МИКРОНАСОСЫ ДЛЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ: ОСОБЕННОСТИ ВЫБОРА МАТЕРИАЛОВ И ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ

В.А. Петров, Т.Н. Герасименко, О.В. Киндеева, А.И. Хаустов

В статье представлены результаты анализа требований, предъявляемых к микрофлюидным устройствам со встроенным микронасосом, которые используются для культивирования клеток. Выбраны материалы, удовлетворяющие следующим требованиям: биосовместимость, эластичность, прочность, возможность стерилизации, газопроницаемость, оптическая прозрачность, необходимая для мониторинга процессов, протекающих в элементах микронасоса и клеточных ячейках. Проведен анализ по выбору соотношения: смола/отвердитель, температурных и временных режимов отверждения полимерного слоя, и по достижению необходимой адгезии между элементами конструкции, что позволило достичь герметичности всего устройства. Разработан технологический процесс изготовления микронасоса в составе микрофлюидного устройства. Для каждого из трех основных этапов технологического процесса подобраны оптимальные параметры, которые позволяют серийно изготовлять качественные изделия.

Ключевые слова: микронасос, микрофлюидное устройство, полидиметилсилоксан, мягкая литография.

MICROPUMPS FOR THE MICROFLUIDIC DEVICES: CHOICE OF MATERIALS AND MANUFACTURING TECHNOLOGY

V.A. Petrov, T.N. Gerasimenko, O.V. Kindeeva, A.I. Khaustov

The article presents the results of the requirements analysis for micropump integrated into the microfluidic devices, which are used for cells culture. The materials that were biocompatible, elastic, strength, resistant to autoclaving, gas permeable, optical transparent have been chosen. Multiple experiments were conducted in order of chose the ratio of base/hardener, temperature and time modes of curing the polymer layer and enhancing the adhesion between structural elements. The technological process of manufacturing micropump integrated into the microfluidic device has been developed on the base of experiments. There were chosen optimum parameters for each of the three main stages of the technological process, which enabled to produce a quality product.

Keywords: micropump, microfluidic device, polydimethylsiloxane, soft lithography.

Введение

В последние годы широко внедряются микрофлюидные устройства различного назначения. Это связано со стремительным развитием технологий, которые позволяют изготавливать высококачественные миниатюрные изделия для медицинских, химических, биологических и других наукоемких применений. Одним из возможных приложений для таких устройств является тестирование новых лекарственных препаратов на токсичность для клеток человека. Перед тем как новое лекарственное средство выйдет на рынок, оно должно пройти тщательный контроль: клинические исследования с участием людей и предшествующие им тестирования на животных. Проведение тестов с участием животных занимают много времени и не отвечают этическим нормам. К тому же результаты токсикологических исследований на животных не всегда достоверно предсказывают поведение препарата в человеческом организме. Альтернативой тестам на животных является создание трехмерной клеточной модели органов

44

человека, которая получила название «орган-начипе» [1–3]. Такое устройство представляет собой ячейки, в которых располагаются клетки различных органов человека. Ячейки соединены между собой микроканалами, по которым циркулирует культуральная среда с веществами, необходимыми для нормальной жизнедеятельности клеток. Поток среды нагнетается с помощью микронасоса, позволяющего подавать жидкость с точностью до десятых долей микролитра в минуту.

Микромасштабы рассматриваемых устройств позволяют максимально приблизить условия, окружающие клеточные модели, к условиям в живом организме. Клетки в организме находятся в тесном взаимодействии друг с другом, а между ними циркулирует межклеточная жидкость, играющая очень важную роль в транспорте питательных веществ и морфогенезе тканей. Проточные системы культивирования клеток не позволяют питательной среде накопить метаболиты, необходимые для анализа состояния клеток и токсикологических исследований. Поэтому особый интерес представляют микрофлюидные устройства замкнутого типа с возможностью отбора среды для биохимических анализов. Для нагнетания жидкости в таких устройствах применяется микронасос с пневматическим приводом, интегрированным в саму конструкцию микрофлюидного устройства.

