



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE

Promocijas darba
kopsavilkums

Jānis Čipa

INTEGRĒTA
MIKROFLUIDIKAS IERĪCE
ĀTRAI PROSTATAS VĒŽA
VEZIKULU MAISĪŠANAI UN
MAGNĒTISKAJAI ATDALĪŠANAI

Rīga 2025



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE

EKSAKTO ZINĀTŅU UN TEHNOLOĢIJU FAKULTĀTE

Jānis Čipa

**INTEGRĒTA MIKROFLUIDIKAS IERĪCE
ĀTRAI PROSTATAS VĒŽA VEZIKULU
MAISĪŠANAI UN MAGNĒTISKAJAI
ATDALĪŠANAI**

Promocijas darba kopsavilkums

iesniegts inženierzinātņu un tehnoloģiju doktora grāda
iegūšanai
materiālzinātnes nozares
materiālfizikas apakšnozarē

Rīga 2025

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Cietvielu fizikas institūtā laika posmā no 2021. līdz 2025. gadam.



NATIONAL
DEVELOPMENT
PLAN 2020



EUROPEAN UNION
European Regional
Development Fund

INVESTING IN YOUR FUTURE



Disertācijas izstrādi atbalstīja Camart2 projekts Nr. 1.1.1.4/17/I/002, Eiropas reģionālas attīstības fonds (ERDF), Nr. 1.1.1.1/20/A/045 un Latvijas zinātnes padomes projekts VPP-EM-FOTONIKA-2022/1-0001.

Darba forma: disertācija materiālzinātnes nozarē materiālfizikas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: *Dr. phys. Roberts Rimša*, Latvijas Universitātes Cietvielu fizikas institūts.

Darba recenzenti:

Aivars Vembris, *Dr. phys.*, vadošais pētnieks, Cietvielu fizikas institūts;
Guntars Kitenbergs, *Dr. phys.*, asociētais profesors, Latvijas Universitāte;
Linās Mazutis, *Ph. D.* bioloģiskajā ķīmijā, profesors, Viļņas Universitāte.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Fizikas un astronomijas, un materiālzinātnes nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2025. gada 12. septembrī plkst. 15.00 Latvijas Universitātes Zinātņu mājā Jelgavas ielā 3, kā arī attālināti.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Fizikas un astronomijas, un materiālzinātnes zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs

_____/ Uldis Rogulis/
(paraksts)

promocijas padomes sekretāre

_____/ Sintija Siliņa/
(paraksts)

© Latvijas Universitāte, 2025
© Jānis Čipa, 2025

ISBN 978-9934-36-403-7
ISBN 978-9934-36-404-4 (PDF)

ANOTĀCIJA

Prostatas vēzis ir otrais visbiežāk diagnosticētais vēzis vīriešiem, taču tas ieņem piekto vietu ar vēzi saistīto mirstību pasaulē. Prostatas vēža noteikšana ir sarežģīta, jo pastāv augsts viltus pozitīvu rezultātu risks, kā arī ir grūtības atšķirt labdabīgu no ļaundabīga audzēja, kas, vēzim progresējot līdz metastātiskajai stadijai, var novest pie būtiska mirstības pieauguma. Pēdējos gados ārpussēnu vezikulas (AV) ir kļuvušas par daudzsoļošu biomarkķieri neinvazīvai slimību noteikšanai. Lai uzlabotu prostatas vēža noteikšanu, tika izstrādāta mikrofluidikas ierīce AV paraugu sagatavošanai, kas sastāv no maisīšanas un magnētiskās atdalīšanas moduļa. Izmantojot pasīvo zigzag veida maisītāju, tika iegūts maisīšanās indekss 0,92, kas tika noteikts ar 2D analīzi. 3D sajaukšanas mehānisms tika pētīts, izmantojot konfokālo mikroskopiju, kurā tika novērota sarežģīta lokāla virpuļu veidošanās. Veicot magnētu izkārtojuma optimizāciju, bija iespējams sasniegt magnētisko daļiņu atdalīšanas efektivitāti, kas bija augstāka nekā 98%. Visefektīvākais izkārtojums bija N45 magnētu masīvs horizontālā Ziemeļu-Dienvidu novietojumā. Pēc moduļu integrācijas mikrofluidikas iekārtā tika mērīta AV un viena domēna anti-CD9 antivielas saistīšanās kinētika. Pamatojoties uz saistīšanās kinētiku, pēc 10 minūtēm saistīšanās sasniedza intensitātes piesātinājumu, kas bija salīdzināms ar standarta laboratorijas metodi, piedāvājot ātrāku alternatīvu citām uz antivielām balstītām saistīšanās metodēm. Turklāt, šajā disertācijā pirmo reizi ir parādīta AV saistīšanās kinētika ar viena domēna anti-CD9 antivielu. Disertācija parāda mikrofluidikas ierīces potenciālu attīstīt klīnisko diagnostiku, uzlabojot detektēšanas ātrumu, samazinot manuālo darbu un nezaudējot precizitāti.

TĒZES

1. Ne-stehiometriskā tiola-ēna polimēru (OSTE) var izmantot kopā ar cikliskā olefīna kopolimēru (COC), lai izgatavotu ārpus šūnu vezikulu paraugu sagatavošanas ierīci, izmantojot fotolitogrāfiju un izslēdzot termiskās cietināšanas posmu.
2. Trīsdimensiju konfokālā mikroskopija pasīvajām mikrofluidikas maisīšanas ierīcēm parāda Dean virpuļu un sekundārā plūsmas veidošanos, sniedzot tiešus eksperimentālus pierādījumus par mikroizmēra plūsmu, kas nav izšķirama tradicionālajā divdimensiju optiskajā mikroskopijā.
3. Magnētiskās daļiņas var tikt atdalītas ar vairāk nekā 98% efektivitāti mikrofluidikas ierīcē. Ārpusšūnu vezikulām, kas ir saistītas ar viena domēna anti-CD9 antivielas konjugētām magnētiskajām daļiņām, saistīšanās kinētika ir asimptotiska un sasniedz piesātinājumu 10 minūšu laikā gan mikrofluidikas ierīcēs, gan standarta laboratorijas metodē.

SATURS

GLOSĀRIJS	6
Saīsinājumi	6
Raksturlielumi	6
IEVADS	7
Pētījuma mērķis	8
Pētījuma uzdevumi	8
Zinātniskā jaunrade	8
Praktiskā nozīme	9
Autora ieguldījums	9
Publikāciju saraksts	10
1. LITERATŪRAS APSKATS	12
2. IZGATAVOŠANA	14
2.1. Dizains un 3D drukāšana	14
2.2. OSTE 322 reakcijas spiedliešana	15
2.3. OSTE 220 reakcijas spiedliešana	16
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	18
3.1. Pasīvā mikrofluidikas maisītāja veiktspējas novērtējums	18
3.2. 3D maisīšanās efekti	20
3.3. Magnētiskā atdalīšana	21
3.4. Daļiņu atdalīšana izmantojot bioloģisko paraugu	23
3.5. Moduļu integrācija	24
3.6. Kvalitātes kontrole	24
3.7. Ierīces integrācijas testēšana	26
3.8. Integrētā ierīces analīze ar AV paraugu	27
4. NOZĪME UN NĀKOTNES VIRZIENI	30
5. SECINĀJUMI	31
ATSAUCES	32
PATEICĪBAS	36

GLOSĀRIJS

Saīsinājumi

AR	malu attiecība
COC	cikliskais olefina kopolimērs
DNS	dezoksiribonukleīnskābes
AVs	ārpusšūnu vezikulas
LNCaP	prostatas limfmezglu karcinomas
MD	magnētiskās daļiņas
Nb	viena domēna antivielas
OSTE	ne-stehiometriskā tiola-ēns
PDMS	polidimetilsiloksāns
PMMA	polimetilmetakrilāts
QPCR	kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija
RMI	pelatīvais maisīšanās indekss
RNA	ribonukleīnskābe
UV	ultraviolets
WB	Western blot (olbaltumvielu imūnblots)

Raksturlielumi

σ	pikseļu intensitātes standartnovirze
σ_0	pikseļu intensitātes standartnovirze nesajauktā gadījumā
$\langle I \rangle$	vidējā pikseļu intensitāte šķērsgriezumā
d	diametrs (m)
De	Dean skaitlis
I_{oi}	vietējā pikseļu intensitāte nesajauktā stāvoklī
N	kopējais pikseļu skaits
r_c	kzliekuma rādiuss (m)
Re	Reinoldsa skaitlis

IEVADS

Jaunu un uzlabotu medicīnas ierīču izstrādes nozīmi ir grūti pārvērtēt, it īpaši tādu slimību gadījumā kā vēzis, kur agrīna diagnostika ir īpaši būtiska, lai samazinātu mirstību. Tomēr pašreizējās diagnostikas metodes bieži saskaras ar ierobežojumiem, kas saistīti ar to sarežģītību, izmaksām, precizitāti un praktiskumu, padarot šīs metodes mazāk efektīvas klīniskajiem pielietojumiem. Šīs problēmas īpaši izpaužas agrīnās vēža stadijās, kad nelielas fizioloģiskas izmaiņas ar esošajām metodēm ir grūti atklāt.

Šī disertācija risina minētās problēmas, fokusējoties uz prostatas vēzi. Disertācija sākumā aplūkoti teorētiskie jautājumi zinātniskajā literatūrā par prostatas vēzi, pašreizējām diagnostikas metodēm un mikrofluidikas pielietojumiem diagnostikā. Eksperimentālajā daļā tiek aplūkots viss ierīces izstrādes cikls, sākot no tās izgatavošanas un beidzot ar testēšanu mikrofluidikas ierīcē, izmantojot bioreaktorā audzētām prostatas vēža ārpusšūnu vezikulas (AV), un izstrādāts metodes salīdzināšanu ar standarta laboratorijas metodēm.

Mikrofluidikas ierīces izveide sastāv no inženierijas, fizikas un bioloģijas konceptiem, veidojot mikrofluidikas pamatus – zinātnes nozari, kuras ietvaros iespējams precīzi darboties ar nelieliem tilpumiem, sākot no pikolitriem pilienu mikrofluidikas ierīcēs un beidzot ar mikrolitriem diagnostikā un biodeteklēšanā, lai uzlabotu funkcionalitāti un procesa efektivitāti. Tas galvenokārt ir skaidrojams ar unikālām fizikālajām parādībām mazā mērogā, piemēram, kapilāru spēku nozīmības pieaugumu, laminārās plūsmas pārsvaru un ievērojamu virsmas laukuma pret tilpuma attiecības pieaugumu. Pateicoties mikrofluidikas ierīču mazajam izmēram, samazinās nepieciešamo reaģentu daudzums, kā rezultātā ievērojami samazinās izmaksas un ir iespējams vienkāršot bioloģiskos procesus mazā izmēra un samazinātu savstarpējo mijiedarbību dēļ.

Lai gan mikrofluidikas ierīces var uzlabot metožu efektivitāti, tās nevar uzlabot šobrīd visplašāk izmantoto bioloģisko marķieru ierobežojumus, piemēram, prostatas vēzim specifisko antigēnu, kam samazinot detektēšanas robežu, netiktu atrisināts augsts nepatīvi pozitīvo rezultātu skaits. Bioloģisko marķieru uzlabošanai varētu izmantot AV, kas, sākot ar 2014. gadu, tika atzītas kā būtisks mediators starpšūnu komunikācijā. AV ir slēgtas lipīdu dubultslāņa struktūras, kuras izdala visu veidu šūnas. AV satur dažādas bioloģiskas molekulas, piemēram, ribonukleīnskābi (RNS) un proteīnus, kas var ietekmēt šūnu procesus. Analōģijai AV var uztvert kā WhatsApp ziņas, kas var likt jums rīta kafijas vietā pagatavot tasīti tējas. AV ir it īpaši interesantas ar to, ka veselas šūnu un vēža šūnu izdalītās AV var atšķirt, tādējādi tās var kalpot kā agrīns vēža indikators.

Apvienojot mikrofluidikas priekšrocības ar AV potenciālu agrīnai vēža noteikšanai, šī disertācija ir mērķēta uz jaunas diagnostikas ierīces izstrādi, kas būtiski uzlabotu esošās vēža noteikšanas metodes.

