Tampereen yliopisto

Elli Heimonen

ORGAN-ON-A-CHIP -LAITTEEN KARAKTERISOINTI

Happipitoisuuden säätelyn mittaaminen ja analysointi

Kandidaatintyö
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Tarkastaja: Kaisa Tornberg
Marraskuu 2025

TIIVISTELMÄ

Elli Heimonen: organ-on-a-chip -laitteen karakterisointi (Characterization of an organ-on-a-chip device)
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma
Marraskuu 2025

Aivohalvaus on tila, jossa aivoihin ei virtaa riittävästi verta, mikä johtaa hypoksiaan eli hapen puutteeseen aivojen kudoksessa. Aivohalvaus on toiseksi yleisin kuoleman ja vammaisuuden aiheuttaja, minkä takia on tärkeää, että sitä pystytään tutkimaan luotettavasti ja tarkasti. Eläinmallien epätarkkuus on kuitenkin ollut haasteena aivohalvauksen hoitomuotojen kehittämisessä. Tämän eläinmallien epätarkkuuden vuoksi tarvitaan muita menetelmiä, joilla näitä matalan happipitoisuuden ympäristöjä voidaan mallintaa ihmissoluilla laboratorioympäristössä.

Organ-on-a-chip on in vitro- malli, jolla pystytään mallintamaan kudoksen toimintaa ihmiskehon ulkopuolella. Tämä laite yhdistää tavalliseen soluviljelmään mikrofluidistisen kanavarakenteen, joka mahdollistaa erittäin pienten kaasumäärien hallinnan. Viemällä soluviljelmään vähähappista kaasua mikrolitrojen tarkkuudella, solujen mikroympäristöä voidaan muokata vastaamaan aivohalvauksen hypoksisia olosuhteita. Organ-on-a-chip -laitteella viljellyt ihmisen solut siis jäljittelevät elimen soluvasteita hypoksisessa ympäristössä, joka on luotu mikrofluidistiikan avulla.

Koska organ-on-a-chipin avulla halutaan tutkia soluvasteita, on tärkeää voida seurata, miten solut reagoivat ympäristön muutoksiin. Osittain tästä syystä organ-on-a-chip -laite on valmistettu läpinäkyvästä PDMS-materiaalista, jonka läpi soluja voidaan tarkastella valomikroskopian avulla. PDMS-materiaalin taittumiskerroin on kuitenkin suuri verrattuna ilman taittumiskertoimeen, minkä takia kaasukanavarakenne vaikeuttaa laitteella viljeltyjen solujen mikroskopointia. Leveämmät kaasukanavat siis mahdollistavat laajemman alueen tarkastelun ilman eroavista taittumiskertoimista johtuvia vääristymiä.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää vaikuttaako mikrofluidistisen kanavarakenteen kaasukanavien leveys happipitoisuuden säätelyn tarkkuuteen. Tutkimus on tarpeellinen koska tiedetään, että mikroskopointi on vaikeampaa kapean kanavarakenteen läpi, mutta ei tiedetä vaikuttaako kanavarakenteen leveyden muuttaminen happipitoisuuden säätelyyn. Tähän kysymykseen pyrittiin vastaamaan suorittamalla ratiometrinen happikuvantaminen kolmelle eri laiteelle, joista kahden laiteen kanavan leveys on 20 µm ja yhden 200 µm. Tuloksista nähtiin, että happipitoisuuden tarkkuuden säätelyssä on eroa eri kanavaleveyden omaavien laitteiden välillä.

Avainsanat: organ-on-a-chip, hypoksia, ratiometrinen happikuvantaminen, mikrofluidistiikka

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

TEKOÄLYN KÄYTTÖ OPINNÄYTTEESSÄ

Opinnäytteessäni on käytetty tekoälysovelluksia:

☐ Ei
☒ Kyllä

Ilmoitukseni mukaan olen käyttänyt opinnäytteessäni tutkielmaprosessin aikana seuraavia tekoälysovelluksia: ChatGPT

Tekoälysovellusten nimet ja versiot: ChatGPT (2022)

Käyttötarkoitus: Tekoälyä on käytetty lähteiden sisällön kääntämiseen suomen kielelle ja lauseiden muotoiluun kieliopillisesti oikeaksi.

Osiot, joissa tekoälyä on käytetty: Johdanto, Organ-on-a-chip –rakenteet ja soluviljelyn olosuhteiden säätely

Olen tietoinen siitä, että olen täysin vastuussa koko opinnäytteeni sisällöstä, mukaan lukien osat, joissa on hyödynnetty tekoälyä, ja hyväksyn vastuun mahdollisista eettisten ohjeiden rikkomuksista.

ALKUSANAT

Haluan kiittää kandidaatintyöni ohjaajaa Kaisa Tornbergia kiinnostavan aiheen tarjoamisesta, yksityiskohtaisesta palautteesta ja kannustavasta asenteesta työn jokaisessa vaiheessa.

Tampereella, 30.10.2025

Elli Heimonen

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO 1
1.1 Organ-on-a-chip –rakenteet ja soluviljelyn olosuhteiden säätely 3
2. MATERIAALIT JA METODIT 8
2.1 PDMS-materiaalin ja kaasukanavien valmistus 8
2.2 Organ-on-a-chip -rakenteen valmistus 9
2.3 Happipitoisuuden mittaus 10
3. TULOKSET 14
3.1 Tulosten pohdinta 16
4. YHTEENVETO 19
5. LÄHTEET 20

1. JOHDANTO

Hypoksialla tarkoitetaan tilaa, jossa kudokseen ei kuljeteta happea normaalisti. Happipitoisuus soluissa määräytyy hapen saannin ja kulutuksen perusteella. Jos hapen kuljetus verisuonistossa häiriintyy esimerkiksi veritulpan, aivohalvauksen, turvotuksen tai vamman seurauksena, kudos saa vähemmän happea kuin kuluttaa ja joutuu hypoksiaan [1]. Tämä kudoksen hypoksinen tila liittyy etenkin syöpään, sydäninfarktiin ja aivohalvaukseen. Aivot ovat erityisen herkät hypoksian aiheuttamille vaurioille, koska ne kuluttavat eniten happea kaikista elimistä. [1] Tässä työssä käytetty organ-on-a-chip -laite eli kudossiru on kehitetty mallintamaan erityisesti aivohalvauksen aiheuttamaa aivojen hypoksiaa. [2]

Aivohalvaus on tila, jossa aivoihin ei virtaa riittävästi verta, mikä johtaa hypoksiaan [1]. Aivohalvaus voi olla iskeeminen tai hemorraginen. Hemorraginen aivohalvaus johtuu aivojen verisuonen repeämisestä, jonka seurauksena paine aivoissa kasvaa ja kudos ei saa riittävästi happea. Iskeeminen aivohalvaus puolestaan johtuu verisuonen tukkeutumisesta, mikä estää aivojen riittävän hapen saannin. Kun iskeemisessä aivohalvauksessa aivovaltimo tukkeutuu, happipitoisuus kyseisen kudosalueen ytimessä laskee nopeasti lähes nollaan. Tämän lisäksi tukoksen ympärillä oleva alue saa puutteellisesti verta, mikä aiheuttaa hypoksiaa. [3]

Aivot ovat erityisen herkät hapenpuutteelle, sillä hermokudos tuhoutuu nopeasti ja palautumattomasti verenkierron häiriön jatkuessa. On arvioitu, että akuutissa aivohalvauksessa iskeemisen aivoverisuonihäiriön vuoksi kuolee 1,9 miljoonaa hermosolua ja 14 miljardia synapsia minuutissa. Aivohalvaus onkin toiseksi yleisin kuoleman ja vammaisuuden aiheuttaja maailmanlaajuisesti. Vuonna 2016 todettiin 13,7 miljoonaa uutta aivohalvaustapausta, joista noin 87 % oli iskeemisiä aivohalvauksia. [4] Aivohalvaus on siis yleinen kuolinsyy, minkä takia on tärkeää pystyä tutkimaan sitä ihmiskehon ulkopuolella.