Так как основной целью микрофлюидного устройства в микробиологии является создание и поддержание условий нормальной жизнедеятельности клеток, то главным требованием для всех используемых в конструкции материалов является биосовместимость. Биосовместимые материалы не оказывают какого-либо вредного воздействия на культивируемые клетки, не вступают с ними в реакцию, обеспечивают возможность создания необходимых условий для жизнедеятельности.

Перед использованием микронасос и все элементы микрофлюидного устройства обязательно проходят стерилизацию. Конструкция микронасоса не должна подвергаться разрушению в процессе стерилизации, материалы не должны вступать в реакцию со стерилизующими веществами, недопустимо изменение физических и механических свойств материалов, из которых изготовлены элементы и узлы насоса.

Материал, в котором находятся клеточные модели, должен обладать возможностью газообмена. Необходимо своевременно отводить продукты жизнедеятельности и подводить к клеткам необходимые вещества.

Важно иметь возможность проводить мониторинг состояния исследуемых клеточных культур в режиме реального времени. Самым удобным решением является использование оптически прозрачных материалов, которые позволяют проводить диагностику с помощью оптических методов, например флуоресцентной микроскопии.

Существует множество различных методов изготовления подобных микрофлюидных устройств. Широко известна и подробно описана в литературе технология изготовления микрофлюидных устройств методом мягкой литографии [4]. При использовании этого метода на чистую кремниевую пластину наносят несколько слоев негативного фоторезиста SU-8, а затем прогревают, чтобы удалить избыток фоторезиста. Затем его облучают УФ-излучением через кварцевый фотошаблон, на котором конструкция устройства напечатана лазером. После этого изготовленная пластина вымачивается в растворе проявителя. Подготовленную дегазированную смесь полимера полидиметилсилоксана (ПДМС) заливают в форму с изготовленной пластиной и отверждают в сушильном шкафу. Полученная структура микроканалов снимается с пластины и готова к использованию.

Похожий способ изготовления микрофлюидных устройств из ПДМС описан в работе [5]. Основное отличие этого способа от других заключается в том, что профиль каналов формируется на двух слоях ПДМС, которые впоследствии склеиваются между собой. Для размягчения ПДМС перед склеиванием авторы метода используют изопропиловый спирт. Описанный метод позволяет изготавливать качественные структуры микроканалов в толще полимера с высокой точностью. Однако материалы и оборудование, необходимые для реализации такого производства, отличаются высокой ценой и сложностью эксплуатации.

Известен метод изготовления микроканалов из ПДМС прямым экспонированием с использованием ультракороткой импульсной лазерной техники [6]. Сначала подготавливается смесь ПДМС и помещается в вакуумную камеру для удаления пузырьков. Затем заготовка проходит отверждение в печи. Далее в ПДМС с помощью импульсного лазера изготавливается сеть микроканалов на глубине 3,5 мм. Параметры лазера: 2 импульса/мкм с энергией 1 мкДж, длина волны 1552 нм. Недостатками такой технологии яв-





ляется низкое качество получаемой структуры микроканала, невозможность осуществлять контроль за шероховатостью поверхности.

Существует еще один способ изготовления микрофлюидных устройств для биологических исследований [7]. Авторы данного метода отдельно изготавливают слои полидиметилсилоксана разной толщины. В каждом слое формируют отверстия, каналы и другие элементы. После подготовки элементы последовательно склеиваются между собой методом озонирования. В зависимости от конфигурации между слоями вклеиваются мембраны из поликарбоната или полидиметилсилоксана. В результате образуется проточная ячейка, предназначенная для культивирования. Полученное таким



Рис. 2. Послойная конструкция микрофлюидного устройства: 1 – эластичный слой; 2 – прозрачный слой; 3 – основа; 4 – пробка клеточной ячейки; 5 – пробка технологического отверстия; 6 – фиттинг микронасоса

образом соединение слоев ПДМС ненадежно, отсюда возникает необходимость дополнительной фиксации изделия винтами.

