks® folií. Tato folie byla prodávána jako dětské hračka, nicméně pozdější experimenty ukázaly, že by se ji dalo zdárně využít v rámci mikrofluidiky, nejen z důvodu jednoduché výroby. Ve stručnosti probíhá výroba tak, že na film pomocí jehly (popřípadě u složitějších návrhů lze využít CNC), vyryjeme motiv. Po vyrytí se folie zapeče a změní svoje rozměry. Šířka a délka se zmenší zhruba o 63 %, avšak výška se zvětší zhruba o 500 %[8]. Díky této metodě je možné vytvořit velice levné mikrofluidní zařízení.[9]

3.2.4 Polyuretan

Polyuretan neboli PU je materiál z konce 30. let 20. století. Od té doby se využívá v řadě medicínských zařízení, zejména tam, kde dochází ke kontaktu s krví, např. umělé srdce, srdeční chlopně, hemodialyzačních membrány, naopak v mikrofluidních zařízeních ho najedeme jen zřídka.

Polyuretan je hydrofobní a zároveň není absorpční ani vůči proteinům nacházejícím se v krvi, z toho důvodu je často používán jako náhrada PDMS, u kterého k absorpci důležitých proteinů dochází. Hydrofóbní schopnost polyuretanu může být ještě vylepšena pomocí aplikace dalších hydrofilních polymerů na jeho povrchů, např. Polydimethylsiloxan.[10]

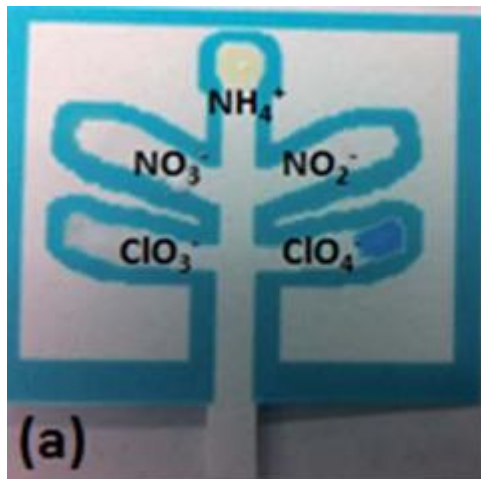
3.3 Papír

Protože přesné laboratorní přístroje jsou i na dnešní bohaté státy dosti nákladné, navíc je k jejich obsluze potřeba kvalifikovaný personál, k využití se stal výbornou alternativou papír. Papír zejména využíváme při detekci nemocí nebo během biochemických analýz, kde nejsou potřeba velká kvanta přesných dat. Díky papíru je tato metoda ekologicky a ekonomicky přívětivá. Většina zařízení využívá kolometrických výsledků, které udávají jasnou odpověď ano/ne srozumitelné i pro nekvalifikované osoby. [11]

Mikrofluidika na papíru byla poprvé představena v roce 2007. Jedno z prvních papírových mikrofluidních zařízení bylo vytvořeno pro analýzu moči. Toto zařízení bylo využito jako kolometrický test k měření koncentraci glukózy a proteinu v moči. Mimo to jej lze využívat i k detekci patogenů či toxinů.[11]

Vyrábění může probíhat několika základními způsoby. Jako první můžeme zmínit tisknutí voskem na papír, kdy je vosk natisknut na papír a roztaven. Rztavený vosk tvoří hydrofobní vrstvu. Jedná se o velice levnou a dostupnou metodu, kterou je jednoduše možné realizovat kdekoliv na světě. Nevýhodou takového tisku je ale nízké rozlišení, takže jej nelze využít u složitějších struktur., Navzdory tomu lze na papíru pomocí skládání a oboustranné vodě nepropustné lepicí pásky realizovat 3D struktury.[11]

Na Obrázku 5 je vyobrazené jednoduché mikrofluidní zařízení realizované na papíře pro detekci anorganických explozivních materiálů. Doprostřed je umístěna kapalina, která se následně rozteče do jednotlivých větví čipu. Pokud je látka detekována, daná část větve se zbarví.



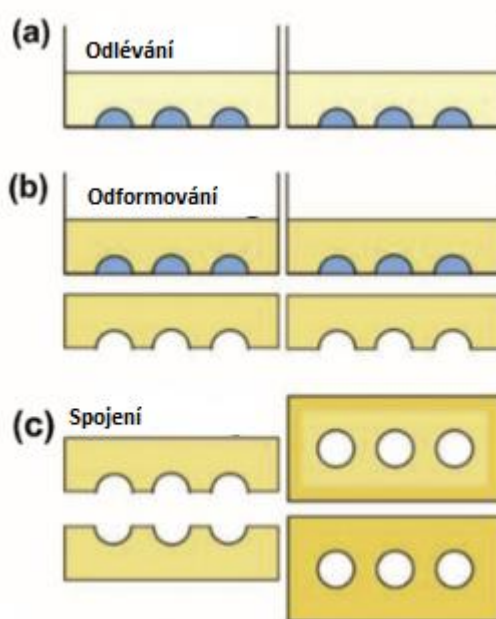
Obrázek 5: Mikrofluidní zařízení pro detekci anorganických explozivních materiálů.[12]

3.4 Hydrogely

Hydrogel je materiál, jenž se skládá z 3D hydrofilních polymerů v kapalném prostředí, převážně ve vodě. Hydrogely jsou velmi porézní a dokáží pohltit velmi velké množství kapalin. S hydrogely se dá velice snadno dosáhnout různých velikostí pórů, které umožňují pronikání některých molekul. Hydrogely využíváme v mikrofluidice především v biologických a biomedicínských odvětvích především díky jejich biokompatibilitě, mechanických vlastnostech, které dokážou připomínat některé tkáně v orgánech, či schopnosti uchovávat biologické entity uvnitř a tím je chránit před okolními jevy.[4][14]

Hydrogely mohou také reagovat na externí podmínky jako jsou například změny teploty, PH, světla, či elektrického a magnetického pole. V závislosti na podmínkách se stav hydrogelu může měnit – z plného a zvětšeného na smrštěný a naopak. Díky těmto vlastnostem se stávají velice zajímavou možností, zejména pak při tzv. „organ on chip“ neboli orgán na čipu, který může napodobovat určité orgány, jako příklad plíce a další.[4][14]

Na Obrázku 6 můžeme vidět jednu z několika výrobních metod. Nejdříve je vytvořena negativní forma, na kterou je umístěn mix prekurzoru a hydrogelu. Vzápětí je z formy hydrogel odstraněn a nabondován na druhou stranou mikrofluidního zařízení.



Obrázek 6: Znázornění výroby hydrogelového mikrofluidního zařízení pomocí negativní formy.[14]

3.5 Příklady ostatních materiálů

U mikrofluidních zařízení lze využít opravdu velké množství materiálů, mimo ty, které byly již zmíněny také využíváme méně známe materiály jako je například Cyklický olefinový kopolymer. Tento polymer pak nachází uplatnění na stejných místech jako třeba PMMA nebo PS. Cyklický olefinový kopolymer vyniká svým excelentním optickým přenosem, biokompatibilitě a velmi vysoké chemické odolnosti. Mezi jeho nevýhody patří jeho křehkost a nízká teplotní difuzivita. S tímto materiálem se pak můžeme mimo mikrofluidiku setkat v optice, elektronice nebo v balení různých produktů.[4]

Dále můžeme zmínit mikrofluidní čipy vytvořené na Polytetrafluorethylenu (PTFE) neboli Teflonu. Čipy na bázi teflonu jsou velmi odolné vůči rozpouštědlům a chemikáliím. Vykazují také nelepivé a anti vegetativní vlastnosti.[4]

4. HLOUBKOVÉ REAKTIVNÍ IONTOVÉ LEPTÁNÍ (DRIE)

Hlubkové reaktivní iontové leptání neboli DRIE, je druhem suchého leptání. DRIE vychází z metody zvané Reaktivní iontové leptání, nebo také často označované anglicky jako Reactive ion etching (RIE), která kombinuje fyzikální a chemický efekt, jenž způsobuje odstranění materiálu z povrchu substrátu. Díky DRIE jsme schopni vytvářet velmi úzké a hluboké struktury při vysokých rychlostech v rozmezí až desítek $\mu\text{m}/\text{min}$. To je možné provést pomocí pasivační vrstvy, díky které dosáhneme anizotropního leptání. Typicky má také DRIE větší selektivitu a lepší kontrolu procesu oproti RIE.

U DRIE využíváme k leptání ionty plynů, které bombardují substrát za vzniku produktů, jež pak můžeme jednoduše odstranit. K tomuto procesu nejčastěji používáme fluor, chlor nebo bromovou plazmu. Po bombardování v rámci reakcí vznikají plynové sloučeniny, a to SiF_4 při využití fluoru, SiCl_4 při využití chloru a SiBr_4 při využití bromu. Z těchto tří se nejčastěji používá fluor, protože při práci s toxickými látkami jako je právě chlor a brom, se musí klást větší důraz na bezpečnost. Přesto že se jedná o látky toxické, můžeme se s chlorem a bromem setkat při výrobě integrovaných obvodů, kde je potřeba snadněji kontrolovatelná šířka u mělkého leptání, kterou tyto látky nabízí.[20]

4.1 Kryogenní proces

Počátky kryogenního procesu jsou datovány od roku 1988, kdy bylo zpozorováno, že chlazením substrátu při RIE jsme schopni dramaticky zabránit tvorbě reakcí na jeho stěnách, což vede k značnému zlepšení anizotropie. Následně na to se také zjistilo, že při takto nízkých teplotách se zlepšuje i selektivita leptání mezi maskou fotorezistem a křemíkovým substrátem. Snížení chemické reakce na stranách substrátu zapříčinila tvorba oxidu křemíku a fluoru (SiO_xF_y). Tato reakce způsobovala tzv. pasivační vrstvu, která vznikala při leptání SF_6/O_2 plazmou. SiO_xF_y se usazuje nejen na bočních stěnách, ale i na dnu leptané struktury. Tato pasivační vrstva je však odleptána z důvodů bombardování dna ionty, a proto může leptání pokračovat dále směrem dolů.[20]

Vysoká rychlost leptacího procesu je zapříčiněna díky leptací plazmě SF_6 a O_2 , kde je vysoký počet fluorových radikálů. Kyslík v plazmě má za příčinu tvorbu pasivační vrstvy. Pokud je kyslíku při leptání nedostatek, má to za přičinění izotropního leptání, avšak pokud je kyslíku při leptání velké množství, tak to způsobuje tvorbu křemíkových reziduí, které jsou známé pod pojmem černý křemík (Black Silicon). Pasivační vrstvu černého křemíku je pak velmi složité odstranit.[20]

Oproti Bosch procesu, má kryogenní proces velmi hladké stěny jednotlivých struktur. Pasivační vrstva u kryogenního procesu je přibližně pouhých 10 nm. Kvůli tomu musíme povrch struktury bombardovat ionty s nízkou energií, tak aby bylo možné odstraňovat pasivační vrstvu ze dna struktury. Díky velmi nízkým teplotám ($-100\text{ }^\circ\text{C}$ až $-150\text{ }^\circ\text{C}$) je nutné vybírat

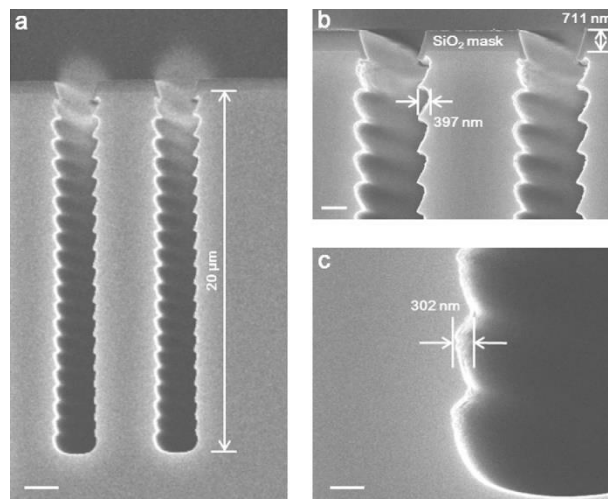
fotorezist, který je kompatibilní s nízkými teplotami. V případě využití fotorezistu neurčeného do nízkých teplot, se při ochlazování roztrhne jako sklo.[20]

4.2 Bosch proces

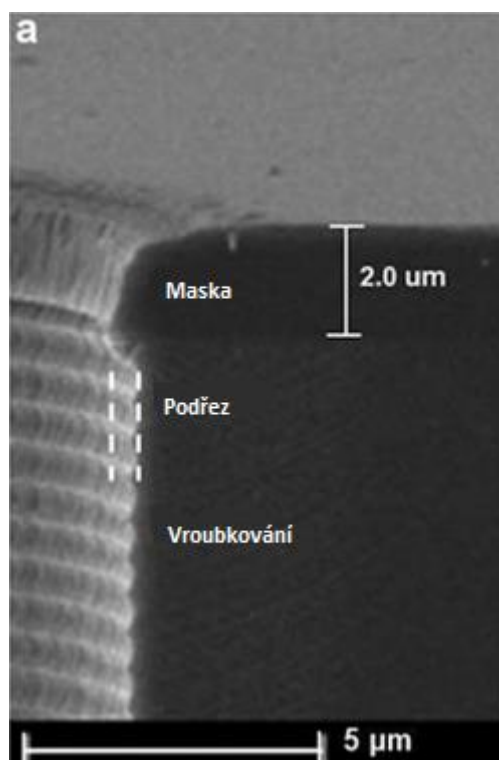
Bosch process, byl patentován v roce 1994 firmou Robert Bosch GmbH, po které byl pojmenován. U této techniky DRIE odpadá nevýhoda kryogenních teplot jako při kryogenním procesu. U této techniky se nevyužívá pasivace kyslíku a velmi nízkých teplot, jako je tomu u kryogenního procesu, ale pasivačního materiálu $(\text{CF}_2)_n$, jež je podobný Teflonu. Ten je na substrát deponován pomocí plynů jako například fluoroform (CHF_3), hexafluorpropylen (C_3F_6), perfluorcyklobutan (C_4F_8) a jako poslední netoxický tetrafluorethylen (C_2F_4). Tyto látky využíváme zejména kvůli jejich jednoduchému odstranění při leptání dna struktur a nezanechání reziduí i při nízkoenergetickém iontovém bombardování.

Jako první základní Bosch proces využívá dvou cyklů. A to pasivace a leptání. U pasivace napouštíme Perfluorcyklobutan (C_4F_8), který slouží jako pasivační prekurzor. Vrstva podobná teflonu je nanášena pomocí kondenzace prekurzoru na povrchu struktury. Po pasivaci přichází na řadu druhý cyklus, kde vháníme do komory SF_6 , jež slouží k leptání struktury. Ionty pak bombardují dno, které odleptávají. Avšak odleptávají i částečně stěny struktury. Na dně odleptáme část struktury a tím vytvoříme nové stěny struktury, které nebudou mít pasivační vrstvu, a proto vždy je potřeba po leptání opakovat cyklus pasivace, aby nedošlo izotropnímu leptání. Změna mezi cykly probíhá v rámci od několika sekund až po minutu. Vždy však k částečnému izotropnímu leptání dojde, což pak má za následek vroubkovanou tzv. scalloping strukturu jedinečnou pro Bosch proces, kterou lze pozorovat na Obrázku 7 a na Obrázku 8.

Tento efekt nelze zcela eliminovat, ale je možno jej minimalizovat na jednotky až desítky nanometrů s využitím ultra rychlých elektromagnetických ventilů. V komoře je pak leptáno pomocí SF_6 a blízko u leptaného substrátu se nachází ventilek s nahromaděným pasivačním prekurzorem. Ventilek pro SF_6 se zavře a na krátký čas se otevře ventilek s nahromaděným pasivačním prekurzorem a vzápětí se zavře. Pokud je pak čas mezi jednotlivými změnami velmi malý je možno do značné míry minimalizované vroubkování stěn struktury.[20][21]



Obrázek 7: Vroubkovaná struktura pořízena pomocí SEM.[37]



Obrázek 8: Popis struktury vytvořené Bosch procesem.[22]

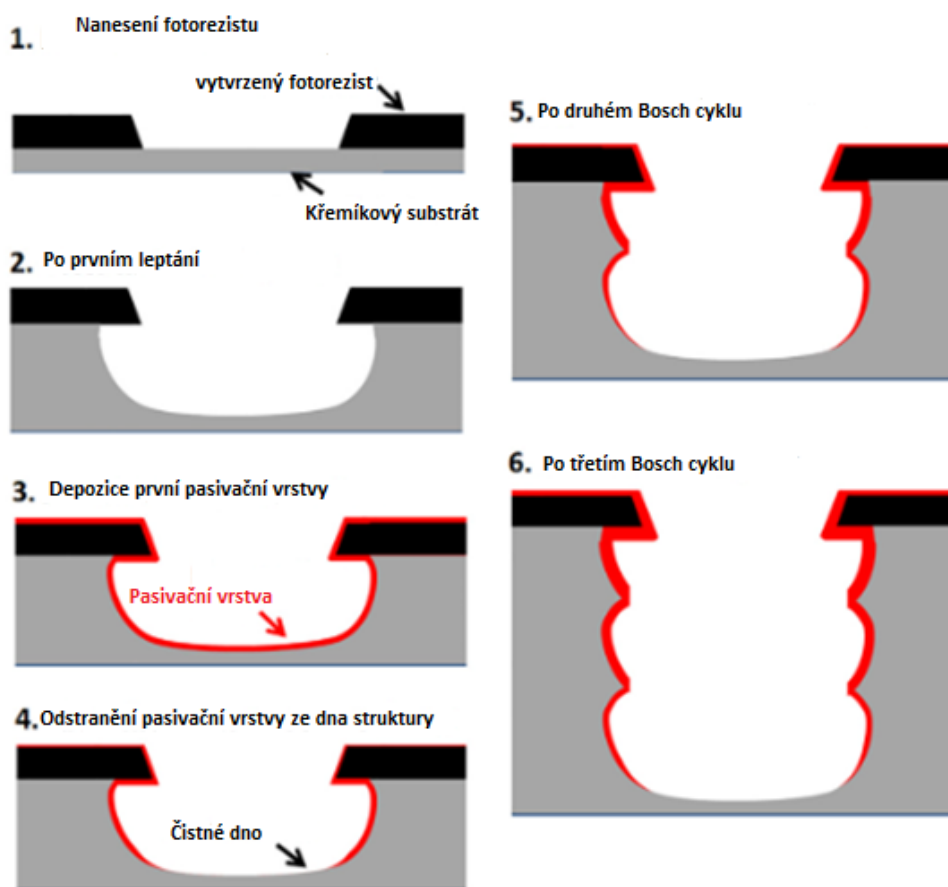
4.3 Smíšený proces

Pod Bosch proces můžeme zařadit také tzv. Smíšený proces. Zde využíváme leptání a pasivace zároveň. V jeden čas do komory vháníme fluorid sírový (SF_6) pro leptání a C_4F_8 jako pasivační plyn, který způsobuje polymeraci na stěnách leptané struktury. Při procesu, však může docházet k tvorbě fluorových uhlovodíků na dně leptané struktury, což je stejně nežádoucí jako tvorba černého křemíku u kryogenního procesu. Jako další je problém rekombinace leptacího a

pasivačního plynu při generování plazmy, které má za následek zániku obou plynů a to způsobuje, že tato metoda se dá využít do hloubky přibližně 10 μm . [20]

4.4 Vícekrokový Proces

Jak již bylo řečeno u Bosch procesu využíváme dvou cyklů, a to pasivace a leptání. U více krokových procesů jako je například DREM neboli Deposit, Remove, Etch, Multistep se využívá tří cyklů a to pasivace, odstranění pasivačního nánosu ze dna struktury a leptání. DREM využíváme zejména pro velmi tenké struktury s velmi vysokým poměrem stran. Jelikož u struktur s vysokým poměrem stran se špatně odstraňuje pasivační vrstva jen pomocí leptacího plynu SF_6 , a proto před samotným leptáním dna struktury je potřeba odstranit pasivační vrstvu zde dna. K depasivaci se pak využívají plyny jako argon nebo kyslík. Na Obrázku 9 je pak znázorněn celý proces v jednotlivých krocích nalevo, kde napravo je pak vidět proces po 2 a 3 cyklech. [20][23][24]



Obrázek 9: Znázornění vícekrokového Bosch procesu. [27]

5. VYUŽITÍ MIKROFLUIDNÍCH SYSTÉMŮ

Mikrofluidní systémy nachází v dnešní době značné uplatnění v biologickém a biomedicínském odvětví.[15]

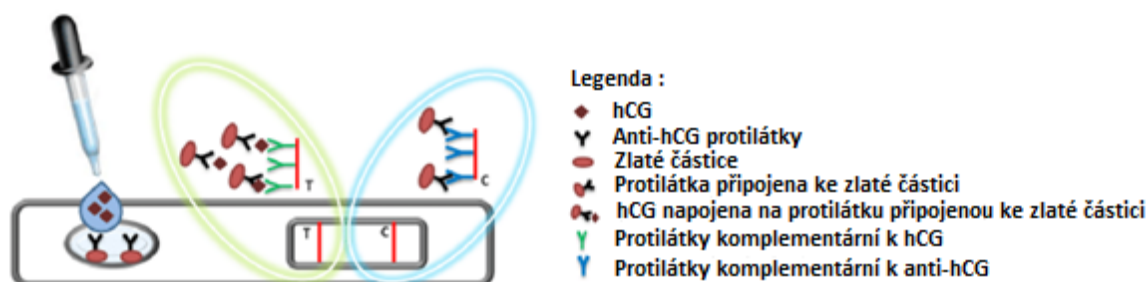
5.1 Laboratoř na čipu

Laboratoř na čipu (Lab on Chip) neboli zkráceně LOC, je v dnešní době značně využívána. Je to miniaturizované zařízení, na kterém může být prováděna jedna či více analýz, které jsou spojeny na jednom čipu. První LOC byl vytvořen v roce 1979 na Stanfordské univerzitě, který byl určen k plynové chromatografii, avšak výrazný pokrok v tomto odvětví byl zaznamenán koncem 80. let 20. století, díky vývoji nových mikrofabrikačních procesů pro polymerní materiály.