Pētījuma mērķis

Veicināt termoplastikas mikrofluidikas ierīces tehnoloģiskā procesa attīstību un izpētīt tās pielietojumu prostatas vēža noteikšanai ar šķidrās biopsijas palīdzību, izmantojot ārpusšūnu vezikulas.

Pētījuma uzdevumi

- Izstrādāt mikrofluidikas ierīces ražošanas procesu, kas nodrošina labāku mērogojamību un mazāku mazo molekulu absorbciju, salīdzinot ar polidimetilsiloksāna ražošanas procesu.
- Izveidot kvalitātes kontroles procedūru ražošanas procesam.
- Izstrādāt maisīšanas un magnētiskās atdalīšanas moduli, lai sagatavotu paraugus tālākai analīzei.
- Kvantitatīvi novērtēt maisīšanas moduli, izmantojot 2D un 3D vizualizācijas metodes, lai noteiktu optimālo dizainu.
- Kvantitatīvi novērtēt magnētiskās atdalīšanas moduļa veiktspēju un optimizēt tā dizainu, lai panāktu 95%+ efektivitāti.
- Novērtēt integrēto magnētisko daļiņu (MD) un AV sistēmu, izmantojot bioreaktorā audzētas AV mikrofluidikas ierīcē, un salīdzināt to ar standarta sistēmu.

Zinātniskā jaunrade

Zinātniskā jaunrade balstās uz mikrofluidikas attīstību prostatas vēža noteikšanai, uzlabojot AV iegūšanas tehnoloģiju un integrējot mikrofluidikas moduļus.

- **Ražošanas process.** Disertācija parāda ne-stehiometriskā tiola-ēna polimēru (OSTE) un cikliskā olefina kopolimēru (COC) ierīces (OSTE-COC) izgatavošanu, izmantojot reakcijas spiediešanas metodi OSTE220 polimēram. Cik autoram zināms, šī metode līdz šim nav izmantota ierīču izveidē prostatas vēža parauga sagatavošanai. OSTE220 pieeja piedāvā priekšrocības salīdzinājumā ar iepriekš izmantotām metodēm, kas pielietotas “orgāns-uz-čipa” [1] un AV atdalīšanai [2].
- **Plūsmas kustības vizualizācija.** Disertācijā parādītās 3D konfokālās mikroskopijas plūsmas kustības attēli zinātniskajā literatūrā ir reti sastopami. Šie attēli uzlabo izpratni par šķidrums dinamikas, it īpaši saistībā ar Dean virpuļiem (*Dean vortices*) un sekundārajām plūsmām.

- **AV saistošās antivielas.** Šajā pētījumā tika izmantotas viena domēna anti-CD9 antivielas nevis tipiskas antivielas, tādējādi ievērojami uzlabojot saistīšanas efektivitāti un samazinot nespecifisko saistīšanos.
- **Ierīces integrācija un potenciāls.** Pateicoties ierīces izgatavošanas procesam un iespējai integrēt vairākus moduļus, tiek demonstrēts tās potenciāls tālākai attīstībai un iespējamiem klīniskajiem pielietojumiem.
- **AV-MD saistīšanās kinētika.** Šajā pētījumā raksturotā AV un magnētisko daļiņu (MD) saistīšanās kinētika, izmantojot viena domēna anti-CD9 antivielas, kas līdz šim nav publicēta, nodrošinot vērtīgu informāciju līdzīgām sistēmām.

Praktiskā nozīme

Pētījumi prostatas vēža noteikšanā ir nozīmīgi mirstības samazināšanai, jo agrīna diagnostika ievērojami palielina veiksmīgas ārstēšanas iespējamību [3]. Ņemot vērā ārpusšūnu vezikulu salīdzinoši neseno atklāšanu kā biomarkieri, ko izdala visas šūnas, tām ir ievērojams potenciāls visaptverošas diagnostikas izstrādei [4]. Turklāt mikrofluidikas ierīču attīstība medicīnā varētu ievērojami samazināt izmaksas un uzlabot ērtību, veicinot labākus veselības aprūpes rezultātus [5]. Šis pētījums ir solis mikrofluidikas ierīču pārejai no laboratorijas uz praktiskiem pielietojumiem, parādot izgatavošanas protokolu mazai līdz vidējai mēroga ražošanai, kas atļauj ātru prototipēšanu un testēšanu ārpus laboratorijas apstākļiem. Visbeidzot, fundamentālās atziņas, kas tika iegūtas no 3D plūsmas vizualizācijas un kinētikām, paplašina zinātnisko izpratni šajā jomā.

Autora ieguldījums

Autors izgatavoja un raksturoja mikrofluidikas ierīces, kas ietvēra ierīču dizaina izstrādi, ražošanas procesa pielāgošanu no esošās literatūras, izstrādes parametru optimizāciju un kvalitātes kontroli. Mikrofluidikas ierīces ražošanas protokola izstrādi atbalstīja Roberts Rimša, Arnita Spule, Gunita Paidere un Kārlis Grindulis, kas palīdzēja ar savām zināšanām, ieteikumiem un sadarbību līdzīgu iekārtu veidošanas procesos.

Autors patstāvīgi veica 2D maisīšanas eksperimentus, savukārt 3D vizualizācija eksperimenti tika veikti ar Feliksa Rumnieka palīdzību, kurš darbojās ar mikroskopu kā operators.

Mikrofluidikas ierīces testēšana ar bioloģiskajiem paraugiem tika veikta sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru. Autors nodrošināja izgatavotās mikrofluidikas ierīces, izstrādāja plūsmas kontroles sekvenci, darbināja mikrofluidikas sistēmu un no mikrofluidikas viedokļa sagatavoja eksperimentus. Gala eksperimentu iestatījumi tika izstrādāti sadarbībā ar Edgaru Endzeliņu.

Western Blot analīzi, kvantitatīvo polimerāzes ķēdes reakciju (qPCR) un dzelzs satura mērījumus veica Edgars Endzeliņš, savukārt datu analīzi veica autors ar Edgara Endzeliņa atbalstu.

Publikāciju saraksts

Publikācijas, kas ir iekļautas disertācijā

1. J. Cipa et al., “OSTE DEVICE FOR MAGNETIC PARTICLE CAPTURE,” *MicroTAS 2022 – 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 919–920, Jan. 2022.
2. J. Cipa, E. Endzelins, A. Abols, N. Romanchikova, A. Line, G. W. Jenster, G. Mozolevskis, R. Rimša. “Elucidating Extracellular Vesicle Isolation Kinetics via an Integrated Off-Stoichiometry Thiol-Ene and Cyclic Olefin Copolymer Microfluidic Device”. *Polymers* 2024, 16, 3579. <https://doi.org/10.3390/polym16243579>

Publikācijas, kas nav iekļautas disertācijā vai citā kvalifikācijas darbā

1. B. Berzina et al., “Luminescence of AlN:Eu ceramics: Properties and mechanisms,” *Opt Mater (Amst)*, vol. 127, p. 112217, May 2022, doi: 10.1016/j.optmat.2022.112217.
2. A. Antuzevics et al., “Thermal properties of paramagnetic radiation-induced defects in lithium orthosilicate containing breeder material,” *Journal of Nuclear Materials*, vol. 565, p. 153713, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.jnucmat.2022.153713.
3. R. Ruska et al., “Off-Stoichiometry Thiol-Ene Surface Functionalization: Example with Gold Nanoparticles” *Materials* 2024, 17(24), 6135; doi: 10.3390/ma17246135.

Saraksts ar starptautiskām konferencēm saistībā ar disertācijas tēmu

1. Janis Cipa, Roberts Rimša, Gatis Mozolevskis, “MICROFLUIDIC MIXERS AND MAGNETIC PARTICLE CAPTURE CHAMBERS BASED ON OSTE POLYMER”, *80th International Scientific Conference of the University of Latvia, Riga Latvia, 2022*
2. Janis Cipa, Edgars Endzelins, Roberts Rimša, Artis Galvanovskis, Arturs Abols, Aija Line and Gatis Mozolevskis, “OSTE DEVICE FOR MAGNETIC PARTICLE CAPTURE,” *MicroTAS 2022 – 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 919–920, Jan. 2022.

3. Janis Cipa, Roberts Rimša, Gatis Mozolevskis, “Fabrication of passive microfluidics mixing device based on Off-stoichiometric thiol-ene and Cyclic olefin copolymer”, *39th Scientific Conference of the Institute of Solid State Physics, University of Latvia, 28 february to 2 march, 2023*.
4. Janis Cipa, Feliks Rumnieks Roberts Rimša, Aija Line, Gatis Mozolevskis “Gravity effects in zig-zag microfluidic mixers for light dye molecules?” *SMILS 2023, Stockholm, May 30–31, 2023*.
5. Janis Cipa, Edgars Endzelins, Roberts Rimša, Arturs Abols, Aija Line and Gatis Mozolevskis, “Polydimethylsiloxane-free microfluidic technology for the rapid capture of extracellular vesicles from urine” *MicroTAS 2023, Katowice, Poland October 15–19, 2023*.
6. Janis Cipa, Edgars Endzelins, Roberts Rimša, Arturs Abols, Aija Line and Gatis Mozolevskis. “Enhanced isolation of cancer-derived extracellular vesicles using PDMS-free microfluidic device” *40th Scientific Conference of the Institute of Solid State Physics, University of Latvia, March 5–7, 2024*.

1. LITERATŪRAS APSKATS

Pēdējās desmitgades laikā ārpusšūnu vezikulas (AV) ir atzītas kā perspektīvs biomarķieris vēža, neurodeģeneratīvo un kardiovaskulāro slimību diagnostikā. [6] AV ir heterogēnas, ar lipīdu dubultslāni norobežotas vezikulas, ko izdala gandrīz visi šūnu tipi. Tās satur signālmolekulas, kas var izraisīt dažādas reakcijas šūnās. AV analīze var potenciāli uzlabot slimību diagnostiku, it īpaši šķidrās biopsijas gadījumā, ko izmantojot, būtu iespējams noteikt ne tikai slimības, bet arī uzraudzīt slimību gaitu un noteikt zāļu efektivitāti, ar galamērķi uzlabot pacientu aprūpi. [7, 8] Tomēr ir sarežģīti ieviest ārpusšūnas vezikulu diagnostiku klīniskajā praksē, jo pietrūkst efektīvas un atkārtojamas metodes specifisku AV apakšpopulāciju izdališanai. Šo problēmu saasina plašais AV izmēru diapazons, kas ir no 30 nm līdz 2000 nm, radot būtiskus izaicinājumus standarta laboratorijas testiem. [6]

Lai izdalītu un analizētu AV, var izmantoto dažādas metodes, kā, piemēram, ultracentrifugāciju, [9] izmēra izslēgšanas hromatogrāfiju, [10] nogulsnešanu [11] un citas [12]. Taču, neskatoties uz pieejamo metožu daudzumu, joprojām ir izaicinājums izolēt noteiktas AV apakšpopulācijas, kas nesatur šūnu atliekas un nespēciskas AV, kā arī nodrošināt pietiekamu AV koncentrāciju kvantitatīvai analīzei. Imūnmagnētiskā izolēšana ir kļuvusi par zelta standartu AV iegūšanā tās efektivitātes, ātruma, mērogojamības un specifiskuma dēļ. [13–19] Šī metode ir izmantota dažādās jomās, tostarp baktēriju ķeršanā un to dezoksiribonukleīnskābes (DNS) izdališanā [20], metabolītu uztveršanā [21], AV atdališanā [9] un citur [22].