Учитывая жесткие требования к конструкции микрофлюидного устройства, сложность реализации известных технологий и низкое качество готовых изделий, целью настоящей работы является разработка технологии для мелкосерийного производства микронасосов в составе микрофлюидного устройства, удовлетворяющего требованиям для приборов медико-биологического назначения.

Конструкция микрофлюидного устройства

Рассматриваемое в данной работе микрофлюидное устройство (МФУ) предназначено для токсикологических и других медико-биологических исследований и может состоять из одного или нескольких циркуляционных контуров. На рис. 1, в качестве примера, показано МФУ, состоящее из четырех независимых контуров. В конструкцию каждого контура интегрирован микронасос. В зависимости от назначения в контуре может формироваться демпфирующий элемент, который является гидроаккумулятором и сглаживает резкие пульсации давления и расхода питательной жидкости от микронасоса. В конструкции предусмотрено технологическое отверстие, необходимое для заполнения контура. Микроканал имеет прямоугольное сечение высотой 100 мкм и шириной 400 мкм.

Устройство формируется из трех слоев материалов, отвечающих необходимым требованиям (рис. 2): эластичного инертного материала, спо-

46

собного выдерживать многократные знакопеременные нагрузки; основы, формирующей все микрофлюидное устройство, в котором выполняются отверстия под клеточные ячейки с пробками; технологические отверстия с пробками; фитинги микронасоса; прозрачного предметного стекла, через которое проводится визуализация процессов в каналах МФУ. Герметичность МФУ обеспечивается клеевым соединением трех перечисленных слоев.

Выбор материала эластичного слоя

Самым широко используемым материалом в микрофлюидике является полидиметилсилоксан (ПДМС) [8]. ПДМС - это полимер, получаемый отверждением смеси смолы и отвердителя в определенной пропорции. Производители ПДМС рекомендуют подготавливать состав в соотношении смола/отвердитель 5:1, 10:1 и 20:1 по массе. При изготовлении изделий для микробиологии чаще всего используют соотношение 10:1. Именно при такой пропорции все молекулы отвердителя участвуют в сшивке готового полимера и формируют пористую структуру материала. Готовый полимер обладает множеством уникальных свойств, которые могут отличаться в зависимости от используемого соотношения и технологии изготовления изделия.

ПДМС отличается высокой податливостью, что позволяет использовать его для изготовления подвижных частей микронасосов. Он подходит для изготовления пористых мембран, на которые можно высеивать монослой клеток и моделировать перистальтические движения [9, 10]. Однако он имеет нелинейную диаграмму деформирования [11] и вязкости [12], что усложняет точное определение механических параметров материала и требует использования сложных математических моделей для описания разрабатываемых изделий.

ПДМС – материал, инертный к биологическим тканям. Он не вступает в реакции с клеточными культурами и не оказывает токсического действия. Это делает его идеальным материалом для использования в медицинских и биологических приборах. В некоторых статьях рассматриваются способы модификации поверхности ПДМС, для того чтобы сделать его более биосовместимым и создать подложку для выращивания клеток непосредственно на полимере [13].

Очень полезным свойством ПДМС для культивирования клеток в замкнутых условиях является его газопроницаемость – необходимый параметр для выживаемости клеток в искусственных условиях. Гибкость связи Si-O обеспечивает большие «отверстия» в объеме ПДМС, через которые осуществляется диффузия газов. Благодаря этому кислород может свободно проникать через поры полимера и подводиться к клеточным ячейкам. Коэффициент диффузии кислорода в ПДМС составляет $D_{\Pi ДМС}^{O2} = 4,1 \cdot 10^{-5}$ см²/с, и этого достаточно, чтобы культивировать клетки в замкнутом биореакторе в течение длительного времени [14].