Tarpeeseen tutkia aivohalvausta on pyritty vastaamaan eläinmalleilla, mutta mallien epätarkkuus on ollut haasteena aivohalvauksen ja sydäninfarktin hoitomuotojen kehittämisessä [5]. Yksi eläinmallien ongelmista on eläimen ja ihmisen sydämen

fysiologiset erot. Esimerkiksi jyrsijöiden sykenopeus on paljon korkeampi kuin ihmisellä [5]. Toinen ongelma on ero terapeuttisen aikaikkunan kestossa, eli aikajakson kestossa, jonka aikana pysyviä vaurioita voidaan estää tai minimoida. Felix Flurin artikkelin [6] mukaan ihmisellä paikallisen aivohalvauksen terapeuttinen vaste heikkenee huomattavasti kolmessa tunnissa, kun taas eläinmalleissa terapeuttinen aikaikkuna voi olla jopa 12 tuntia [6]. Eläinmallien epätarkkuuden vuoksi tarvitaan siis muita menetelmiä, joilla näitä matalan happipitoisuuden ympäristöjä voidaan mallintaa ihmissoluilla laboratorioympäristössä. Ihmissolujen kasvatus hypoksisessa ympäristössä edellyttää solujen kasvualustaa, jossa solujen kaasumikroympäristöjä eli solusta mikrometrien etäisyydellä olevaa aluetta voidaan hallita nopeasti ja tarkasti [2].

Solun mikroympäristöstä tulevat ärsykkeet vaikuttavat soluihin ja saavat aikaan soluvasteen, jolla tarkoitetaan solun tapaa reagoida ympäristön ärsykkeisiin. Ympäristöstä tulevat ärsykkeet voivat olla mekaanisia tai fysiologisia. Esimerkki mekaanisesta ärsykkeestä on vetojännite, joka voi johtaa väliaikaisiin muutoksiin solun sytoskeletonin eli tukirangan järjestymisessä ja edelleen pitkäaikaisiin vaikutuksiin sen geenien ilmentämisessä. Fysiologinen ärsyke puolestaan voi olla esimerkiksi nesteen virtaus solun kasvualustalla, joka aiheuttaa soluun leikkausjännitystä. Solu aistii tämän leikkausjännityksen, eli sen kasvualustan kanssa yhdensuuntaisen voiman, mikä voi saada aikaan soluvasteen. [7]

Nämä mikroympäristön muutosten aikaansaamat soluvasteet ovat välttämättömiä ihmiskehon toiminnalle. Esimerkiksi luukudos alkaa haurastua, jos sen solut eivät koe riittävästi mekaanista kuormitusta [8]. Soluvasteiden ansiosta ei siis tarvitse tutkia kokonaista kudosta, sillä viljeltyjen solujen soluvasteiden perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä kokonaisen kudoksen toiminnasta

In vitro -malleilla halutaan tutkia solujen toimintaa laboratorio-olosuhteissa sovelluksissa, kuten lääketestauksessa, yksilöllisessä lääketieteessä ja tautimallinnuksessa. In vitro -mallit ovat laboratoriossa valmistettuja systeemejä, joiden avulla halutaan tutkia biologisia prosesseja ihmiskehon ulkopuolella. In vitro -mallit perustuvat usein viljeltyihin soluihin, joita kasvatetaan kaksiulotteisina kerroksina. Näiden lisäksi on kehitetty 3D-malleja, jotka mallintavat in vivo -ympäristöä eli kehon ympäristöä paremmin kuin tavallinen 2D-soluviljelmä. In vitro -mallit ovat siis edellytys biologisten prosessien tutkimiseen laboratoriossa viljeltyjen ihmisten solujen avulla. [9]

1.1 Organ-on-a-chip –rakenteet ja soluviljelyn olosuhteiden säätely

Organ-on-a-chip laitteistot ovat edistyksellisiä in vitro -malleja, joiden avulla pyritään mallintamaan kudoksen toimintaa paremmin kuin perinteisellä 2D-viljelymaljalla. Toisin sanoen Organ-on-a-chip -laitteen viljellyt solut siis jäljittelevät elinten soluvasteita olosuhteissa, jotka voidaan luoda vastaamaan ihmiskehoa. [10] Organ-on-chip laitteilla voidaan esimerkiksi muokata solujen kasvuympäristön happipitoisuutta, mutta niillä on myös monia muita käyttökohteita. Organ-on-a-chip -laitteiden avulla voidaan myös tutkia esimerkiksi mekaanisen voiman ja sähköisen tai kemiallisen ärsykkeen vaikutusta soluihin.

Havainnollistetaan organ-on-a-chip -laitteiden muita käyttökohteita happipitoisuuden säätelyn lisäksi muutamalla esimerkillä. Ensimmäisenä esimerkkinä Yun Liun tutkimuksessa [11] on tutkittu mekaanisen voiman vaikutusta soluihin. Tämän tutkimuksen organ-on-a-chipillä viljeltiin indusoiduista pluripotenteista kantasoluista peräisin olevia sydänlihassoluja, fibroblasteja ja verisuonien endoteelisoluja. Artikkelissa raportoitiin, miten viljelmän solut reagoivat ärsykkeeseen eli viljelyliuoksen virtaukseen, jolla pyrittiin jäljittelemään veren virtausta elimistössä. Artikkelin mukaan mikrofluidistisissa kanavissa kasvatetut verisuonien endoteelisolut reagoivat virtaukseen suuntautumalla virtauksen suunnan mukaisesti. Lisäksi viljelyliuoksen virtaus edisti verisuonten endoteelisolujen eheyttä. Kun tämän organ-on-a-chip -laitteen soluille vietiin noradrenaliinia, solujen vaste oli samankaltainen kuin in vivo -sydämen, eli syketiheys kasvoi. Tällä organ-on-a-chipillä voidaan siis mallintaa ihmisen sydämen käyttäytymistä.[11]

Toisena esimerkkinä JaeHee Shinin artikkelissa [12] on tutkittu sähköisen ärsykkeen vaikutusta soluihin. Artikkelissa esiteltiin in vitro -malli, jossa viljeltiin ihmisen välilevyn fibroottisen ulko-osan tulehtuneita soluja. Artikkelin mukaan solujen sähköinen stimulaatio (150mV/mm ja 200Hz) esti tulehduksellisten sytokiinien eritystä sekä alensi soluväliaineen muokkaamiseen liittyvien entsyymien ja matriksin metalloproteinaasi-1:n aktiivisuutta. Näillä tuloksilla osoitettiin, että micro-EI-stimulaatiolla voi olla vaikutusta tulehduksellisissa rappeumasairauksissa. Tällä micro-EI-chip laitteella voidaan siis jäljitellä ihmisen kudosten vastetta sähköiseen stimulaatioon. [12]

Mikrofluidistiikan avulla voidaan hallita soluviljelmän mikroympäristöä eli solusta mikrometrien etäisyydellä olevaa aluetta tarkasti [2]. Toisin sanoen mikrofluidistiikan

avulla voidaan viedä soluviljelmään erittäin pieniä määriä kaasua tai nestettä samalla tietäen sen määrän ja sijainnin. Organ-on-a-chip laitteella voidaan siis esimerkiksi tehdä solujen kaasumikroympäristö hypoksisesksi viemällä viljelmään vähähappista kaasua. [2] Mikrofluidistiset organ-on-a-chip -laitteet edellyttävät kuitenkin valmistusmateriaalilta tiettyjä ominaisuuksia, kuten bioyhteensopivuutta ja kaasujen läpäisevyyttä, jotta laitteen toiminta vastaisi haluttuja biologisia olosuhteita.

Polydimetyylisiloksaani eli PDMS on yleisin materiaali mikrofluidistisissa sovelluksissa sen erinomaisen kaasujen läpäisevyyden, bioyhteensopivuuden, lämmönkeston ja optisen läpinäkyvyyden ansiosta [13]. Nämä ominaisuudet mahdollistavat, että kaasut pääsevät mikrokanaviststa kammioihin, ja että soluja pystytään tarkkailemaan materiaalin läpi. Yksi PDMS:n haasteista on kuitenkin sen hydrofobisuus ja huono kastuvuus, jonka takia soluilla on vaikeuksia kiinnittyä PDMS pinnalle [6]. PDMS-pinta voidaan kuitenkin tehdä hydrofiiliseksi käsittelemällä se happiplasmalla, joka muodostaa hydrofiilisiä silnanoli (Si-OH) ryhmiä PDMS:än pinnalle. Tämä tekee pinnasta hydrofiilisen, jonka seurauksena solut kiinnittyvät pintaan paremmin. Lisäksi plasmakäsittelyn avulla PDMS-pintoja voidaan kiinnittää toisiinsa, sillä plasmakäsitellyt PDMS-pinnat voivat sitoutua toisiinsa kovalenttisesti ja pysyvästi. [13] Tämän sitoutumisprosessin aikana PDMS pintojen silanoliryhmien hydroksyyliryhmät muodostavat keskenään vetysidoksia. Silanoli ryhmät voivat lisäksi osallistua kondensaatioreaktioon muodostaen siloksaani Si-O-Si sidoksia. Tämä kovalenttinen sidos mahdollistaa pintojen pysyvän kiinnittymisen. [13] Organ-on-chip -laitteessa viljeltyjen solujen mikroympäristö voidaan siis tehdä hypoksiseksi ohjaamalla viljelmään hapetonta kaasua diffuusiolla PDMS-materiaalista valmistetun mikrofluidistisen kanavan kautta.