V dnešní době se můžeme setkat s LOC například v molekulární biologii, kde jej využíváme k množení a detekci DNA/RNA. K množení DNA pomocí polymerové řetězové reakce neboli Polymerase chain reaction (PCR), využíváme teplotní cyklování a pomocí LOC je možno provádět rychlé teplotní změny v miniaturním měřítku. Díky tomuhle je možné provádět velmi rychlé PCR.[16]

Mezi určitou podskupinu LOC můžeme zařadit tzv. testování v místě péče neboli POC. Jak vyplývá z názvu jedná se o testování, které jsme schopni vykonávat u pacienta. Zároveň je možné testování provádět v odlehlých lokalitách bez přístupu elektřiny. Mezi to můžeme zahrnout již zmíněný základní test těhotenství, nebo také HIV test, kde pomocí zjištění počtu CD4⁺ T lymfocytů v krvi jsme schopni zjistit v jakém stádiu nemoci se daný člověk nachází.[17][18]

Na Obrázku 10 se nachází základní těhotenský test, který je realizován pomocí mikrofluidiky. Na určené místo vlevo je vložena moč. Pokud se v moči vyskytuje hormon Choriogonadotropin (hCG), tak se naváže na komplementární anti-hCG protilátku, která je připojena ke zlaté částici. Anti-hCG protilátky se zlatou částicí, které na sebe navázali hCG se sdruží a proudí tam kde se setkají s druhými protilátkami, které jsou komplementární pro hCG a mají za příčinu zbarvení proužku T. Anti-hCG protilátky se zlatou částicí, které na sebe nenavázali hCG proudí k místu kde se setkají s protilátkami komplementárními s anti-hCG, což má za příčinu zbarvení kontrolního proužku C. Test je pak pozitivní, pokud jsou obě linie (T i C) viditelné.[19]



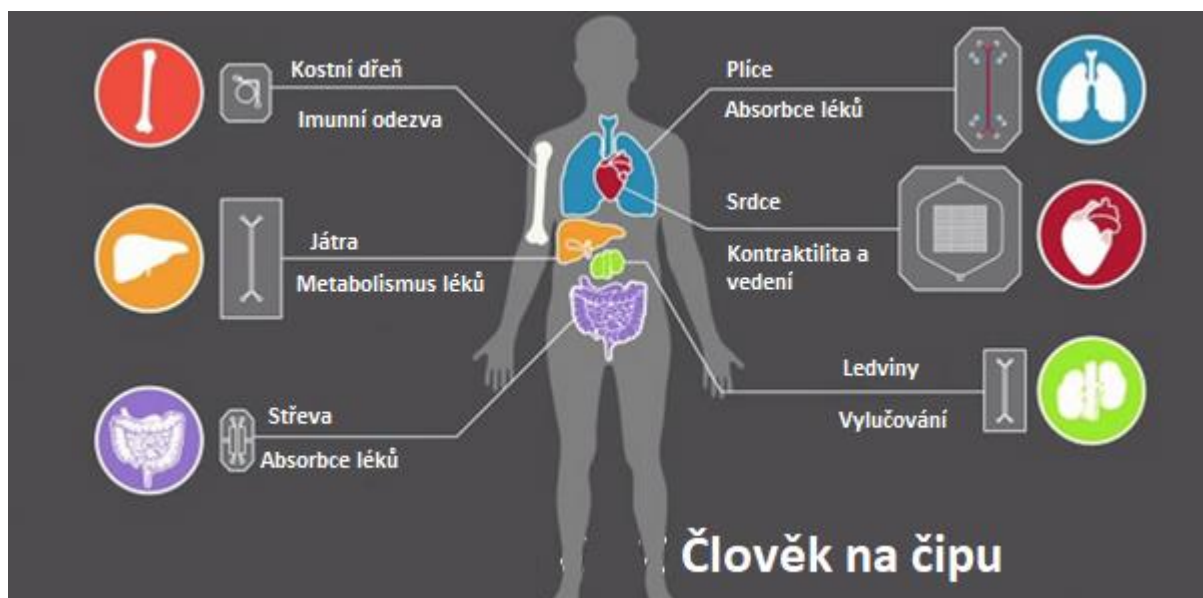
Obrázek 10: Schéma znázorňující funkci těhotenského testu.[19]

5.2 Orgán na čipu

Orgán na čipu neboli Organ on chip (OoC) je zařízení, jehož myšlenka byla poprvé představena v roce 2007, kdy Donald Ingber viděl mikrofluidní zařízení, které demonstrovalo plíce člověka na čipu, avšak v téhle době ještě čip neobsahoval živé buňky. Toho bylo dosaženo až v roce 2010, kdy se podařilo vytvořit živé plíce na čipu.[25]

Tyto mikrofluidní zařízení se pak uplatňují při testování, nových léků. Jak je známo, uvést nové léky na trh je velice zdoluhavý a díky tomu i nákladný proces. Většina finančních prostředků pak putuje do testování nové látky místo jejího vývoje. Testování látek na Petriho misce je nedostatečným prostředkem pro testování, jelikož látky nereagují s buňkami jako v lidském těle. Z toho důvodu je pak nutnost přejít na testování na zvířatech, které je velmi zdoluhavé a finančně nákladné. Navíc je zde možnost, že co bude fungovat na zvířatech může být pro člověka nebezpečné či toxické. Zde tedy přichází OoC, kde je možné simulovat, jak tkáň orgánu pracuje. U OoC jsme schopni simulovat plíce, játra, srdce, nebo střeva. Zde je také možnost propojovat jednotlivé orgány a vytvořit tak více orgánový čip nebo tzv. člověka na čipu, díky kterému je pak možno pozorovat jaké má lék efekty na různé orgány zároveň. Na Obrázku 11 je pak možné pozorovat diagram člověka na čipu a k čemu jednotlivé orgány využívají v rámci testu nových léků. Například játra je důležité simulovat u každého nového léku, jelikož velmi často mnoho nových léků způsobuje Hepatotoxicitu, která vzniká chemickým poškozením.[26]

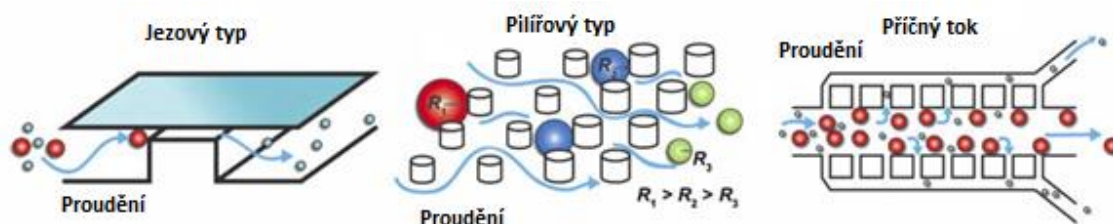
Díky využití OoC je pak možné značně zrychlit vývoj některých léků a tím tedy snížit i jejich náklady na vývoj.[26]



Obrázek 11: Diagram člověka na čipu a k čemu se jednotlivé orgány využívají.[26]

5.3 Separace a třídění buněk

V některých případech je potřeba buňky separovat, aby s nimi bylo možné pracovat. To může být provedeno pomocí drahých laboratorních přístrojů. Avšak mikrofluidní systémy dokážou integrovat některé metody pro třídění podle fyzikálních parametrů. Mikrofluidní čipy jsou kvůli svým rozměrům perfektní volbou pro manipulování s jednotlivými buňkami. Na mikrofluidních čipech lze integrovat mnoho separačních a třídících metod. Například nejjednodušší třídění lze provést pomocí mikrofiltrů, pomocí kterých jsou čipy schopny propouštět jen určitou velikost či tvar buněk. Ač je tato separační metoda jednoduchá představuje mnoho překážek, zejména heterogenitu velikosti buněk, ucpávání a zanášení filtrů. Další metody jsou založeny na jevech, jako jsou například: hydrodynamické, elektrické, gravitační či odstředivé. Na Obrázku 12 jsou znázorněny některé metody separace s využitím mikrofiltrů.[34]



Obrázek 12: Různé typy mikrofiltrové separace a třídění buněk.[34]

6. KREV A MIKROFLUIDIKA

Krev je červená viskozitní kapalina, která patří do hlavní části vnitřního organismu. Krev se skládá z dalších buněčných elementů jako krevních destiček, červených a bílých krvinek v krevní plazmě. Přesné množství krve se u každého jedince liší, avšak u většiny mužů se pohybuje v rozmezí 4,5-5 litrů. U žen je to pak o něco méně z důvodu jiné stavby těla, která je složena z více tukové tkáně oproti mužům, kteří mají více svalové tkáně. Tuková tkáň je méně metabolicky aktivní než svalová tkáň.[29]

Krev obsahuje informace o celém lidském těle. Každou minutu je provedena recirkulace celého krevního oběhu, dodávání kyslíku a živin do jednotlivých buněk a transportování produktů ať už od buněk nebo přímo k buňkám. Krví jsou také transportovány buňky imunitního systému, které v celém těle provádí imunitní dozor. Díky tomu je možné z krve zjistit velké množství informací o fungování těla a jeho orgánů, které je pak možné využít pro medicínské aplikace.[30]

6.1 Složení krve

6.1.1 Červené krvinky

Červená krvinka neboli erytrocyt slouží k distribuci kyslíku a oxidu uhličitého po celém těle. To je možné díky tomu že erytrocyt nemá buněčné jádro, kdyby buněčné jádro obsahovalo, tak by značnou část kyslíku spotřebovalo, a tedy distribuce by pak nebyla zdaleka tak účinná. Erytrocyty jsou zploštělého tvaru, kde jejich průměr je 7,4 μm a její šířka 2,1 μm . Průměrná doba života erytrocytů je pak 90 až 120 dní, kde následkem hemolýzy zaniknou.[29]

Součástí červených krvinek je také glutathion, který hraje důležitou roli v chránění hemoglobinu, před oxidací. Hemoglobin pak slouží k tomu, že na sebe váže kyslík.[31]

6.1.2 Bílé krvinky

Bílé krvinky neboli leukocyty jsou souhrnem několika různých buněk, které fungují jako náš obranný mechanismus proti virům, bakteriím či jiným buňkám, které nejsou typickou součástí lidského těla. Jejich velikost se pohybuje od 6 μm do 30 μm v závislosti na jejich typu. Tento typ buněk je pak vytvářen v kostní dřeni. Počet bílých krvinek v krvi nám dokáže říct, jestli tělo bojuje s infekcemi, alergiemi, zánětem či leukémií. Existuje mnoho nemocí, které ovlivňují počet bílých krvinek či jejich fungování. Například virus HIV způsobuje deficit, těchto buněk a tím zapříčiní, že je tělo velmi náchylné k nemocem. Dalším pak může být onemocnění autoimunitní, kde pak bílé krvinky nefungují tak jak mají a poškozují zdravou tkáň organismu.[29]

6.1.3 Krevní destičky

Krevní destičky neboli trombocyty jsou nejmenší součástí krve. Tyto destičky jsou zploštělé disky, jenž mají průměr okolo 2 až 4 μm . Jejich život je poměrně krátký a to okolo 9 až 12 dní.

Trombocyty slouží ke srážení krve, jejich využití je tedy zásadní při hojení ran. Pokud je krevních destiček nedostatek, má to za následek způsobení onemocnění známe jako trombocytopenie. Malý pokles lze zanedbat, rány se hojí pomaleji či dochází k častější tvorbě modřin, avšak při velkém poklesu krevních destiček je velmi obtížné zastavit krvácení a může dojít i ke samovolnému vnitřnímu krvácení.[29][32]

6.1.4 Krevní plazma

Krevní plazma je tekutá část krve, je nažloutlé barvy a tvoří ji převážně voda (cca 90 %). Jako další pak obsahují organické či anorganické látky (například sodík, draslík či vápník). Krevní plazma nám dovoluje regulaci pH krve, které je stabilní ($\approx 7,4$) a zároveň slouží k transportu živin, hormonů, ale také bílkovin, které jsou důležité společně s trombocyty pro srážení krve.[29][33]

6.2 Využití krve v mikrofluidice

Jak již bylo uvedeno v předešlých kapitolách, krev je zdrojem mnoha cenných informací, protože krev je nesena celým tělem, do každé tkáně, orgánu i buňky, může nám poskytnout obraz o funkčnosti celého lidského organismu. Přestože se zprvu může zdát, že jde o jednoduchou záležitost, k analýze krve a jejímu vyhodnocení jsou potřeba drahé přístroje i kvalifikovaný personál. Proto by bylo v mnohých případech za více než vhodné využít právě mikrofluidní zařízení. Mikrofluidní zařízení, které by nám umožnily vcelku rychle takové testy vyhodnotit a získat tak celistvý obraz o stavu pacienta. Takováto mikrofluidní zařízení lze použít například k ověření o prodělání infekčního onemocnění, nebo konkrétněji při určování stadia onemocnění AIDS.

Vzhledem k tomu, že takové druhy testování probíhají po celém světě, a připočítáme-li základní výhody mikrofluidních zařízení, jako je jejich cena, snadný transport a schopnost pracovat jen s malým množstvím vzorku, mikrofluidní zařízení se stávají populárnějšími a více atraktivními nejen v oblasti medicíny, ale také v rámci budoucího vývoje.

Avšak k těmto informacím je složité získat přístup, jelikož k celkové analýze jsou potřeba drahé přístroje a kvalifikovaný personál, který umí krev, jak zpracovat, tak i správně popsat a vyhodnotit výsledky. V některých případech pak můžeme využít právě mikrofluidní zařízení, díky kterému je možné rychle vyhodnotit různé testy pro získání informací o stavu těla, například o prodělání infekčního onemocnění či v jakém stadiu se nachází onemocnění při nemoci AIDS.[17][18][35]

Jak tedy bylo zmíněno, krev v mikrofluidice nachází uplatnění zejména skrze její analýzy anebo z hlediska identifikace nemocí ve formě laboratoř na čipu. Díky tomu, že je možné provést jednoduchou separaci a využít pouze malé množství krve k analýze či využít je v odlehlých místech bez přístupu elektřiny jsou stále více využívány a velice atraktivní pro další vývoj.[35]

7. PRAKTICKÁ ČÁST

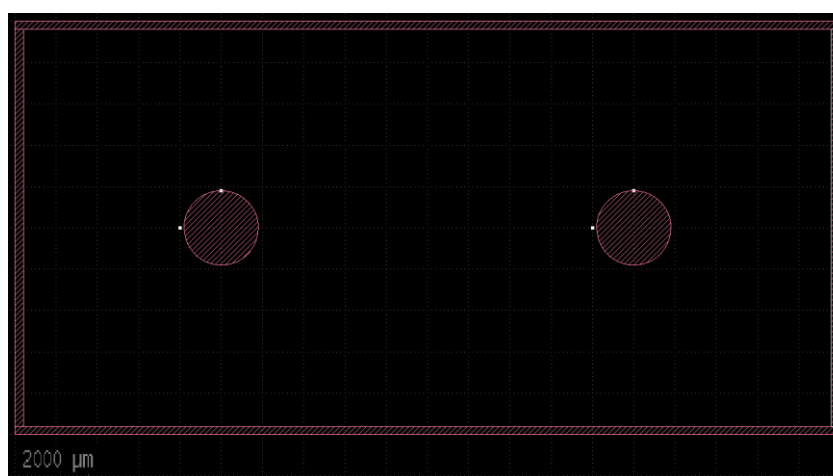
Praktická část práce byla realizována v čistých laboratořích třídy ISO 5 ve výzkumném zařízení CEITEC Nano Core Facility. Pro účely zpracování práce bylo absolvováno několik školení zaměřených na bezpečnost a obsluhu potřebného vybavení pro výrobu mikrofluidních čipů.

7.1 Návrh mikrofluidního čipu

Jako první bylo potřeba jednotlivé čipy navrhnout tak, aby bylo prozkoumáno několik možností rozmístění a tvarů čepelí. Návrh byl realizován v programu K-layout. Po předchozích zkušenostech z prvního prototypu bylo rozhodnuto, že budou vytvořeny dvě masky pro proces fotolitografie.

U prvního prototypu založeného na jedné litografii byly jednotlivé přívodní trubičky přivedené z vrchní strany čipu, což se ale ukázalo jako nepraktické řešení. V takovém případě musely být jednotlivé přívodní otvory pro tekutinu, provrtány nebo vyřezány laserem skrz vrchní pyrexové sklo. Vrták se zde neukázal jako velice praktický, jelikož po vrtání zůstal v místě vrtu nechtěný odpad, který nebylo možné jednoduše vyčistit. Kvůli odpadu docházelo k ucpávání kanálků, které již nebyly dále použitelné. Mimo jiné během vrtání pyrexové sklenice často praskalo. V případě řezání pomocí YAG laseru, nebyl k dispozici dostatečně výkonný laser, což práci značně prodlužovalo a otevření otvorů bylo nedokonalé. Jako další se ukázal problém při pozorování čipu pod mikroskopem, jelikož při lepení mikrofluidního vedení na čip se využíval epoxid, který se často roztekl na povrchu skla, a tak nebylo možné sledovat kanál v čipu.

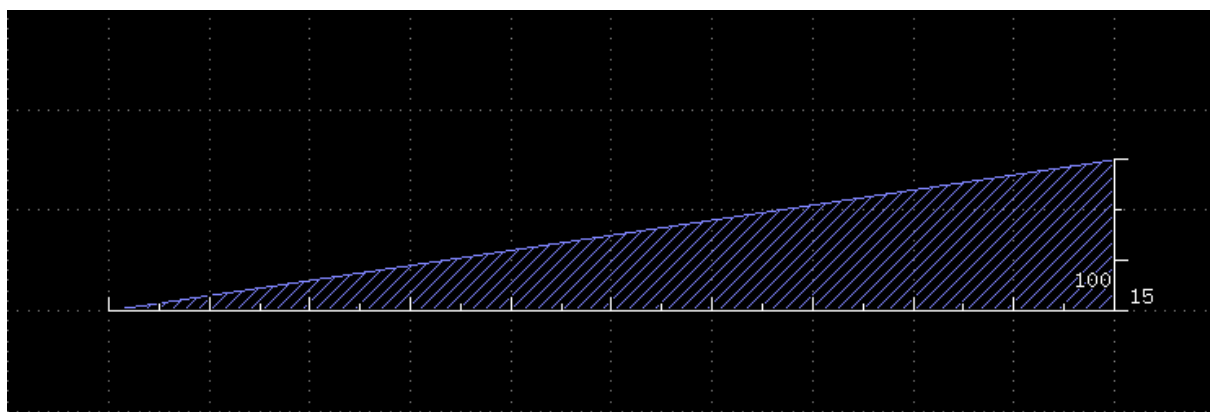
Kvůli těmto překážkám byly otvory realizovány ve spodní části křemíkového čipu pomocí zařízení DRIE. Na Obrázku 13 je vyobrazena maska pro připojení uzávěrů o průměru 1,8 mm. Samotný čip má rozměry $(20 \times 10) \text{ mm}^2$. Pro zjednodušení procesu výroby jsou zde leptány i okraje čipu – díky tomuto kroku pak nemusíme jednotlivé čipy od sebe řezat pomocí diamantové pily. Tento návrh rozložení otvorů byl pro všechny typy čipů stejný.



Obrázek 13: Návrh prvního motivu pro masku.

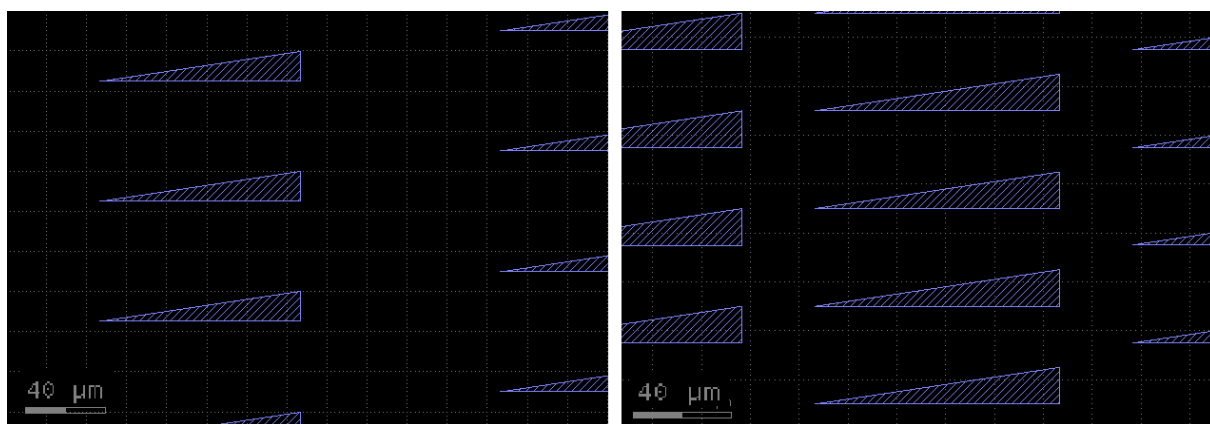
Poté byla navrhnutá maska pro kanálek, ve kterém se nachází pole čepelí. Kanálky byly realizovány v různých šířkách, protože v případě použití úzkých kanálků by mohlo docházet k ucpávání průtoků krevními elementy. Z tohoto důvodu se jednalo o tři různé šířky kanálků: 200, 300 a 400 μm .