Обязательным требованием для всего оборудования, контактирующего с клетками, является возможность стерилизации. ПДМС поддается стерилизации различными методами:

 вымачиванием в 70 % этаноле в течение 30 мин с последующей сушкой при комнатной температуре;

2) экспонированием поверхности образца под ультрафиолетовым излучением с длиной волны 254 нм и плотностью потока 100 мкВт/см² в течение 30 мин в ламинарном шкафу;

3) автоклавированием при температуре 121 °C в течение 20 мин.

Перечисленные методы успешно стерилизуют изделия из ПДМС и не оказывают на них разрушающего воздействия [15, 16].

Выбор материала прозрачного слоя

Для того чтобы иметь возможность проводить оптические исследования культивируемых клеток в структурах из ПДМС, его поверхность должна быть чистой, свободной от шероховатостей. Чтобы избежать описанных трудностей, для герметизации микроконтура, полученного из ПДМС, было решено приклеивать его к подложке из предметного стекла. Это решение имеет ряд достоинств: простота изготовления; возможность оптических исследований; соответствие размеров изделия заявленным в чертежах; удобный формат готового изделия для установки его на биологические микроскопы; прочное герметичное соединение стекла с ПДМС. Стекло обладает биоинертностью и является хорошей основой для культивирования клеток. Технология стерилизации стекла широко известна и детально проработана. Стекло можно стерилизовать автоклавированием, газом, УФ-излучением и химическими методами без изменения свойств самого материала.

Выбор материала конструкционной основы

Для обеспечения жесткости готовой конструкции и подключения трубок управляющего давления и системы смены среды к микрофлюидному устройству, основа устройства может быть изготовлена из поликарбоната (ПК) или полистирола (ПС).

Полистирол – это термопластичный материал, который легко поддается механической обработке. Этот пластик обладает достаточно высоким коэффициентом светопропускания, нетоксичен и биоинертен. Именно из этого материала делают чашечки Петри для культивирования клеток. Из-за низкой температурной устойчивости (верхний предел рабочих температур 65–75 °C) лучшим способом стерилизации для полистирола считается радиация. Недостатками полистирола являются его хрупкость, слабая износостойкость, низкая прочность. Он легко царапается при эксплуатации, что ухудшает внешний вид изделия, затрудняя визуализацию процессов культивирования клеток.

Поликарбонат – термопластичный полимерный материал с коэффициентом светопропускания около 90 %. Он отличается от полистирола высокой теплостойкостью, сохраняет стабильность свойств в достаточно широком диапазоне температур от -100 до 135 °C. Его устойчивость к спиртам дает возможность стерилизации изделий этанолом. Этот материал без последствий переносит автоклавирование, однако подвержен износу под воздействием УФ-излучения. Поликарбонат обладает высокой проч-



Рис. 3. Элементы формы для изготовления эластичного слоя: 1 – мастер-шаблон; 2 – крышка; 3 – рамка; 4 – поликарбонатная основа; 5 – спейсер клеточной ячейки; 6 – спейсер демпфирующего элемента; 7 – спейсер технологического отверстия; 8 – спейсеры микронасоса ностью и жесткостью, отличается стойкостью к ударным воздействиям. Этот термопластик может использоваться для изготовления многоразовых микрофлюидных устройств. Исходя из проведенного анализа свойств материалов для изготовления микрофлюидного устройства, был выбран поликарбонат.

Далее рассмотрим технологию изготовления микронасоса в составе микрофлюидного устройства.

Изготовление поликарбонатной основы

В пластине из ПК предусмотрены резьбовые отверстия для подключения трубок управляющего давления и системы смены питательной среды, поэтому для мелкосерийного производства основа изготавливается на фрезерном станке с числовым программным управлением. На готовую основу наносится праймер-грунт *Primer PR-1200* фирмы *Dow Corning*, который увеличивает адгезию ПДМС к поверхности основы.

Изготовление эластичного слоя микрофлюидного устройства и микронасоса

Наибольшие трудности представляет собой формирование микроканалов и клапанов насоса в ПДМС. Изготовление включает несколько этапов.