Mikrofluidistiikan lisäksi muita yleisiä metodeja hypoksisen ympäristön luomiseen soluille ovat esimerkiksi hypoksiakaappi ja happipitoisuutta muokkkaavat materiaalit. Ensimmäisenä esimerkkinä Zachary R. Sitten [14] artikkelissa on esitetty happiympäristön hallitsemiseen kolme-lohkoinen hypoksia kaappi, jossa voidaan viljellä soluja. Kaappi on valmistettu akryylistä, koska se on kaasutiivis, kevyt ja läpinäkyvä materiaali. Artikkelin hypoksia kaappi koostuu kolmesta tilavuudeltaan yhtä suuresta ilmatiiviistä osiosta, joiden happipitoisuutta voidaan säädellä erikseen.[14]

Toisena esimerkkinä Drago Stickerin [15] tutkimuksessa on esitelty biosirujen valmistukseen soveltuva materiaali, johon on integroitu happea sitova tioli-ene-epoksipolymeeri. Tämä polymeeri pystyy artikkelin mukaan poistamaan liuennutta happea alle 1 hPa tasolle. Tämän materiaalin hapenpoistonopeutta voidaan säätää

muuttamalla mikrofluidistisen kanavan pinta-ala tilavuussuhdetta, kovettumisaikaa ja valmistusprosessin lämpötilaa. Korkeassa lämpötilassa kovetettu materiaali poistaa happea vähemmän kuin matalammassa lämpötilassa kovetettu.[15] Näiden menetelmien avulla voidaan muokata solujen kaasuympäristöä, mutta lisäksi on tärkeää pystyä mittaamaan siinä vallitseva happipitoisuus.

Ratiometrisellä happikuvantamismenetelmällä voidaan mitata organ-on-a-chipin kammioiden happipitoisuutta. Ratiometriset mittaukset mahdollistavat happipitoisuuden muutoksen seuraamisen kammion tietyssä kohdassa reaaliajassa [16]. Birgit Ungerböckin tutkimuksessa [16] on esitetty korkean resoluution happikuvantamismenetelmä, joka on osoitettu sopivaksi mikrofluidististen ympäristöjen 2D-happikuvantamiseen [16]. Tämä tutkimuksessa esitelty happikuvantaminen on mahdollista CCD-kameralla, jossa on oma kanava vihreän- ja punaisen värin aallonpituuksille. Tällä kameralla kuvataan anturifilmiä, joka sisältää happipitoisuuteen reagoivaa punaista väriainetta (platina(II)-5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorifenyyli)-porfyriiniä (PtTFPP) (Livchem Logistics GmbH, Frankfurt, Saksa)) ja referenssiväriainetta, joka emittoi samaa vihreän valon aallonpituutta riippumatta happipitoisuudesta [16]. Tällöin punaisen värin intensiteettiä mittaava kanava tuottaa happiherkän intensiteettikuvan, kun taas vihreän valon intensiteettiä mittaava kanava tuottaa referenssikuvan.

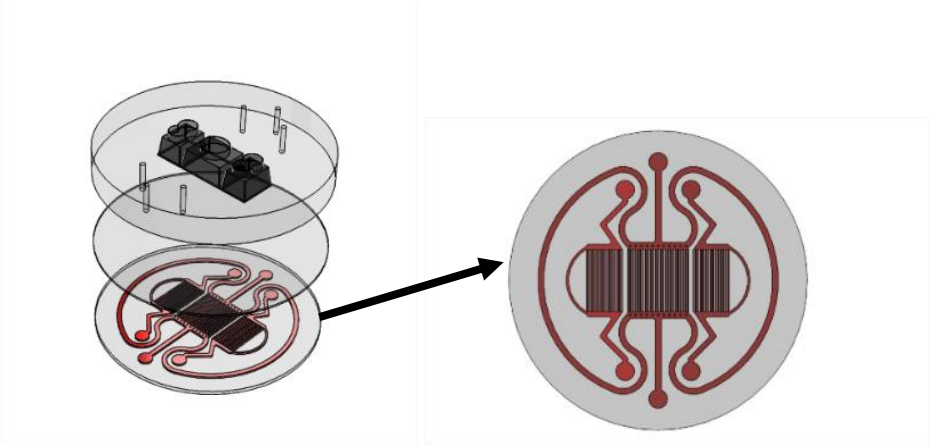
Tämän happimittaus menetelmän haittana on kuitenkin sen herkkyys optisen järjestelmän virheille, jotka aiheuttavat signaalinvaihteluita. Näitä virheitä ovat esimerkiksi valonlähteen epähomogeenisuus, havainnointijärjestelmän epätasainen herkkyys tai fluorisoivien koettimien epätasainen jakautuminen tunnistusmatriisissa. Laskemalla näiden punaisen ja vihreän kuvan suhde saadaan suhdelukuun perustuva kuva, joka on riippumaton aiemmin mainituista virhelähteistä. [14]

Jotta kammion pohjalla olevan punaisen väriaineen intensiteettimuutoksesta voidaan määrittää happipitoisuuden arvoja, tulee punaisen väriaineen intensiteetit kalibroimalla yhdistää reaaliseen arvoon. Tämä filmien kalibrointi tehdään viemällä kammioon kaasuseoksia, joiden happipitoisuudet ovat etukäteen tiedossa. Paras kalibrointitulos saadaan aikaan, jos punaisen ja vihreän kanavan suhde määritetään hapettomissa ja täysin hapen kyllästämissä olosuhteissa [16]. Kalibroinnin jälkeen havaittuja punaisen värin intensiteettiarvoja voidaan verrata kalibrointidataan. Kun väriaineita sisältävä filmi integroidaan organ-on-a-chipin kammion pohjalle, voidaan siis seurata reaaliajassa, miten happipitoisuus soluviljelykammion pohjalla muuttuu.

Tässä työssä käytetty organ-on-a-chip -laite yhdistää tavalliseen in vitro -soluviljelmään mikrofluidistisen kanavarakenteen, joka mahdollistaa erittäin pienten fluidimäärien eli nesteiden tai kaasujen määrän hallinnan. Laite on suunniteltu kaasujen virtaukselle, ja sen kanavarakenne on sijoitettu soluviljelykammion alapuolelle PDMS-kalvolla erotettuna. Kalvon tarkoitus on läpäistä kaasuja ja näin ohjata ne kulkemaan diffuusion avulla soluviljelmään. Laitteen happipitoisuutta säädellään siis syöttämällä laitteen alimman kerroksen mikrofluidistiseen kanavarakenteeseen haluttua kaasuseosta, joka kulkee diffuusiolla laitteen ylimmän kerroksen soluviljelykammioihin. Tässä työssä käytetty organ-on-a-chip -laite ja sen mikrofluidistinen kanavarakenne on esitetty kuvassa 1. Tämän laitteen alimman kerroksen mikrofluidistinen kanavarakenne koostuu kolmesta erillisestä mikrokanavien sarjasta, joiden kautta kaasuseokset siirtyvät soluviljelmään [2].

Keskitytään etenkin kammioiden alla olevaan mikrofluidistiseen kanavarakenteeseen, koska kaasut kulkevat sen kautta solujen kasvualustalle. Tässä rakenteessa on kolme erillistä mikrokanavien sarjaa. Kaasut tuodaan mikrokanavia pitkin näihin mikrokanavien sarjoihin, jotka ohjaavat kaasut diffuntoitumaan ohuen kalvon läpi soluviljelykammioihin. Kaisa Tornbergin tutkimus [2] on osoittanut, että hapen pitoisuuksia soluviljelmän pinnalla voidaan säätää muutamassa minuutissa ja laite pystyy luomaan soluille hypoksisen ympäristön. Yhdistämällä tämä mikrofluidistinen kanavarakenne avoimen kammion viljelylaitteeseen, voidaan viljellä eri solutyyppejä omissa erillisissä kammioissaan. Tämän monisoluisen viljelmän happipitoisuutta voidaan säädellä erikseen kolmessa osastossa viemällä eri kaasuseoksia kuhunkin kammioon kanavarakenteiden kautta.

On kuitenkin vielä epäselvää, miten ja miten paljon mikrofluidistisen kanavarakenteen leveyden muuttaminen vaikuttaa laitteen happipitoisuuden säätelyn tarkkuuteen. Tämän työn tavoitteena on selvittää, onko happimittausten tuloksissa eroja, kun ne suoritetaan kahdelle laitteelle, joiden mikrokanavarakenteet ovat erilevyiset. Vertailun kohteena on kaksi laitetta: toinen; jonka kaasukanavat ovat 20 µm leveitä, ja toinen, jossa kanavien leveys on 200 µm.