Salīdzinot ar klasiskajām laboratorijas metodēm, mikrofluidikas ierīcēm ir ievērojams potenciāls AV atdališanā. Ar mikrofluidikas ierīcēm ir iespējams veikt efektīvāku AV koncentrēšanu salīdzinājumā ar tradicionālām metodēm, piemēram, ultracentrifugāciju [9]. Papildus tam šādām ierīcēm ir raksturīga lielāka caurlaidspēja [23], nepieciešami mazāki parauga tilpumi [24] un to lietošana ir mazāk darbietilpīga. Piemēram, Y. Wang u. c. izstrādāja mikrofluidikas ierīci, izmantojot magnētiskās daļiņas un Ramana spektrometriju, ar kuru varēja veiksmīgi atšķirt vēža pacientus no veselīem pacientiem stundas laikā, sasniedzot AV noķeršanas efektivitāti 72,5%, tā pierādot metodes efektivitāti. [25] Tomēr šīs AV atdališanas ierīces trūkums ir lēns plūsmas ātrums (0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$), kas standarta klīniskā parauga tilpuma (vismaz 100 μl) apstrādei prasītu vairāk nekā 5,5 stundas, lai sasniegtu standarta noteikšanas limitu. [26]

Neskatoties uz mikrofluidikas iekārtu priekšrocībām, to pielietojamību AV diagnostikā ierobežo ierīču izgatavošanai izmantotie materiāli. Visbiežāk mikrofluidikā izmantotie materiāli, piemēram, polidimetilsiloksāns (PDMS), ko

izmanto mikrofluidikas ierīču prototipu izstrādei, ir problemātiski, jo tie sagādā ievērojamus izaicinājumus ražošanas mērogošanā. Turklāt PDMS absorbē mazas hidrofobas molekulas [27, 28], piemēram, AV, kas ierobežo iekārtas efektivitāti hidrofobas molekulu analizē. Vēl jo vairāk bioloģisku paraugu gadījumā ir nepieciešamas nodrošināt sterilu vidi, ko var panākt tikai ar vienreizējas lietošanas ierīcēm, padarot PDMS iekārtas ekonomiski neizdevīgas.

Lai risinātu šos ierobežojumus, aktīvi tiek pētīti alternatīvi materiāli, kā, piemēram, termoplastiski polimēri. Perspektīvi kandidāti ir COC un OSTE, kur abiem materiāliem ir potenciāls samazināt hidrofobo molekulu absorbciju un nodrošināt ražošanas daudzveidību. [28–31] COC polimērs tiek plaši izmantots kā bioloģiski saderīgs un optiski caurlaidīgs materiāls dažādos mikrofluidikas pielietojumos [32], kamēr OSTE polimēri tiek pielietoti sintētiskā papīra veidošanā [33], zirnekļa zīda izgatavošanas ierīču veidošanā [34] un kā kanāli fotoniskajiem biosensoriem [35]. Tomēr, cik autoram zināms, OSTE-COC ierīces līdz šim ir izgatavotas tikai “orgāns uz čipa” [1] un uz asimetriskās plūsmas lauka-plūsmas fracionēšanas principa balstītai AV atdalīšanai, [2] nevis AV imūnmagnētiskajai atdalīšanai vai kā mikrofluidikas AV paraugu sagatavošanas rīks.

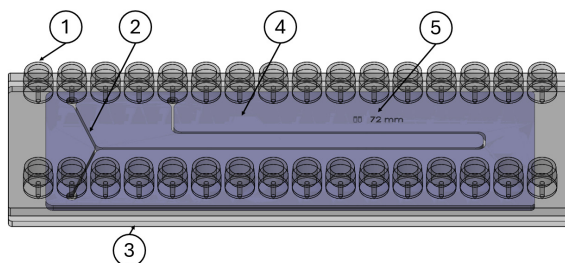
Šai disertācijai ir visaptveroša pieeja, lai uzlabotu AV iegūšanas tehniku un paplašinātu mikrofluidikas biodetektēšanas pielietojumus, aprakstot visu darbplūsmu no ierīces izgatavošanas līdz bioloģiskajam pielietojumam. Darba ietvaros tika izstrādāta AV sagatavošanas ierīce, kas integrē maisīšanas un magnētisko daļiņu noķeršanas funkcionalitāti PDMS nesaturošā čipā. Piedāvātā sistēma ne tikai uzlabo AV iegūšanas mērogojamību, bet arī piedāvā praktisku un daudzfunkcionālu platformu AV saturošu šķidrums biopsijas paraugu testēšanai, paverot ceļu nākotnes klīniskajiem pielietojumiem.

2. IZGATAVOŠANA

Lai izveidotu mikrofluidikas ierīci prostatas vēža analīzei, izmantojot AV, paraugs vispirms ir jā sagatavo specifiskajai mērīšanas metodei. Imūnmagnētiskās atdalīšanas gadījumā paraugs ir jā sajauc ar MD, kas ir pārklātas ar antivielām vai viena domēna antivielām, kuras pēc tam jā atdala no plūsmas, tādējādi atdalot tikai interesējošās AV. Šis process prasa divus atsevišķus moduļus: MD un parauga sajaukšanas moduli un moduli AV saistīto MD atdalīšanai no plūsmas, izmantojot magnētisko lauku.

2.1. Dizains un 3D drukāšana

Ierīces izgatavošana sākas ar mikrofluidiskas ierīces projektēšanu, izmantojot datorizētās projektēšanas (CAD) programmu. Tipisks ierīces dizains sastāvēja no trim galvenajām sastāvdaļām: šķidruma savienotājiem, piemēram, mini luer, COC plāksni ierīces augšējai un apakšējai daļai, kas kalpo kā caurspīdīgs slānis, un OSTE starpslānis, kas veido kanālu sānu sienām (1. attēls).

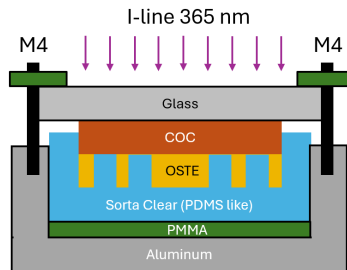


1. attēls. Mikrofluidikas ierīce, kas ir veidota no COC mikroskopijas plāksnes ar mini luer savienojumiem (1), $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ kanāls (2), COC mikroskopijas plāksne (3), OSTE slānis (4) un atskaites punkta marķieris (5)

Mikrofluidikas ierīce tika izgatavota, izmantojot mīkstās litogrāfijas metodes, kurās dubulti negatīva veidne tika izdrukāta ar 3D printeri Zortrax Inkspire, izmantojot $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ pikselus un $50\ \mu\text{m}$ slāņa augstumu. 3D drukai tika izmantots ziloņkaula baltais (ivory-white) sveķu materiāls ar Junga moduli 2 GPa un tilpuma sarūkuma koeficientu 4%. Sorta Clear™ polimērs tika izmantots mīkstās litogrāfijas veidņu izgatavošanai, aizstājot SYLGARD 184, jo Sorta Clear™ polimēram ir mazāka adhēzija OSTE materiālam. Kā sākotnējs pielietojums tika izstrādāta un izgatavota ierīce magnētisko daļiņu atdalīšanai.

2.2. OSTE 322 reakcijas spiedliešana

Magnētisko daļiņu atdalīšanas ierīces izgatavošanai tika izmantots OSTE termoplastiskais polimērs ar divpakāpju sacietēšanas procesu. Process sākas ar OSTE iepildīšanu elastīgā polimēra veidnē, kas ir balstīta uz magnētiskās atdalīšanas kameras dizaina. Pēc tam OSTE polimērs tiek apstarots ar UV gaismu, kas inducē polimerizāciju, pārveidojot materiālu no šķīdra polimēra uz lipīgu un cietu vielu, kas spēj kovalenti saistīties ar COC pamatni (2. attēls). Izveidotie OSTE polimēra kanāli tika noslēgti, izmantojot COC plāksni ar mikrofluidikai saderīgiem savienojumiem, kā mini-luer. Visbeidzot, ierīce tika termiski nocietināta, tādējādi pabeidzot polimerizācijas procesu un iegūstot hermētiski noslēgtu ierīci. Šo procesu sauc par OSTE reakcijas spiedliešanu (OSTE-RIM), un tam nav nepieciešams augsts spiediens vai sarežģīta termiskā kontrole. Tā rezultātā veidni var izgatavot, izmantojot tipisku mīkstās litogrāfijas procesu, vai arī veidot metāla veidnes, ievērojami samazinot izmaksas salīdzinājumā ar tradicionālo spiedliešanu un nodrošinot ātru prototipu izveidi. [36]



2. attēls. Shematisks sānskats reakcijas spiedliešanai priekš OSTE 322 (nav mērogā)

Izmantojot reakcijas spiedliešanu, tika izgatavotas mikrofluidikas ierīces ar dažādiem magnētisko daļiņu atdalīšanas dizainiem, pārveidojot kapilāros vai liela izmēra magnētisko daļiņu ķeršanas elementus uz kompakto, mikroshēmām līdzīgu platformu, kas ir automatizējama un savietojama ar citiem mikrofluidikas moduļiem (3. attēls).



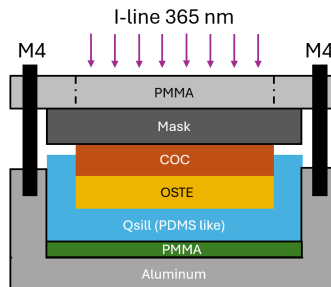
3. attēls. Izgatavotā OSTE 322 ierīce (pa kreisi) un ierīces sānskats (pa labi)

2.3. OSTE 220 reakcijas spiedliešana

Tika konstatēti ierobežojumi, pielietojot OSTE 322 izgatavošanas metodi maisīšanas modulim. Izmatojot OSTE 322 metodi, izšķirtspēja ir ierobežota līdz vairākiem simtiem mikrometru, kas neļauj izveidot asas stūru formas. Turklāt, izmantojot šo procesu, nav iespējama iekšējo struktūru izveidošana kanālā, ko var izmantot, lai uzlabotu sajaukšanās efektivitāti. Lai risinātu šos ierobežojumus, tika izstrādāta alternatīva izgatavošanas metode, balstoties uz OSTE 220 protokolu. Lai arī OSTE-RIM procesu iepriekš aprakstījis N. Sandström [36], šajā darbā metode tika pielāgota hermētiski noslēgtas OSTE-COC kompozītmateriāla ierīces izgatavošanai.

Tika ieviests modificēts process, lai uzlabotu izšķirtspēju un likvidētu nepieciešamību pēc termiskās sacietēšanas posma. Šī pieeja, kas aprakstīta 3.2. sadaļā, izmantoja OSTE 220 kā negatīvu fotoresistu. Mikrostruktūras tika definētas, selektīvi apstarojot OSTE slāni ar UV gaismu caur foto-masku, inducējot polimerizāciju tikai apstarotajos apgabalos. Šādi bija iespējams izveidot struktūras ar minimālo izmēru dažu mikrometru apmērā. Dažu mikrometru izšķirtspēja bija nepieciešama, lai izveidotu šaurus kanālus un asus stūrus, tādējādi veidojot lokālus virpuļus, kas var uzlabot maisīšanās efektivitāti [37].

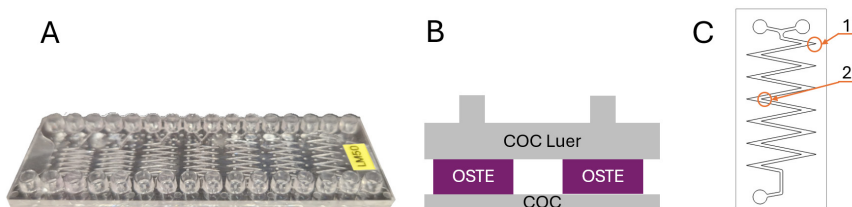
Mikstajām polimēra veidnēm Sorta Clear vietā tika izmantots QSil 216 (CHT) polimērs. QSil 216 ir PDMS līdzīgs materiāls, kas apvieno SYLGARD 184 sagatavošanas īpašības un ir ar mazāku adhēziju pret OSTE, tādējādi uzlabojot veidnes noņemšanas procesu. Pamata substrātam stikla vietā tika izmantoti COC plāksne, pateicoties labākai adhēzijai ar OSTE polimēru. Ņemot vērā salīdzinoši zemu UV dozu, kas nepieciešama OSTE 220 polimerizācijai (aptuveni 100 mJ/cm^2), polimetilmetakrilāta (PMMA) starplika tika ievietota zem veidnes, lai samazinātu UV atstarojumu un novērstu nevēlamu sacietēšanu. Ierīces augstumu noteica veidne, savukārt pielikto spiedienu kontrolēja ar sešām skrūvēm, kuras tika pievilktas ar griezes momenta atslēgu, iestatītu uz 0,3 Nm. Veidne tika piepildīta ar OSTE 220 un apstarota ar UV gaismu, izmantojot I-linijas filtru ar gala dozu 50 mJ/cm^2 (4. attēls).