Многослойность задуманной конструкции привела нас к идее объединить известные способы изготовления микроканалов. ПДМС марки *Sylgard 184* фирмы *Dow Corning* готовится в соотношении 10:1. После чего смесь помещается в вакуумную камеру на 30 мин для удаления пузырьков воздуха из смеси.

В качестве мастер-шаблона в данной работе был использован шаблон из алюминиевого сплава, на котором фрезеровкой создан позитивный оттиск микроканалов и элементов микронасоса 1 (рис. 3). На расстоянии, равном толщине готового слоя ПДМС, от мастер-шаблона с помощью рамки 3 фиксируется поликарбонатная основа 4. Для формирования мембран микронасоса и формы клеточных ячеек в отверстия в поликарбонатной плате устанавливаются специальные спейсеры 5–8. Все элементы формы закрываются крышкой 2 и соединяются винтами 9. В полученную герметичную форму заливается готовая смесь ПДМС. Далее заготовка проходит центрифугирование с частотой

48

вращения равной 200 об/мин в течение 35 мин с одновременным нагревом до 60 °C. Такой режим был подобран эмпирически, чтобы обеспечить гарантированное отсутствие пузырьков в объеме готового ПДМС. После удаления пузырьков из заливочной формы полученная заготовка представляет собой слой ПДМС с микроканалами, приклеенный к поликарбонатной основе.

Подбором частоты вращения ротора центрифуги удалось добиться качественного и полного заполнения заливочной формы и избежать возникновения пузырей в толще ПДМС. Так, при вращении ротора с частотой 700 об/мин образовался пузырь при изготовлении образца (рис. 4), а при частоте вращения ротора 200 об/мин был получен удачный образец (рис. 5). Подбором температуры центрифугирования удалось достигнуть оптимального времени изготовления образца.

Заключительный этап изготовления МФУ заключается в приклеивании стекла. Поверхность ПДМС у заготовки протирается спиртом и просушивается продувочным пистолетом с целью удаления частичек пыли. После чистки заготовка размещается вместе с предметным стеклом в плазменной камере для активирования и повышения адгезии склеиваемых поверхностей. Обе поверхности обрабатываются плазмой низкого давления в течение 1 мин. Затем их сжимают друг с другом в течение 90 с, что позволяет сформировать неразъемное герметичное соединение.

Поскольку после обработки в плазменной камере ПДМС из гидрофобного переходит в гидрофильное состояние, микроканалы необходимо сразу заполнять деионизированной водой. После этого изделие готово к стерилизации и последующей работе с клетками (рис. 6).

Заключение

Тщательный анализ требований, предъявляемых к МФУ для работы с клетками, позволил выбрать материалы, отвечающие требованиям по биосовместимости, стерилизации, визуализации протекающих процессов, прочности и эластичности. Разработанная технология формирования эластичного слоя, включающего основные элементы микронасоса, микроканалы для клеток, вместе с поликарбонатной основой с последовательной сшивкой его с предметным стеклом позволяет изготавливать микронасосы в составе МФУ, удовлетворяющие необходи-



Рис. 4. Образовавшийся пузырь в слое ПДМС



Рис. 5. Успешно залитая заготовка



Рис. 6. Готовое микрофлюидное устройство

мым требованиям. Для каждого из этапов изготовления подобраны оптимальные параметры технологического процесса.

Список литературы

- Microfluidic Organ-on-a-Chip Technology for Advancement of Drug Development and Toxicology / J.D. Caplin, N.G. Granados, M.R. James, R. Montazami, N. Hashemi // Adv. Healthcare Mater. 2015. Vol. 4. P. 1426–1450
- Andersson H., Berg A. Microfluidic devices for cellomics: a review // Sensors and Actuators B. 2003. Vol. 92. P. 315–325
- Becker H., Locascio L.E. Polymer microfluidic devices // Talanta. 2002. Vol. 56. P. 267–287.
- 4. Fluid-structure interaction in deformable microchannels / *D. Chakraborty et al.* // Physics of Fluids. 2012. Vol. 24. No. 10. P. 1–35.
- 5. Adam T., Hashim U. Three-Dimensional Channel Design and Fabrication in Polydimethyl-

siloxane (PDMS) Elastomers Using capillary Action mechanism in fluidics for life sciences // Journal of Applied Sciences Research. 2012. Vol. 8. No. 4. P. 2203–2208.