Kuva 1. *Organ-on-a-chip -laitteen rakenne ja mikrofluidistinen kanavarakenne*

2. MATERIAALIT JA METODIT

Tässä työssä valmistettiin PDMS-materiaalia, josta rakennettiin organ-on-a-chip -laitteita kahdella eri kanavaleveydellä (20 µm ja 200 µm). Valmiiseen laitteeseen asetettiin happianturi, joka toimi indikaattorina happipitoisuuden muutokselle. Valmiiden laitteiden kaasukanavista valikoitiin parhaat tarkastamalla kanavat mikroskoopilla. Kanavat, joissa näkyi merkittäviä poikkeamia, kuten ilmakuplia tai karvoja jätettiin pois mittauksista. Mikroskoopissa ehjän näköisistä kanavista valikoitiin parhaat mittaamalla niiden läpi tulevan kaasun virtausnopeutta. Lopullinen happimittaus suoritettiin ehjille kanaville, joiden läpi virtasi kaasua. Tämän työn vaiheet ovat siis PDMS-materiaalin valmistus, Organ-on-a-chip -laitteen rakennus ja happimittaus.

Tässä työssä käytetty organ-on-a-chip -laite koostuu kolmesta päällekkäin kiinnitetystä PDMS kerroksesta: mikrofluidistisesta kanavarakenteesta, läpinäkyvästä PDMS kalvosta ja kammiorakenteesta, jonka kolme kammiota on yhdistetty toisiinsa mikrotunneleilla *[17]*. Laitteen alimman kerroksen mikrofluidistinen kanavarakenne koostuu kolmesta erillisestä mikrokanavien sarjasta, joiden kanavien etäisyys toisiinsa nähden on aina 20 µm [2]. Tässä työssä käytettiin kanavia, joiden seinämien paksuus oli aina 20 µm ja kanavien leveys oli 20 µm tai 200 µm. Tämän mikrofluidistisen kanavarakenteen erillisissä mikrokanavien osastoissa on lisäksi 100 µm korkea ohituskanava, joka estää kalvon taipumisen vähentämällä kaasukanavien sisääntulon ja ulostulon välistä paine-eroa. Koko mikrofluidistinen kanavarakenne on suljettu päältä 20 µm paksuisella Silpuran-kalvolla (SILPURAN® Film 2030 250/20, Wacker Chemie AG, Saksa), jonka läpi mikrokanaviston kaasut pääsevät diffuntoitumaan kammiorakenteisiin.

2.1 PDMS-materiaalin ja kaasukanavien valmistus

PDMS valmistettiin sekoittamalla elastomeeripohjaa ja kovetusainetta suhteessa 10:1. Aineet sekoitettiin setrifugilla (DAC 150.1 FVZ, Hauschild SpeedMixer, Saksa) nopeudella 1500rpm yhden minuutin ajan. Sekoituksen aikana syntyneet ilmakuplat poistettiin vakuumissa. Ilmakuplaton PDMS kaadettiin pyöreän SU-8 piilevyn päälle, jonka pinnalla oli monikerroksisella SU-8-pikamallinnusmenetelmällä tehty mikrofluidistisen kanavarakenteen muotti. Kiekon pinnalla olevat kohoumat toimivat muottina kaasukanavistolle. PDMS:n levitykseen käytettiin spin coating -menetelmää, jossa SU-8-muotti asetetiin spinneriin ja muottia pyöritettiin Taulukon 1. mukaisesti.

Levityksen jälkeen PDMS-kerroksen korkeus oli noin 240-280 µm. Piilevyn päällä olevaa PDMS:ää kovetettiin uunissa vähintään 10 tunnin ajan lämpötilassa 60°C. Tässä ajassa voitiin olettaa, että elastomeeripohja ja kovetusaine ehtivät reagoida täydellisesti ja PDMS oli saavuttanut kiinteän olomuotonsa. Uunista saatiin PDMS-levy, johon oli upotettu kaasukanavat.

Taulukko 1: PDMS päällysteisen SU-8-muotin spin coattauksen vaiheet

Vaihe	kesto (s)	pyörimisnopeus (rpm)
1.	20	100
2.	30	300
3.	10	100

2.2 Organ-on-a-chip -rakenteen valmistus

Uunista tulleesta PDMS-levystä leikattiin kanavarakenteet irti käyttämällä stanssia. Lisäksi stanssattiin auki kanavarakenteen sisääntulot sekä ulostulot. Tämän jälkeen nämä valmistetut rakenteet sekä 20 µm paksu Silpuran-kalvo (SILPURAN® Film 2030 250/20, Wacker Chemie AG, Saksa) kiinnitettiin toisiinsa happiplasmalla (Pico, Diener Electronic GmbH+Co. KG, Ebhausen, Saksa).

Kalvolla suljettu kanavarakenne kiinnitettiin happiplasmalla yhteen aiemmin julkaistun avoimen kammion viljelylaitteen kanssa, joka koostuu kolmesta kammiosta, jotka ovat yhteydessä toisiinsa mikrokanavilla *[17]*. Kasatun laitteen sisääntulo- ja ulostulokanavat stanssattiin auki. Tämä valmiiksi kasattu rakenne kiinnitettiin puhdistetulle lasilevylle happiplasmalla. Rakenne kiinnitettiin lasilevylle kammiot ylöspäin, jolloin sirurakenne oli valmis.

Valmiin organ-on-a-chip -laitteen kammioiden pohjalle kiinnitettiin happiplasmalla happianturi, jonka halkaisija oli 1,5 mm. Happianturi leikattiin filmistä, joka sisältää happeen reagoivaa punaista väriainetta(platina(II)-5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorifenyyli)-porfyriiniä (PtTFPP) (Livchem Logistics GmbH, Frankfurt, Saksa). Tämä valmiiksi koottu rakenne plasmattiin, jotta sen pinta saatiin aktivoitua. Tämän jälkeen laitteen kolme kammiota pipetoitiin täyteen Milli-Qvettä. Milli-Q veden oli annettu

ilmoittua vähintään viikon ajan, jotta sen happipitoisuus saatiin lähelle huoneilman happipitoisuutta, jossa happimittaus suoritetaan. Reunimmaisiin kammioihin pipetoitiin noin 30 µl ja keskimmäiseen noin 50 µl Milli-Q vettä. Pipetoinnin jälkeen varmistettiin, ettei kammion ulkopuolelle ole jäänyt vettä, joka voi haitata teipin kiinnittymistä. Lopuksi kammiot suljettiin päältä akryyliteipillä.

Saman laitteen kolmen kaasukanaviston kanavaleveydet ovat samat, joten tuloksen kannalta ei ollut merkitystä mikä niistä valittiin happimittaukseen. Teipillä suljetun laitteen kaasukanavien laatua tutkittiin mittaamalla kanavan läpi virtaavan kaasun virtausnopeutta. Ensin mitattiin suoraan kaasupullosta virtaavan kaasun virtausnopeus virtausmittarilla. Tämä tehtiin yhdistämällä kaasupullosta tuleva letku virtasmittarin sisääntuloletkuun. Seuraavaksi jokaisen kanavan läpi virtaavan kaasun nopeus mitattiin yksitellen kiinnittämällä kaasupullosta tuleva letku tiiviisti sisääntuloon ja virtausmittari ulostuloon. Jos virtausnopeus kanavan läpi oli merkittävästi pienempi kuin pullosta tulevan kaasun virtausnopeus, se saattoi viitata vuotokohtaan kanavassa. Happimittaukseen valittiin kanava, jonka läpi tulevan kaasun virtausnopeus oli mahdollisimman lähellä suoraan kaasupullosta tulevan kaasun virtausnopeutta. Näitä tuloksia ei tähän työhön ole kerätty.

2.3 Happipitoisuuden mittaus

Ennen happimittausta laitteistolle suoritettiin kalibrointi, jolla saatiin luotua referenssikuvat, joihin verrata mittauksessa kuvattuja väriaineen intensiteetin muutoksia. Kalibrointia varten laite kiinnitettiin mikroskoopin näytealustalle ja mikroskooppiin kiinnitettiin led valo. Aikaisemmin happimittaukseen valittu kanava kohdistettiin mikroskoopin kameran fokusalueelle ja siitä otettiin kuvia 2 minuutin välein kalibroinnin aikana. Tässä työssä kalibrointiin käytettiin kolmea eri happipitoisuuden omaavaa kaasuseosta, joista kutakin syötettiin kanavistoon noin tunnin ajan.