4. attēls. Shematisks sānskats reakcijas spiedliešanai priekš OSTE 220 (nav mērogā), kur raustītā līnija norāda griezumu un maska nav aizklāta ar PMMA plāksni

Pēc UV apstarošanas COC plāksne ar OSTE slāni tika attīstīta acetona, izmantojot ultraskaņas vannu, kam sekoja izopropanola noskalošana, N₂ nopūšana un termiskā apstrāde 60 °C. Pirms slāņu savienošanas COC plāksne ar mini-luer savienotājiem tika apstrādāta ar O₂ plazmu. Vēlāk abi slāņi tika savietoti, sastiprināti un apstaroti ar UV gaismu (4000 mJ/cm²), iegūstot hermētiski noslēgtu ierīci ar plūsuma izturību, kas pārsniedz 400 µl/min (5. attēls).

Izveidotajai ierīcei ir izcila optiskā caurlaidība un augsta spiediena izturība, vienlaikus ļaujot izmantot standarta mini Luer savienojumus. Turklāt ražošanas protokols balstās uz iepriekšējām Mikro un Nanoierīču laboratorijas iestrādānēm, kur disertācijas pienesums bija mazākā elementa izmēra samazināšana līdz 20 µm un uzlabots ražošanas ātrums. Uzlabojumu bija iespējams panākt, jo šī ražošanas metode izmanto fotomasku un dubultu gaismas nocietināšanas soli, kas ļauj neizmantot termisko apstrādi, tādējādi gatavu ierīci laboratorijas apstākļos var izgatavot mazāk nekā vienas stundas laikā [30].

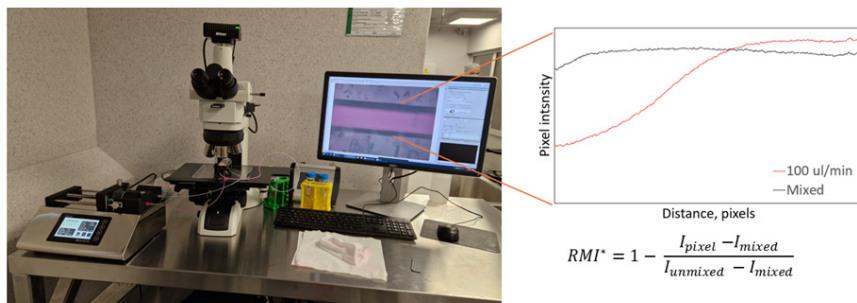


5. attēls. Mikrofluidikas maisīšanas ierīce (A), ierīces sānskats (B) un shematiskais skats (C), kur 1 ir ārējais stūris un 2 – iekšējais stūris

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Pasīvā mikrofluidikas maisītāja veiktspējas novērtējums

Mikrofluidikas ierīces veiktspēja tika novērtēta, izmantojot sarkanu krāsvielu – Rodamīnu B un dejonizētu ūdeni, kur uzturot nemainīgu plūsmas ātrumu, tika veikti optiskie mērījumi kanāla galā. Kvantitatīvai sajaukšanas efektivitātes noteikšanai tika izmantots relatīvas maisīšanās indekss (1), līdzīgi kā citos darbos ar mikrofluidikas iekārtām [38, 39].



6. attēls. Maisīšanās sistēmas fotogrāfija (pa kresi) un maisīšanās datu piemērs (pa labi), kur x ass ir kanāla platums. Visas vērtības ir integrētas kanāla garumā, un maisīšanās vērtības ir uzņemtas pie konstanta plūsmas ātruma, turpretī samaisītā vērtība ir 5 minūtes pēc tam, kad plūsma ir apstādināta

Lai matemātiski aprakstītu 2 šķidrumu maisīšanos, tika izmantots relatīvais maisīšanās indekss, ko apraksta vienādojums (1) [40]:

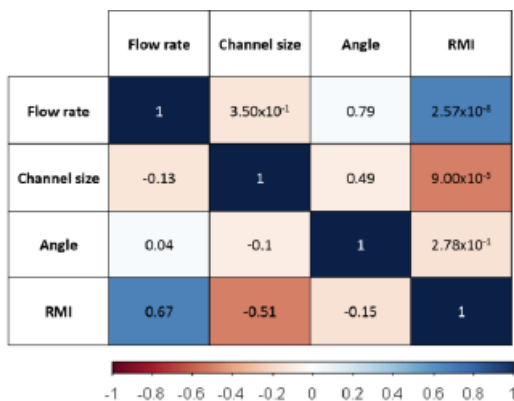
$$RMI = \frac{\sigma}{\sigma_0} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (I_i - \langle I \rangle)^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (I_{oi} - \langle I \rangle)^2}} \quad (1)$$

Kur σ – pikseļu intensitātes standartnovirze, I_i – vietējā pikseļa intensitāte, $\langle I \rangle$ vai I_{mixed} – vidējā pikseļu intensitāte kanāla šķērsgrīzumā, N – kopējais pikseļu skaits, σ_0 – pikseļu intensitāšu standartnovirze nesajauktā gadījumā, I_{oi} – vietējā pikseļa intensitāte nesajauktā stāvoklī.

Lai gan sajaukšanas indekss ir precīzi definēts, sajaukšanas efektivitāte, kas tipiski ir izteikta procentos, bieži ir neviennozīmīgi definēta, tomēr vairumā gadījumu sajaukšanās indeksu var tieši pārvērst procentu izteiksmē, lai aptuveni

salīdzināt datus. Izveidotajai mikrofluidikas ierīcei relatīvais sajaukšanas indekss ir 0,92, izmantojot dizainu ar 12 asiem stūriem un kopējo kanāla garumu 70 mm. Iegūtā sajaukšanās vērtība ir salīdzināma ar literatūras rezultātiem, kur sajaukšanas indekss 0,96 tika sasniegts 77 mm garā secīgi izliektā kanālā [41]. Lai gan dizaini, kā eglītes tipa (Herringbone) maisītāji, tipiski ir ar augstāku sajaukšanas indeksu, pateicoties lielam skaitam rievu kanāla apakšā [42], to trūkums ir iespējama AV iesprūšana rievās. Turklāt izstrādātais plakana pasīvais zigzaga maisītājs ir ar līdzvērtīgu veiktspēju un to var viegli pagarināt, lai uzlabotu sajaukšanu, pateicoties tā modulārajai struktūrai.

Lai apstiprinātu iegūtos rezultātus, izmantojot ANOVA testu, tika izvērtēti 54 datu punkti. Korelācijas matricā apakšējā diagonāle attēlo Pīrsona (Pearson) korelācijas koeficientu, bet augšējā diagonāle – p vērtības. Pīrsona korelācijas koeficients kvantitatīvi raksturo lineārās attiecības stiprumu un virzienu starp diviem mainīgajiem. Tā vērtība ir no -1 līdz 1 , kur 1 nozīmē perfektu pozitīvu korelāciju, -1 – perfektu negatīvu korelāciju, bet 0 – nekādu korelāciju. Korelācijas matrica (7. attēls) norāda uz spēcīgu sakarību starp plūsmas ātruma palielināšanos un uzlabotu sajaukšanās efektivitāti ($r = 0,67$), kas ir statistiski nozīmīga ($p = 2,57 \times 10^{-8}$), liecinot, ka lielāki ātrumi pasīvajā mikromaisītājā veicina efektīvāku sajaukšanos. Turklāt kanāla platuma samazināšana no $300 \mu\text{m}$ līdz $200 \mu\text{m}$ izraisīja statistiski nozīmīgu ($p = 9 \times 10^{-5}$) sajaukšanas indeksa uzlabojumu ($r = -0,51$), iespējams, pateicoties lokālās haotiskās plūsmas pastiprinājumam, tostarp Dean virpuļu un sekundārās plūsmas veidošanās asajos stūros [43]. Interesanti, ka stūra leņķa samazināšana no $22,5$ līdz 14 grādiem nerādīja būtisku ietekmi ($r = 0,04$, $p = 0,278$), kur analīze tika veikta ar 95% ticamības intervālu, kas saskan ar Kosentīno (Cosentino) u.c. secinājumiem [44].

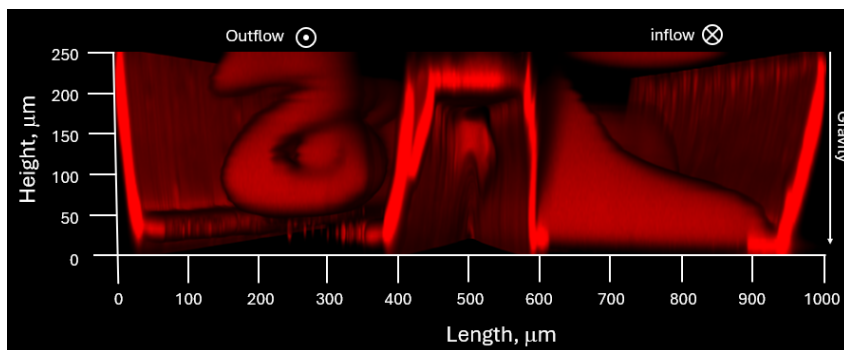


7. attēls. Korelācijas matrica relatīvajiem sajaukšanas indeksiem, mikro maisīšanas ierīcei, kas ir aprēķināta, izmantojot Pīrsona koeficientu un virs diagonāles ir attēlotas korelācijas koeficientu p -vērtības

Lai gan iegūtie rezultāti ir statistiski būtiski, tie balstās uz pieņēmumu, ka 2D optiskā mikroskopija ir pietiekama, lai pilnībā novērtētu sajaukšanās procesu mikrofluidikas ierīcē. Šī pieņēmuma problēma ir tāda, ka kanāliem ir dziļums un neideāli taisnas sienas, kas rodas izgatavošanas procesa rezultātā, tādējādi var rasties trīs dimensiju efekti, kuri netiek ņemti vērā.

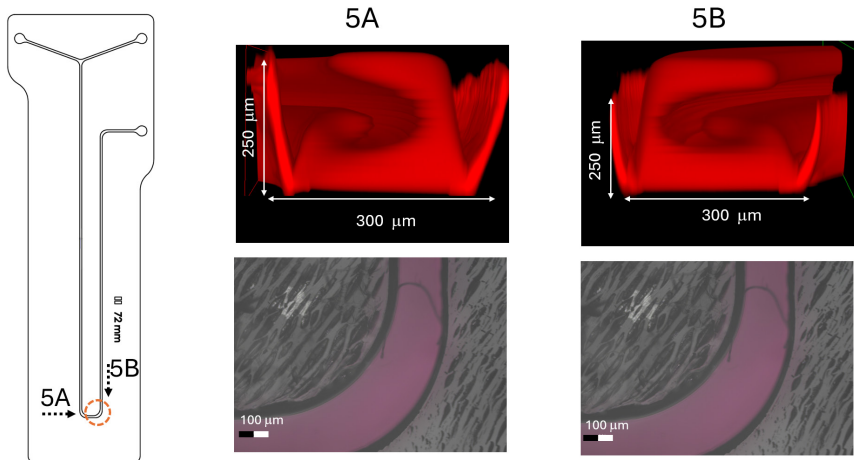
3.2. 3D maisīšanās efekti

Lielākā daļa maisīšanas iekārtas tiek novērtētas, izmantojot gaišā lauka vai fluorescences mikroskopiju, taču šīs metodes galvenokārt izvērtē plūsmu kanāla augšējā slānī, zaudējot detaļas kanāla apakšā. Lai iegūtu labāku izpratni par procesiem, kas notiek maisītājā, tika izmantota konfokālā fluorescences mikroskopija. Šo tehniku ir iespējams izmantot, jo lamināra plūsma ir stabila un laikā nemainīga, kas atļauj veikt 3D skenēšanu visā kanāla dziļumā.



8. attēls. Konfokālā mikroskopa attēls, kurā redzama Rodamīna B un dejonizēta ūdens sajaukšanās pirmajā asajā stūrī zigzag veida maisītājā

Kā redzams 8. attēlā, katrs ierīces stūris veicināja virpuļa veidošanos, palielinot difūzijas laukumu un uzlabojot sajaukšanās efektivitāti. Šī parādība, ko sauc par sekundāro plūsmu, kuras rezultāta veidojas Dean virpuļi (*Dean vortices*), novērojama, kad plūsma nonāk stūrī, kur inerces dēļ veidojas U formas plūsmas profils. U formas profila veidošanās tika eksperimentāli apstiprināts, izmantojot kanālu ar 1000 μm rādiusu, kā redzams 9. attēlā.