Hlavní část čipu představuje již zmíněné pole čepelí, které je určené k řezání červených krvinek. Dohromady byly zvoleny čtyři rozdílné tvary a uspořádání čepelí – u třech se měnil rozměr čepele u posledního typu byla změněna velikost mezi sloupci čepelí. Jako výchozí tvar pro čepele byl zvolen tvar trojúhelníku o základním rozměru, jenž odvěsny stran měly rozměr 100 μm a 20 μm . Základní čepel je vyobrazena na Obrázku 14.



Obrázek 14: Design tvaru čepele.

Z čepelí pak bylo vytvořeno pole a základní čepel byla zmenšena na tři různé velikosti. Odvěsny těchto trojúhelníkových čepelí byly 20 a 3, 40 a 6 a 30 a 4,5 μm . Poslední návrh byl proveden o velikosti odvěsen 30 a 4,5 μm , kde byly také zvětšeny mezery mezi sloupci. To zde bylo navrženo kvůli tomu, aby se jednotlivé červené krvinky nezasekávaly a kanálky neucpávaly. Na Obrázku 15 je porovnání mezer, kde nalevo jsou vidět větší mezery mezi sloupci a napravo jsou pak vidět menší mezery mezi sloupci čepelí. Tyto mezery pak mají rozměry 30 μm a 9 μm .

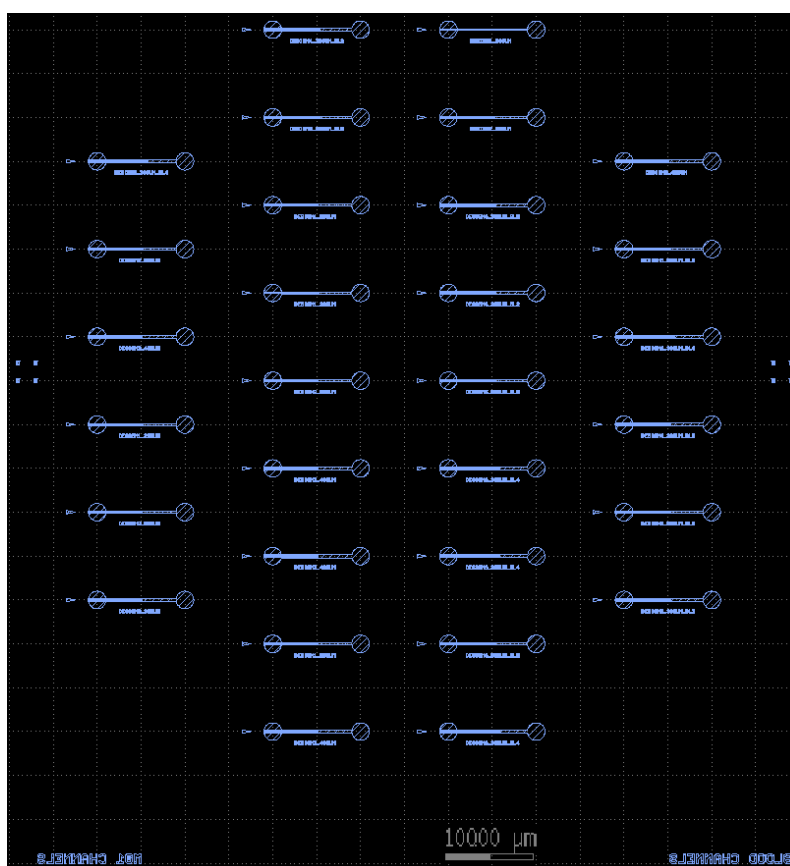


Obrázek 15: Porovnání rozestupů mezi sloupci čepelí u motivů 6 (vlevo) a 5 (vpravo).

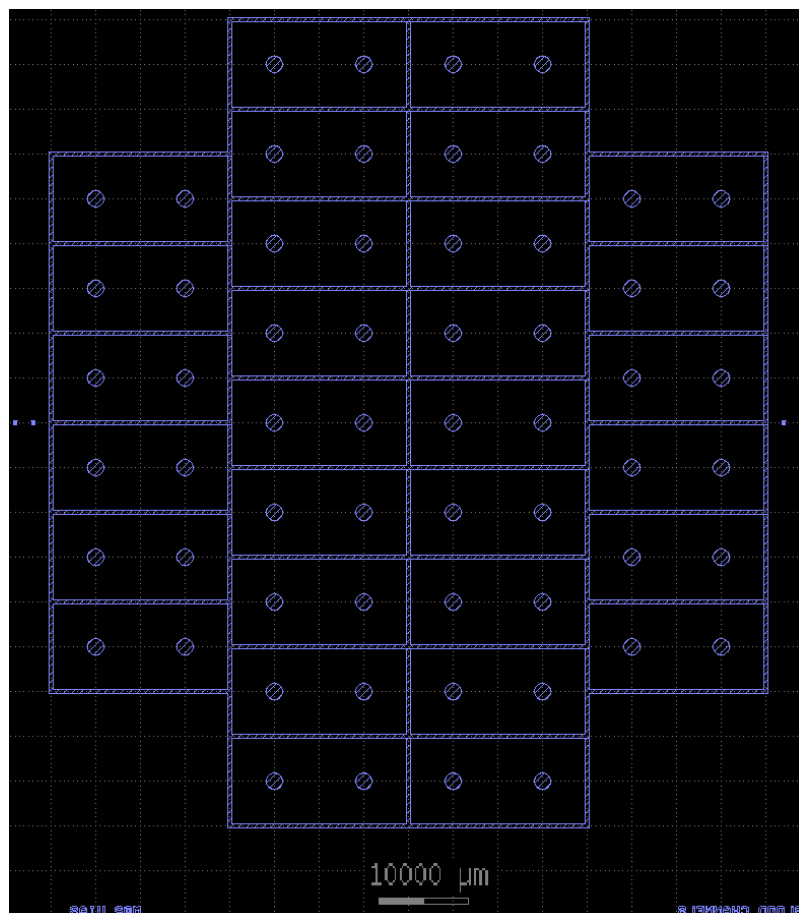
Dohromady bylo tedy vytvořeno šest různých motivů, jejichž kritické rozměry jsou popsány v Tabulce 1. V posledním kroku přípravy bylo potřeba do designu umístit dva otvory o průměru 2 mm na připojení fitinek. Tyto motivy byly pak přeneseny na masku, která se pak přenese na čtyř-palcový křemíkový substrát. Dva motivy, které byly použity pro výrobu skleněných masek, jsou znázorněny na Obrázku 16 a Obrázku 17.

Tabulka 1: Vlastnosti jednotlivých motivů.

Název motivu	Velikost čepelí [μm]	šířka kanálků [μm]	Poznámka
Design1_200um	20x3	200	
Design2_300um	20x3	300	
Design3_400um	20x3	400	
Design4_300um_BLD2	40x6	300	
Design5_300um_BLD3	30x4,5	300	
Design6_300um_BLD4	30x4,5	300	Zvětšené mezery mezi sloupci



Obrázek 16: Design prvního motivu masky.



Obrázek 17: Design druhého motivu masky.

7.2 Výroba čipů

K výrobě čipů byly využity vcelku tři křemíkové substráty typu P s krystalografickou orientací (100) o tloušťce $\approx 535 \mu\text{m}$, na nichž již byla vytvořena vrstva termálního SiO_2 o tloušťce $\approx 1130 \mu\text{m}$.

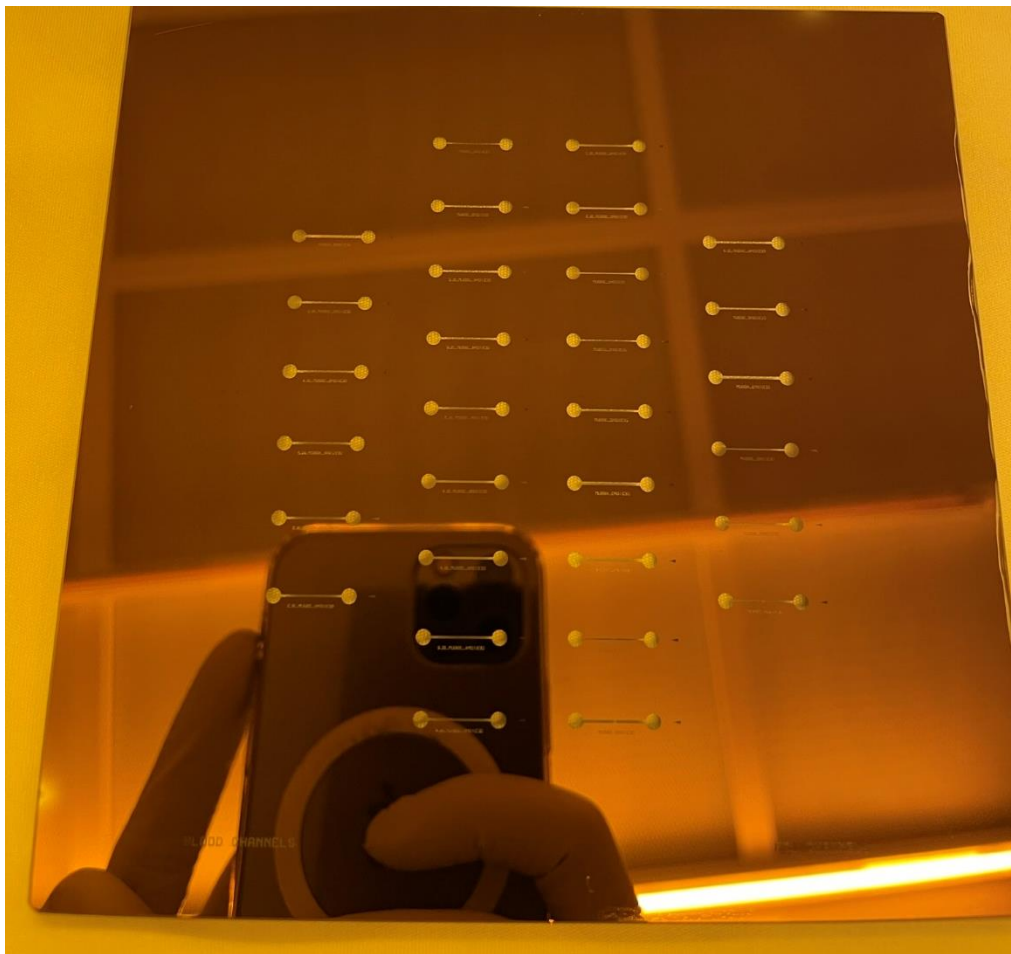
7.2.1 Výroba masek

Jako první bylo potřeba realizovat UV litografii. Vytvořený design byl přenesen pomocí UV Direct Write Laseru (DWL) na skleněnou masku s vrstvou Cr/CrO_x . Na ní byl nanesen fotorezist AZ5214E a poté byla maska vložena do DWL, kde se na ní vysvítil motiv. Masku byla vyvolána ve vývojce AZ 726 MIF po dobu 30 sekund. Následně byla maska využita k přenosu motivu na křemíkový substrát. Tento proces byl opakován i pro druhý design masky.

7.2.2 Přenos prvního motivu na substrát

Po vytvoření obou masek bylo možné začít s výrobou substrátů, a to s realizací motivu z první masky. Substrát byl nejdříve vložen do komory pro nanášení HMDS (Hexamethyldisilazane) při teplotě 135°C ve 3 cyklech (každý cyklus trval 60 s). Tato látka zvyšuje adhezi mezi rezistem a křemíkovým substrátem. Následně byl pomocí přístroje Suss MicroTec RCD8

nanesen pozitivní fotorezist AZ5214E, kde rychlost otáček při nanášení byla 4000 ot/min. Poté se fotorezist nechal zapéct na 110 °C na 50 sekund. Po tomto zapečení fotorezist získal své vlastnosti, byl vytvrzen a mohlo s ním být dále manipulováno. Následoval přenos prvního motivu masky na substrát pomocí Mask Aligneru (MA8). Expozice byla provedena ozářením o síle 90 mJ/cm² a vlnové délce 365 nm při nastavení hard contact. Po osvětlení byl substrát vložen na 1 minutu do vývojky AZ 726 MIF, kde došlo k odplavení osvětleného fotorezistu a vznikl tak výsledný motiv. Na Obrázku 18 je vidět první skleněná maska, která sloužila k přenosu motivu na substrát



Obrázek 18: První skleněná maska s motivem kanálků a čepemi.

7.2.3 Příprava na přenos druhého motivu na substrát

Po odplavení osvětleného fotorezistu, byl substrát opláchnut vodou a vysušen stlačeným dusíkem. Následně bylo potřeba substrát vložit do DRIE, kde bylo nejprve potřeba odstranit SiO₂ z míst nezakrytých fotorezistem. Tento proces odstraňoval ≈ 300 nm SiO₂ za minutu – proces trval 4 minuty, abychom vyleptali SiO₂ na povrchu substrátu.

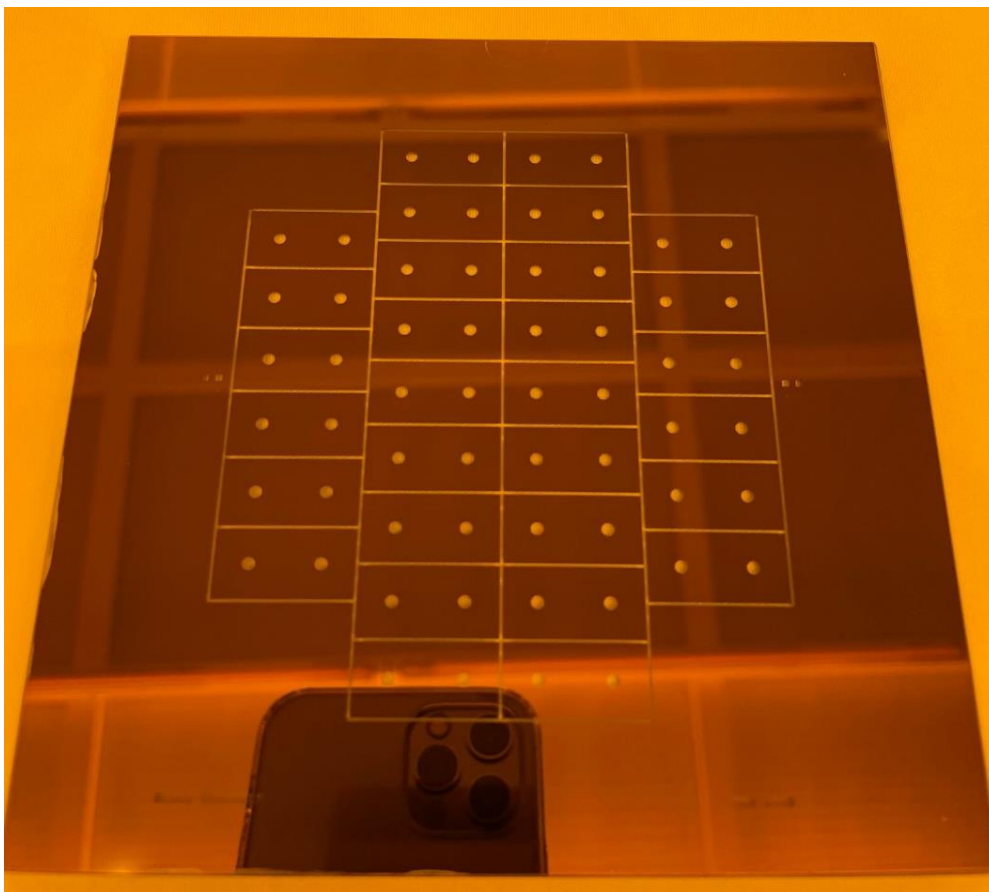
Poté byl Substrát vložen do roztoku 1-methyl-2-pyrrolidon (NMP) zahřátého na 85 °C. V tomto roztoku, byl odstraněn fotorezist AZ5214E, ze substrátu a byla vytvořena oxidová maska. Pro odstranění organických residuí a zbytků po odstranění rezistu, byl vzorek na 5 minut

vložen do DRIE, kde byl očištěn pomocí kyslíkové plazmy. Takto připravený substrát, byl připraven na nanesení dalšího motivu.

7.2.4 Přenos druhého motivu na substrát

Po vytvoření oxidové masky, byl opakován předchozí postup, depozice HMDS při 135 °C ve 3 cyklech (každý cyklus trval 60 s). Poté byl nanesen na substrát pozitivní fotorezist AZ 10XT. Tento fotorezist byl pak nanesen rychlostí 2500 ot/min. Následně musel být fotorezist zapečen na 110 °C po dobu 150 sekund. Jelikož se jedná o „tlustovrstvý“ fotorezist, tak se musel nechat zhruba 30 minut tzv. rehydratovat, než mohl být osvícen. Po rehydrataci byl vložen substrát do MA8 a bylo přistoupeno k expozici druhého motivu masky. Pro přenesení motivu na substrát bylo zapotřebí využít tzv. split expozici neboli expozici po částech. Split expozice byla využita, pro zabránění vzniku bublinek vzduchu, které vznikali v důsledku zahřívání velkou intenzitou UV záření, které by motiv poškodily. Tento jev by nastával případně, pokud by fotorezist byl osvícen celou dávkou UV záření v jednom kroku. U split expozice byla použita dávka 400 mJ/cm² s vlnovou délkou 365 nm. Osvit probíhal vždy 4 sekundy a poté bylo 60 sekund na rehydrataci. Celý proces osvitu a rehydratace byl takto 6× zopakován.

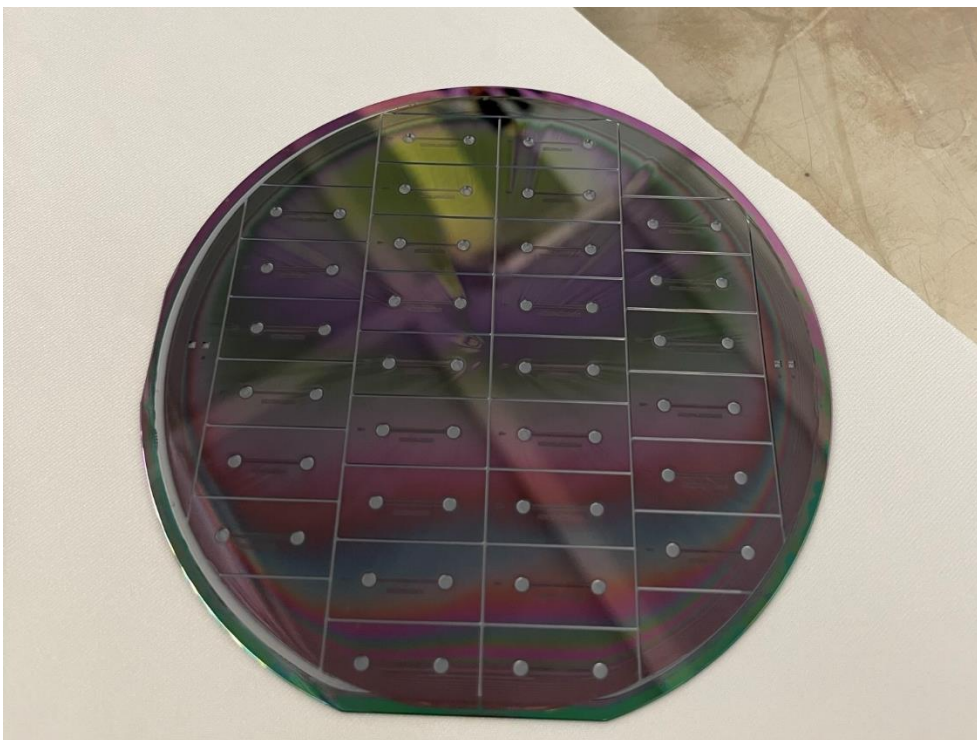
Po osvitu následovalo vyvolání, které bylo provedeno ve vývojce AZ400K. Ta se namíchala v hmotnostním poměru společně s vodou 1:2. Substrát byl následně ve vývojce 3 minuty a poté byl opláchnut vodou a vysušen stlačeným dusíkem. Takto připravený substrát byl vložen do MA8, ještě jednou a byl ozářen znovu split expozicí, avšak tentokrát bez masky. Tato expozice byla provedena, aby při využívání DRIE nevznikali ve fotorezistu vzduchové bublinky. Druhou masku, jenž byla využita pro přenesení druhého motivu na substrát, lze vidět na Obrázku 19



Obrázek 19: Skleněná maska s druhým motivem otvorů a rozdělovacích kanálků.

7.2.5 Leptání motivu pomocí DRIE

Po vložení substrátu do zařízení DRIE bylo jako první potřeba vyleptat nezakryté SiO_2 o tloušťce ≈ 1130 nm. To zde bylo zase docíleno v DRIE. Proces zde trval 4 minuty, jelikož program v DRIE odstraňoval 300 nm/min. Teprve po vyleptání SiO_2 se mohlo přistoupit k hloubkovému leptání, děr při kterém byly leptány díry skrz substrát včetně ohraničení okolo čipu, kdy se jednotlivé čipy poté nemusely dělit pomocí diamantové pily. Hrubé leptání proběhlo do tloušťky ≈ 470 μm . Leptání probíhalo po částech a hloubka byla průběžně kontrolována pomocí kontaktního profilometru. U dalších dvou substrátů bylo nastaveno více cyklů, tudíž byl proces leptání rychlejší, jelikož při oddělování jednotlivých čipů nebylo vše rovnoměrně doleptané a tvořily se úlomky křemíků, které čip znečišťovaly. Na Obrázku 20 je vidět částečně vyleptaný substrát.