Kalibrointi toteutettiin nelivaiheisena prosessina, joista kunkin kesto oli noin yksi tunti. Oletuksena oli, että tunnin aikana kammion pohja ehtii saavuttaa lähes saman happipitoisuuden kaasupullosta tulevan kaasuseoksen kanssa ja tästä punaisen värin intensiteetistä saatiin tiettyä happipitoisuutta vastaavat kalibrointipisteet. Lisäksi varsinaisen happimittauksen jälkeen kammioon syötettiin 0 % happikaasuseosta ja injektoitiin natriumsulfiittia, joka laskee happipitoisuuden noin nollaan. Tästä saatiin hapetonta ympäristöä vastaava kalibrointipiste. Natriumsulfiitti injektoitiin kammioon vasta kaasuseosten syöttämisen jälkeen, ettei sen jäämät vaikuta mittaustuloksiin.

Taulukossa 2 on esitetty kalibroinnin vaiheet yleisesti. Kalibroinnin ensimmäisessä vaiheessa kanavaan syötettiin kaasua, jonka happipitoisuus oli 19 %. Tämän jälkeen kaasua, jonka happipitoisuus oli 1 %, kolmannessa vaiheessa 5 %, ja lopuksi palattiin takaisin 19 %:n happipitoisuuteen. Jokainen mainittu kaasuseos sisälsi mainitun happipitoisuuden lisäksi 5 % hiilidioksidia ja jäljelle jäävä tilavuus oli täytetty typellä. Kalibroinnin alkaessa mikroskoopin kamera ajastettiin ottamaan kuva anturifilmistä kahden minuutin välein. Kaasuseos vaihdettiin tunnin välein, jotta happipitoisuus laitteessa ehti stabiloitua. Lisäksi happimittauksen jälkeen otettiin kuva anturista, kun kammioon oli injektoitu natriumsulfiittia. Näin saatiin kuva anturista hapettomassa ympäristössä kalibrointia varten.

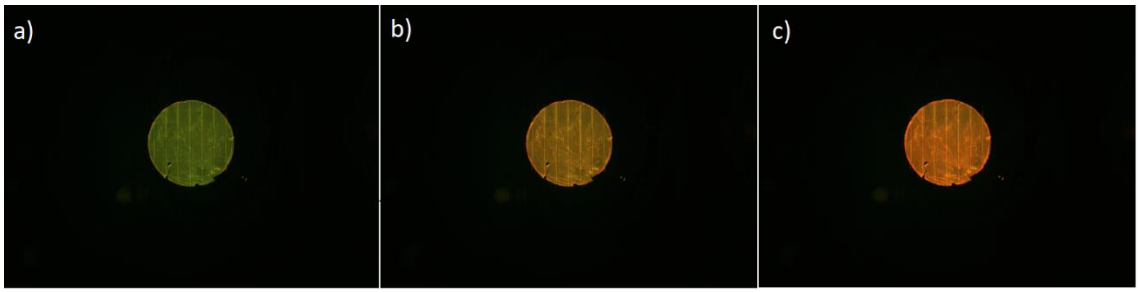
Taulukko 2: Happimittausta varten tehdyn kalibroinnin yleiset vaiheet ja natriumsulfiitin injektointi kalibrointia varten happimittausten jälkeen

vaihe	kaasuseoksen happipitoisuus (%)	kesto (min)
1.	19	60
2.	1	60
3.	5	60
4.	19	60
5.	0 % + natriumsulfiitti	

Tulosten luotettavuuden varmistamiseksi ainoa valonlähde kalibroinnin aikana oli mikroskoopin oma valo, jotta saadut kuvat säilyivät vertailukelpoisina myöhemmistä happimittauksista saatavien kuvien kanssa. Kalibroinnin tavoitteena oli saada referenssikuvat punaisen väriaineen intensiteetistä kaasupullojen tiedossa olevissa happipitoisuuksissa. Kuvissa 2a-c on esitetty kalibroinnin aikana mikroskoopilla otettuja kuvia samasta anturifilmistä kolmessa eri stabiloituneessa happipitoisuudessa. Siirryttäessä kuvasta 2a kuvaan 2c, punaisen värin intensiteetti kasvaa, kun kanavaan syötetyn kaasun happipitoisuus pienenee.

Taulukossa 2 on esitetty happimittausta varten tehtävän kalibroinnin vaiheet yleisesti, mutta kalibroinnin aikana tapahtuneiden virheiden takia tämän työn kalibroinnit poikkeavat normaalista. Tämän työn kalibroinnit on numeroitu 1-3 ja ne vastaavat

happimittauksia 1-3. Kalibroinnin 1 aikana 5 % kaasupullo ei toiminut, jonka seurauksena yksi luotettava kalibrointipiste jäi puuttumaan. Kalibroinnin 3 lopussa 19 % happikaasupullo unohtui kiinni, jonka seurauksena happipitoisuus jäi lähemmäs arvoa 5 %, joka oli edellisen kanavaan syötetyn kaasuseoksen happipitoisuus.



Kuva 2. Soluviljelykammion pohjalle asetettu anturifilmin pala, jota on kuvattu kalibroinnin aikana, kun happipitoisuus on ehtinyt stabiloitua. Kuvassa a) kaasukanavistoon on viety 60 minuutin ajan kaasuseosta, jonka happipitoisuus on 19 %, kuvassa b) 56 minuutin ajan kaasuseosta, jonka happipitoisuus on 5 % ja kuvassa c) 56 minuutin ajan kaasuseosta, jonka happipitoisuus on 1 %.

Kalibroinnin jälkeen aloitettiin happimittaus. **Happimittaukset 1 ja 2** on tehty laitteelle, jonka kanavaleveys on 20 µm, kun taas **happimittaus 3** on tehty laitteelle, jonka kanavaleveys on 200 µm. Happimittausten tavoitteena on verrata kahden eri levyisen kaasukanaviston omaavan organ-on-a-chip -laitteen kykyä säädellä happipitoisuutta laitteen kammiossa. Laitteiden happipitoisuuden säätelyn tarkkuutta selvitettiin ratiometrisellä happikuvantamisella, joka tehtiin kolmelle vertailtavalle laitteelle yksitellen

Happimittaukseen käytettiin kaasuja, joiden happipitoisuudet olivat 19 % ja 0 %. Happimittaus toteutettiin neljässä vaiheessa. Taulukoissa 3-5 on esitetty Happimittausten 1-3 aikana kanavaan syötettyjen kaasuseosten happipitoisuudet ja kunkin vaiheen kesto. Erona happimittauksiin 2 ja 3 mittauksen 1 alussa kanavistoon ei syötetty kaasua, jonka happipitoisuus on 19 %, vaan kanavistoon syötettiin ajanhetkestä 0 alkaen 0 % kaasuseosta. Ennen happimittausta 1 laite kuitenkin kalibroitiin. Kalibroinnin viimeisessä vaiheessa kanavistoon syötettiin tunnin ajan kaasua, jonka happipitoisuus on 19 %, eli happipitoisuus laitteessa ennen happimittausta on stabiloitunut lähelle arvoa 19 %, kuten mittauksissa 2 ja 3. Happimittausta 1 voidaan siis

verrata melko luotettavasti muiden mittausten vaiheeseen, jossa kanavaan syötetään kaasua, jonka happipitoisuus on 0 %. Myös taulukoissa 4 ja 5 esitettyjen mittausten 2 ja 3 vaiheiden kestossa on pieniä eroja, mutta erojen ollessa pieniä tuloksia voidaan edelleen pitää vertailukelpoisina.

Taulukko 3: Happimittauksen 1 vaiheiden kesto ja kanavaan syötettyjen kaasujen happipitoisuus

vaihe	kaasuseoksen happipitoisuus (%)	kesto (min)
1.	0	11

Taulukko 4: Happimittauksen 2 vaiheiden kesto ja kanavaan syötettyjen kaasujen happipitoisuus

vaihe	kaasuseoksen happipitoisuus (%)	kesto (min)
1.	19	10
2.	0	29
3.	19	40

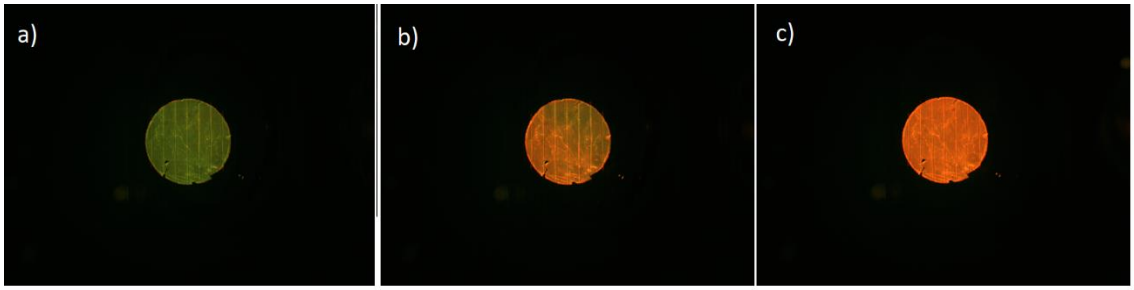
Taulukko 5: Happimittauksen 3 vaiheiden kesto ja kanavaan syötettyjen kaasujen happipitoisuus

vaihe	kaasuseoksen happipitoisuus (%)	kesto (min)
1.	19	10
2.	0	31
3.	19	30

Happimittauksessa 1 mikroskoopilla otettiin kuva anturista kahden sekunnin välein ja mittauksissa 3 ja 4 30 sekunnin välein. Jokaisesta mittauksesta saaduista kuvista määriteltiin yksitellen anturin vihreän ja punaisen värin intensiteettien suhde käyttäen mittauksia varten luotua MATLAB ohjelmistoa Mikro ja Nanosysteemien tutkimusryhmässä. Tämän suhdeluvun ja kunkin anturifilmin omien kalibrointiparametrien perusteella voitiin määrittää arvio jokaisen kuvan pinnan happipitoisuuden arvolle erikseen. Näiden laskettujen happipitoisuuden arvojen perusteella saatiin selville, miten happipitoisuus pinnalla muuttuu ajan suhteen.

