



Politechnika Wrocławska

DZIEDZINA: Nauki inżynieryjno-techniczne.

DYSCYPLINA: Automatyka, elektronika, elektrotechnika i technologie kosmiczne.

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Technologia transdermalnego dostarczania leku za pomocą
plastra mikroigłowego połączona z diagnostyką do
zastosowania w medycynie weterynaryjnej.**

Mgr inż. Justyna Kornicka

Promotor: Prof. dr hab. inż. Rafał Walczak

Słowa kluczowe: mikroigły, druk 3D, optoelektronika, diagnostyka, weterynaria

WROCŁAW 2026

Streszczenie w języku polskim

Rozprawa doktorska zatytułowana „Technologia transdermalnego dostarczania leku za pomocą plastra mikroigłowego połączona z diagnostyką do zastosowania w medycynie weterynaryjnej” dotyczy opracowania, wytworzenia oraz eksperymentalnej weryfikacji dwóch nowoczesnych, komplementarnych rozwiązań technologicznych o potencjale wdrożeniowym w medycynie weterynaryjnej:

- (1) rozpuszczalnych plastrów mikroigłowych do transdermalnego dostarczania substancji aktywnych, wytworzonych z wykorzystaniem druku 3D oraz mikroformowania,
- (2) przenośnego systemu diagnostycznego typu „point-of-care” (POC), opartego na izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych metodą RT-LAMP prowadzonej w chipach również wytworzonych z wykorzystaniem druku 3D.

Praca ma charakter interdyscyplinarny i łączy zagadnienia z zakresu inżynierii mikrosystemów (MEMS), technologii druku 3D, optoelektroniki oraz diagnostyki molekularnej. Główną motywacją do podjęcia badań była potrzeba opracowania tanich, mobilnych, prostych w obsłudze i możliwych do personalizacji narzędzi diagnostyczno-terapeutycznych, które mogłyby być stosowane bezpośrednio w miejscu opieki nad zwierzęciem, bez konieczności dostępu do wyspecjalizowanych laboratoriów.

W części pracy dotyczącej plastrów mikroigłowych zaprojektowano różne geometrie mikroigieł (m.in. stożkowe i piramidalne), które następnie wydrukowano jako struktury matrycowe wykorzystując druk 3D w wariantcie DLP (ang. digital light processing). Na ich podstawie opracowano proces technologiczny rozpuszczalnych mikroigieł metodą mikroformowania z wykorzystaniem silikonowych form PDMS. Jako materiał nośny zastosowano mieszaniny biodegradowalnych i biokompatybilnych polimerów poliwinylpirolidonu (PVP) oraz poliwinylowego alkoholu (PVA).

Przeprowadzono szczegółową analizę zgodności wymiarowej mikroigieł rozpuszczalnych względem struktur wzorcowych, wykazując niewielkie, geometrycznie zależne odchylenia, mieszczące się w granicach kilku procent. Następnie wykonano badania funkcjonalne obejmujące testy rozpuszczalności mikroigieł, ocenę ich stabilności mechanicznej oraz analizę kinetyki uwalniania substancji modelowej (rodaminy B) w warunkach symulujących kontakt ze skórą. Wykazano, że kompozycja PVP 10% / PVA 5% zapewnia korzystny kompromis pomiędzy wytrzymałością mechaniczną a szybkością i powtarzalnością uwalniania substancji czynnej. Pełne uwolnienie związku modelowego następowało w czasie od około 120 do 150 sekund, w zależności od geometrii mikroigieł.

Uzupełnieniem badań były testy *in vitro* obejmujące ocenę biokompatybilności i cytotoksyczności, które potwierdziły bezpieczeństwo biologiczne opracowanych struktur. Uzyskane wyniki wskazują, że rozpuszczalne plastry mikroigłowe mogą stanowić realną alternatywę dla klasycznych iniekcji w weterynarii, umożliwiając bezpieczne, mało inwazyjne i kontrolowane podawanie leków lub szczepionek.

W części diagnostycznej rozprawy opracowano warunki reakcji RT-LAMP, dedykowane do wykrywania wirusów zwierzęcych. Zaprojektowano i zestawiono stanowisko optoelektroniczne umożliwiające fluorescencyjny odczyt przebiegu reakcji (detekcja „end point”) oraz docelowo w czasie rzeczywistym, co pozwoliło na obiektywną ocenę amplifikacji oraz zwiększyło potencjał automatyzacji systemu w porównaniu do metod kolorymetrycznych. Następnie

zaprojektowano i wykonano w technologii DLP chip mikrofluidyczny, umożliwiający prowadzenie reakcji RT-LAMP w formie „on-chip”.