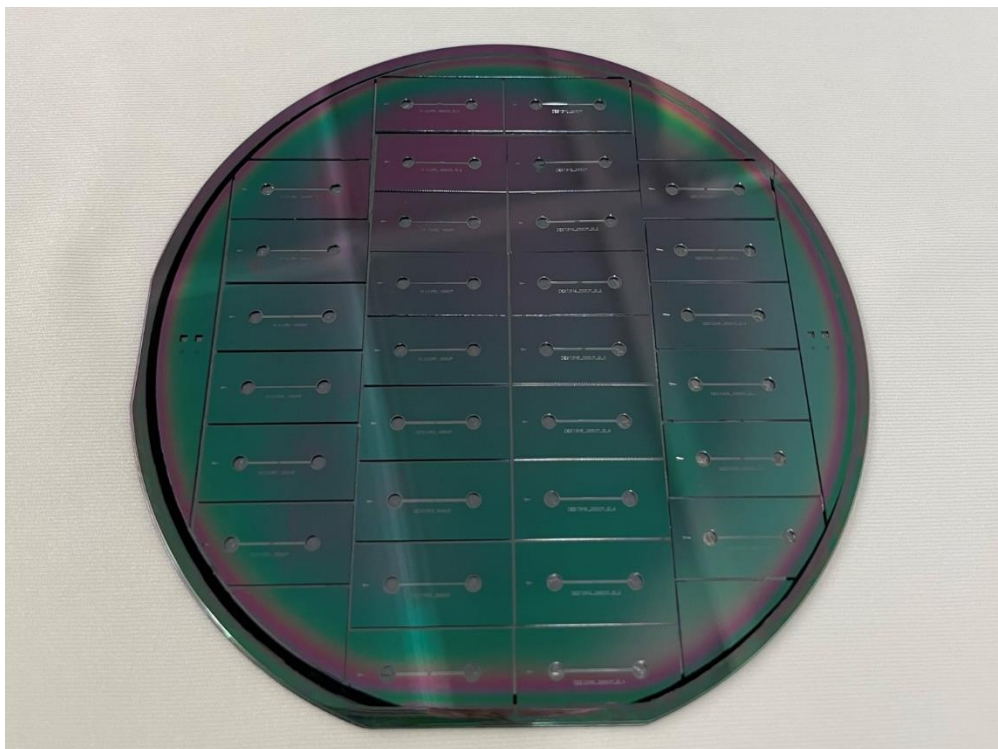


Obrázek 20: Křemíkový substrát vyleptaný hrubým procesem.

Naleptaná deska byla umístěna na podložní substrát. Ten zajišťoval další leptání bez rizika poničení zařízení a také zamezoval nechtěnému rozpadu hlavního substrátu na jednotlivé čipy již během samotného procesu. Spojení těchto dvou substrátů proběhlo nanesením Fomblinu® PFPE, který substráty nejen spojil, ale také zajistil přenos tepla, čímž docházelo k chlazení leptaného substrátu.

Jako další krok bylo odstranění fotorezistu AZ 10XT na povrchu substrátu, pomocí kyslíkové plazmy, kde byl substrát ponechán po dobu 10 minut. Na substrátu tedy zůstal jen první motiv, který zůstal chráněn pod vrstvou SiO_2 . Ta odkrývala kanálky a otvory a zároveň zakrývala jednotlivé čepele. Zde bylo leptáno do hloubky $50\text{ }\mu\text{m}$ pomocí jemného procesu. Tento proces nám dovolil leptat velmi jemné struktury, kterými byly v našem případě čepele. Proces, také redukoval vroubkování na minimum, které bylo značné při leptání otvorů. Po skončení tohoto procesu byl substrát proleptán skrz. Při leptání jemným procesem vznikla na okraji černá nedoleptaná místa tzv. černý křemík. Tento jev je nežádoucí a je způsoben špatným nastavením programu leptání s enormní depozicí pasivační vrstvy. Přestože je tento jev většinou nežádoucí, v našem případě funkčnost nijak neovlivňuje, protože se nachází jen na okrajích substrátu.

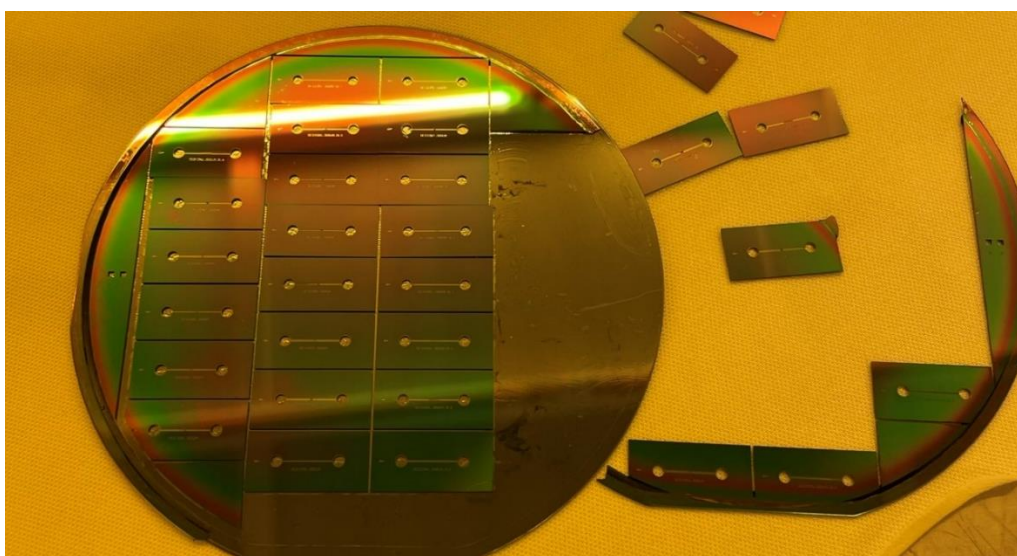
Kompletně vyleptaný substrát včetně oddělených jednotlivých čipů a černým křemíkem po kraji substrátu je zobrazen na Obrázku 21.



Obrázek 21: Vyleptaný křemíkový substrát na podložním substrátu.

7.2.6 Rozdělení jednotlivých čipů

Po dokončení leptání byly čipy z podložního substrátu odděleny a separovány. Jakmile došlo k oddělení čipů, byly vloženy do roztoku tzv. „Piraňa“ (směs kyseliny sírové (H_2SO_4) a peroxidu vodíku (H_2O_2) v poměru 1:3, který organické nečistoty odleptal. Po odstranění nečistot došlo na čipech ke vzniku map, které musely být podrobeny dalšímu čištění, a to pomocí acetonu. Poslední zbytky nečistot byly odstraněny vložением jednotlivých čipů do kyslíkové plazmy. Na Obrázku 22 lze vidět proces rozdělování čipů.



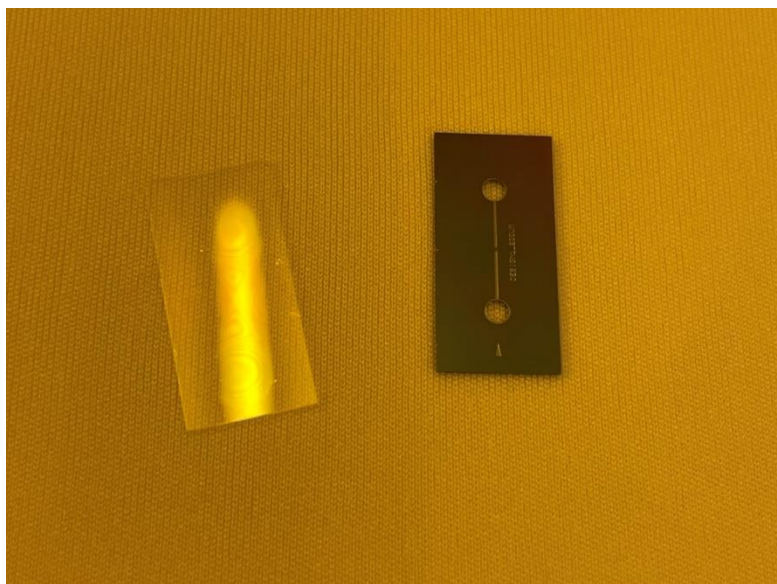
Obrázek 22: Rozdělování křemíkového substrátu na jednotlivé čipy.

7.2.7 Spojování čipů s krycím sklem

Aby čip mohl být použitelný a mohla ním protékat tekutina, musí být uzavřený. Toto uzavření proběhlo pomocí pyrexového skla. Jako první bylo realizováno spojení mezi čipem a sklíčkem pomocí rezistu - zde se však objevil problém, protože fotorezist často natekl do jednotlivých kanálků, které tak ucpal a čip se stal nepoužitelným. Muselo se tedy využít jiné metody, a to spojování čipů pomocí Parylenu-C.

Pyrexový substrát byl nařezán na stejné rozměry jako Si čip. Poté byla na jednotlivá sklíčka nadeponovaná vrstva Parylenu-C, o tloušťce $\approx 5 \mu\text{m}$. Při spojování čipu byl čip i pyrexové sklíčko umístěno do kyslíkové plazmy. V kyslíkové plazmě se styčné plochy sklíčka očistily a došlo k aktivaci povrchu Parylenu-C, což umožnilo vznik kvalitního mechanického a vodotěsného spoje. V kyslíkové plazmě byla sklíčka ponechána minutu při výkonu 300 W a tlaku $\approx 10 \text{ Pa}$. Pokud však byla pyrexová sklíčka delší dobu ponechána v klidu v atmosférických podmínkách, docházelo k jejich špatnému spojení k čipu, díky adsorpci vlhkosti ze vzduchu. Na druhou stranu, sklíčko se nemůže v plazmě nechat ani příliš dlouho, bez toho, aby nedošlo k leptání Parylenu-C. Oba tyto problémy byly vyřešeny, když čas umístění sklíčka do kyslíkové plazmy byl dvě minuty.

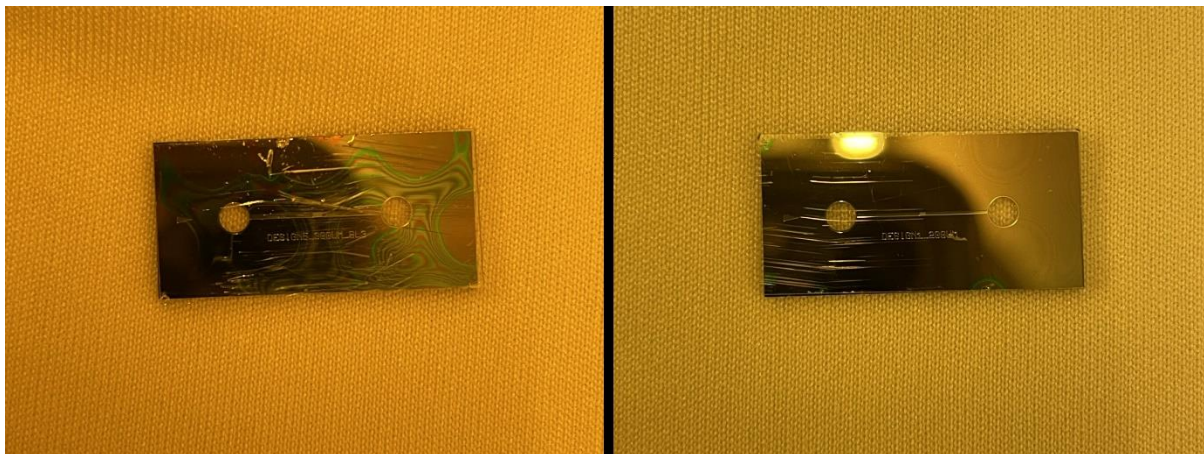
Po vytáhnutí byl Si čip umístěn (vrchní stranou čipu nahoru) na topnou desku (hot-plate), který byl nastaven na teplotu 230°C . Poté bylo dáno sklíčko vrchní stranou (s homogenní nadeponovanou vrstvou Parylenu-C) na čip. Teplotou se Parylen-C aktivoval. Pak bylo na celý čip zatlačeno pomocí plastového válečku, tímto se čip a sklíčko spojily a mohly být sundány z hot-platu. Čip a sklíčko před procesem spojování je možné pozorovat na Obrázku 23



Obrázek 23: Pyrexové sklíčko s nadeponovanou vrstvou Parylenu-C (vlevo) křemíkový čip (vpravo).

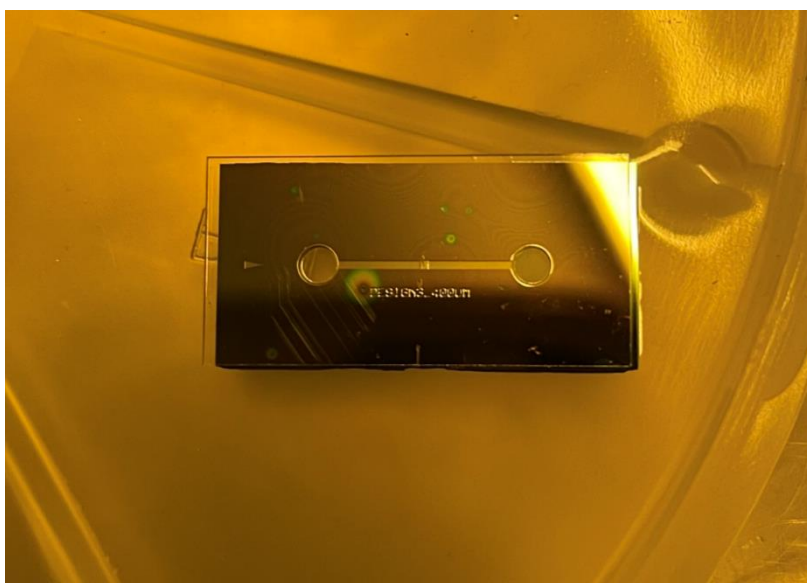
Při spojování mohlo dojít k otočení sklíčka, to vedlo ke spojení čipu se stranou, kde Parylen-C nebyl homogenně rozprostřen. To bylo možné pozorovat na sklíčku ve formě kroužků. Tyto materiály se spojily pouze v určitých místech, což je znázorněno na Obrázku 24,

kde je nalevo možné pozorovat spojený čip, u kterého bylo sklíčko otočeno. Na takovém sklíčku jsou pak patrné zvláště zbarvená místa, kde nedošlo ke spojení obou materiálů. Tomuto problému však nebylo možné předejít ani za použití vyššího tlaku na daná místa. Napravo na Obrázku 24 je pak možné vidět správně spojený čip.



Obrázek 24: Špatně spojený čip z důvodu otočení sklíčka (vlevo) správně spojený čip (vpravo).

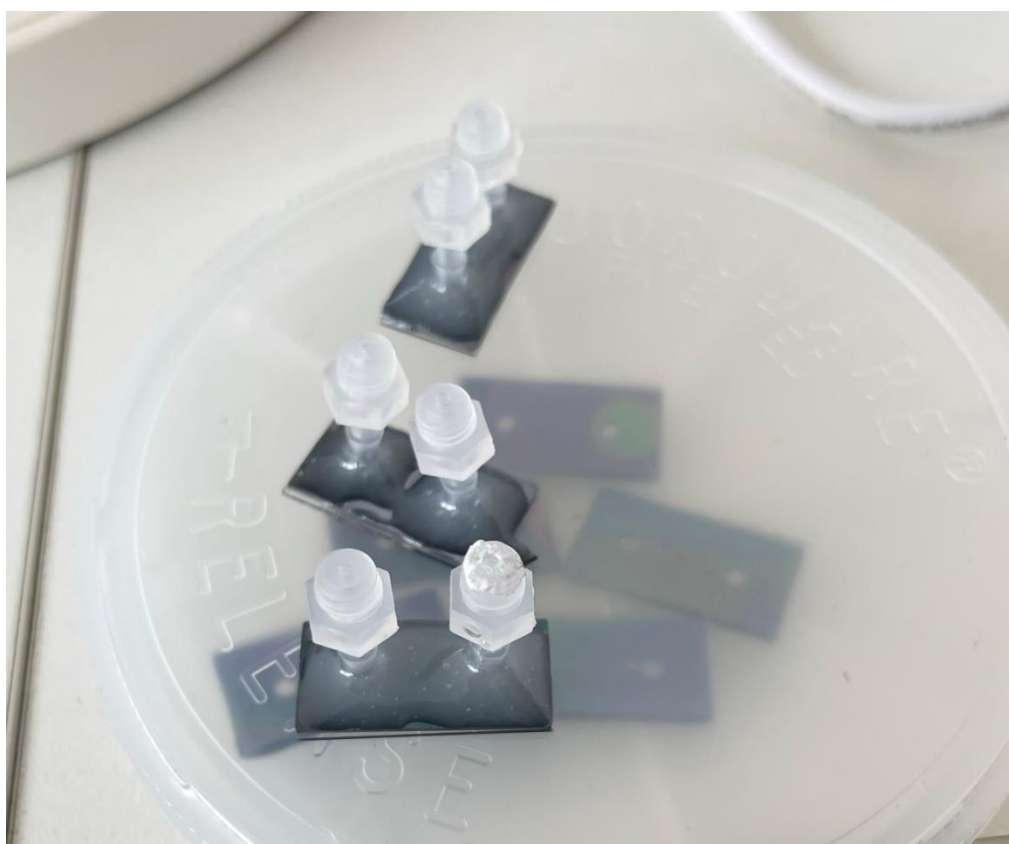
U některých čipů se určitá místa i přes spojení správnými stranami nespojila. To bylo způsobeno kousky křemíků, které vznikly při proleptávání děr křemíkovým substrátem při procesu DRIE. Tento jev se však podařilo co nejvíce minimalizovat díky delšímu času leptání substrátu. Některé malé částice (o velikosti jednotek až desítek μm) se však nepovedlo vždy odstranit, a to ani pomocí oplachu acetonem či ofouknutím stlačeným vzduchem. Tyto částice je možné vidět na Obrázku 25 zejména pak pod kanálkem. Protože se tyto defekty nenachází přímo u kanálku či otvorů k přivádění tekutin, nemají tak vliv na funkčnost čipu, ale pouze na jeho vzhled. Takto vyrobený mikrofluidní čip již bylo možné přichystat na připojení fitinků.



Obrázek 25 Čip s defektem způsobený křemíkovou částicí

7.3 Připojování čipu na přívod tekutin

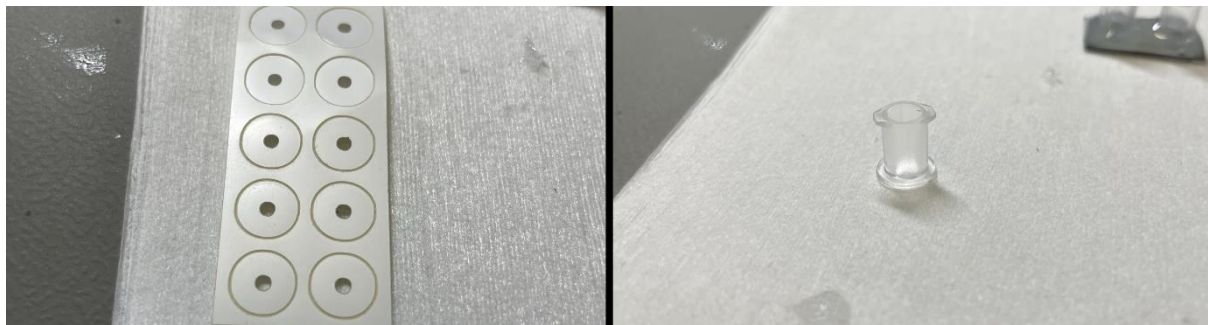
Po vyrobení takového čipu je potřeba jej také připojit na příslušné přípojky (fitinky), do kterých jsme pak schopni přivést tekutinu. Jako první byly vyzkoušeny předem připravené polyuretanové fitinky. Ty byly k čipu přilepeny pomocí rychle tvrdnoucího dvousložkového epoxidu značky Ceys. Ten se namíchal v poměru 1:1 pomocí dvou složek a poté se aplikoval okolo fitinků. I přesto že byl epoxid vytvrzený do 5 minut, docházelo k zatečení epoxidu dovnitř kanálků kvůli nepřesnému tvaru fitinek. bylo nutné fitinku po dobu ≈ 5 minut držet na stejném místě, dokud nebyl epoxid částečně vytvrzen. Kvůli nepraktické ruční manipulaci s čipem v průběhu lepení bylo od použití PU fitinek upuštěno. Celková doba, za kterou byl epoxid kompletně vytvrzen byla 24 hodin. Čipy s těmito polyuretanovými fitinkami lze vidět na Obrázku 26.



Obrázek 26: Čipy s polyuretanovými fitinkami.

Po tomto zjištění byly pořízeny profesionální fitinky od značky microfluidic-ChipShop, které byly přímo vytvořeny k tomu, aby šel čip a fitinka co nejlépe spojit. V tomto případě byla zcela eliminována manipulace rukou, jelikož fixace fitinky na čip zde bylo dosaženo pomocí adhezního kroužku, který je vidět na Obrázku 27 vlevo. Tento kroužek se přilepil na spodní stranu fitinky, která se přilepila na substrát a po stlačení zůstala fixována na pozici v čipu. Díky tomu vznikalo velmi dobré spojení, které umožňovalo komfortní oblepení fitinky epoxidem. Adhezní kroužek také zajišťoval, že epoxid nezatekl do kanálku v čipu. Nový typ fitinků byl

z polykarbonátu, tento typ materiálů zajišťuje velmi dobrou chemickou odolnost. Použité fitinky lze vidět napravo na Obrázku 27. Nový typ měl lepší tvar, umožňoval jednodušší práci. Po aplikaci adhezního kroužku se na celou zadní stranu aplikoval epoxid, který vše spojil permanentně a zabránil průsaku tekutiny mimo kanál.



Obrázek 27: Adhezční kroužky (vlevo) a fitinka pro připojení k čipu (vpravo).

Na fitinku byl poté nasazen mezikus-redukce, která umožnila připojit čip k přívodní trubičce. Přívodní trubičky měly dva typy. Jedna silikonová ohebnější o vnitřním průměru 0,76 mm a vnějším průměru 1,65 mm a druhá teflonová méně ohebná, která měla vnitřní průměr 0,5 mm a vnější průměr 1 mm. Silikonová sloužila k propojení fitinky a teflonové trubičky. Teflonová trubička se pak připojila k polypropylenovému adaptéru, který byl zapojen do stříkačky. Ke spojení teflonové trubičky a adaptéru se využilo další silikonové trubičky. Takto připravený čip mohl být podroben testování. Celý zapojený čip je pak možné pozorovat na Obrázku 28.