3. TULOKSET

Kuvassa 3 on esitetty kuvia Organ-on-a-chipin kammion pohjalle asetetusta anturifilmistä happimittauksen 3 aikana, kun laitteeseen on syötetty kaasua taulukon 3 mukaisesti. Kuvissa on esitetty kuvia anturifilmistä, kun happipitoisuus on ehtinyt stabiloitua. Siirryttäessä kuvasta 3a kuvaan 3c punaisen värin intensiteetti kasvaa, kun happipitoisuus laitteessa pienenee.

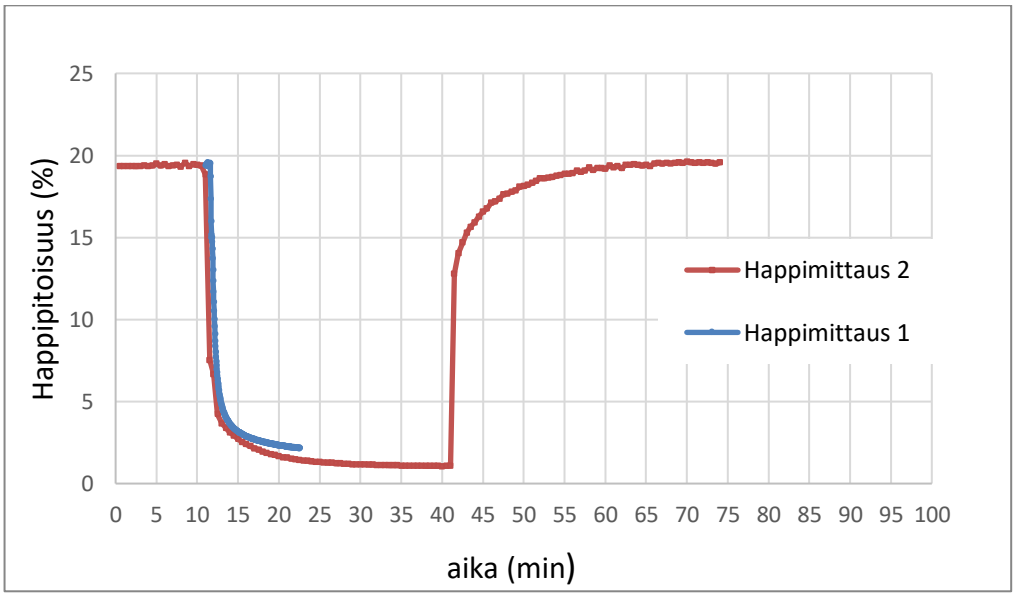


Kuva 3. Soluviljelykammion pohjalle asetettu anturifilmin pala, joka on kuvattu, kun happipitoisuus on stabiloitunut. Kuvassa a) kaasukanavistoon on viety 9 minuutin ajan kaasuseosta, jonka happipitoisuus on 19 %, kuvassa b) 30 minuutin ajan kaasuseosta, jonka happipitoisuus on 0 % ja kuvassa c) kammioon on injektoitu natriumsulfiittia, joka laskee happipitoisuuden lähelle nollaa.

Kuvassa 4 on esitetty happimittausten 1 ja 2 happipitoisuudet ajan suhteen, kun kanavaan on syötetty kaasua happimittauksessa 1 taulukon 3 esittämällä tavalla ja happimittauksessa 2 taulukon 4 esittämällä tavalla. Nämä happimittaukset 1 ja 2 ovat tehty laitteille, joiden kaasukanavan leveys on kummassakin 20 µm. Happimittauksessa 1 kanavistoon syötettiin 0 % happiseosta ajanhetkestä 0 alkaen. Tässä kuvassa 4 happimittauksen 1 kuvaaja on siirretty alkamaan ajanhetkestä 11,033 min, jolloin mittauksessa 2 kanavistoon alettiin syöttää 0 % kaasua. Mittauksen 1 kuvaajaa siirrettiin sitä vastaavaan kohtaan happimittauksessa 2, jotta kuvaajia on helpompi verrata keskenään.

Kuvasta 4 nähdään, että happimittausten 1 ja 2 kuvaajat ovat keskenään lähes saman muotoisia. Molempien happimittausten kuvaajat laskevat matalimpaan happipitoisuuden

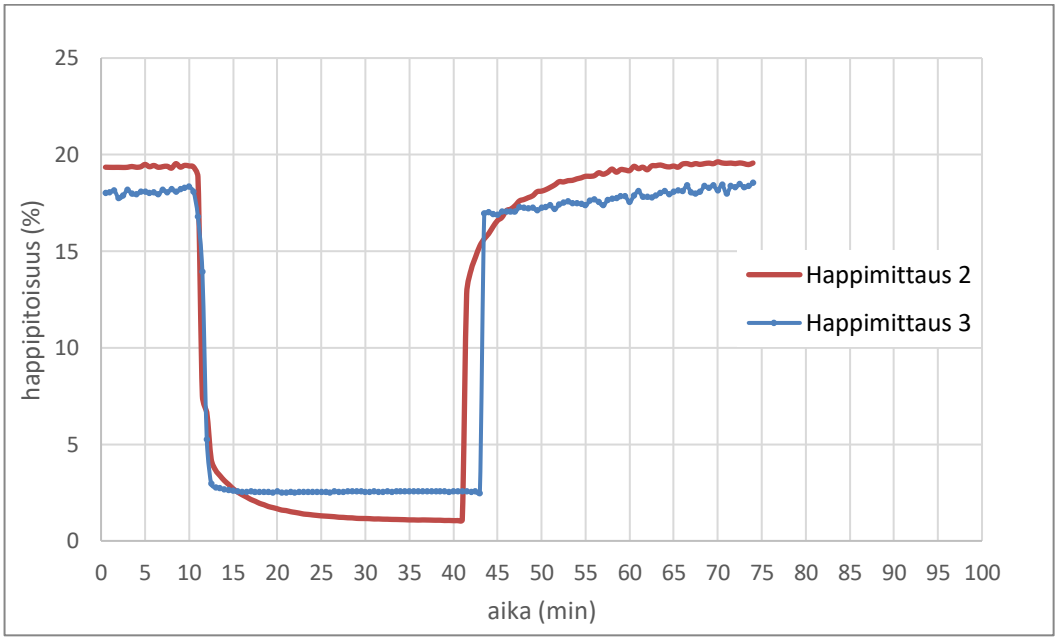
arvoon kaarevaa käyrää pitkin, jolloin happipitoisuuden lasku on aluksi nopeaa, mutta hidastuu happipitoisuuden lähestyessä nollaa. Happimittauksen 2 kuvaaja myös nousee korkeimpaan arvoonsa kaarevaa käyrää pitkin, jossa happipitoisuuden nousu on ensin nopeaa ja hidastuu happipitoisuuden kasvaessa.