9. attēls. Konfokālā un optiskā mikroskopija 2. stūrī, skatoties no ieplūdes 5A un izplūdes 5B, norādīts ar punktētu bultu

Sekundārās plūsmas un Dean virpuļi ir pamats sajaukšanās procesam pasīvajos maisīšanas dizainos. Procesa intensitāti var aprakstīt ar bezdimensionālu lielumu, ko sauc par Dean skaitli. Dean skaitli matemātiski apraksta ar vienādojumu:

$$De = Re \sqrt{\frac{d}{2r_c}} \quad (2)$$

Kur Re – Reinoldsa skaitlis, d – kanāla diametrs (apaļam kanālam), r_c – izliekuma rādiuss. Izstrādātajai zigzag pasīvās maisīšanas ierīcei Dean skaitlis ir 33,3. Šī vērtība ir pārāk maza, lai pilnībā izskaidrotu novēroto virpuļu intensitāti [45]. Viens no iespējamajiem skaidrojumiem ir tas, ka kanāla sienas nebija pilnīgi taisnas, tajās bija defekti (caurumi un izciļņi), kas veicināja virpuļu veidošanos. 3D maisīšanās rezultāti uzlaboja vispārējo izpratni par sajaukšanās moduļa darbības principu, kas būtu jāņem vērā turpmākajai optimizācijai.

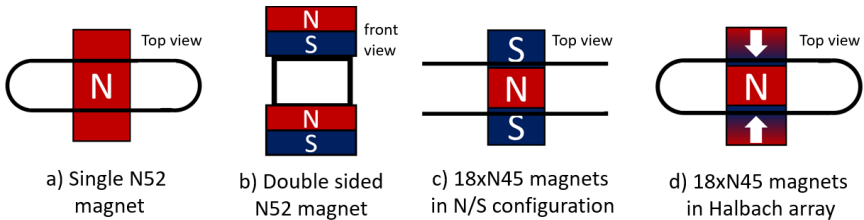
3.3. Magnētiskā atdalīšana

Kad ir noteikta maisīšanās efektivitātes un plūsmas dinamika mikrofluidiskas kanālos, mēs pārejam pie nākamās projekta daļas – magnētisko daļiņu atdalīšana no šķidrums un iekārtas optimizācija. Lai pārbaudītu magnētiskās atdalīšanas efektivitāti, tika pārbaudītas OSTE 322 ierīces ar dažādu MD atdalīšanas kameru malu attiecību. Testēšanai tika izmantotas dzelzs kodola mikrodaļiņas, kuras tika laistas caur kameru, zem kuras novietots magnēts. Tika savāktas gan

aizplūdušās, gan noķertās MD, tās tika izšķīdinātas karaļūdenī, un dzelzs saturs tika kvantitatīvi noteikts, izmantojot optisko absorbciju.

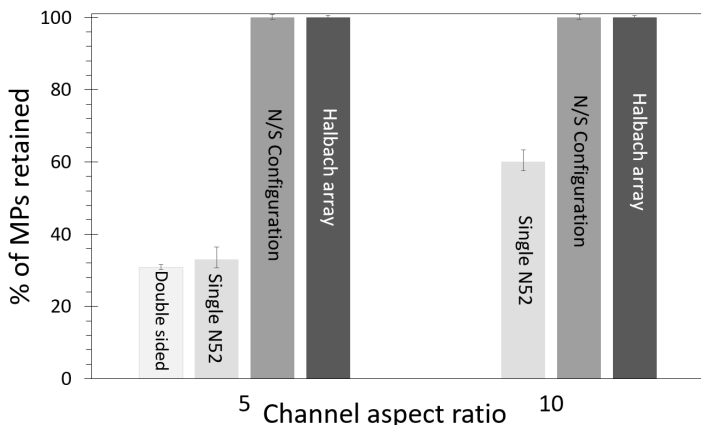
Lai novērtētu magnētisko daļiņu uztveršanas efektivitāti mikrofluidikas sistēmā, tika pārbaudītas vairākas magnētiskās konfigurācijas. Sākotnējos testos, izmantojot vienu N52 pastāvīgo magnētu, daļiņu notveršanas efektivitāte bija mazāka par 60% kanālam, kura platums bija 2 mm un augstums 0,5 mm. Lai uzlabotu šo veiktspēju, tika pārbaudītas vairākas alternatīvas magnētu konfigurācijas salīdzinājumā ar oriģinālo dizainu (10a attēls):

- **Divu magnētu konfigurācija.** Konfigurācija ar diviem N52 magnētiem, novietotiem virs un zem kanāla (10b attēls).
- **Magnētu masīvi.** 18 N45 magnēti, kas sakārtoti horizontāli ar pretējiem poliem (10c attēls).
- **Halbaha masīvi.** 18 N45 magnēti, sakārtoti Halbaha masīvā (attēls 10d).



10. attēls. Shematisks attēlojums dažādām magnētu konfigurācijām mikrofluidikas ierīcei

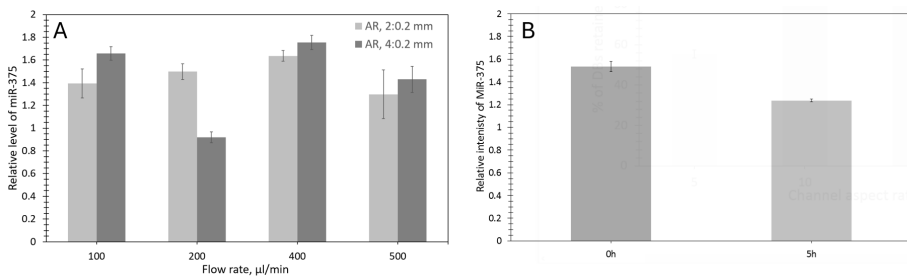
Svarīga magnētu masīvu īpašība ir nevienmērīga magnētiskā lauka veidošana. Nevienmērības ietekmē MD, kas plūst cauri magnētiskā lauka gradientam tiek pakļautas magnētiskajam spēkam. Šī spēka rezultātā daļiņu kustības trajektoriju tiek noliekta uz kanāla apakšu, tādējādi noķerot magnētiskās daļiņas. Šis efekts ir īpaši izteikts Halbaha (Halbach) masīva gadījumā, kur magnētiskais lauks ir vērsts no apakšas uz augšu, ievērojami pastiprinot magnētiskā lauka intensitāti salīdzinājumā ar ziemeļu/dienvidu (N/S) konfigurāciju, kurā lauka stiprums ir vienāds gan virs magnēta, gan zem tā. Salīdzinot dažādas konfigurācijas, kā parādīts 11. attēlā, tika sasniegta daļiņu notveršanas efektivitāte, kas pārsniedza 98%. Starp pārbaudītajām konfigurācijām Halbaha masīvam bija nedaudz labāka veiktspēja, tomēr, ņemot vērā tā izgatavošanas sarežģītību un raksturīgo nestabilitāti, turpmākajiem eksperimentiem tika izvēlēta (N/S) konfigurācija.



11. attēls. MD notveršanas efektivitāte dažādās magnētiskajās konfigurācijās

3.4. Daļiņu atdalīšana izmantojot bioloģisko paraugu

Lai varētu lietot AV mikrofluidikas sistēmās, vispirms ir jānovērtē AV izturība. Šis novērtējums bija nepieciešams, jo AV ir trauslas un liels bīdes spēks, ko var izraisīt sekundārā plūsma, var saraut AV membrānas, kā rezultātā var tikt atbrīvots AV saturs, padarot tās nelietojamas. Lai noteiktu, vai membrānas tiek sarautas kanālu sienu, laminārās plūsmas profila vai citu faktoru izraisīta bīdes spēku dēļ, tika noteikta AV izturības atkarība no plūsmas ātruma, analizējot AV saturu ar qPCR metodi (12A attēls). Būtisks novērojums bija tas, ka kontroles AV paraugs, kas tika uzglabāts +4 °C temperatūrā, ar laiku degradējās, kā redzams 12B attēlā, tāpēc datu kopai tika piemērota lineāra korekcija, lai kompensētu EV zudumu.



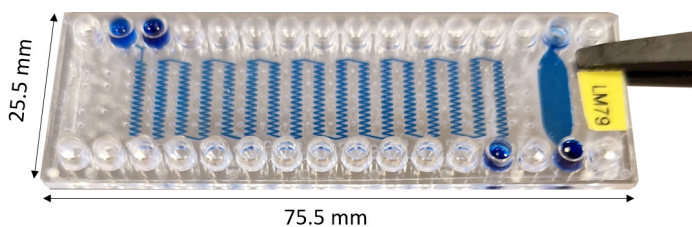
12. attēls. qPCR analīze miR375 proteīnam, kas iegūts no AV atkarībā no plūsmas ātruma (A) un kontroles AV, kas bija glabātas +4 °C (B)

qPCR dati, kā redzams 12. attēlā, norāda uz mikro ribonukleīnskābe (miR-375) klātbūtni, kas ir prostatas audiem specifiska ribonukleīnskābe (RNS) un tiktu konstatēta tikai tad, ja RNS ir iekapsulēta AV. Tas skaidrojams ar to, ka jebkura RNS molekula, kas atrodama ārpus AV, tiek ātri noārdīta visur sastopamā ribonukleāzes enzīma ietekmē. Galvenais secinājums ir tas, ka miR-375 var veiksmīgi konstatēt no AV, izmantojot mikrofluidikas ierīci. Turklāt tika novērots, ka plūsmas ātruma diapazonā no 100 līdz 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, kas atbilst bīdes spēkam līdz 1,4 Pa, AV integritāte ievērojami nemainījās.

3.5. Moduļu integrācija

Lai palielinātu bioloģiskā parauga mijiedarbības varbūtību mikrofluidikas ierīcē, kanāla garums tika palielināts no 74 mm līdz 800 mm, un kanāla stūru skaits – no 12 līdz 510. Iepriekš izmantotā 1000 μm biežā COC pamatnes vietā tika izmantota 140 μm bieža COC plēve, kas uzlaboja ierīces savienošanos un ražošanas efektivitāti. Atšķirībā no iepriekšējiem dizainiem, kas ietvēra vairākus neatkarīgus kanālus, jaunais dizains sastāvēja no viena nepārtraukta kanāla, kas aptver visu pamatnes laukumu. Šī modifikācija palielināja izgatavošanas jutību un prasīja augstāku izgatavošanas precizitāti.

Lai kompensētu veidnes saraušanos un plēves elastību, tika piemērots sarukuma korekcijas koeficients 0,67 %. Ierīces apstarošanas un attīstīšanas parametri tika optimizēti ar gala dozu 107,5 mJ UV gaismas un attīstīšanas laiku: 75 sekundes acetona. Rezultātā tika atkārtoti izveidoti mikrofluidikas kanāli ar izmēriem 200 μm \times 200 μm \times 800 mm. Turklāt tajā pašā ierīcē tika integrēts magnētiskās atdalīšanas modulis ar izmēriem 4 mm \times 200 μm \times 18 mm (13. attēls).

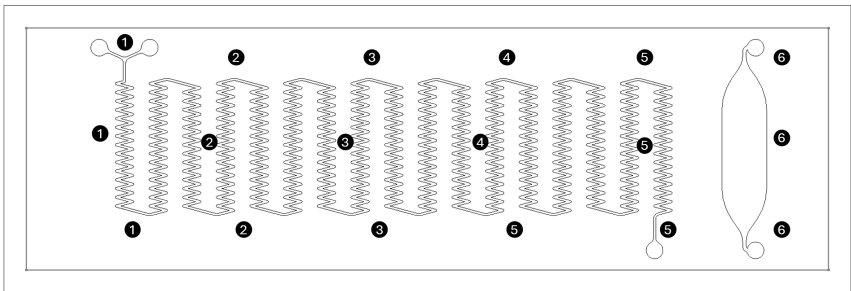


13. attēls. Integrēta maisīšanas un magnētiskās atdalīšanas ierīce uz COC pamatnes

3.6. Kvalitātes kontrole

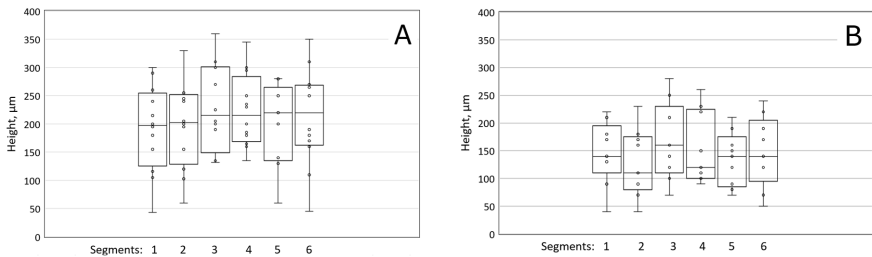
Lai palielinātu ražošanas apjomu un izveidotu ierīci, kas ir piemērota bioloģisko paraugu analīzei, bija nepieciešams ieviest papildu kvalitātes kontroli. Tā kā bioloģiskajiem paraugiem būs jāizmanto dažādas ierīces, lai nodrošinātu

sterilitāti, visām izgatavotajām ierīcēm jābūt pēc iespējas līdzīgām. Tāpēc visā ierīces garumā tika veikti augstuma mērījumi, lai novērtētu izgatavošanas kvalitāti, kā tas attēlots 14. attēlā.