Obrázek 28: Zapojený čip s přívodními hadičkami.

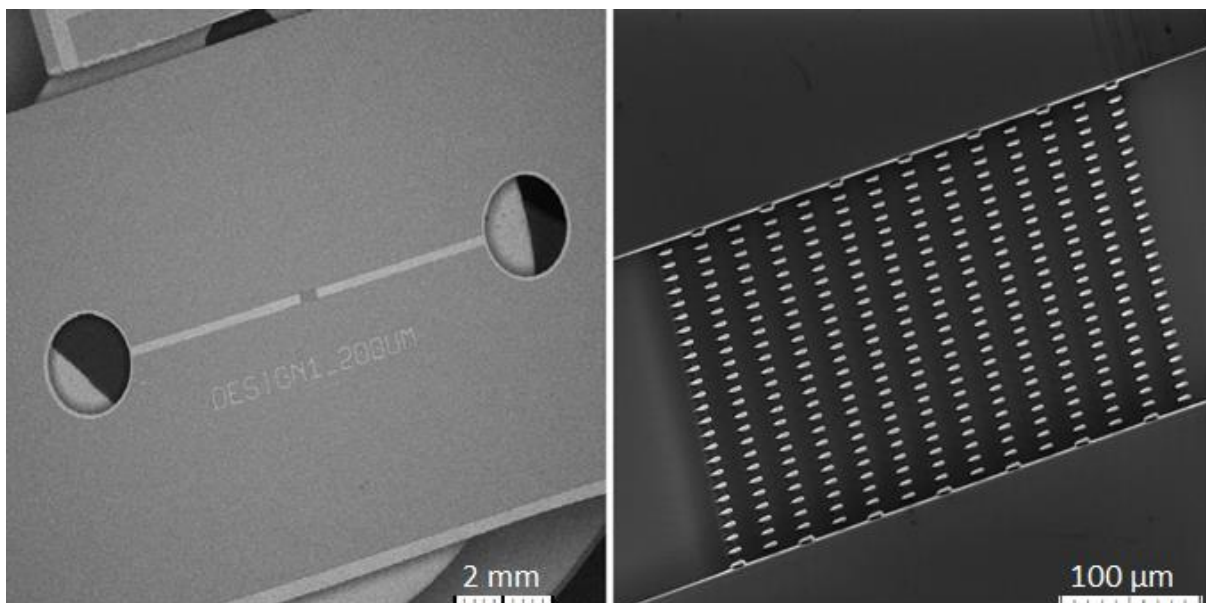
7.4 Analýza čipů pomocí SEM

Abychom určili, jak přesně se podařilo čipy vyleptat a určit kvalitu (ostroť) jednotlivých čepelí, byl každý typ čipu vložen do rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM), kde byl poté pozorován. Výška čepelí dosahovala 50 μm .

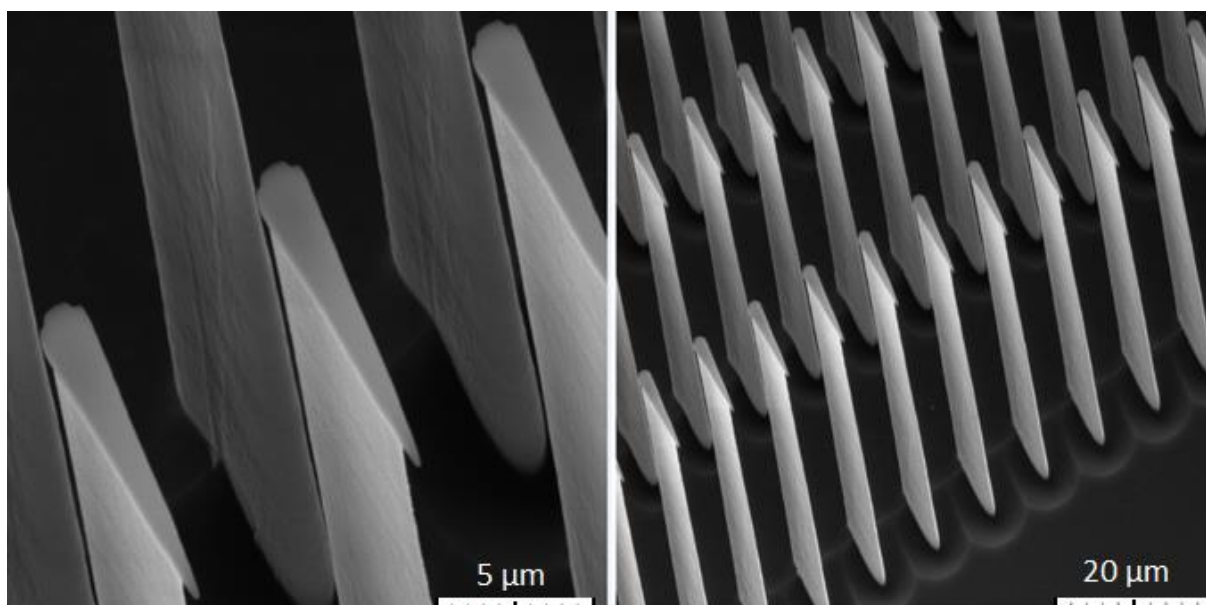
7.4.1 První motiv

První typ lze vidět vlevo na Obrázku 29. Zde můžeme pozorovat, že čip má proleptané otvory i kanálky a uprostřed jsou viditelné čepele. Tyto čepele byly nejmenší ze třech velikostí, (odvšudy 20 a 3 μm). Napravo na Obrázku 29 lze vidět, že pole čepelí je vyleptané a žádná z čepelí není proleptaná naskrz. Nalevo na Obrázku 30 jsou pak jednotlivé čepele zachyceny v detailu, v horní části obrázku jsou pozorovatelné čepele v původním stavu. Na těchto čepelích je ponechána vrstva SiO_2 o tloušťce $\approx 1130 \text{ nm}$, která sloužila, jako tzv. „tvrdá maska“. Metoda DRIE je vysoce selektivní (1:100) a zde leptala pouze křemík.

Dále lze pozorovat, že vrstva SiO_2 je podleptána tzv. „notching“. Nejvíce je to patrné na ostré straně břitů, ve špici na rozhraní oxid/křemík. Jev podleptání by bylo možné odstranit pomocí lepšího nastavení procesu při leptání v DRIE, ale přesto by bylo vždy do určité míry patrné. Čepele jsou ve vrchní části značně ostré, spodní část se postupně rozšiřuje a s tím jsou konce čepelí tupější. V tomto případě by byla opětovně potřeba lépe nastavit leptací proces v DRIE. Vroubkování tzv. „scaloping“, které je pro DRIE typické je pozorovatelné jen v minimální míře a je pro tuto aplikaci prakticky zanedbatelné. Naopak, je předpoklad, že scaloping jednotlivých čepelí, může pozitivně ovlivnit lýzu erytrocytů uvnitř kanálu. Je tím myšleno, že oproti hladkému břitu s definovaným poloměrem, můžou jednotlivé „scalopky“ vytvářet submikronové artefakty v podobě ostřin které usnadní penetraci jednotlivých buněk. Na Obrázku 30 napravo je pak zobrazeno pole čepelí pod úhlem, na kterém lze lépe pozorovat rozšíření u konce čepelí.



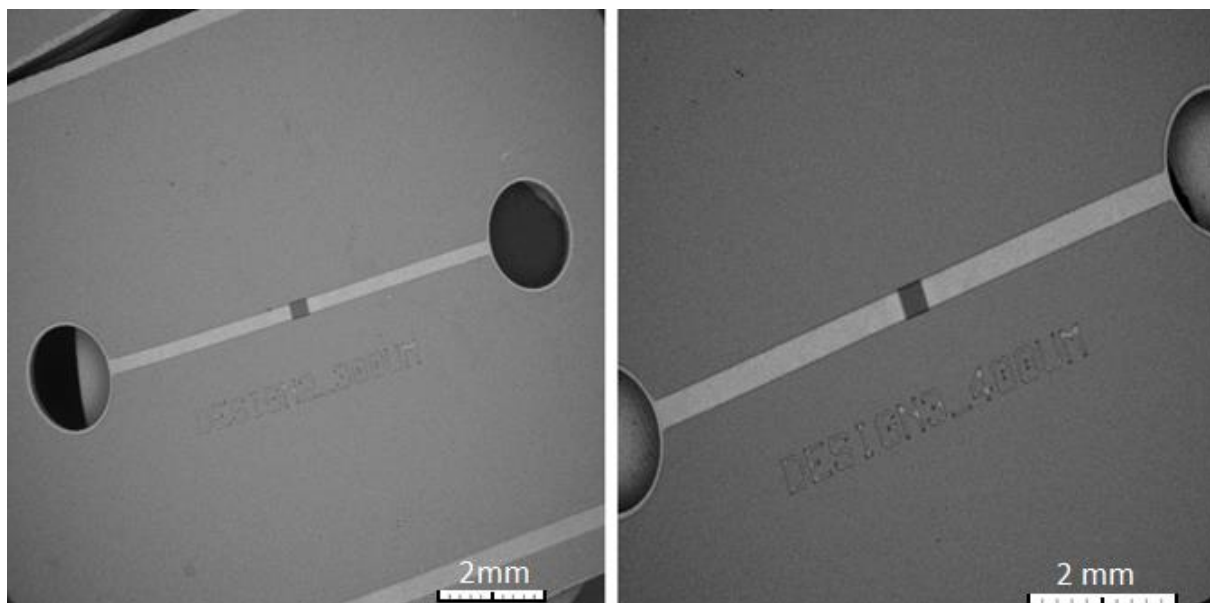
Obrázek 29: Detailní snímek celého čipu (vlevo) a detailní snímek pole čepelí (vpravo) prvního motivu.



Obrázek 30: Detailní záběr čepelce (napravo) a seřazených čepelí (vlevo) u prvního motivu.

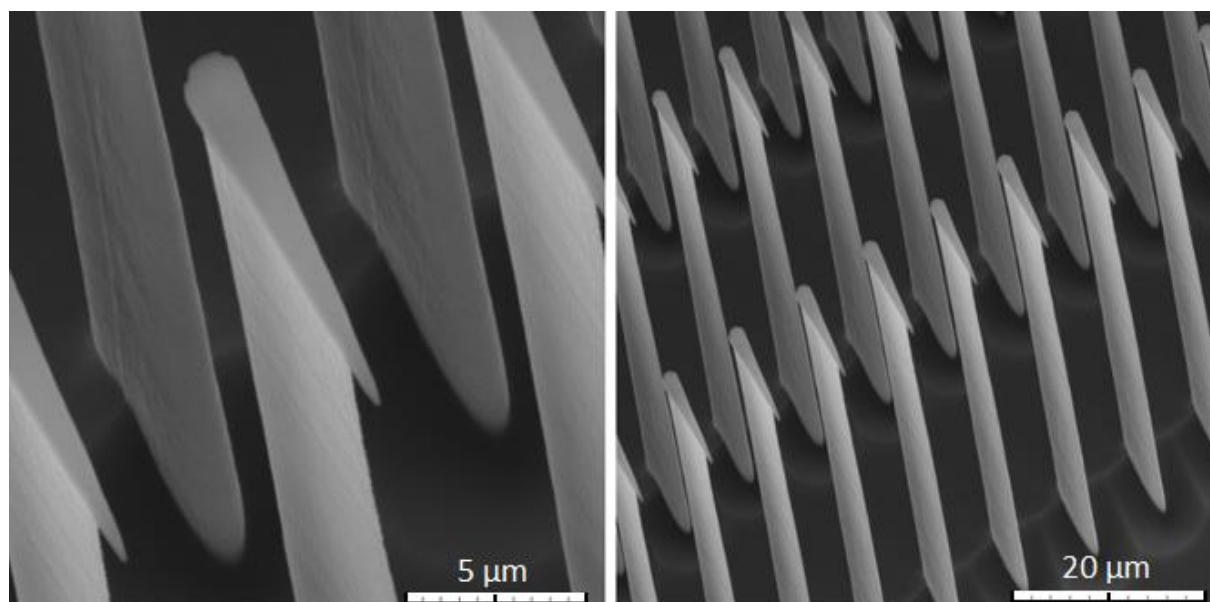
7.4.2 Druhý a třetí motiv

Druhý a třetí typ lze pozorovat na Obrázku 31. Tyto dva motivy měly stejně velké čepelce jako první typ, nicméně je patrné že kanálky mají rozdílnou velikost. Motiv 2 (vlevo) má šířku 300 μm a motiv 3 (napravo) má šířku kanálku 400 μm .

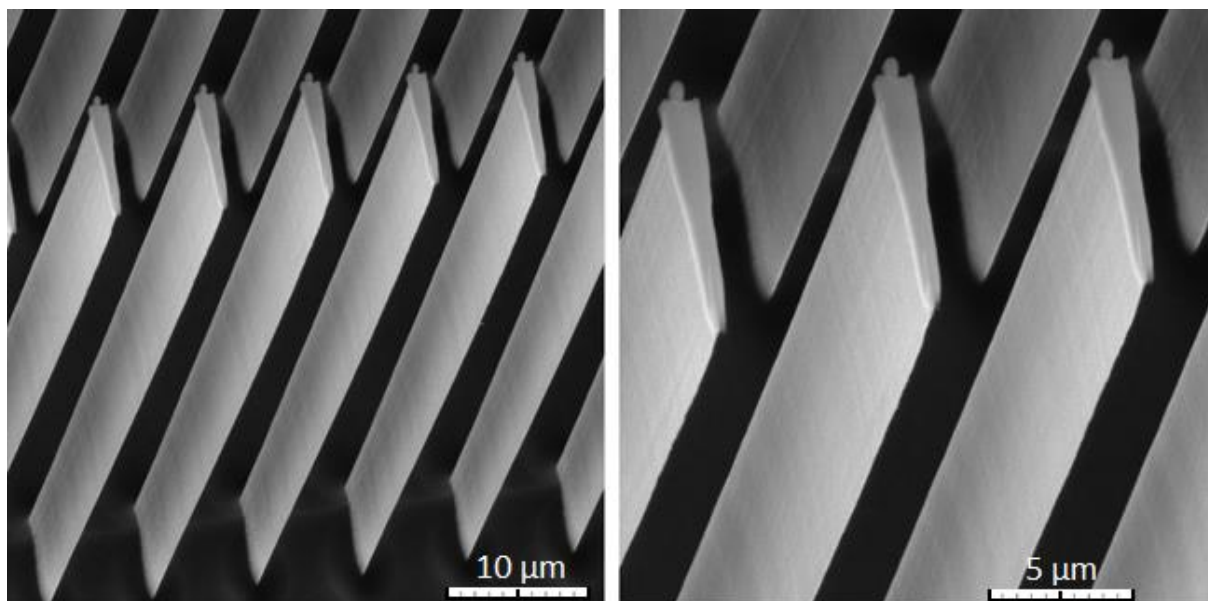


Obrázek 31: Detailní snímek druhého motivu (vpravo) a detailní snímek třetího motivu (vlevo).

Čepele u druhého designu jsou naprosto identické jako u designu prvního a jejich detail můžeme vidět na Obrázku 32. U třetího designu, který vidíme na Obrázku 33 se však čepele zdají být ostré i na spodních stranách, ale na druhou stranu došlo k narušení svrchního oxidu. To mohlo být s největší pravděpodobností způsobeno při transportu vzorků k elektronovému mikroskopu, na funkčnost to však nemá žádný vliv.



Obrázek 32: Detailní záběry čepelí druhého motivu.

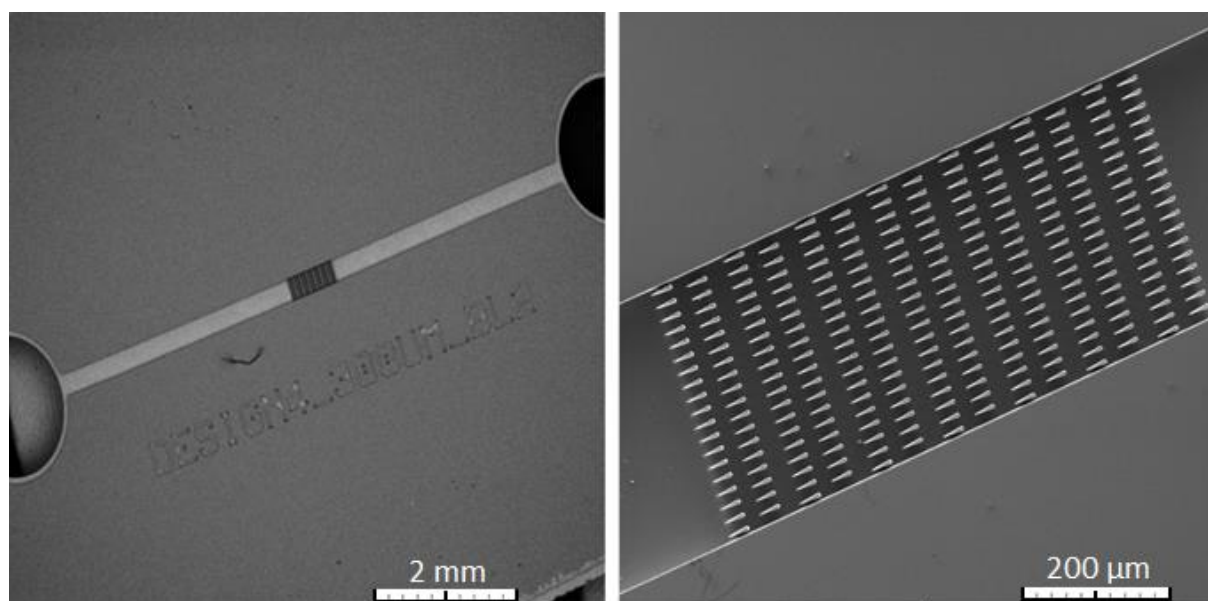


Obrázek 33: Detailní záběr čepelí třetího motivu.

7.4.3 Čtvrtý motiv

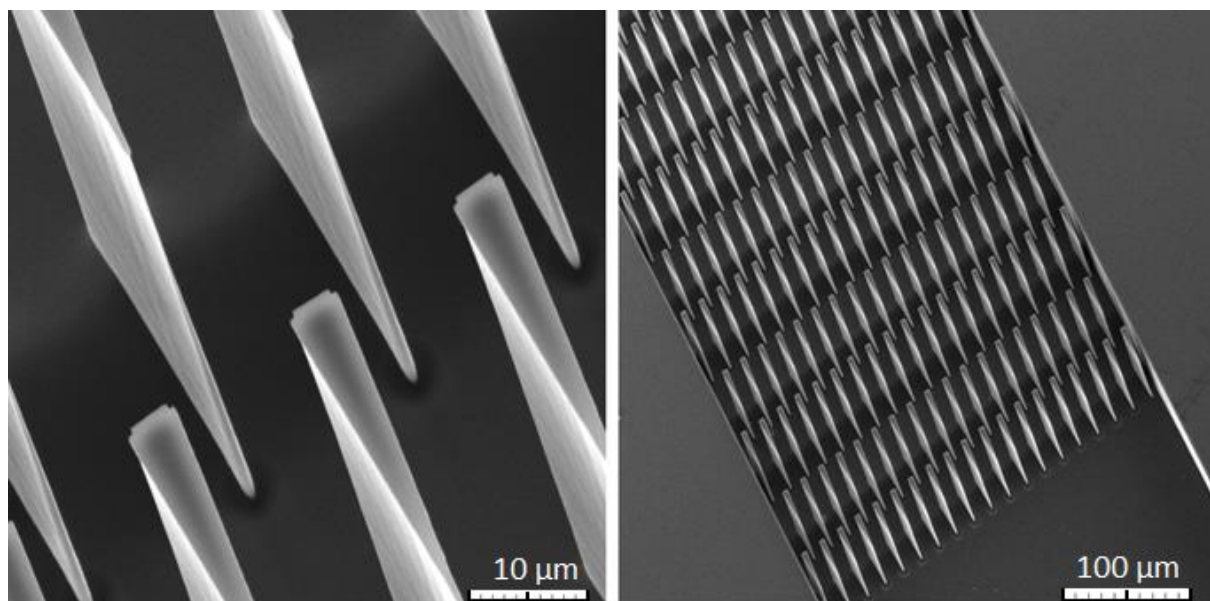
Na motivu designu, Obrázek 34 vlevo, jsou na první pohled pozorovatelné patrné nečistoty, tvořeny pravděpodobně zbytky křemíku, po nezdařilém vyčištění. Na pravé straně je potom vidět detailní fotografie čepelí. Stejně jako u předchozího designu se i v tomto případě čepele u koncových částí rozšiřují, přičemž dochází k otupení čepelí směrem dolů.

Protože se zde jedná o největší použité čepele (rozměry odvěsen 40 a 6 µm), došlo pouze k velice malému podleptání ve srovnání s ostatními designy.