Kuva 4. Happimittausten 1 ja 2 (laitteistoille, joiden kanavaleveys on 20 µm) happipitoisuus ajan suhteen

Kuvassa 5 on esitetty happimittausten 2 ja 3 happipitoisuudet ajan suhteen, kun kanavaan on syötetty kaasua happimittauksessa 2 taulukon 4 ja happimittauksessa 3 taulukon 5 esittämällä tavalla. Happimittaus 2 on tehty laitteelle, jonka kanavaleveys on 20 µm ja happimittaus 3 laitteelle, jonka kanavaleveys on 200 µm. Happimittauksen 2 kuvaaja happipitoisuus laskee matalimpaan arvoonsa hitaammin kuin happimittauksen 3 kuvaaja. Tämä voidaan huomata kuvaajien erilaisesta muodosta. Happimittauksen 2 kuvaaja laskee matalimpaan happipitoissuuteen kaarevaa viivaa pitkin, jossa happipitoisuuden lasku on nopeampaa alussa, mutta hidastuu lopussa. Happimittauksen 3 kuvaaja laskee alhaisimpaan happipitoisuuden arvoon nopeasti muodostaen kuvaajaan lähes suoran kulman. Lisäksi happimittauksen 2 suurin happipitoisuuden arvo on suurempi kuin mittauksen 3 suurin happipitoisuus ja mittauksessa 2 päästään lähemmäs happipitoisuuden arvoa 0 % kuin mittauksessa 3. Samanlainen ero kuvaajien muodossa nähdään, kun happipitoisuus nousee. Happimittauksen 2 kuvaaja nousee korkeimpaan arvoonsa kaarevaa käyrää pitkin, jossa happipitoisuuden nousu on

nopeampaa alussa, mutta hidastuu happipitoisuuden lähestyessä maksimiarvoa. Happimittauksen 3 kuvaaja puolestaan nousee nopeasti maksimiarvoonsa muodostaen lähes suoran kulman.



Kuva 5. Happimittausten 2 (laitteistolle, jonka kanavaleveys on 20 µm) ja 3 (laitteistolle, jonka kanavaleveys on 200 µm) happipitoisuus ajan suhteen

3.1 Tulosten pohdinta

Kalibrointien aikana tapahtui virheitä, jotka voivat vaikuttaa kuvaajiin. Ensimmäisenä happimittauksen 3 kalibroinnin aikana 19 % happikaasupullo ei ollut auki, jonka seurauksena kalibroinnista puuttuu yksi luotettava piste. Tämän seurauksena happimittauksen 3 kalibrointi on erilainen kuin muissa happimittauksissa, ja voi vääristää sen tuloksia. Kalibrointipisteen puuttumisen ei kuitenkaan pitäisi vaikuttaa kuvaajan muotoon, eli kuvassa 5 esitettyjen happimittausten 2 ja 3 kuvaajien muodon voidaan todeta olevan erilaisia puutteellisesta kalibroinnista huolimatta. Kuvaajan maksimi ja minimikohtiin kalibrointipisteet puolestaan voivat vaikuttaa, eli voi olla mahdollista, että kuvassa 5 näkyvät happipitoisuuden arvot mittaukselle 3 eivät vastaa todellisia happipitoisuuden arvoja.

Toisena virheenä happimittauksen 1 kalibroinnin aikana 5 % happikaasupullo ei toiminut, jonka seurauksena kalibrointi ei ole ideaalinen. Tämä kalibrointipisteen puuttuminen voi vaikuttaa siihen, miten hyvin kalibrointidatan perusteella lasketut happipitoisuuden arvot vastaavat todellisia arvoja. Voidaan kuitenkin olettaa, ettei kalibroinnin epätäydellisyys vaikuta juurikaan kuvaajan muotoon.

Kaisa Tornbergin tutkimuksessa [2] on osoitettu, että tässä työssä käytetyn organ-on-a-chip -laitteen avulla voidaan muuttaa soluviljelykammioiden happipitoisuutta erikseen kolmessa eri osiossa. Tornbergin tutkimuksessa on käytetty laitetta, jonka kaasukanavien leveys on 2 µm, eli kaasukanavat ovat kapeammat kuin tässä työssä käytettyjen laitteiden kanavat. Tornbergin artikkelissa on esitetty tämän työn kuvia 4 ja 5 vastaava kuvaaja, jossa happipitoisuus muuttuu ajan funktiona kaarevaa kuvaajaa pitkin. Artikkelissa esitetty kuvaaja vastaa muodoltaan enemmän tämän työn kuvassa 5 esitettyä happimittauksen 2 kuvaajaa kuin happimittauksen 3 kuvaajaa.

Tämän lisäksi kuvan 4 Happimittauksen 1 ja 2 kuvaajat vastaavat melko hyvin toisiaan. Tästä voidaan päätellä, että mittaustulos on melko luotettava, koska kuvaajan samanlainen muoto toistuu kahdella eri mittauksella. Molemmissa kuvan 4 kuvaajissa happipitoisuus laskee kaarevaa käyrää pitkin kohti matalinta happipitoisuuden arvoa. Tämä tukee oletusta siitä, että kapeampaa kanavarakennetta käyttäessä happipitoisuus laskee kaarevaa käyrää pitkin.

Tarkastellaan ensin matalimpia happipitoisuuden arvoja happimittauksissa 2 ja 3, joiden happimittausten kuvaajat on esitetty kuvassa 5. Happimittauksessa 3 matalin saavutettu happipitoisuus on noin 2,55 %, kun taas happimittauksessa 2 vastaava arvo on noin 1,05 %. Aivohalvauksessa happipitoisuus hypoksisen kudosalueen ytimessä voi laskea lähes nollaan [3]. Tämän perusteella happimittauksessa 3 saavutettu alin happipitoisuuden arvo on melko korkea verrattuna aivohalvauksen tilanteeseen. Happimittauksessa 2 saavutettu happipitoisuuden arvo 1,05 % on puolestaan jo lähempänä nollaa, ja vastaa näin ollen paremmin aivohalvauksen tilannetta. Happimittauksen 3 kalibroinnin aikana 19 % happikaasupullo ei ollut auki, joten kalibroinnista puuttui yksi luotettava piste. Tämän takia on mahdollista, että happimittauksen 3 matalin arvo voi kuitenkin todellisuudessa olla matalampi kuin kuvan 5 kuvaajan perusteella.

Tarkastellaan seuraavaksi happipitoisuuden laskun nopeutta happimittauksissa 2 ja 3, joiden happimittauskuvaajat on esitetty kuvassa 5. Happimittauksen 2 laitteistolla kestää noin 20 minuuttia päästä matalimpaan arvoonsa, kun happimittauksen 3 laitteiston happipitoisuus laskee matalimpaan arvoonsa noin kolmessa minuutissa. Iskeemisessä

aivohalvauksessa happipitoisuus voi laskea nollaan muutamassa minuutissa [18]. Tämän perusteella happimittauksen 2 nopeus ei ehkä ole riittävä mallintamaan aivohalvausta tarkasti. Puolestaan happimittauksessa 3 happipitoisuus laskee matalimpaan arvoonsa noin kolmessa minuutissa, joka on lähempänä aivohalvauksen tilannetta.

Organ-on-a-chip -laitteistot ovat kehitetty solun mikroympäristön tarkkaan hallintaan, minkä takia on tärkeää ottaa huomioon mikroskopoinnin helppouteen vaikuttavat asiat. Tämä on tärkeää, jotta voidaan seurata miten solut reagoivat ympäristön muutoksiin. PDMS:än läpinäkyvyys ja optiset ominaisuudet mahdollistavat organ-on-a-chip -laitteella viljeltyjen solujen tarkkailun mikroskoopilla. Laitteen alla oleva mikrokanavisto kuitenkin tekee mikroskopoinnista haastavampaa kuin maljalla viljeltyjen solujen tarkkailusta. Jos kanavarakenteen kanavat ovat leveämpiä, solut nähdään mikroskoopilla helpommin kuin kapeampien kanavarakenteiden läpi.

Leveän ja kapean kanavarakenteen erot mikroskopoinnissa voidaan selittää PDMS:än suurella taittumiskertoimella verrattuna ilman taittumiskertoimeen. Taittumiskerroin kertoo, kuinka paljon valo taittuu saapuessaan aineeseen *[19]*. Kun valo kulkee PDMS pinnan läpi, sen kulkema matka on pidempi kuin ilmaa sisältävän kanavan läpi, mikä aiheuttaa eron optisessa polussa. Leveämmän kanavan käyttö mahdollistaa laajemman alueen tarkastelun mikroskoopilla ilman optisen polun erosta johtuvia vääristymiä.*[20]* Mikroskopoinnin kannalta olisi siis mielekästä käyttää leveämpiä (200 µm) kanavia.

Kuitenkin aivohalvausta mallinnettaessa happipitoisuuden säätelyn tarkkuus on ehkä tärkein ominaisuus eli mikroskopoinnin haastavuus voi olla toissijainen ongelma. Kuvasta 5 nähdään, että happipitoisuuden säätelyssä on eroa kahden eri kanavaleveyden omaavan laitteen välillä. Kuvaajista kuitenkin nähdään, että happimittauksessa 3 happipitoisuuden matalin arvo saavutetaan nopeammin kuin happimittauksessa 2. Toisaalta happimittauksessa 2 päästään lähemmäs aivohalvausta vastaavaa 0 % happipitoisuutta. Tämän mittauksen perusteella ei voida luotettavasti sanoa kumpaa kanavaleveyttä kannattaisi käyttää, mutta aivohalvauksen tilannetta mallinnettaessa nopeutta tärkeämpää on ehkä päästä mahdollisimman lähelle 0 % happipitoisuutta.