System zweryfikowano eksperymentalnie na przykładzie detekcji genomowego RNA kociego kaliciwirusa (ang. feline calicivirus, FCV) - wysoce zaraźliwego i szeroko rozpowszechnionego wśród populacji kotów. Uzyskano wysoką swoistość reakcji, bez amplifikacji w próbach kontrolnych, oraz granicę wykrywalności (LOD) na poziomie $2,3 \times 10^3$ kopii RNA na reakcję. Choć czułość układu „on-chip” była niższa niż w klasycznych reakcjach prowadzonych w probówkach w warunkach laboratoryjnych, wyniki te uznano za wystarczające dla zastosowań weterynaryjnych i typowe dla prototypowych systemów mikrofluidycznych wytwarzanych technologią addytywną.

W pracy potwierdzono, że druk 3D stanowi efektywne narzędzie do szybkiego prototypowania i personalizacji systemów diagnostyczno-terapeutycznych. Opracowane rozwiązania tworzą spójną platformę o wysokim potencjale wdrożeniowym, możliwą do dalszego rozwoju w kierunku zintegrowanych urządzeń diagnostyczno-leczniczych nowej generacji dla medycyny weterynaryjnej.

Streszczenie w języku angielskim

The doctoral dissertation entitled “Transdermal Drug Delivery Technology Using a Microneedle Patch Combined with Diagnostics for Veterinary Medicine Applications” focuses on the development, fabrication, and experimental validation of two modern, complementary technological solutions with implementation potential in veterinary medicine:

- (1) dissolvable microneedle patches for transdermal delivery of active substances, manufactured using 3D printing and micromolding techniques,
- (2) a portable point-of-care (POC) diagnostic system based on isothermal nucleic acid amplification using the RT-LAMP method, carried out in chips also fabricated using 3D printing.

The dissertation is interdisciplinary in nature and integrates issues from microsystems engineering (MEMS), 3D printing technologies, optoelectronics, and molecular diagnostics. The primary motivation for undertaking this research was the need to develop low-cost, mobile, easy-to-use, and customizable diagnostic and therapeutic tools that could be applied directly at the site of animal care, without requiring access to specialized laboratories.

In the part of the work concerning microneedle patches, various microneedle geometries (including conical and pyramidal) were designed and then printed as array structures using DLP (digital light processing) 3D printing. Based on these structures, a technological process for fabricating dissolvable microneedles was developed using micromolding with silicone PDMS molds. Mixtures of biodegradable and biocompatible polymers, polyvinylpyrrolidone (PVP) and polyvinyl alcohol (PVA), were used as the carrier materials.

A detailed dimensional conformity analysis of the dissolvable microneedles relative to the master structures was conducted, demonstrating small, geometry-dependent deviations within a few percent. Subsequently, functional studies were performed, including microneedle dissolution tests, assessment of mechanical stability, and analysis of the release kinetics of a model substance (rhodamine B) under conditions simulating skin contact. It was shown that a PVP 10% / PVA 5% composition provides a favorable compromise between mechanical strength and the speed and

repeatability of active substance release. Complete release of the model compound occurred within approximately 120 to 150 seconds, depending on the microneedle geometry.

The studies were complemented by *in vitro* tests evaluating biocompatibility and cytotoxicity, which confirmed the biological safety of the developed structures. The obtained results indicate that dissolvable microneedle patches may constitute a viable alternative to conventional injections in veterinary practice, enabling safe, minimally invasive, and controlled administration of drugs or vaccines.

In the diagnostic part of the dissertation, RT-LAMP reaction conditions dedicated to the detection of animal viruses were developed. An optoelectronic setup enabling fluorescent readout of the reaction (end-point detection and, ultimately, real-time monitoring) was designed and assembled, allowing objective assessment of amplification and increasing the automation potential of the system compared to colorimetric methods. Subsequently, a microfluidic chip enabling RT-LAMP reactions in an on-chip format was designed and fabricated using DLP technology.

The system was experimentally validated using the detection of genomic RNA of feline calicivirus (FCV), a highly contagious virus widely distributed among cat populations. High reaction specificity was achieved, with no amplification observed in control samples, and a limit of detection (LOD) of 2.3×10^3 RNA copies per reaction was obtained. Although the sensitivity of the on-chip system was lower than that of conventional tube-based reactions performed under laboratory conditions, these results were considered sufficient for veterinary applications and typical for prototype microfluidic systems manufactured using additive technologies.