- Huang H., Guo Z. Ultra-short pulsed laser PDMS thin-layer separation and microfabrication // Journal of Micromechanics and Microengineering. 2009. Vol. 19. No. 5. P. 1–9.
- Microfluidic biochip for the perifusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies / P.M. van Midwoud et al. // Biotechnology and bioengineering. 2010. Vol. 105. No. 1. P. 184–194.
- Berthier E., Young E. W.K., Beebe D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia // Lab Chip. 2012. Vol. 12. P. 1224–1237.
- Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip / D. Huh, B.D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H.Y. Hsin, D.E. Ingber // Science. 2010. Vol. 328. P. 1662–1668.
- Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsislike motions and flow / H.J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D.E. Ingber // Lab Chip. 2012. Vol. 12. P. 2165–2174.
- 11. Kim T.K., Kim J.K., Jeong O.C. Measurement of nonlinear mechanical properties of PDMS

elastomer // Microelectronic Engineering. 2011. Vol. 88. P. 1982–1985.

- 12. *Fincan M.* Assessing Viscoelastic Properties of Polydimethylsiloxane (PDMS) Using Loading and Unloading of the Macroscopic Compression Test // PhD thesis, University of South Florida. 2015. Graduate Theses and Dissertations. URL: http://scholarcommons.usf.edu/etd/5480 (дата обращения: 12.05.2017).
- Poly(dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: Cell culture and flow studies with glial cells / *S.L. Peterson, A. McDonald, P.L. Gourley, D.Y. Sasaki //* Journal of Biomedical Materials Research. 2005. Vol. 72A. No. 1. P. 10–18.
- Leclerc E., Sakai Y., Fujii T. Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane) // Biomedical Microdevices. 2003. Vol. 5. P. 109–114.
- 15. *Skaalure S.C., Oppegard S.C., Eddington D.T.* Characterization of sterilization techniques on a microfluidic oxygen delivery device // J. Undergrad Res. 2008. Vol. 2. No. 1. P. 1–4.
- Mata A., Fleischman A.J., Roy S. Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems // Biomedical microdevices. 2005. Vol. 7. No. 4. P. 281–293.

Материал поступил в редакцию 30.05.2017

ПЕТРОВ Владимир Андреевич E-mail: petrovv@inbox.ru Тел.: (916) 586-15-78	Научный сотрудник кафедры «Системы жизнеобеспечения летательных ап- паратов» Московского авиационного института (МАИ) (Национальный ис- следовательский университет). Сфера научных интересов – микрофлюиди- ка, микронасосы, гидродинамика. Автор 5 статей.
ГЕРАСИМЕНКО Татьяна Николаевна E-mail: staubchen03@gmail.com Тел.: (926) 428-60-05	Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник ООО НТЦ БиоКлиникум. Сфера научных интересов – математическое моде- лирование, МКЭ, микрофлюидика. Автор 18 статей и одного изобретения.
КИНДЕЕВА Ольга Владимировна E-mail: ov.kindeeva@gmail.com Тел.: (903) 780-68-08	Аспирант кафедры «Системы жизнеобеспечения летательных аппаратов» МАИ. Сфера научных интересов – микрофлюидные устройства, гидродина- мика, системы жизнеобеспечения. Автор трех статей.
ХАУСТОВ Александр Иванович Е-mail: khaustov.alex@mail.ru Тел.: (903) 559-12-00	Доктор технических наук, профессор, профессор кафедры «Системы жиз- необеспечения летательных аппаратов» МАИ. Сфера научных интересов – гидроаэродинамика, насосы, системы жизнеобеспечения. Автор более 80 статей и 6 изобретений.