14. attēls. Mērījuma punkti uz ierīces, skaitlis norāda uz kolonu, kura tika mērīta

Svarīgs ierīces raksturošanas aspekts bija OSTE slāņa augstuma noteikšana. Šim nolūkam tika izvērtētas divas mērīšanas metodes: optiskās mikroskopijas metode un mikrometra metode. Optiskajā metodē ierīces augstums tika novērtēts, secīgi fokusējoties uz augšējo un apakšējo virsmu un aprēķinot augstumu no fokusa atšķirības. Savukārt mikrometra metode ietvēra kopējā biezuma mērīšanu ar digitālu mikrometru, no kura tika atņemts zināmais pamatnes biezums, lai iegūtu OSTE slāņa biezumu. Abu metožu salīdzinājums parādīts 15. attēlā.



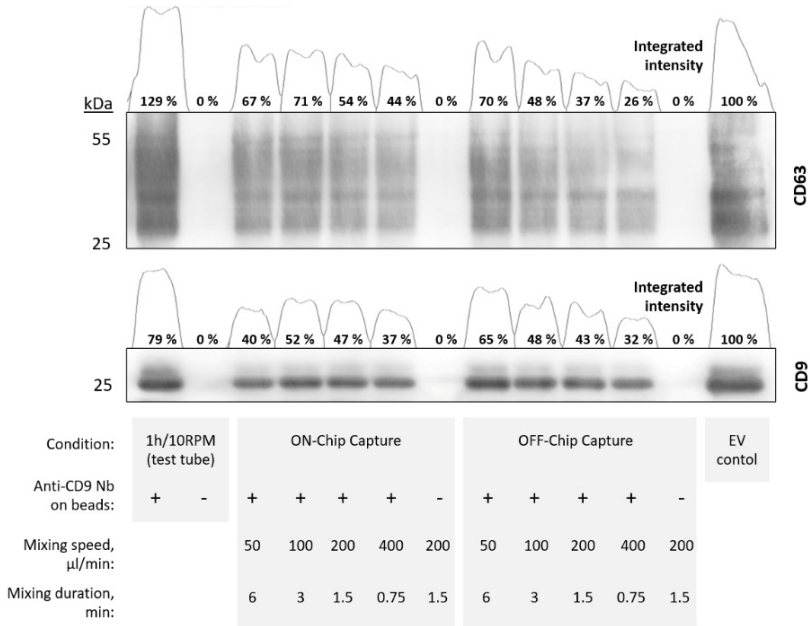
15. attēls. Optiskā mikroskopa (A) un digitālā mikrometra (B) kolonnu augstuma mērījumi, kur katra kaste attēlo 4 atšķirīgu ierīču segmentus, kā norādīts 14. attēlā.

Rezultātos bija novērojamas tikai nelielas atšķirības starp abām mērīšanas metodēm. Tomēr optiskajā metodē bija nedaudz lielāka datu izkliede, iespējams, jo bija sarežģīti precīzi un atkārtojami noteikti fokusu katrā punktā kas tieši ietekmēja augstuma mērījumu. Ņemot vērā mazāku datu izkliedi un ātrāku darbību, turpmākajiem mērījumiem tika izvēlēta mikrometra metode.

3.7. Ierīces integrācijas testēšana

Lai veiksmīgi apvienotu maisīšanas un magnētiskās atdalīšanas moduļus, tos ir nepieciešamas pārbaudīt ar prostatas vēzim bioloģiski līdzīgu paraugu un salīdzināt mikrofluidikas ierīci ar standarta metodi. Šim mērķim tika izmantotas Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra sagatavotās biorekatorā audzētas prostatas vēža AV.

Lai pārbaudītu mikrofluidikas iekārtu, tika izstrādāta pusautomātiska paraugu apstrādes programma, kas ietvēra paraugu sajaukšanu, atdalīšanu un mazgāšanu, izmantojot iepriekš uzpildītas šļirces, kas bija ievietotas šļirces sūknī. Savukārt standarta metode ietvēra vairāk nekā 10 manuālas darbības, tostarp vairākus pipetēšanas un atkārtotas daļiņu suspendēšanas soļus.



16. attēls. AV izturība atkarībā no plūsmas ātrumu un atdalīšanas veida integrētajā sistēmā. Augšējā attēlā ir Western Blot gels, kur tumšāka josla norāda uz augstāku intensitāti, kas ir attēlota kā integrēta vērtībā augšpusē

16. attēlā ir parādīta AV izturības atkarību no plūsmas ātruma, kā arī atšķirība starp integrēto un neintegrēto MD atdalīšanas metodi. 16 attēla augšpusē ir Western Blot (WB) gela attēls, kurā jo tumšāka ir josla, jo lielāka ir koncentrācija, kas ir attēlota ar integrētajām vērtībām virs katras joslas. Grafikā tiek izdalīti eksperimentālie nosacījumi, kur (-) nozīmē, ka MD virsma bija

nefunkcionalizēta jeb bez viena domēna anti-CD9 antivielas daļiņām. Šādā gadījumā iegūtā vērtība apraksta nespecifisko saistīšanos, kas bija minimāla (zem 0,5%), apstiprinot, ka mijiedarbība starp AV un magnētiskajām daļiņām ir CD9 specifiska.

Vērā ņemams bija novērojums, ka, izmantojot standarta metodi (OFF-chip), iegūtā signāla intensitāte bija augstāka par mikrofluidikas sistēmā iegūto vērtību (ON-chip). Šī atšķirība, visticamāk, ir saistīta ar atšķirīgajām konfigurācijām: mikrofluidikas sistēmā AV, kas netika piesaistīta pie MD, tiek nekavējoties aizvāktas, savukārt standarta metodē pēc sajaukšanas mikrofluidikas ierīcē ir iespējama mijiedarbībai parauga savākšanas traukā, kas paildzina inkubācijas laiku, efektīvi pagarinot maisīšanas laiku, un tādējādi palielinot signāla intensitāti. Lai gan mikrofluidikas sistēma nodrošina precīzāku un kontrolētāku mijiedarbības laiku, rezultātā signāla intensitāte ir nedaudz zemāka īsākā inkubācijas laika dēļ.

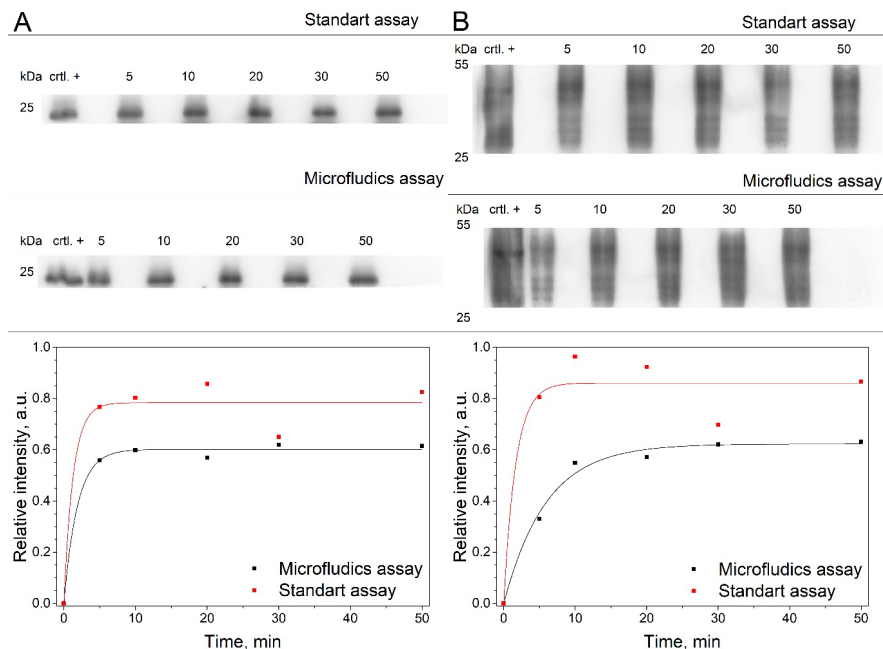
45. sekundē maisīšanas gadījumā tika novērots potenciāls intensitātes kritums, kas varētu liecināt par mērījumu kļūdu vai AV izturības zuduma sākumu. Tomēr šis pieņēmums nav viennozīmīgs, jo WB datiem nav pietiekami daudz atkārtojumu, lai veiktu kvantitatīvu statistisko analīzi. Papildus eksperimenti ar vairākiem atkārtojumiem būtu nepieciešami, lai apstiprinātu šo hipotēzi. Tomēr, lai samazinātu AV membrānas sabrukšanas varbūtību, turpmākiem eksperimentiem plūsmas ātrums tika samazināts, lai saglabātu bīdes spriegumu zem 5 Pa.

Lai uzlabotu saistīšanas efektivitāti un labāk izprastu saistīšanas procesu, sistēma tika pielāgota recirkulācijai. Tādējādi palielinot mijiedarbības laiku starp AV un MD, tiek nodrošināta, iespējams, labāka saistīšanas efektivitāti un parada AV-MD mijiedarbības dinamiku.

3.8. Integrētā ierīces analīze ar AV paraugu

16. attēlā ir redzams, ka pēc sajaukšanas mikrofluidikas ierīcē tika noķerti mazāk nekā 60% no kopējā AV skaita, kas varētu nozīmēt, ka nenotiek pietiekama parauga maisīšanās. Lai gan optimizācija, kas tika veikta balstoties uz krāsvielu testiem, garantētu 99% maisīšanās efektivitāti pēc ne vairāk kā 30 pagriezieniem, iegūtie 60% apstiprina ievērojamu atšķirību starp krāsvielu testu un enzimatisku reakciju, kā tas ir AV un MD gadījumā. Lai risinātu šo problēmu, tika ieviesta parauga atkārtota maisīšana jeb recirkulācija. Recirkulācija nozīmē, ka šķidrums paraugs tiek izlaists caur maisītāju, tad tas tiek uzglabāts caurulē un pēc tam ar to pašu ātrumu atkārtoti izlaists cauri maisītājam pretējā plūsmas virzienā. Šis process tika atkārtots no vienas līdz desmit reizēm, kas atbilst inkubācijas laikam 5–50 minūtes. Tests tika veikts paralēli standarta laboratorijas metodei, kurā tika izmantots rotācijas maisītājs, magnētiskais stends un manuāla pipete. Savukārt mikrofluidikas sistēma tika darbināta pusautomātiski, izmantojot iepriekš sagatavotus paraugus un skalošanas šķidrums, kur manuāli bija nepieciešamas noņemt tikai magnētu, lai savāktu noķertās MD ar AV. Gan

mikrofluidikas, gan standarta laboratorijas protokola pēdējie soļi bija parauga lizēšana un paraugu analīze, izmantojot WB, kā rezultāti ir attēloti 17. attēlā.



17. attēls. WB analīze, kas parāda AV noķeršanas efektivitāti, izmantojot viena domēna anti-CD9 antivielas ķeršanai un CD9 detektēšanai (A), viena domēna anti-CD9 antivielas ķeršanai un CD63 detektēšanai (B), kur katrs datu punkts ir integrēta vērtība attiecībā pret kopējo AV daudzumu. Augšējais attēls ir WB gels, kas ir izejas dati.

Attēlā 17A ir parādīts WB, kur tika izmantotas viena domēna anti-CD9 antivielas, lai noķertu AV, bet mērījums tika veikts ar CD9 proteīnu. Turpretim attēls 17B ir attēlots WB, kur tika izmantotas viena domēna anti-CD9 antivielas, lai noķertu AV, bet mērījums tika veikts ar CD63 proteīnu. Visas attēlotās relatīvās intensitātes vērtības ir relatīvas pret kontroles paraugu, kuram netika veikta eksperimentāla manipulācija un kas atbilst tai pašai AV koncentrācijai (ctrl. +).