The dissertation confirms that 3D printing is an effective tool for rapid prototyping and customization of diagnostic and therapeutic systems. The developed solutions form a coherent platform with high implementation potential, suitable for further development toward integrated next-generation diagnostic and therapeutic devices for veterinary medicine.

Spis treści

1	Wstęp i cele pracy	10
2	Wprowadzenie	12
3	Technologia mikroigieł w dostarczaniu leków i jej potencjał w medycynie weterynaryjnej	15
3.1	Rodzaje mikroigieł i metody ich wytworzenia	19
3.1.1	Lite (stałe) mikroigły	19
3.1.2	Puste w środku mikroigły	20
3.1.3	Rozpuszczalne mikroigły	21
3.1.4	Powlekane mikroigły	23
3.2	Przewagi mikroigieł w dostarczaniu leków	26
3.3	Możliwość zastosowania w weterynarii	30
4	RT-LAMP w diagnostyce z potencjałem do zastosowania w medycynie weterynaryjnej	36
5	Druk 3D w konstrukcji mikroigieł oraz miniaturowych urządzeń diagnostycznych	42
6	Rozpuszczalne plastry mikroigłowe	46
6.1	Wytwarzanie mikroigłowych matryc	47
6.2	Wytwarzanie rozpuszczalnych plastrów mikroigłowych	58
6.3	Testy wytrzymałości mechanicznej i potencjału penetracji plastra mikroigłowego	65
6.4	Rozpuszczalność mikroigieł i zdolność uwalniania leku	70
6.5	Ocena biokompatybilności i cytotoxiczności <i>in vitro</i> oraz właściwości regeneracyjne mikroigieł	74
6.6	Podsumowanie	80
7	Urządzenie diagnostyczne RT-LAMP z drukowanym chipem	81
7.1	Opracowanie warunków reakcji RT-LAMP i jej optymalizacja w środowisku laboratoryjnym	81
7.2	Konstrukcja własnego stanowiska pomiarowego	92
7.3	Drukowane chipy i detekcja optyczna	94
7.4	Reakcja RT-LAMP w chipie	113
7.5	Podsumowanie	120
8	Wnioski końcowe	121
9	Bibliografia	126
	Załącznik nr 1	137

Spis akronimów

2PP	polimeryzacja dwufotonowa (ang. Two-Photon Polymerization)
3D	trójwymiarowy (ang. three-dimensional)
AIV	wirus grypy ptaków (ang. avian influenza virus)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BHV-1	alfaherpeswirus bydła typu 1 (ang. Bovine alphaherpesvirus 1)
BioMEMS	biomedyczne mikroelektromechaniczne systemy (ang. biomedical microelectromechanical systems)
BSA	albumina surowicy bydłej (ang. bovine serum albumin)
BTV	wirus niebieskiego języka (ang. Bluetongue virus)
CaAstV	astrowirus psów (ang. canine astrovirus)
CMNs	mikroigły powlekane (ang. coated microneedles)
CNT	nanorurki węglowe (ang. carbon nanotubes)
COVID-19	choroba koronawirusowa 2019 (ang. coronavirus disease 2019)
CPIV5	wirus paragrypy psów typu 5 (ang. canine parainfluenza virus 5)
Ct	cykl progowy (ang. cycle threshold)
CSFV	wirus klasycznego pomoru świń (ang. classical swine fever virus)
CSSCs	komórki macierzyste zrębu rogówki (ang. corneal stromal stem cells)
DLP	cyfrowe przetwarzanie światła (ang. Digital Light Processing)
DMNs	rozpuszczalne mikroigły (ang. dissolving microneedles)
DMD	cyfrowe urządzenie mikrozwierciadlane (ang. digital micromirror device)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksynukleotydy trifosforanowe (ang. deoxynucleotide triphosphates)
FCV	koci kaliciwirus (ang. feline calicivirus)
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
FDM	modelowanie osadzania topionego materiału (ang. Fused Deposition Modeling)
FMDV	wirus pryszczycy (ang. foot-and-mouth disease virus)
FPV	wirus panleukopenii kotów (ang. feline panleukopenia virus)