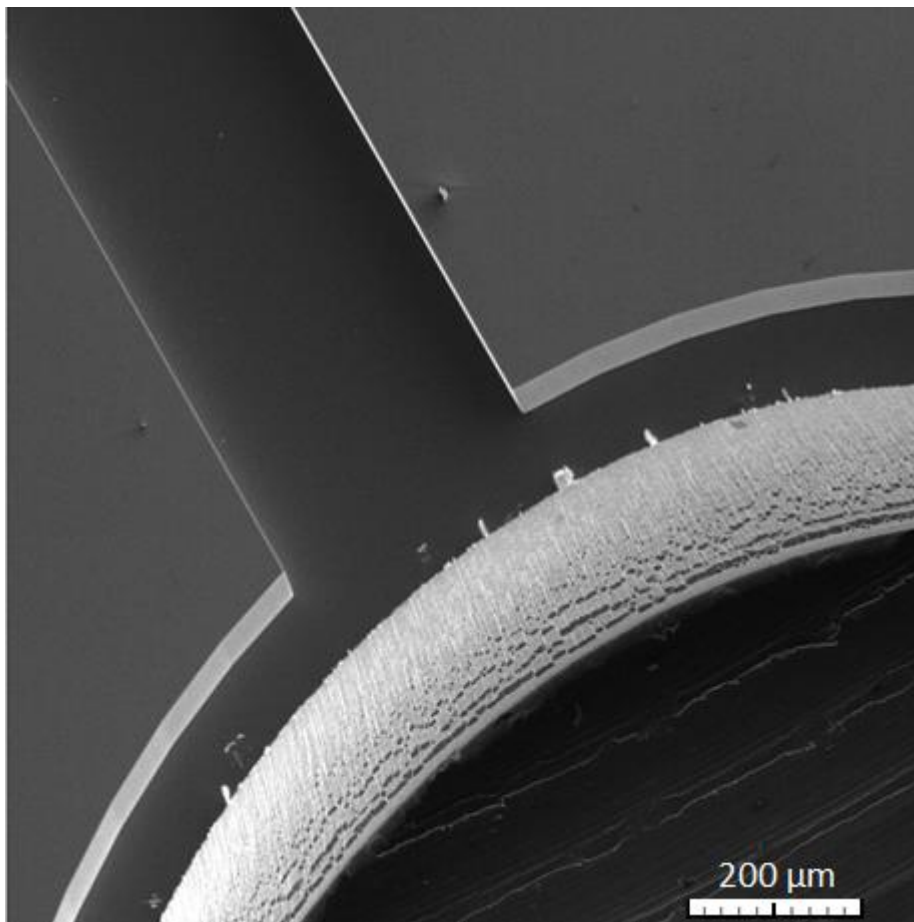


Obrázek 34: Detailní záběr čipu (vlevo) a pole čepelí (vpravo) pro čtvrtý motiv.

Po stranách designu je pak možné vidět jemné, jen zřídka patrné vroubkování. Detailní záběry těchto čepelí je možné pozorovat na Obrázku 35. Je zde patrná deformace, rozšíření, u paty bříty. U tohoto designu byl také pořízen snímek otvoru, který vypadal u všech designů stejně. Na Obrázku 36 je možné vidět přechod kanálku a otvorem. Zatímco u leptání kanálku není patrné žádné vroubkování, v samotném otvoru je to však naopak. To je zde způsobeno rozdílnými leptacími programy. U těchto kanálků byl použit velmi jemný proces, který vroubkování minimalizoval na zanedbatelnou hodnotu, avšak byl velmi pomalý. Zatímco na leptání děr byl využit rychlejší leptací proces, který způsobil značné vroubkování, což v otvoru ničemu nevadí.



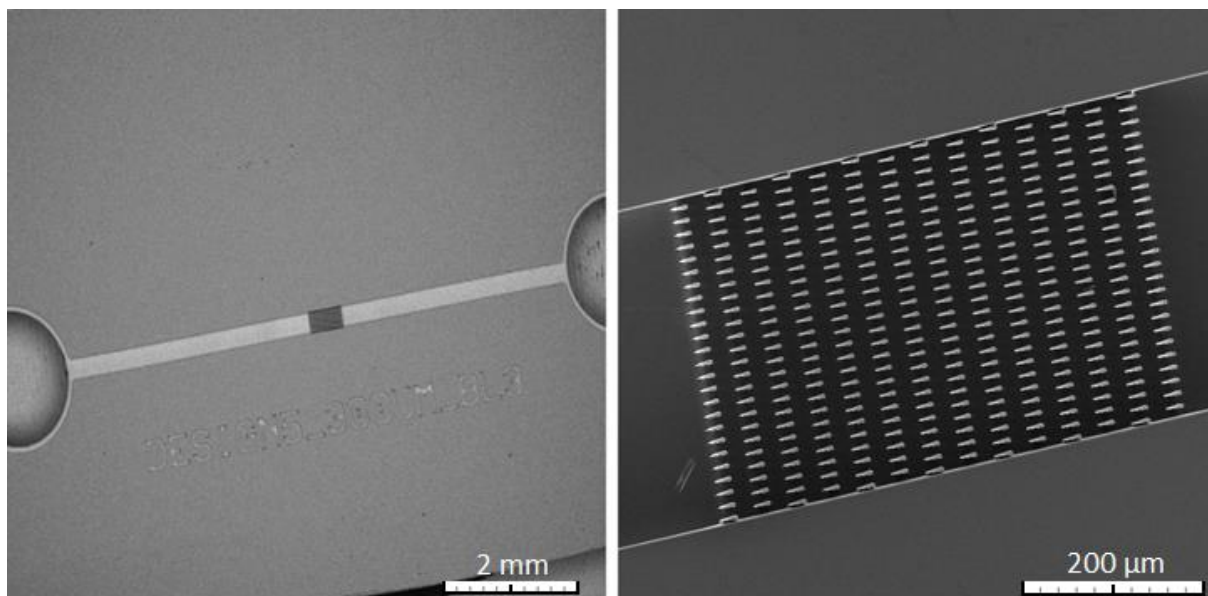
Obrázek 35: Detailní záběry čepelí u čtvrtého motivu.



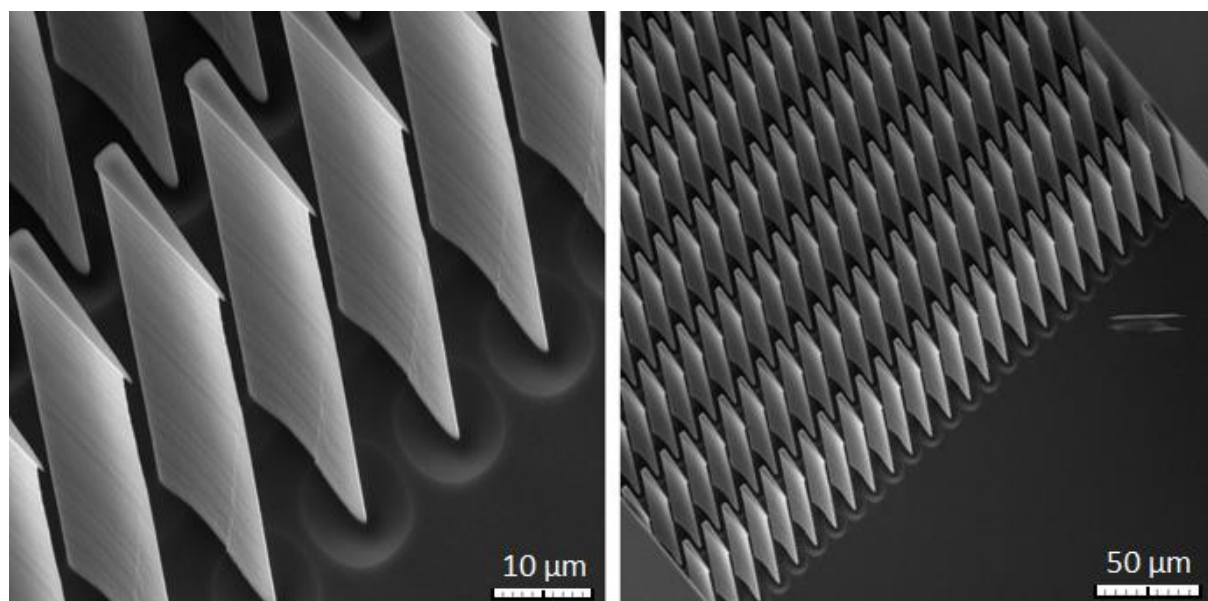
Obrázek 36: Detailní záběr otvoru pro přívod roztoku u čtvrtého motivu.

7.4.4 Pátý design

U pátého designu, Obrázek 38 vlevo, byla vyleptána střední velikost čepelí, tedy s rozměry odvěsen 30 a 4,5 μm . Pole čepelí je vidět na Obrázku 38 vpravo, kde leptání proběhlo velmi dobře, jelikož jsou všechny čepele kompletní bez jakéhokoliv náznaku mechanického poškození. Na Obrázku 38 jsou pak detailní fotografie čepelí, kde zase sledujeme rozšíření u spodní části čepelí. V tomto případě jsou čepele ostřejší než u předchozích designů s menšími čepelemi, na druhou stranu jsou ale méně ostré než u čtvrtého designu. Oxidová vrstva je zde už znatelně podleptaná, přesto ani zde funkčnost neovlivňuje. Na Obrázku 38 vpravo lze pak vidět, že před polem čepelí je rýha, ta byla pravděpodobně způsobena mechanickým poškozením při manipulaci s čipem, navzdory tomu by neměla omezovat funkčnost čipu.



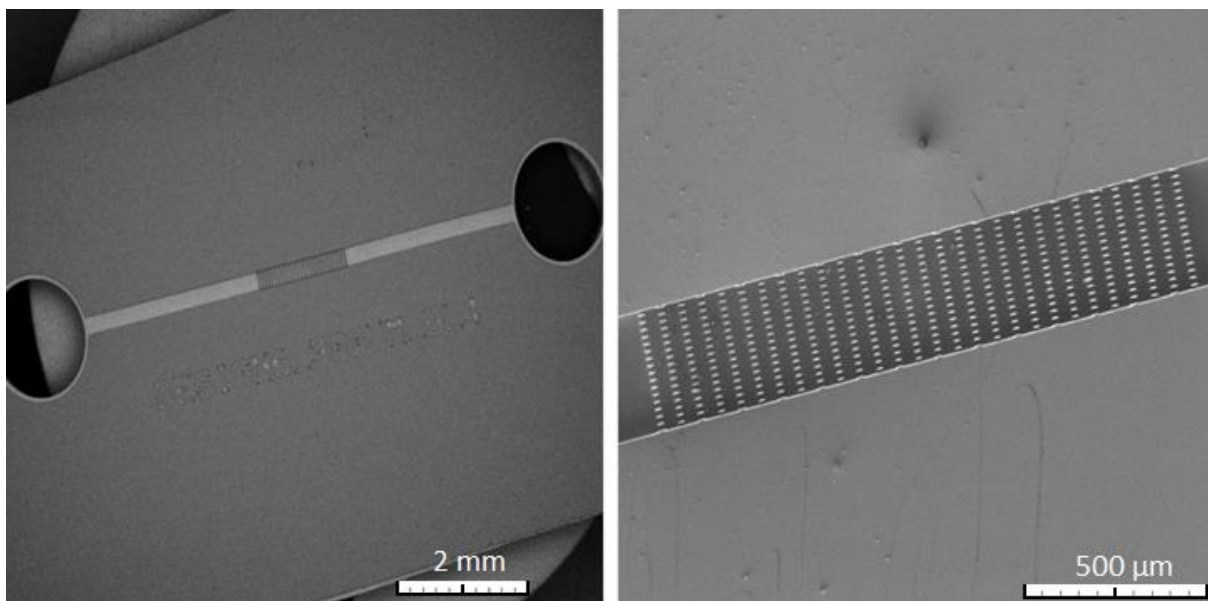
Obrázek 37: Detailní záběr čipu pátého motivu.



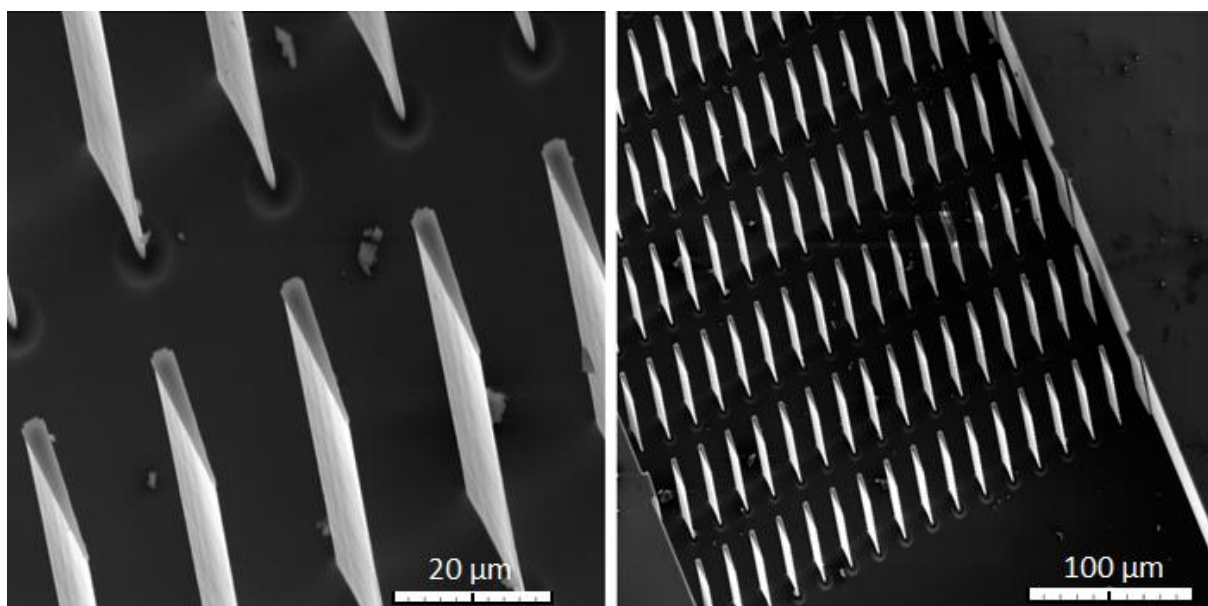
Obrázek 38: Detailní záběr čepelí u pátého motivu.

7.4.5 Šestý design

U šestého designu byly využity stejné velikosti čepelí jako u pátého designu, přesto v tomto případě ale byly mezery mezi sloupci rozšířeny. Na Obrázku 39 vlevo, je pak vidět celý čip a napravo pole čepelí, které je oproti všem předchozím designům roztáhlé do šířky, právě kvůli větším mezerám mezi sloupci. Na Obrázku 40, lze vidět detail čepelí, zde se opakuje podobný případ jako u předchozího designu, tudíž jsou čepele ostré nahoře a tupé zespodu. Dále můžeme na fotce vidět spoustu malých částecek, které pravděpodobně představují úlomky křemíku z doby po rozdělení substrátu před vložením do SEM.



Obrázek 39: Detailní záběr čipu šestého motivu.



Obrázek 40: Detailní záběr čepelí u šestého motivu.

U všech pozorovaných břitů bylo dosaženo submikronové rozměru řezné hrany $\sim 100 - 500$ nm. Lze tedy konstatovat, že vyrobené břity, jsou použitelné pro lýzu jednotlivých buněk v řádech jednotek až desítek mikrometrů.

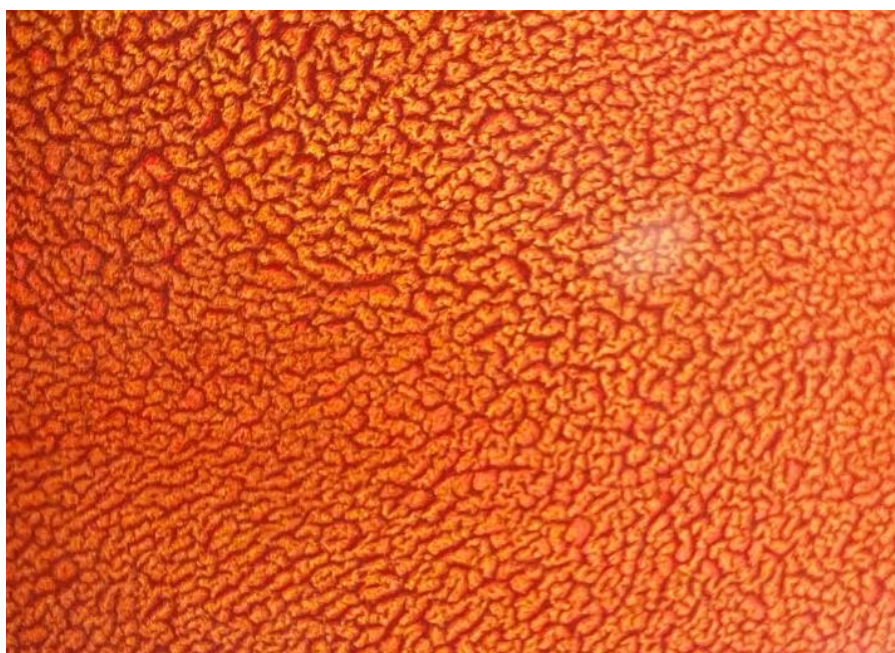
7.5 Příprava testovací vzorku s erytrocyty

K ověření funkčnosti čipů byl použit antikoagulované erytrocyty (červené krvinky) v citrátovém pufru. Vzorek byl připraven, separován od ostatních krevních komponentů

(bílých krvinek a krevních destiček) a testován na FN Brno. Bílé krvinky a destičky by mohly kanálky ucpat, a mohlo by docházet k nežádoucím interakcím což by bylo v rámci testování vysoce nežádoucí. V 1 μ l krve se nachází u muže zhruba od 4,6 až 6 milionů červených krvinek, zatímco u žen to bývá obvykle mezi 4,2 až do 5 milionů[38]. Vzorek byl ovšem při výrobě ve FN Brno již upraven na koncentraci zhruba 1 milion. Přesto, kvůli takto vysoké koncentraci musel být vzorek ještě rozředěn, aby nedošlo k ucpání čepele ani kanálků. K ředění se použil fosfátový pufr (PBS). Ukázalo se, že nejvhodnějším poměrem ředění vzorku a pufru bylo 1:10, při této koncentraci nedocházelo k ucpávání kanálků, a zároveň to poskytovalo dostatečnou koncentraci červených krvinek. Vzniklý roztok musel být následně zamíchán pomocí třepačky. Roztok byl připraven odborně vyškolenou osobou pro práci s biologickými vzorky.

Pokud se roztok delší dobu nepoužil, červené krvinky měly tendenci usadat na spodu zkumavky a roztok musel být znovu podroben míchání, aby byl roztok co nejvíce homogenní.

Na Obrázku 41, lze vidět nerozředěné červené krvinky v nerozředěném stavu, blízko u sebe. Na Obrázku 42 lze pak pozorovat červené krvinky rozředěné roztokem PBS s poměrem 1:10, kde jsou červené krvinky volněji rozprostřeny



Obrázek 41: Snímek zachycující nezředěné červené krvinky pod mikroskopem se zvětšení 20x.



Obrázek 42: Snímek zachycující červené zředěné červené krvinky a PBS k poměru 1:10 pod mikroskopem se zvětšením 20x.

Všechny vzorky a roztoky pak byly připraveny v mikrozkuvkách typu Eppendorf. Mikrozkuvky byly uschovány v lednici v rozmezí teplot od +1 do +6 °C. Tím bylo zajištěno životnost vzorků po dobu několika dnů. Z mikrozkuvek byl roztok přenesen do stříkačky, která byla umístěna do stříkačkové pumpy, ze které byla připojena k čipu. Tím bylo zajištěno minimum manipulace se vzorkem a zabráněno jeho případné kontaminaci. Jednotlivé mikrozkuvky lze vidět na Obrázku 43, kde zleva roztok naředěný 1:100 a jako poslední roztok 1:10, který byl používán pro testování čipů.



Obrázek 43: Mikrozkušavky typu Eppendorf zleva naředěný roztok 1:100 a naředěný roztok 1:10.

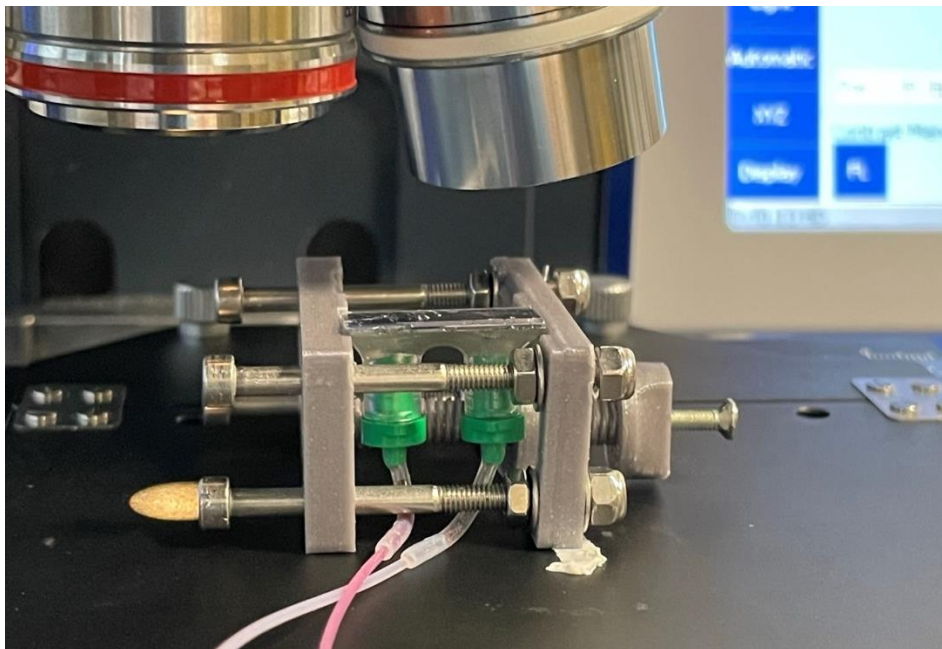
7.6 Testování jednotlivých designů

V posledním kroku experimentální části došlo k testování čipů jednotlivými typy čepelí. Jednotlivé čipy byly připojeny k roztoku a pumpě značky SyringePump (Obrázek 44), která nám definovala průtok roztoku za minutu. Každý design čipu byl pak umístěn pod optický mikroskop, na kterém bylo pozorováno, jak roztok čipy prochází. V testování jsme se zaměřili na průchodnost, zda se krvinky v čípech nezasekávají a jestli dochází k rozřezávání krvinek na čepelích.