WB signāls 17A attēlā parāda, ka maksimālā relatīvā AV saistīšanās efektivitāte ar MD ir $f_{\infty} = 0,60 \pm 0,01$, kas ir līdzīga standarta laboratorijas testa vērtībai $f_{\infty} = 0,78 \pm 0,04$. Turklāt CD63 analīze, izmantojot anti-CD63 antivielu, kā parādīts attēlā 17B, apstiprināja veiksmīgu AV vai dubultpozitīvu membrānas fragmentu uztveršanu, nevis brīvi peldošu CD9 proteīnu. Abu marķieru mērījumi norāda, ka lielākā daļa signāla rodas no uztvertajām dubultpozitīvajām vezikulām, ar minimālu vai neesošu brīvi peldošu CD9 proteīna artavu.

Lai izvērtētu eksperimentālos datus, eksponenciāla funkcija $f = f_{\infty}[1 - \exp(-\sigma t)]$ tika aprēķināta integrētajām fona atņemtajām WB vērtībām, izmantojot vismazāko kvadrātu metodi, kur līdzīgu modeli izmantoja K. Petkoviča u. c. [46]. Šeit f_{∞} ir saistīšanās efektivitātes asimptotiskā vērtība, un ir saistīšanās ātrums, kur rezultāti ir apkopoti 1. tabulā.

1. tabula. Asimptotiskā saistīšanās efektivitātes vērtība un integrēto WB signālu saistīšanās ātrums

	R^2	f_{∞}	σ
CD9 mikrofluidikas	0,99	0,60	0,53
CD9 standarta metode	0,94	0,78	0,77
CD63 mikrofluidikas	0,99	0,62	0,17
CD63 standarta metode	0,92	0,86	0,60

WB rezultāti norāda, ka lielākā daļa AV saistīšanās ar MD notiek ātri – pirmo 10 minūšu laikā. Tas ir ievērojams uzlabojums salīdzinājumā ar tradicionālajām laboratorijas metodēm, kur MD saistīšanās ar antivielām parasti prasa no vienas līdz 24 stundām, kā tas norādīts vairākos MD saistīšanas protokolos [47, 48]. Ātrāku saistīšanos, ko veicina viena domēna antivielas, kombinācijā ar mikrofluidikas ierīci, kurai ir automatizācijas potenciāls, var uzskatīt par būtisku priekšrocību salīdzinājumā ar esošajām metodēm.

4. NOZĪME UN NĀKOTNES VIRZIENI

Šī disertācija piedāvā jaunus atzinumus prostatas vēža ārpusšūnu vezikulu mijiedarbībai ar magnētiskām daļiņām mikrofluidikas ierīcē. Kinētikas dati atklāja ātru AV saistīšanos, uzlabojot izpratni par mazu daļiņu mijiedarbību lamināras plūsmas sistēmās. Pēc autoru zināšanām šis ir pirmais pētījums par saistīšanās kinētiku prostatas specifiskajām AV mijiedarbībā ar magnētiskajām daļiņām mikrofluidikas sistēmā.

Šis pētījums parāda automatizācijas potenciālu, izmantojot mikrofluidikas ierīci. Izstrādāto sistēmu var darbināt, iestatot plūsmas parametrus, ielādējot paraugus un noņemot magnētu, izslēdzot nepieciešamību pēc sarežģītas darba plūsmas, kas raksturīga klasiskajām laboratorijas procedūrām. Izveidoto mikrofluidikas sistēmu ir iespējams uzlabot, padarot to pilnīgi automatisku, atrisinot inženiertehniskās problēmas, piemēram, automatizējot magnētu noņemšanu un atļaujot iestatīt mainīgu plūsmu, lai beigās to izveidotu par praktisku laboratorijas instrumentu. Izveidotā sistēma varētu samazināt reaģentu izmaksas, uzlabot efektivitāti un uzlabot prostatas vēža noteikšanas iespējamību, tādējādi palielinot prostatas vēža agrīnas diagnostikas precizitāti, kas varētu novestu pie samazinātas prostatas vēža mirstības.

5. SECINĀJUMI

1. Izmantojot reakcijas spiedlišanu ir iespējams izgatavot hermētiski noslēgtu OSTE-COC ierīci kur kanālu ģeometrija ir definēta ar UV masku vai veidni, bet savienošanos var panākt izmantojot O₂ plazmas virsmas apstrādi, UV gaismu un siltumu. Izmantojot 140 μm COC plēvi kā substrātu, var izgatavot 800 mm garu maisīšanas moduli, savienotu ar 4 mm platu magnētiskās atdalīšanas moduli.
2. Pasīvu zig-zag OSTE-COC mikromaisītāju var izmantot, lai sasniegtu relatīvo maisīšanas indeksu 0,92, kas ir salīdzināms ar modernajiem dizainiem [37]. Samazinot kanāla izmēru no 300 μm līdz 200 μm un palielinot plūsmas ātrumu ievērojami uzlabojas maisīšanās efektivitāte, savukārt zigzag leņķa mainīšana no 14° līdz 22,5° būtiski neietekmē maisīšanas indeksu ($p = 0,278$).
3. 3D maisīšanās efekti, kā piemēram, virpuļi, tika attiecināti uz Dean virpuļiem un kanāla sānu sienu ģeometriju, ko varēja novērtēt ar konfokālo mikroskopiju gan zig-zag maisītājā, gan saliektā kanālā ar 1 mm rādiusu.
4. Optimālā magnētiskā konfigurācija magnētisko daļiņu notveršanai bija 18 N45 magnēti, kas izkārtoti horizontāli mainīgā polaritātē. Sistēmā ar 4 mm platu kanālu, var notvert vairāk nekā 98% no 70 μg magnētiskajām daļiņām, izmantojot 26% no ierīces ietilpības. Ja nepieciešama lielāka ietilpība, var palielināt magnētiskā lauka spēku, izmantojot Halbaha masīva konfigurāciju.
5. Ārpusšūnu vezikulas saglabā savu integritāti plūsmas ātrumos no 100 līdz 500 μl/min mikrofluidikas magnētisko daļiņu atdalīšanas modulī, ko apstiprināja qPCR analīze miRNA375 proteīnam.
6. On-chip atdalītās LNCaP ārpusšūnu vezikulas ir ar vienmērīgāku western blot signāla intensitāti dažādos plūsmas ātrumos (50–400 μl/min), kas liecina, ka on-chip atdalīšanas metode ir uzticamāka. Turpretim off-chip metode ir ar augstāku western blot signāla intensitāti, salīdzinot ar on-chip sistēmu, visticamāk, ilgāka saistīšanās laika dēļ.
7. Izmantojot mikroskopa stikliņa izmēra mikrofluidikas ierīci var veiksmīgi sajaukt CD9 konjugētas magnētiskās daļiņas ar LNCaP ārpusšūnu vezikulām, kur sajaukšanas efektivitāte un saistīšanās kinētika ir salīdzināma ar standarta metodēm. Abu konfigurāciju saistīšanās kinētika bija asimptotiska $f = f_{\infty}[1 - \exp(-\sigma t)]$, sasniedzot piesātinājumu 10 minūšu laikā, parādot ierīces piemērotību ātrai un automatizētai ārpusšūnu vezikulas atdalīšanai.

ATSAUCES

1. Rimsa, R.; Galvanovskis, A.; Plume, J.; Rumnieks, F.; Grindulis, K.; Paidere, G.; Erentraute, S.; Mozolevskis, G.; Abols, A. Lung on a Chip Development from Off-Stoichiometry Thiol–Ene Polymer. *Micromachines (Basel)* **2021**, *12*, doi:10.3390/mi12050546.
2. Priedols, M.; Paidere, G.; Santos, C. B.; Miscenko, A.; Bergmanis, R. G.; Spule, A.; Bekere, B.; Mozolevskis, G.; Abols, A.; Rimsa, R. Bifurcated Asymmetric Field Flow Fractionation of Nanoparticles in PDMS-Free Microfluidic Devices for Applications in Label-Free Extracellular Vesicle Separation. *Polymers (Basel)* **2023**, *15*, doi:10.3390/polym15040789.
3. Crosby, D.; Bhatia, S.; Brindle, K. M.; Coussens, L. M.; Dive, C.; Emberton, M.; Esener, S.; Fitzgerald, R. C.; Gambhir, S. S.; Kuhn, P.; et al. Early Detection of Cancer. *Science (1979)* **2022**, *375*, doi:10.1126/science.aay9040.
4. Bonifacino, J. S. Vesicular Transport Earns a Nobel. *Trends Cell Biol* **2014**, *24*, 3, doi:10.1016/J.TCB.2013.11.001.
5. Yeo, L. Y.; Chang, H. C.; Chan, P. P. Y.; Friend, J. R. Microfluidic Devices for Bioapplications. *Small* **2011**, *7*, 12–48, doi:10.1002/SMLL.201000946.
6. Shao, H.; Im, H.; Castro, C. M.; Breakefield, X.; Weissleder, R.; Lee, H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev* **2018**, *118*, 1917–1950, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00534.
7. Nawaz, M.; Camussi, G.; Valadi, H.; Nazarenko, I.; Ekström, K.; Wang, X.; Principe, S.; Shah, N.; Ashraf, N.M.; Fatima, F.; et al. The Emerging Role of Extracellular Vesicles as Biomarkers for Urogenital Cancers. *Nature Reviews Urology* **2014**, *11*, 688–701, doi:10.1038/nrurol.2014.301.
8. Liu, C.; Zhao, J.; Tian, F.; Cai, L.; Zhang, W.; Feng, Q.; Chang, J.; Wan, F.; Yang, Y.; Dai, B.; et al. Low-Cost Thermophoretic Profiling of Extracellular-Vesicle Surface Proteins for the Early Detection and Classification of Cancers. *Nature Biomedical Engineering* **2019**, *3*, 183–193, doi:10.1038/s41551-018-0343-6.
9. Reátegui, E.; Van Der Vos, K. E.; Lai, C. P.; Zeinali, M.; Atai, N. A.; Aldikacti, B.; Floydjr, F. P.; Khankhel, A. H.; Thapar, V.; Hochberg, F.H.; et al. Engineered Nanointerfaces for Microfluidic Isolation and Molecular Profiling of Tumor-Specific Extracellular Vesicles., doi:10.1038/s41467-017-02261-1.
10. Grant, R.; Ansa-Addo, E.; Stratton, D.; Antwi-Baffour, S.; Jorfi, S.; Kholia, S.; Krige, L.; Lange, S.; Inal, J. A Filtration-Based Protocol to Isolate Human Plasma Membrane-Derived Vesicles and Exosomes from Blood Plasma. *J Immunol Methods* **2011**, *371*, 143–151, doi:10.1016/j.jim.2011.06.024.
11. Ludwig, A. K.; De Miroschedji, K.; Doepfner, T. R.; Börger, V.; Ruesing, J.; Rebmann, V.; Durst, S.; Jansen, S.; Bremer, M.; Behrmann, E.; et al. Precipitation with Polyethylene Glycol Followed by Washing and Pelleting by Ultracentrifugation Enriches Extracellular Vesicles from Tissue Culture Supernatants in Small and Large Scales. *J Extracell Vesicles* **2018**, *7*, doi:10.1080/20013078.2018.1528109.