GMSCs	dziąsłowe mezenchymalne komórki macierzyste (ang. gingival mesenchymal stem cells)
GOx	oksydaza glukozy (ang. glucose oxidase)
HA	kwask hialuronowy (ang. hyaluronic acid)
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)
IBDV	wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza (ang. infectious bursal disease virus)
IL-4	interleukina 4 (ang. interleukin-4)
IRMN	mikroigły reagujące na nacisk (ang. insertion-responsive microneedle)
LAMP	izotermiczna amplifikacja za pomocą pętli (ang. loop-mediated isothermal amplification)
LOD	limit detekcji (ang. limit of detection)
MEMS	systemy mikroelektromechaniczne (ang. micro-electro-mechanical systems)
MN	mikroigła (ang. microneedle)
MNs	mikroigły (ang. microneedles)
NAAT	techniki amplifikacji kwasów nukleinowych (ang. nucleic acid amplification techniques)
NP	nanocząsteczki (ang. nanoparticles)
NTC	kontrola bez matrycy (ang. no-template control)
PDMS	polidimetylosiloksan (ang. polydimethylsiloxane)
PEDV	wirus biegunki epidemicznej świń (ang. porcine epidemic diarrhea virus)
PFA	paraformaldehyd (ang. paraformaldehyde)
PLA	kwask polimlekowy (ang. polylactic acid)
PLGA	kwask polilaktydowo-glikolowy (ang. poly(lactic-co-glycolic acid))
POC	w miejscu opieki (ang. point-of-care)
POCT	testy w miejscu opieki (ang. point-of-care testing)
PDCoV	deltakoronawirus świń (ang. porcine deltacoronavirus)
PPR	potwór małych przeżuwaczy (ang. peste des petits ruminants)

PPRV	wirus pomoru małych przeżuwaczy (ang. peste des petits ruminants virus)
PVA	alkohol poliwinylowy (ang. polyvinyl alcohol)
PVP	poliwinylopirolidon (ang. polyvinylpyrrolidone)
RT-qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
RT-LAMP	izotermiczna amplifikacja za pomocą pętli z odwrotną transkrypcją (ang. reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)
SARS-CoV-2	drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
SLA	stereolitografia (ang. stereolithography)
SLS	selektywne spiekanie laserowe (ang. selective laser sintering)
SNR	stosunek sygnału do szumu (ang. signal-to-noise ratio)
TDDS	systemy transdermalnego dostarczania leków (ang. transdermal drug delivery systems)
TGEV	wirus zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (ang. transmissible gastroenteritis virus)
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta)
Tp	czas do maksymalnego sygnału (ang. time to peak)
UV	ultrafiolet (ang. ultraviolet)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłona naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

1 Wstęp i cele pracy

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki autorskich interdyscyplinarnych badań dotyczących rozwoju dwóch nowoczesnych rozwiązań o potencjale aplikacyjnym w medycynie weterynaryjnej, wykorzystujących technikę mikrosystemów, optoelektronikę i druk 3D, są to:

1. Rozpuszczalne plastry mikroigłowe przeznaczone do transdermalnego podawania substancji aktywnych.
2. System diagnostyczny oparty na reakcji izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych metodą RT-LAMP (ang. reverse transcription loop-mediated isothermal amplification).

Oba rozwiązania zostały opracowane z wykorzystaniem druku 3D i z myślą o zwiększeniu dostępności, szybkości i skuteczności opieki medycznej nad zwierzętami, w szczególności eliminując udział wyspecjalizowanych laboratoriów.

Badania nad technologią mikroigieł miały na celu opracowanie alternatywy dla klasycznych metod iniekcyjnych, umożliwiając bezpieczne, mało inwazyjne i kontrolowane transdermalne dostarczanie leków bądź szczepionek. Z kolei proponowane urządzenie diagnostyczne docelowo ma być przenośnym narzędziem diagnostycznym pozwalającym na szybkie wykrywanie infekcji wirusowych bezpośrednio w miejscu opieki (ang. point-of-care, POC) w gabinecie weterynaryjnym, schronisku dla zwierząt, lecznicy czy w hodowli. Kluczowym założeniem obu koncepcji była maksymalna prostota obsługi, umożliwiająca ich stosowanie przez niewyszkolony personel, a także mobilność, niskie koszty wytworzenia oraz elastyczność konstrukcyjna, pozwalająca na łatwe dostosowanie urządzeń do różnych zastosowań oraz potrzeb terapeutycznych i diagnostycznych.