4. YHTEENVETO

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää vaikuttaako mikrofluidistisen kaasukanavan leveys happipitoisuuden säätelyn tarkkuuteen organ-on-a-chip -laitteessa. Tämä tutkimus on tarpeellinen koska tiedetään, että mikroskopointi on vaikeampaa kapean kanavarakenteen läpi, mutta ei tiedetä vaikuttaako kanavarakenteen leveyden muuttaminen happipitoisuuden säätelyyn. Tähän kysymykseen pyrittiin vastaamaan suorittamalla ratiometrinen happikuvantaminen kolmelle eri laiteelle, joista kahden laiteen kanavan leveys on 20 µm ja yhden 200 µm. Mittausten perusteella kapeampaa kaasukanavaa käyttämällä päästäisiin lähemmäs syötetyn kaasuseoksen happipitoisuuden arvoa, kun taas leveämpää kaasukanavaa käyttämällä happipitoisuus näyttäisi stabiloituvan nopeammin sen maksimi ja minimi arvoihin. Tämän mittauksen tulokset siis viittaavat siihen, että organ-on-a-chip -laitteen kanavan leveys vaikuttaa sen happipitoisuuden säätelyn tarkkuuteen.

Tiedetään, että happipitoisuus kyseisen kudosalueen ytimessä voi laskea nollaan muutamissa minuuteissa. Happimittauksessa 3 matalin saavutettu happipitoisuus oli noin 2,55 %, kun taas happimittauksessa 2 vastaava arvo oli noin 1,05 %. Matalimman saavutetun arvon perusteella siis happimittauksen 2 laitteisto vastaisi paremmin oikean aivohalvauksen tilannetta. Happimittauksessa 3 matalin happipitoisuuden arvo saavutettiin noin kolmessa minuutissa, kun taas happimittauksessa 2 vastaava aika oli 20 minuuttia. Happipitoisuuden laskun nopeuden kannalta siis happimittauksen 3 laitteisto mallintaisi oikean aivohalvauksen tilannetta paremmin. Näiden tulosten perusteella ei kuitenkaan voida tehdä lopullista johtopäätöstä siitä, kumpi kanavarakenne on parempi aivohalvauksen mallintamiseen.

Tämän työn happimittaukset 1 ja 2 on tehty laitteille, joissa molempien kanavaleveys on 20 µm. Näiden molempien happimittausten kuvaajat ovat toistensa kanssa saman muotoisia ja happipitoisuus laskee kaarevaa käyrää pitkin. Lisäksi aiemmin julkaistussa artikkelissa on esitetty vastaava kuvaaja happipitoisuuden muutoksesta ajan suhteen happimittauksesta, jossa käytetyn laitteen kanavaleveys on 2 µm. Artikkelissa esitetty kuvaaja vastaa muodoltaan tämän työn happimittausten 1 ja 2 kuvaajia, mikä tukee oletusta siitä, että kapeampaa kanavaa käytettäessä happipitoisuus laskee kaarevaa käyrää pitkin. Tässä työssä happimittaus 3 puolestaan on ainoa, joka tehtiin laitteelle, jonka kanavaleveys on 200 µm. Tulevaisuudessa voitaisiin tutkia tarkemmin, toistuuko happimittauskäyrän muoto peräkkäisissä mittauksissa.

5. LÄHTEET

1. Uddin Chowdhury MdJ, Hussan A, Islam Hridoy DA, Sikder AS. Incorporating an Integrated Software System for Stroke Prediction using Machine Learning Algorithms and Artificial Neural Network. In: 2023 IEEE 13th Annual Computing and Communication Workshop and Conference (CCWC) [Internet]. 2023 [cited 2025 Feb 7]. p. 0222–8. Available from: https://ieeexplore.ieee.org/document/10099245/?arnumber=10099245

2. Tornberg K, Välimäki H, Valaskivi S, Mäki AJ, Jokinen M, Kreutzer J, Kallio P. Compartmentalized organ-on-a-chip structure for spatiotemporal control of oxygen microenvironments. Biomed Microdevices. 2022 Oct 21;24(4):34.

3. Rink C, Khanna S. Significance of Brain Tissue Oxygenation and the Arachidonic Acid Cascade in Stroke. Antioxid Redox Signal. 2011 May 15;14(10):1889–903.

4. Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. Neurology. 2021 Nov 16;97(20_Supplement_2):S6–16.

5. Chen T, Vunjak-Novakovic G. In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. Regen Eng Transl Med. 2018 Sep 1;4(3):142–53.

6. Kleinschnitz C, Fluri F, Schuhmann M. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. Drug Des Devel Ther. 2015 Jul;3445.

7. Saldaña L, Crespo L, Bensiamar F, Arruebo M, Vilaboa N. Mechanical forces regulate stem cell response to surface topography. J Biomed Mater Res A. 2014;102(1):128–40.

8. Buck HV, Stains JP. Osteocyte-mediated mechanical response controls osteoblast differentiation and function. Front Physiol [Internet]. 2024 Mar 11 [cited 2025 Mar 12];15. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2024.1364694/full

9. Helena Macedo M, Baião A, Pinto S, Barros AS, Almeida H, Almeida A, das Neves J, Sarmento B. Mucus-producing 3D cell culture models. Adv Drug Deliv Rev. 2021 Nov 1;178:113993.

10. Rackus DG, Riedel-Kruse IH, Pamme N. “Learning on a chip:” Microfluidics for formal and informal science education. Biomicrofluidics. 2019 Jul 9;13(4):041501.

11. Liu Y, Kamran R, Han X, Wang M, Li Q, Lai D, Naruse K, Takahashi K. Human heart-on-a-chip microphysiological system comprising endothelial cells, fibroblasts, and iPSC-derived cardiomyocytes. Sci Rep. 2024 Aug 8;14(1):18063.

12. Shin J, Hwang M, Back S, Nam H, Yoo C, Park J, Son H, Lee J, Lim H, Lee K, Moon H, Kim J, Cho H, Choi H. Electrical impulse effects on degenerative human

annulus fibrosus model to reduce disc pain using micro-electrical impulse-on-a-chip. Sci Rep. 2019 Apr 9;9(1):5827.

13. Jiang B, Guo H, Chen D, Zhou M. Microscale investigation on the wettability and bonding mechanism of oxygen plasma-treated PDMS microfluidic chip. Appl Surf Sci. 2022 Feb;574:151704.

14. Sitte ZR, Miranda AA, DiProspero TJ, Lockett MR. A three-zone hypoxia chamber capable of regulating unique oxygen and carbon dioxide partial pressures simultaneously. HardwareX. 2024 Sep;19:e00556.

15. Sticker D, Rothbauer M, Ehgartner J, Steininger C, Liske O, Liska R, Neuhaus W, Mayr T, Haraldsson T, Kutter JP, Ertl P. Oxygen Management at the Microscale: A Functional Biochip Material with Long-Lasting and Tunable Oxygen Scavenging Properties for Cell Culture Applications. ACS Appl Mater Interfaces. 2019 Mar 13;11(10):9730–9.

16. Ungerböck B, Charwat V, Ertl P, Mayr T. Microfluidic oxygen imaging using integrated optical sensor layers and a color camera. Lab Chip. 2013 Mar 19;13(8):1593–601.

17. Ristola M, Sukki L, Azevedo MM, Seixas AI, Relvas JB, Narkilahti S, Kallio P. A compartmentalized neuron-oligodendrocyte co-culture device for myelin research: design, fabrication and functionality testing. J Micromechanics Microengineering. 2019 May;29(6):065009.

18. Dreier JP, Major S, Foreman B, Winkler MKL, Kang EJ, Milakara D, Lemale CL, DiNapoli V, Hinzman JM, Woitzik J, Andaluz N, Carlson A, Hartings JA. Terminal spreading depolarization and electrical silence in death of human cerebral cortex. Ann Neurol. 2018;83(2):295–310.

19. Esser D, Mahlmann D, Wortmann D, Gottmann J. Interference microscopy of femtosecond laser written waveguides in phosphate glass. Appl Phys B. 2009 Aug 1;96(2):453–7.

20. Xu T, Lim YJ, Zheng Y, Jung M, Gaus K, Gardiner EE, Lee WM. Modified inverted selective plane illumination microscopy for sub-micrometer imaging resolution in polydimethylsiloxane soft lithography devices. Lab Chip. 2020 Oct 27;20(21):3960–9.