12. Cheng, S.; Li, Y.; Yan, H.; Wen, Y.; Zhou, X.; Friedman, L.; Zeng, Y. Advances in Microfluidic Extracellular Vesicle Analysis for Cancer Diagnostics. *Lab Chip* 2021, 21, 3219–3243.
13. Wan, Y.; Cheng, G.; Liu, X.; Hao, S. J.; Nisic, M.; Zhu, C. D.; Xia, Y. Q.; Li, W. Q.; Wang, Z. G.; Zhang, W. L.; et al. Rapid Magnetic Isolation of Extracellular Vesicles via Lipid-Based Nanoprobes. *Nature Biomedical Engineering* 2017 1:4 **2017**, 1, 1–11, doi:10.1038/s41551-017-0058.
14. Chen, W.; Li, H.; Su, W.; Qin, J. Microfluidic Device for On-Chip Isolation and Detection of Circulating Exosomes in Blood of Breast Cancer Patients. *Biomicrofluidics* **2019**, 13, doi:10.1063/1.5110973/238275.
15. Zhao, Z.; Yang, Y.; Zeng, Y.; He, M. A Microfluidic ExoSearch Chip for Multiplexed Exosome Detection towards Blood-Based Ovarian Cancer Diagnosis. *Lab Chip* **2016**, 16, 489–496, doi:10.1039/C5LC01117E.
16. Jeong, S.; Park, J.; Pathania, D.; Castro, C.M.; Weissleder, R.; Lee, H. Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis. *ACS Nano* **2016**, 10, 1802–1809, doi.org/10.1021/acsnano.5b07584.
17. Clayton, A.; Court, J.; Navabi, H.; Adams, M.; Mason, M.D.; Hobot, J.A.; Newman, G. R.; Jasani, B. Analysis of Antigen Presenting Cell Derived Exosomes, Based on Immuno-Magnetic Isolation and Flow Cytometry. *J Immunol Methods* **2001**, 247, 163–174, doi:10.1016/S0022-1759(00)00321-5.
18. Chen, J.; Xu, Y.; Lu, Y.; Xing, W. Isolation and Visible Detection of Tumor-Derived Exosomes from Plasma. *Anal Chem* **2018**, 90, 14207–14215, doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03031.
19. Shao, H.; Chung, J.; Lee, K.; Balaj, L.; Min, C.; Carter, B.S.; Hochberg, F. H.; Breakefield, X. O.; Lee, H.; Weissleder, R. Chip-Based Analysis of Exosomal MRNA Mediating Drug Resistance in Glioblastoma. *Nature Communications* 2015 6:1 **2015**, 6, 1–9, doi:10.1038/ncomms7999.
20. Ben Aissa, A.; Araújo, B.; Julián, E.; Zaroni, M. V. B.; Pividori, M.I. Immunomagnetic Separation Improves the Detection of Mycobacteria by Paper-Based Lateral and Vertical Flow Immunochromatographic Assays. *Sensors* **2021**, 21, 5992, doi:10.3390/S21185992/S1.
21. Yan, L.; Dou, L.; Bu, T.; Huang, Q.; Wang, R.; Yang, Q.; Huang, L.; Wang, J.; Zhang, D. Highly Sensitive Furazolidone Monitoring in Milk by a Signal Amplified Lateral Flow Assay Based on Magnetite Nanoparticles Labeled Dual-Probe. **2018**, doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.016.
22. Moyano, A.; Serrano-Pertierra, E.; Salvador, M.; Carlos Martínez-García, J.; Rivas, M.; Carmen Blanco-López, M. Diagnostics Magnetic Lateral Flow Immunoassays., doi:10.3390/diagnostics10050288.
23. Guo, M. T.; Rotem, A.; Heyman, J. A.; Weitz, D. A. Droplet Microfluidics for High-Throughput Biological Assays. *Lab Chip* **2012**, 12, 2146–2155, doi:10.1039/C2LC21147E.
24. Le, M. C. N.; Fan, Z. H. Exosome Isolation Using Nanostructures and Microfluidic Devices. *Biomedical Materials* **2021**, 16, 022005, doi:10.1088/1748-605X/ABDE70.
25. Wang, Y.; Li, Q.; Shi, H.; Tang, K.; Qiao, L.; Yu, G.; Ding, C.; Yu, S. Microfluidic Raman Biochip Detection of Exosomes: A Promising Tool for Prostate Cancer Diagnosis. *Lab Chip* **2020**, 20, 4632–4637, doi:10.1039/d0lc00677g.

26. Freiman, J. M.; Wang, J.; Easterbrook, P. J.; Horsburgh, C. R.; Marinucci, F.; White, L. F.; Kamkamidze, G.; Krajden, M.; Loarec, A.; Njouom, R.; et al. Deriving the Optimal Limit of Detection for an HCV Point-of-Care Test for Viraemic Infection: Analysis of a Global Dataset. *J Hepatol* **2019**, *71*, 62–70, doi:10.1016/j.jhep.2019.02.011.
27. van Meer, B. J.; de Vries, H.; Firth, K. S. A.; van Weerd, J.; Tertoolen, L. G. J.; Karperien, H. B. J.; Jonkheijm, P.; Denning, C.; IJzerman, A.P.; Mummery, C. L. Small Molecule Absorption by PDMS in the Context of Drug Response Bioassays. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *482*, 323–328, doi:10.1016/J.BBRC.2016.11.062.
28. Kemas, A. M.; Zandi Shafagh, R.; Taebnia, N.; Michel, M.; Preiss, L.; Hofmann, U.; Lauschke, V.M. Compound Absorption in Polymer Devices Impairs the Translatability of Preclinical Safety Assessments. *Adv Healthc Mater* **2023**, doi:10.1002/adhm.202303561.
29. Attia, U. M.; Marson, S.; Alcock, J. R. Micro-Injection Moulding of Polymer Microfluidic Devices. *Microfluid Nanofluidics* **2009**, *7*, 1–28, doi:10.1007/S10404-009-0421-X/TABLES/4.
30. Bajo-Santos, C.; Priedols, M.; Kaukis, P.; Paidere, G.; Gerulis-Bergmanis, R.; Mozolevskis, G.; Abols, A.; Rimsa, R. Extracellular Vesicles Isolation from Large Volume Samples Using a Polydimethylsiloxane-Free Microfluidic Device. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24097971.
31. Nunes, P. S.; Ohlsson, P. D.; Ordeig, O.; Kutter, J. P. Cyclic Olefin Polymers: Emerging Materials for Lab-on-a-Chip Applications. *Microfluid Nanofluidics* **2010**, *9*, 145–161, doi:10.1007/s10404-010-0605-4.
32. Agha, A.; Waheed, W.; Alamoodi, N.; Mathew, B.; Alnaimat, F.; Abu-Nada, E.; Abderrahmane, A.; Alazzam, A. A Review of Cyclic Olefin Copolymer Applications in Microfluidics and Microdevices. *Macromol Mater Eng* **2022**, *307*, doi:10.1002/mame.202200053.
33. Guo, W.; Vilaplana, L.; Hansson, J.; Marco, M.-P.; Van Der Wijngaart, W. Immunoassays on Thiol-Ene Synthetic Paper Generate a Superior Fluorescence Signal. *Biosens Bioelectron* **2020**, *163*, 112279, doi:10.1016/j.bios.2020.112279.
34. Gustafsson, L.; Tasiopoulos, C. P.; Jansson, R.; Kvik, M.; Duursma, T.; Gasser, T. C.; van der Wijngaart, W.; Hedhammar, M. Recombinant Spider Silk Forms Tough and Elastic Nanomembranes That Are Protein-Permeable and Support Cell Attachment and Growth. *Adv Funct Mater* **2020**, *30*, doi:10.1002/adfm.202002982.
35. Errando-Herranz, C.; Saharil, F.; Mola Romero, A.; Sandström, N.; Zandi Shafagh, R.; van der Wijngaart, W.; Haraldsson, T.; Gylfason, K. B.; Sun, Y. S.; Landry, J. P.; et al. Integration of Microfluidics with Grating Coupled Silicon Photonic Sensors by One-Step Combined Photopatterning and Molding of OSTE. *Optics Express*, Vol. 21, Issue 18, pp. 21293–21298 **2013**, *21*, 21293–21298, doi:10.1364/OE.21.021293.
36. Sandström, N.; Shafagh, R. Z.; Vastesson, A.; Carlborg, C. F.; Van Der Wijngaart, W.; Haraldsson, T. Reaction Injection Molding and Direct Covalent Bonding of OSTE+ Polymer Microfluidic Devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2015**, *25*, 075002, doi:10.1088/0960-1317/25/7/075002.
37. Lee, C. Y.; Wang, W. T.; Liu, C. C.; Fu, L. M. Passive Mixers in Microfluidic Systems: A Review. *Chemical Engineering Journal* **2016**, *288*, 146–160.

38. Wang, S.; Huang, X.; Yang, C. Mixing Enhancement for High Viscous Fluids in a Microfluidic Chamber. *Lab Chip* **2011**, *11*, 2081–2087, doi:10.1039/C0LC00695E.
39. Xia, H. M.; Wang, Z. P.; Wang, W.; Fan, W.; Wijaya, A.; Wang, Z. F. Aeroelasticity-Based Fluid Agitation for Lab-on-Chips. *Lab Chip* **2013**, *13*, 1619–1625, doi:10.1039/C3LC41346B.
40. Hashmi, A.; Xu, J. On the Quantification of Mixing in Microfluidics. *J Lab Autom* **2014**, *19*, 488–491, doi:10.1177/2211068214540156.
41. Chen, J. J.; Shie, Y. S. Interfacial Configurations and Mixing Performances of Fluids in Staggered Curved-Channel Micromixers. *Microsystem Technologies* **2012**, *18*, 1823–1833, doi:https://doi.org/10.1007/s00542-012-1489-x.
42. Du, Y.; Zhang, Z.; Yim, C. H.; Lin, M.; Cao, X. Evaluation of Floor-Grooved Micromixers Using Concentration-Channel Length Profiles. *Micromachines* **2010**, *Vol. 1, Pages 19–33* **2010**, *1*, 19–33, doi:10.3390/M11010019.
43. Rösing, W.; Schildhauer, T.; König, J.; Cierpka, C. Passive Control of the Concentration Boundary Layer in Microfluidic Fuel Cells Using Dean Vortices. *Microfluid Nanofluidics* **2019**, *23*, doi:10.1007/s10404-019-2274-2.
44. Cosentino, A.; Madadi, H.; Vergara, P.; Vecchione, R.; Causa, F.; Netti, P. A. An Efficient Planar Accordion-Shaped Micromixer: From Biochemical Mixing to Biological Application. *Scientific Reports* **2015**, *5:1* **2015**, *5*, 1–10, doi:10.1038/srep17876.
45. Fellouah, H.; Castelain, C.; Ould El Moctar, A.; Peerhossaini, H. A Criterion for Detection of the Onset of Dean Instability in Newtonian Fluids. *European Journal of Mechanics – B/Fluids* **2006**, *25*, 505–531, doi:10.1016/J.EUROMECHFLU.2005.11.002.
46. Petkovic, K.; Metcalfe, G.; Chen, H.; Gao, Y.; Best, M.; Lester, D.; Zhu, Y. Rapid Detection of Hendra Virus Antibodies: An Integrated Device with Nanoparticle Assay and Chaotic Micromixing. *Lab Chip* **2017**, *17*, 169–177, doi:10.1039/c6lc01263a.
47. Caltag Exosome-Human CD63 Isolation/Detection (from Cell Culture Media) Protocol for Use in Flow Cytometry Product Description.
48. Technologies, L. *Exosome-Human CD9 Isolation (from Cell Culture) Pre-Enriched Exosome Sample Input*; 2014.

PATEICĪBAS

Autors izsaka pateicību Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram, it īpaši **Edgaram Endzeliņam** un **Aijas Line** grupai par viņu nenovērtējamo ieguldījumu ārpusšūnu vezikulu(AV) un magnētisko daļiņu (MD) konjugētu viena domēna anti-CD9 antivielas izveidē. Viņu palīdzība eksperimentu veikšanā, ieskaitot dzelzs satura analīzi, proteīnu imunoblotu un qPCR mērījumus; standarta testa kontroles eksperimentu veikšana bija neatņemamam sastāvdaļa no šī pētījumam.

Autors ir pateicīgs kolēģiem no **Cellbox Labs** un **Cietvielu fizikas institūta** par noderīgajām diskusijām un ieteikumiem saistībā ar mikrofluidikas ierīču izveidošanu un testēšanu it īpaši **Robertam Rimšam** par doktorantūras vadīšanu.

Autors izsaka arī atzinību Latvijas Universitātei par iespēju veikt doktorantūras pētījumus programmas “Dabaszinātņu (fizikas, astronomijas un mehānikas) akadēmiskais doktors” ietvaros.

Visbeidzot, autors izsaka pateicību projektiem, kuros finansiāli tika atbalstīta darba izstrāde: Project was funded by European Regional Development Fund (ERDF), Measure 1.1.1.1 “Support for applied research” No 1.1.1.1/20/A/045, “Development of a novel microfluidic device for label-free quantification of prostate cancer-derived extracellular vesicles and analysis of their RNA content (PROCEX)” The financial support of Latvian Council of Science project VPP-EM-FOTONIKA-2022/1-0001 “Smart Materials, Photonics, Technologies, and Engineering Ecosystems is appreciated.