Obrázek 44: Pumpa od značky SyringePump.

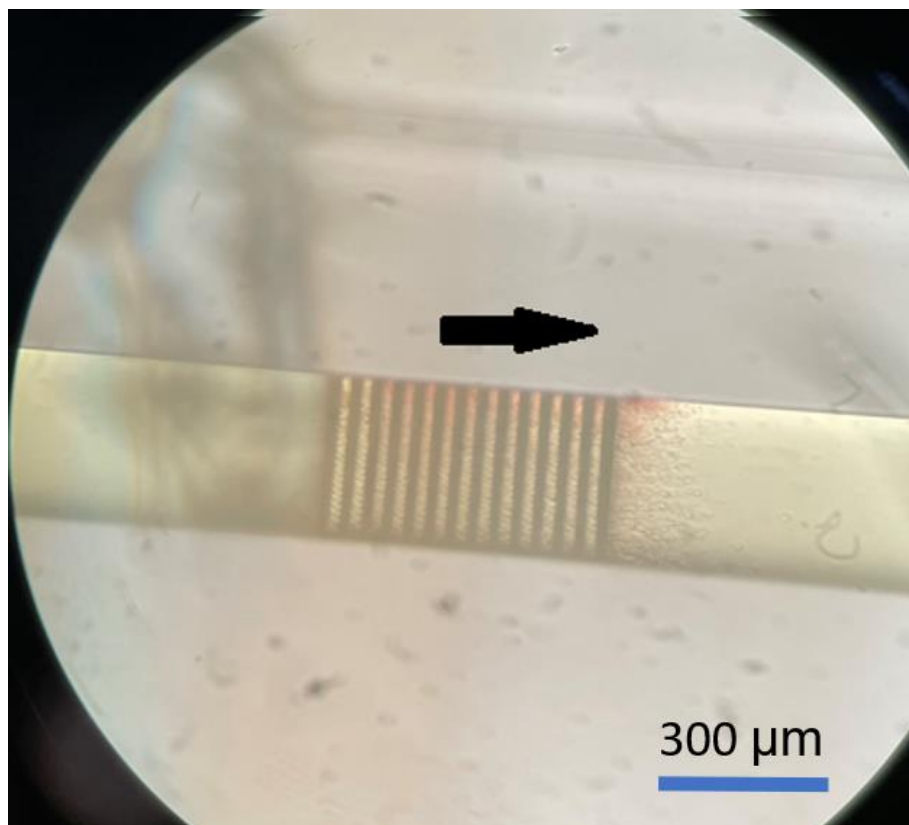
Testovací čip byl umístěn do držáku, který byl vytisknut na 3D tiskárně za účelem testování čipů. V něm byl čip uchycen a zafixován pomocí aretačního šroubu. Tento stojánek s čipem byl umístěn pod optický mikroskop. Na Obrázku 45 je vidět, jak probíhalo měření pod mikroskopem.



Obrázek 45: Čip umístěný v držáku pod mikroskopem připravený na testování.

7.6.1 Testování prvního designu

První design měl nejmenší čepele a také i nejmenší šířku kanálku, což znamenalo i vysoký tlak. Jako průtok byl zvolený rozsah na injekční pumpě 50 nl/min. I při tomto malém průtoku, lze vidět na Obrázku 46, že červené krvinky se rozřezávají a mezi čepelemi či za nimi, zůstávají jen prázdné obaly, které lze vidět jako červené skvrnky. Šipka pak zobrazuje směr průtoku roztoku. Bylo zde možné pozorovat, že červené krvinky pronikají dále, avšak v relativně malém měřítku.

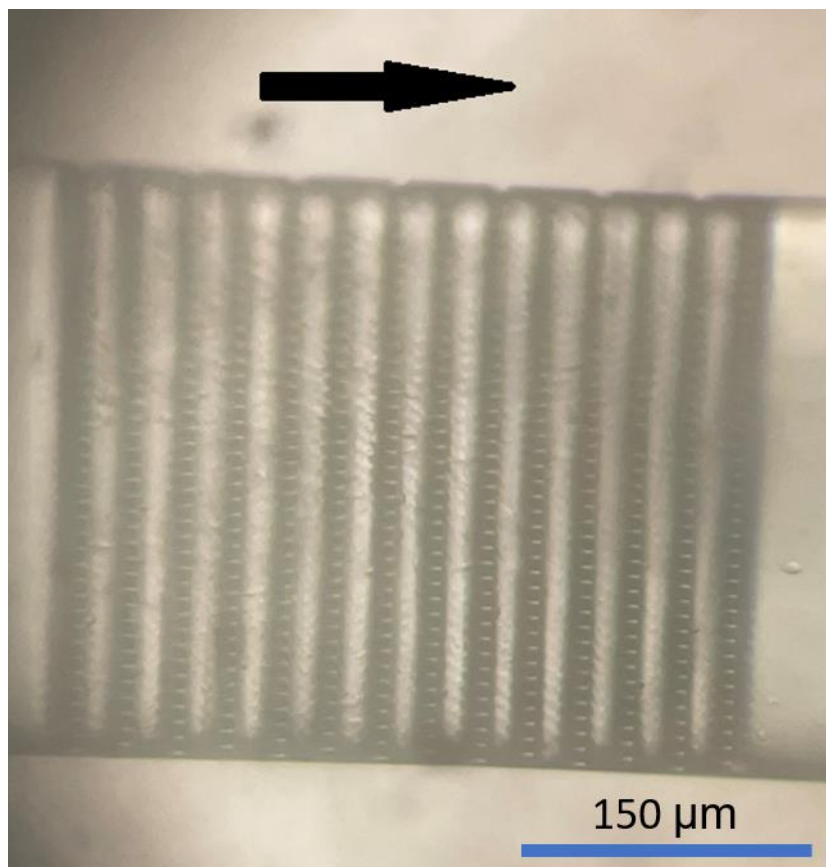


Obrázek 46: První motiv při průtoku roztoku 50 nl/min.

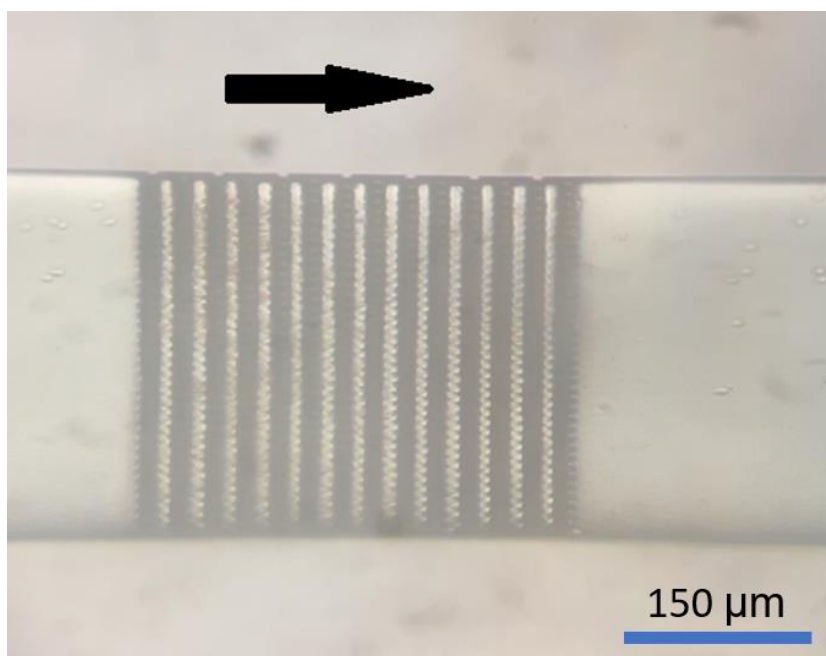
7.6.2 Testování druhého designu

Druhý design měl sice stejně malé čepele jak ten předchozí, ale šířka kanálku byla 300 μm . Na základě širšího kanálku tedy došlo k poklesu tlaku a tím i k pomalejšímu pohybu červených krvinek skrze systém. Na Obrázku 47 lze vidět čip, kterým protékal roztok rychlosti 50 nl/min. Bohužel nižší rychlost celkového pohybu krvinek zapříčinila, že nedocházelo k jejich rozřiznutí v takové míře, jako by bylo potřeba (směr průtoku je zde vyznačen šipkou). To jsme mohli pozorovat skrze nízkou koncentrací hemoglobinu, který se po rozřiznutí krvinky uvolňuje.

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům z prvního testu, jsem se rozhodl zvýšit tlak, a to na 100 nl/min. Tento čip s vyšším průtokem je pak znázorněn na Obrázku 48. Při tomto průtoku, a tedy i vyšším tlaku, již docházelo k většímu počtu rozřezávání krvinek. To je zřetelné z většího zbarvení čipu hemoglobinem.



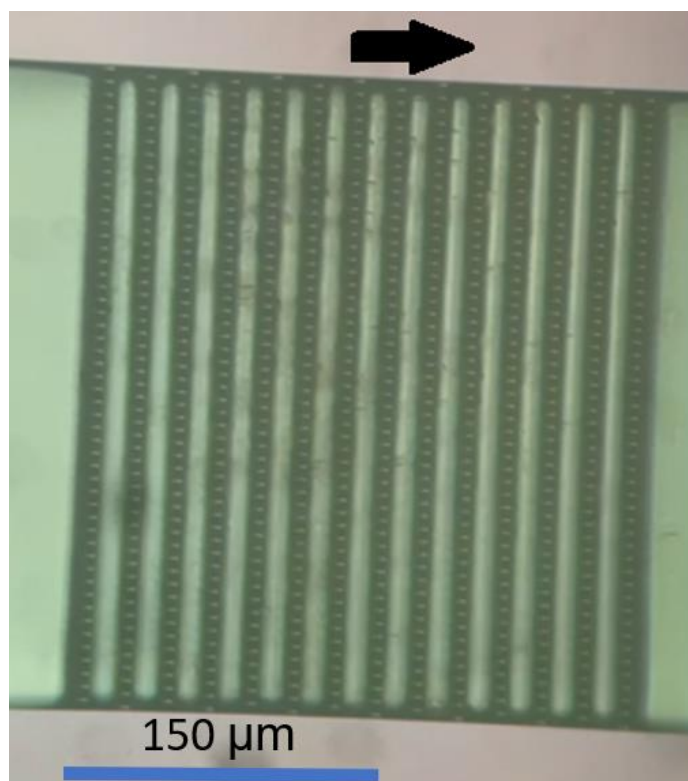
Obrázek 47: Druhý motiv při průtoku roztokem 50nl/min.



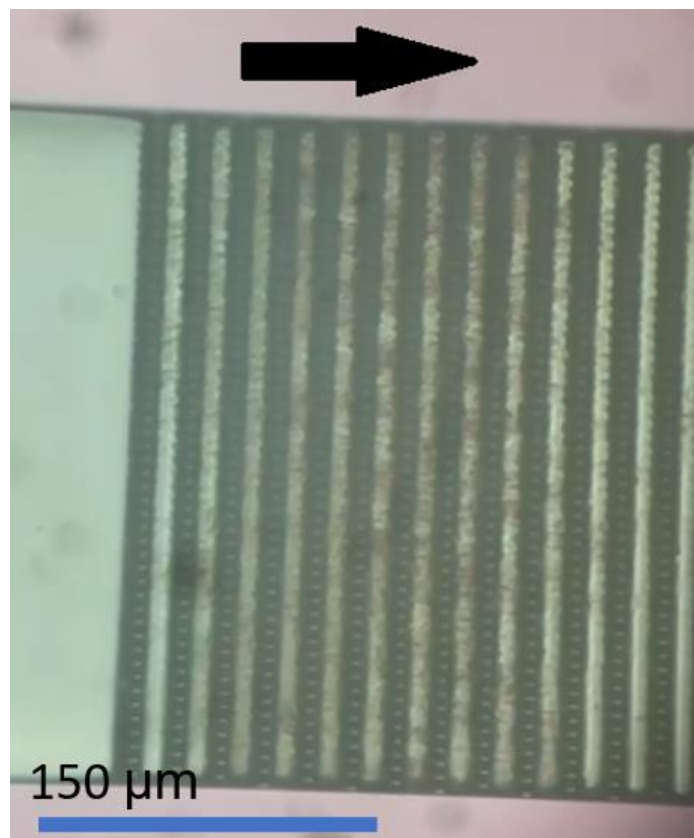
Obrázek 48: Druhý motiv při průtoku roztoku 100nl/min.

7.6.3 Testování třetího designu

U třetího designu také byli ještě čepele nejmenších velikostí a průměr kanálku byl navrhnut na 400 μm . Jak jsme očekávali po testování předchozího designu, tak kvůli většímu průměru kanálku došlo ještě k většímu poklesu tlaku. Zároveň s velikostí průtoku o rychlosti 50 nl/min se krvinky téměř nerozřezávají (Obrázek 49). Zvýšení průtoku na 100 nl/min se také neukázalo být o moc efektivnější, a tak se přešlo na průtok o rychlosti 200 nl/min. Takto vysoký průtok se už ukázal jako efektivní, díky barvení hemoglobinu. Můžeme jej pozorovat na Obrázku 50.



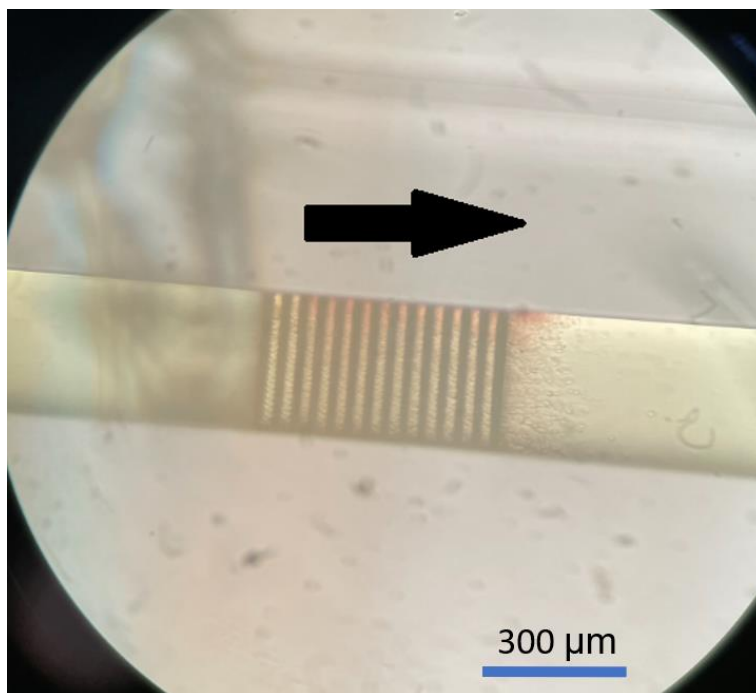
Obrázek 49: Testování třetího motivu při průtoku roztoku 100nl/min.



Obrázek 50: Testování třetího motivu při průtoku roztokem 200nl/min.

7.6.4 Testování čtvrtého designu

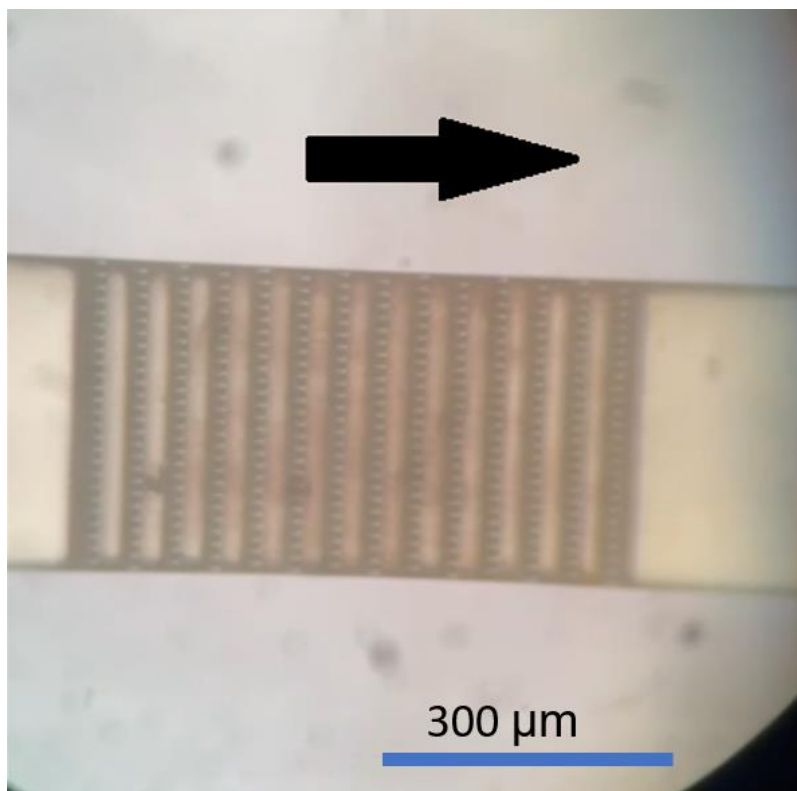
Tento design měl největší velikost čepelí a šířku kanálku 300 μm . Díky poznatkům z předchozího testování byl zvolen větší průtok a to 200 nl/min. Tento průtok se ukázal být optimální, jelikož mnoho červených krvinek bylo rozřezáno, jak je možné vidět na Obrázku 51, kde směr průtoku je naznačen šipkou. Zde však byl podobný problém jako v minulých designech kde, když jsme značně zvýšili průtok, tak se mnoho červených krvinek dostávalo na druhou stranu bez rozřezání. Při tomto designu byl tento jev minimalizován oproti předchozím designům, a to z důvodu, že byly čepele větší, a proto byla větší šance, že krvinky narazí do čepelí a rozřezou se.



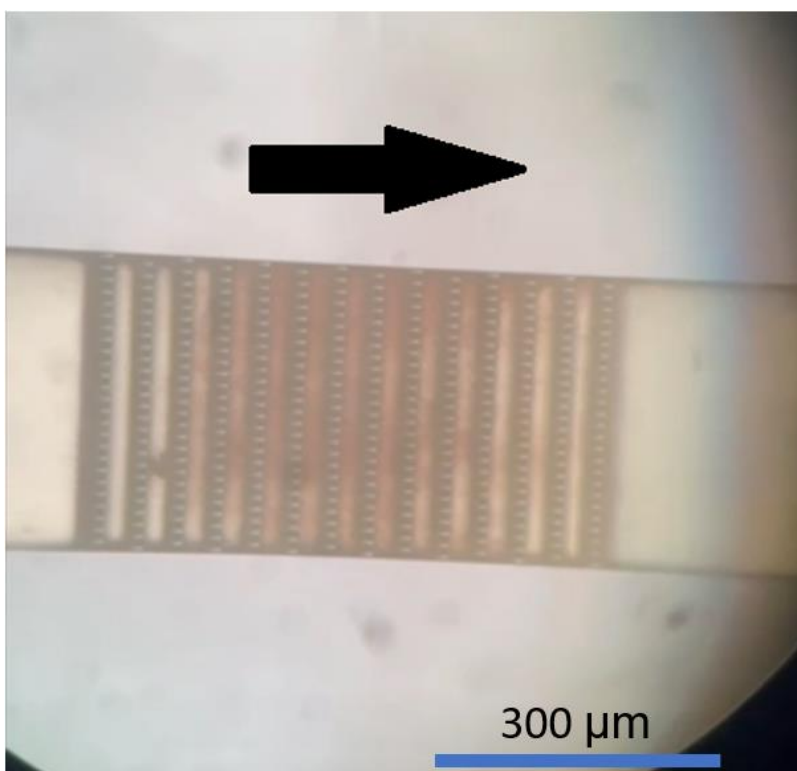
Obrázek 51: Testování čtvrtého motivu při průtoku roztoku 200nl/min.

7.6.5 Testování pátého designu

Pátý design měl velikost čepelí střední z třech návrhů a šířku kanálků zase 300 μm . Díky získaným poznatkům zde bylo přistoupeno k rychlosti průtoku 200 nl/ min. Průtok roztoku kanálkem je možné vidět na Obrázku 52 zde docházelo k efektivnímu rozřezání krvinek, avšak zase zde nastával stejný problém, a to že spoustu červených krvinek prošlo bez rozřezání. Na tomto designu byl pak vyzkoušen průtok 500 nl/min. Ten lze vidět na Obrázku 53. Při tomto průtoku se velice rychle zabarvili čepele do červena což znamená uvolnění hemoglobinu.