Jak wspomniano wcześniej w procesie projektowania i wytwarzania zaproponowanych rozwiązań kluczowe znaczenie miał druk 3D w wariantcie DLP (ang. digital light processing), który umożliwił uzyskanie wysokiej precyzji odwzorowania mikroskopowych struktur oraz szybkie prototypowanie. Zastosowanie tej metody znacząco skróciło czas iteracji projektowych oraz umożliwiło tworzenie spersonalizowanych, a zarazem powtarzalnych elementów.

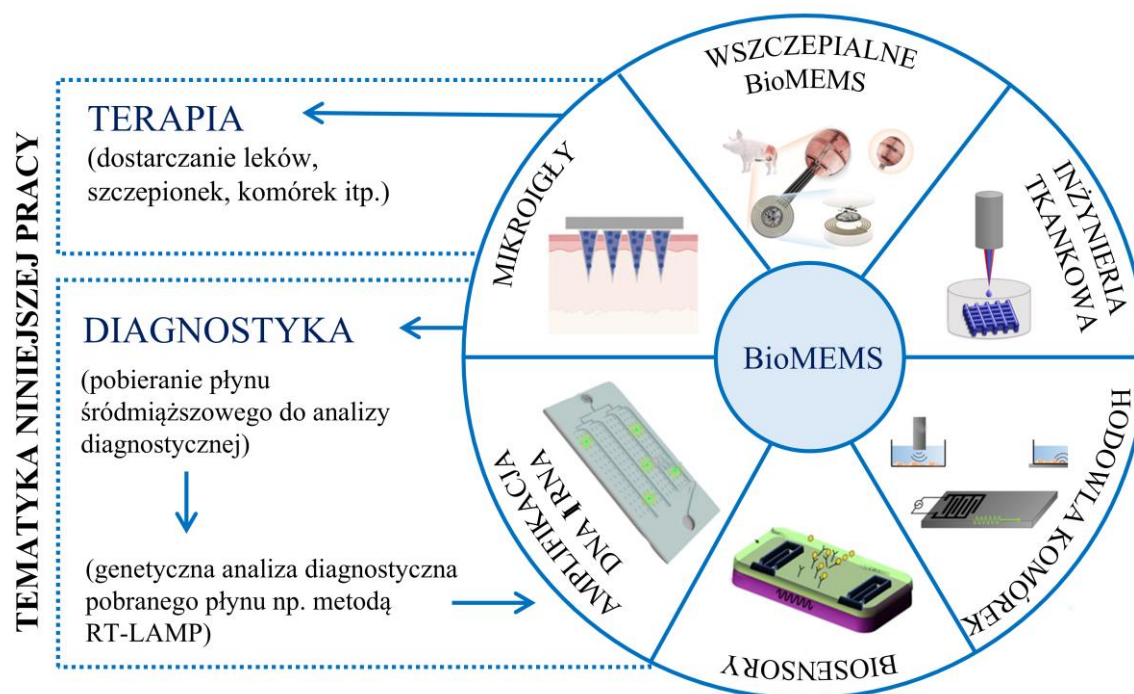
Niniejsza praca została podzielona na dwie zasadnicze części. W pierwszej omówiono problem badawczy oraz sformułowano cele pracy, omawiając jednocześnie aktualne wyzwania stojące przed medycyną weterynaryjną w zakresie nowoczesnych metod terapii i diagnostyki. Podkreślono również potencjał proponowanych rozwiązań w kontekście poprawy dostępności opieki, zwiększenia efektywności leczenia oraz ograniczenia kosztów. Druga część pracy zawiera prezentację i omówienie wyników badań eksperymentalnych: najpierw dotyczących projektowania, wytwarzania i oceny funkcjonalności plastrów mikroigłowych powstałych z zastosowaniem druku 3D, a następnie modelu optoelektronicznego systemu diagnostycznego opartego na reakcji RT-LAMP prowadzonej w drukowanych 3D chipach.

Inżynieryjno-technicznym celem głównym niniejszej pracy było wykazanie, że precyzyjny druk 3D w technologii DLP, będący jedną z najnowszych technik mikroinżynieryjnych stosowanych w inżynierii mikrosystemów, może być z powodzeniem wykorzystany do opracowania zarówno matryc rozpuszczalnych mikroigieł do dozowania leków, jak i mikrochipów stanowiących kluczowy element optoelektronicznej platformy diagnostycznej do wykrywania patogenów metodą RT-LAMP.