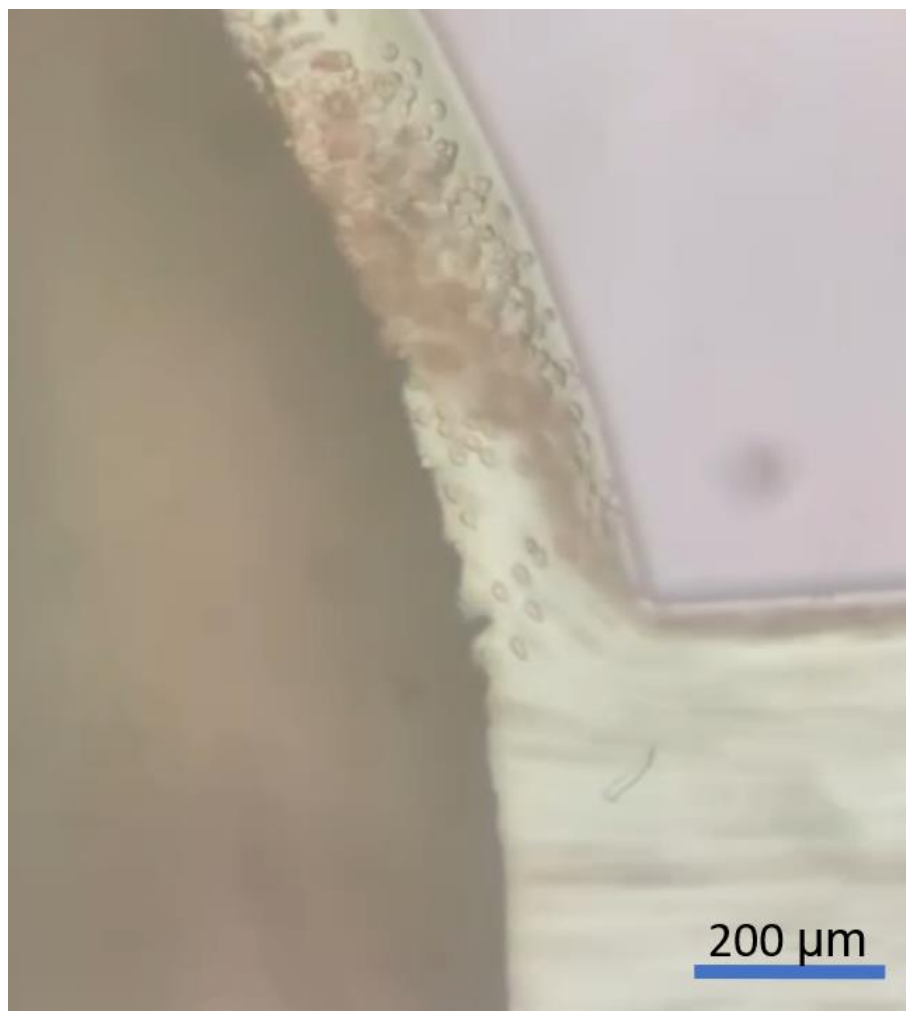


Obrázek 52: Testování pátého motivu při průtoku roztoku 200 nl/min.



Obrázek 53: Testování pátého motivu při průtoku roztoku 500 nl/min.

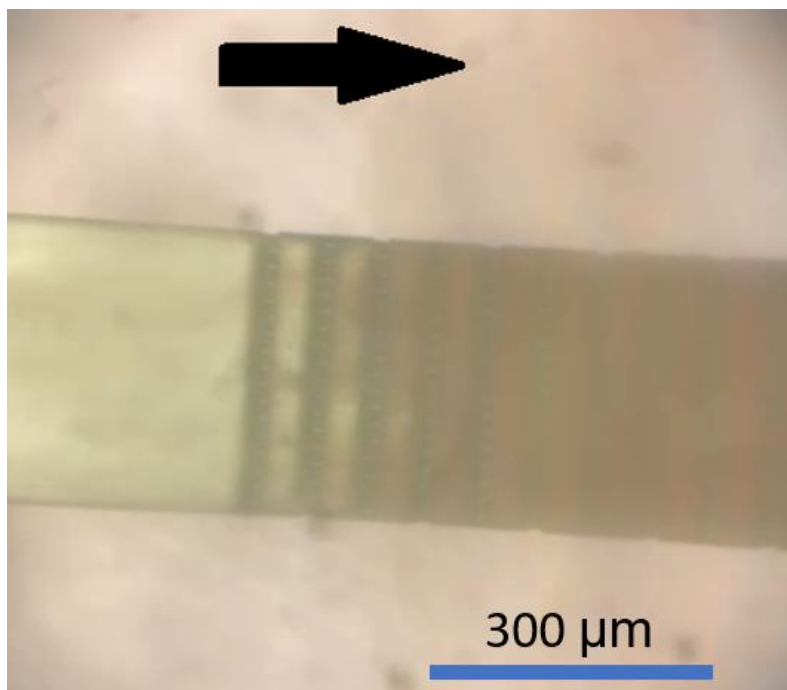
Na Obrázku 54 je možné pozorovat, že při takto vysokém průtoku (500 nl/min) většina červených krvinek nebyla rozřezaná a odtékala druhým koncem z čipu pryč. Červené šmouhy, které je tam možné na obrázku pozorovat, byly velmi rychlé procházející červené krvinky.



Obrázek 54: Detailní záběr konce kanálku při průtoku roztoku 500nl/min.

7.6.6 Testování šestého designu

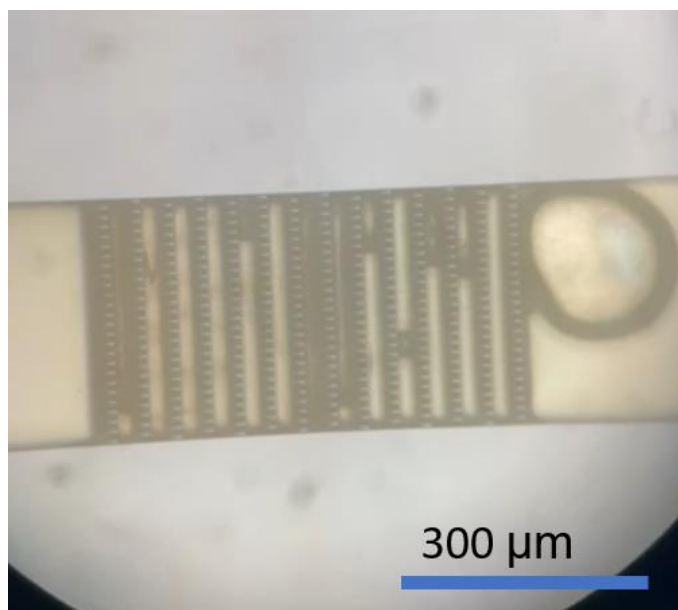
U šestého designu byly čepele střední velikosti z třech navržených designů. Oproti pátému designu se zde rozšířily mezery mezi sloupci čepelí. To bylo navrženo proto, aby se kanálky neucpávaly. Ze zkušeností z předchozích designů však bylo patrné, že tento jev nenastal. Krvinky skoro tedy nerozřezával, proto zde byl vyzkoušen největší tlak 600 nl/min. Jak je vidět na Obrázku 55, kanálek rozřízl značné množství červených krvinek, avšak při tomto průtoku, více červených krvinek odtékalo. Takže tento design se ukázal jako značně nevhodný.



Obrázek: 55: Testování čipu s průtokem roztoku 600nl/min.

7.7 Čištění čipu

Jako poslední experiment bylo vyzkoušeno, jestli lze čip vyčistit, a tedy jej znovu využít. Proto byla stříčka se vzorkem nahrazena isopropyl alkoholem a připojená proti proudění roztoku. Průtok pak byl nastaven na 1 μ l/min. Čip při tomto průtoku byl vyčištěn a mohl být znovu použit. Na Obrázku 56 je možné vidět snímek, který byl zachycen při čištění kanálku.



Obrázek 56: Průběh čištění čipu isopropyl alkoholem s průtokem 1 μ l/min.

8. ZÁVĚR

Tato diplomová práce líčí v první části popis a principy mikrofluidiky, materiály využívané k výrobě mikrofluidních zařízení a jejich celkovým využitím. Dále je zde popsána technologie DRIE a v poslední kapitole této teoretické části je popsáno složení krve a její vlastnosti.

Praktická část je věnována konstrukci a testování čipů, popisuje jejich výrobu, pouzdrění, analýze pomocí SEM a nakonec průběh jejich testování na reálném vzorku.

Celkem bylo designováno šest čipů. První tři čipy byly charakteristické velmi malými velikostmi odvěsen čepelí (20 a 3 μm), u kterých se měnily pouze šířky kanálků. U čtvrtého a pátého motivu záleželo na změně velikosti odvěsen čepelí, a to na 30 a 4,5 μm , 40 a 60 μm . U šestého motivu zůstaly rozměry odvěsen čepelí stejné jako u pátého motivu, 30 a 4,5 μm , ale došlo k rozšíření mezer mezi sloupci.

K výrobě jednotlivých čipů bylo využito dvou masek a UV litografie. Na první masce se nacházely funkční kanály a pole čepelí. Na druhé masce byly kontaktovací otvory uvolňující drážku, které procházely skrz čip a obvod čipu. Design byl situován tak, aby se nemusel čip mechanicky řezat. Během leptání v DRIE byl zjištěn, vysoký vliv doby leptání na kvalitu struktury. Příliš krátká doba leptání způsobovala přenos úlomku křemíku na povrch čipu a do jednotlivých kanálků a jejich čepelí.

K zapouzdření čipu se využilo pyrexové sklo, na které byla nadeponována vrstva Parylenu-C. Jednalo se o velmi spolehlivé spojení křemíkového čipu a krycího skla. Dalo by se říct, že tato metoda lze s úspěchem použít místo tradičního a technologicky náročného anodického bondování. Takto vytvořený spoj fungoval, a to jak z hlediska mechanické pevnosti, tak i bezchybné těsnosti.

V průběhu kompletace čipu bylo nutné vyřešit několik technologických problémů, jednak s částicovou kontaminací struktur při separaci jednotlivých čipů. Tento problém byl vyřešen důkladným čištěním a jak se ukázalo neměl patrný vliv na funkci čipu. Další komplikací bylo nutnost využít komerčního způsobu napojení čipu na testovací sestavu v kombinaci s vhodnou hustotou epoxidového lepidla, tak aby nedošlo k nežádoucímu ucpání struktur.

Pro kvalitativní analýzu struktur byla použita SEM analýza. Lze konstatovat, že všechny čipy byly vyrobeny v požadované kvalitě. Analýza odhalila, že na čípech s čepelí o největším rozměru stran, se ukázala jako nejperspektivnější, jelikož tyto čepele byly ostré po celé své délce. Naopak tomu bylo u čepelí s nejmenšími rozměry, kde byla ostrá pouze vrchní část. Tomuto by se dalo předcházet leptáním do menších hloubek, například pouze do 30 μm . Další pozorovatelný jev u těchto malých čepelí bylo podleptání SiO_2 na jejich horní straně. Stejně tak i tomuto jevu by se dalo předejít nižší hloubkou leptání, nebo popřípadě lepším nastavením leptání při DRIE. Eventuálně by také bylo možné SiO_2 odleptat mokrou cestou.

V posledním kroku proběhlo konečné testování čipů, za použití červených krvinek. Roztok s krvinkami naředěný pomocí PBS, měl - nejlepší poměr ředění krvinek s pufrům 1:10. Během testování byl roztok vháněn do jednotlivých motivů v čipu a současně pozorován pod mikroskopem.

U prvního motivu, o průtoku 50nl/min, docházelo k částečnému průřezu krvinek, přesto některé krvinky stále protékaly čipem bez rozřezání.

U druhého a třetího motivu s širším kanálem, nedocházelo při stejném průtoku k lýze krvinek, protože při malém průtoku docházelo i k poklesu tlaku a krvinky neměly dostatečnou rychlost pro lýzu. Zvýšení průtoku na 100 nl/min a poté až na 200 nl/min, pak vedlo k rozřezávání krvinek, ale mnoho z nich také volně pronikalo systémem čepelí. Na základě tohoto pozorování vyplynulo, že nejvýhodnější je kanál užší (s šířkou 200 μm), pro zajištění dostatečné rychlosti průtoku.

U čtvrtého a pátého motivu se měnily velikosti čepelí. U těchto motivů byla stanovena šířka kanálku na 300 μm , a byl nastaven větší průtok roztoku. Zde opět docházelo k tomu, že část krvinek ve velkém průtoku procházela čipem bez rozřezání.

Šestý motiv měl čepele střední šířky, ale byly zde rozšířeny mezery mezi čepelemi. Tento rozšířený motiv vznikl kvůli domněnce, že by mohlo docházet k celkovému ucpávání systému. Kvůli větším mezerám ale procházelo čipem značné množství nerozřezaných krvinek, a tak se tento motiv jevil nevhodný pro praktické využití.

Na základě testování těchto šesti motivů bylo zjištěno, že největší vliv na počet rozřezaných krvinek má tlak v kanálku. Vyšší tlak lze jednoduše docílit zvýšením průtokem roztoku, což ale může způsobovat průchod některých krvinek skrz čip i bez jejich rozřezání. Praktičtější by tedy bylo snížit hloubku kanálku, tím pádem by to napomohlo i zachovat pouze ostřejší části čepelí a zároveň tím zajistit i lepší pozorovací podmínky při práci s optickým mikroskopem. Dále se ukázalo, že v tomto případě nejlépe pracují čepele o střední velikosti (jako u motivu č. 5), které by bylo vhodnější umístit blíže k sobě.

Navazujícím pokračováním této práce by dále mohla být implementace elektrochemického senzoru do čipu, který bude citlivý glutathion detekovat a vznikl by tak efektivní čip POC pro stanovení koncentrace glutathionu v krvi.

LITERATURA

- [1] CONVERY, Neil a Nikolaj GADEGAARD. 30 years of microfluidics: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool held in Stockholm, 10-16 june, 1998. *Micro and Nano Engineering* [online]. 2019, 1999, 2, 76-91 [cit. 2021-11-20]. ISSN 25900072. Dostupné z: doi:10.1016/j.mne.2019.01.003
- [2] NGE, Pamela N., Chad I. ROGERS a Adam T. WOOLLEY. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2013, 113(4), 2550-2583 [cit. 2021-12-20]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr300337x
- [3] ILIESCU, Ciprian, Hayden TAYLOR, Marioara AVRAM, Jianmin MIAO a Sami FRANSSILA. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. In: *Biomicrofluidics* [online]. 2012 [cit. 2021-11-20]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.3689939
- [4] Materials for microfluidic device fabrication: a review. *Elveflow* [online]. [cit. 2021-11-20]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/materials-for-microfluidic-chips-fabrication-a-review-2017/>
- [5] SOMEI, Koutaro, Shohei KANEDA, Teruo FUJII a Satoshi MURATA. A Microfluidic Device for DNA Tile Self-assembly. In: *DNA Computing* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, 2006, s. 325-335 [cit. 2021-11-20]. Lecture Notes in Computer Science. ISBN 978-3-540-34161-1. Dostupné z: doi:10.1007/11753681_25
- [6] HOW TO CHOOSE A MICROFLUIDIC CHIP? *Fluigent* [online]. [cit. 2021-11-20]. Dostupné z: <https://www.fluigent.com/resources/microfluidic-expertise/what-is-microfluidic/how-to-choose-a-microfluidic-chip/>
- [7] Common materials for fabrication of microfluidic devices. *Ufluidix* [online]. [cit. 2021-11-21]. Dostupné z: <https://www.ufluidix.com/microfluidic-technical-knowledgebase/materials-for-microfabrication/>
- [8] GRIMES, Anthony, David N. BRESLAUER, Maureen LONG, Jonathan PEGAN, Luke P. LEE a Michelle KHINE. Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns. *Lab Chip* [online]. 2008, 8(1), 170-172 [cit. 2021-11-21]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/B711622E
- [9] PENTECOST, Amber M. a R. Scott MARTIN. Fabrication and characterization of all-polystyrene microfluidic devices with integrated electrodes and tubing. *Analytical Methods* [online]. 2015, 7(7), 2968-2976 [cit. 2021-11-21]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/C5AY00197H
- [10] WU, Wen-I, Kyla N. SASK, John L. BRASH a P. Ravi SELVAGANAPATHY. Polyurethane-based microfluidic devices for blood contacting applications. *Lab on a Chip* [online]. 2012, 12(5) [cit. 2021-11-21]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/c2lc21075d

- [11] Paper microfluidic devices : A review 2017. *Elveflow* [online]. [cit. 2021-11-22]. Dostupné z: https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/paper-microfluidic-devices-a-review-2017/#_ftn2
- [12] PETERS, Kelley L., Inge CORBIN, Lindsay M. KAUFMAN, Kyle ZREIBE, Lucas BLANES a Bruce R. MCCORD. Simultaneous colorimetric detection of improvised explosive compounds using microfluidic paper-based analytical devices (μPADs). *Analytical Methods* [online]. 2015, 7(1), 63-70 [cit. 2021-11-22]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/C4AY01677G
- [13] ABBAS, Yawar, Junichi MIWA, Roland ZENGERLE a Felix VON STETTEN. Active Continuous-Flow Micromixer Using an External Braille Pin Actuator Array. *Micromachines* [online]. 2013, 4(1), 80-89 [cit. 2021-11-23]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi4010080
- [14] GOY, Carla B., Roberto E. CHAILE a Rossana E. MADRID. Microfluidics and hydrogel: A powerful combination. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2019, 145 [cit. 2021-11-23]. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104314
- [15] Advantages of Microfluidic Systems. *Kelly Pneumatics* [online]. 2020, 19.7.2020 [cit. 2021-12-07]. Dostupné z: <https://kellypneumatics.com/advantages-of-microfluidic-systems/>
- [16] Introduction to lab-on-a-chip 2020: review, history and future. *Elveflow* [online]. [cit. 2021-12-07]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/introduction-to-lab-on-a-chip-review-history-and-future/>
- [17] SMITH, Suzanne, Klariska MOODLEY, Ureshnie GOVENDER, et al. Paper-based smart microfluidics for education and low-cost diagnostics. *South African Journal of Science* [online]. 2015, 111(Number 11/12) [cit. 2021-12-07]. ISSN 0038-2353. Dostupné z: doi:10.17159/sajs.2015/20140358
- [18] CHENG, Xuanhong, Daniel IRIMIA, Meredith DIXON, et al. A microfluidic device for practical label-free CD4 T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab Chip* [online]. 2007, 7(2), 170-178 [cit. 2021-12-07]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/B612966H
- [19] SMITH, Suzanne, Klariska MOODLEY, Ureshnie GOVENDER, et al. Paper-based smart microfluidics for education and low-cost diagnostics. *South African Journal of Science* [online]. 2015, 111(Number 11/12) [cit. 2021-12-07]. ISSN 0038-2353. Dostupné z: doi:10.17159/sajs.2015/20140358
- [20] LAERMER, Franz, Sami FRANSSILA, Lauri SAINIEMI a Kai KOLARI. Deep reactive ion etching. *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies* [online]. Elsevier, 2020, 2020, , 417-446 [cit. 2021-12-08]. ISBN 9780128177860. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817786-0.00016-5

- [21] ROOZEBOOM, F., F. VAN DEN BRUELE, Y. CREYGHTON, P. POODT a W. M. M. KESSELS. A Spatial ALD Oxide Passivation Module in an All-Spatial Etch-Passivation Cluster Concept. *ECS Transactions* [online]. 2015, **69**(7), 243-258 [cit. 2021-12-11]. ISSN 1938-6737. Dostupné z: doi:10.1149/06907.0243ecst
- [22] Introduction to Silicon DRIE Processing. *SPTS* [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://www.spts.com/resources/tech-insights/intro-to-silicon-DRIE-etching>
- [23] VOLLAND, B., F. SHI, P. HUDEK, H. HEERLEIN a Ivo. W. RANGELOW. *Dry etching with gas chopping without rippled sidewalls* [online]. 1999, **17**(6) [cit. 2021-12-12]. ISSN 0734211X. Dostupné z: doi:10.1116/1.591061
- [24] ABDOLVAND, Reza a Farrokh AYAZI. An advanced reactive ion etching process for very high aspect-ratio sub-micron wide trenches in silicon. *Sensors and Actuators A: Physical* [online]. 2008, **144**(1), 109-116 [cit. 2021-12-12]. ISSN 09244247. Dostupné z: doi:10.1016/j.sna.2007.12.026
- [25] Human Organs-on-Chips. *Wyss Institute* [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>
- [26] Organs on chip review. *Elveflow* [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/organs-on-chip-3d-cell-culture/organs-chip-review/>
- [27] CHANG, Bingdong, Pele LEUSSINK, Flemming JENSEN, Jörg HÜBNER a Henri JANSEN. DREM: Infinite etch selectivity and optimized scallop size distribution with conventional photoresists in an adapted multiplexed Bosch DRIE process. *Microelectronic Engineering* [online]. 2018, **191**, 77-83 [cit. 2021-12-12]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2018.01.034
- [28] WHAT IS THE HISTORY OF MICROFLUIDICS? *Fluigent* [online]. [cit. 2021-12-14]. Dostupné z: <https://www.fluigent.com/resources/microfluidic-expertise/what-is-microfluidic/history-of-microfluidics/>
- [29] MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. vyd.* Praha: Grada, 2012. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3918-2.
- [30] TONER, Mehmet a Daniel IRIMIA. Blood-on-a-Chip. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2005, **7**(1), 77-103 [cit. 2021-12-19]. ISSN 1523-9829. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bioeng.7.011205.135108
- [31] Glutathione reductase in the red blood cells. *National Library of Medicine* [online]. 1978 [cit. 2021-12-20]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/623427/>
- [32] Thrombocytopenia (low platelet count). *Mayo Clinic* [online]. [cit. 2021-12-20]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/thrombocytopenia/symptoms-causes/syc-20378293>
- [33] SLOŽENÍ KRVE. *Krajská nemocnice Tomáše Bati* [online]. [cit. 2021-12-20]. Dostupné z: <https://www.kntb.cz/slozeni-krve>

- [34] Microfluidic cell separation and sorting: a short review: Introduction to microfluidic cell sorting and separation. *Elveflow* [online]. [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/microfluidics-for-cell-biology/label-free-microfluidic-cell-separation-and-sorting-techniques-a-review/>
- [35] TONER, Mehmet a Daniel IRIMIA. Blood-on-a-Chip. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2005, **7**(1), 77-103 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1523-9829. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bioeng.7.011205.135108
- [36] WINTERS, H. F. a J. W. COBURN. The etching of silicon with XeF₂ vapor. *Applied Physics Letters* [online]. 1979, **34**(1), 70-73 [cit. 2021-12-28]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.90562
- [37] LIN, Yuanwei, Renzhi YUAN, Xinshuai ZHANG, et al. Deep Dry Etching of Silicon with Scallop Size Uniformly Larger than 300 nm. *Silicon* [online]. 2019, **11**(2), 651-658 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1876-990X. Dostupné z: doi:10.1007/s12633-018-9948-3
- [38] Co je počet červených krvinek?. *Netinbag* [online]. [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.netinbag.com/cs/health/what-is-a-red-blood-cell-count.html>