W pracy tej o niewątpliwie interdyscyplinarnym charakterze, przeplatają się zagadnienia z dwóch obszarów badawczych. Dominująca jest szeroko pojęta technika mikrosystemów i optoelektronika w ramach dyscypliny „Automatyka, elektronika, elektrotechnika i technologie kosmiczne”, ponieważ użyte narzędzie technologiczne (druk 3D wykorzystujący specjalizowane układy optoelektroniczne), obszar technologii mikroinżynieryjnych związanych z techniką mikrosystemów (mikroigły, chipy mikrofluidyczne) oraz zastosowany układ detekcji optoelektronicznej związane są z tą dyscypliną bezpośrednio. Natomiast użyteczny cel pracy związany jest z potencjalnym zastosowaniem opracowanych rozwiązań w weterynarii i stąd też obecność wielu zagadnień z obszaru biotechnologii.

2 Wprowadzenie

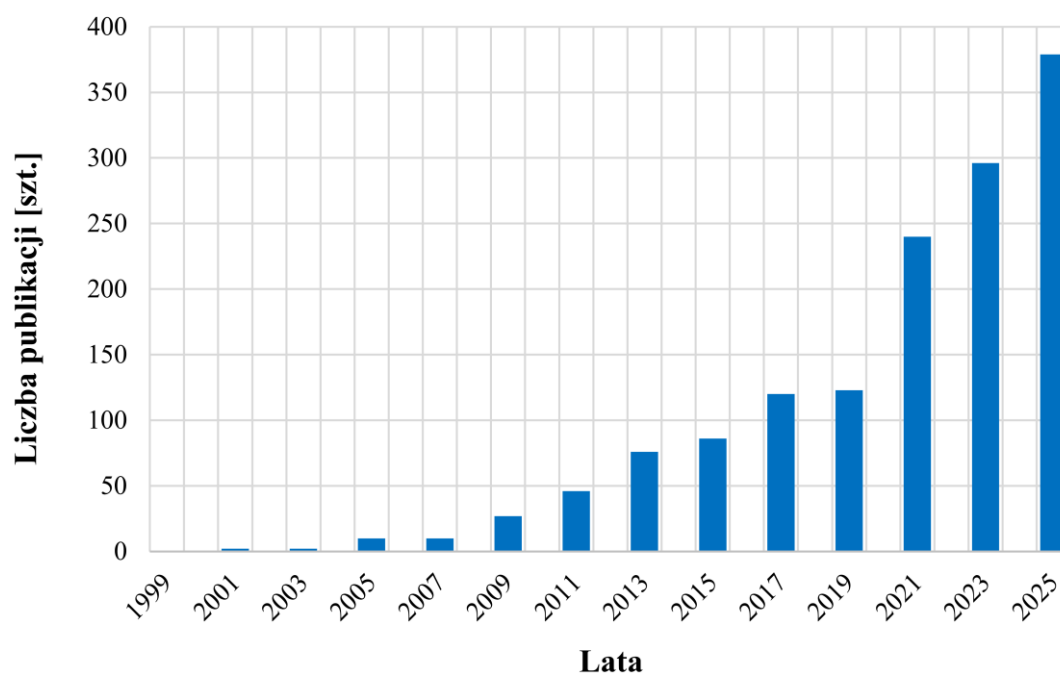
Na przestrzeni ostatnich lat systemy mikroelektromechaniczne (ang. micro-electro-mechanical systems, MEMS) zwane częściej mikrosystemami, znacząco przyczyniły się do rozwoju zaawansowanych, zminiaturyzowanych urządzeń przeznaczonych do zastosowań biologiczno-medycznych [1]. Szczególne zainteresowanie wzbudziła tzw. mikrofluidyka, która umożliwia precyzyjne manipulowanie małymi objętościami cieczy w układach o mikroskalowych wymiarach [2]. Połączenie biotechnologii z mikrofluidyką otworzyło nowe możliwości w projektowaniu systemów diagnostycznych oraz terapeutycznych, spełniających wymagania współczesnej biomedycyny [3]. Mikroelektromechaniczne systemy, które zawierają jednostki biologiczne lub są przeznaczone do zastosowań biomedycznych, często nazywane są bio-mikroelektromechanicznymi systemami (ang. biomedical microelectromechanical systems, BioMEMS) [4-5]. Mogą być one stosowane jako narzędzia terapeutyczne lub diagnostyczne, w tym do kontrolowanego dostarczania leków z wykorzystaniem systemów mikroprzepływowych, takich jak laboratorium na chipie (ang. lab-on-a-chip, LOC) (Rys.1) [6].



Rysunek 1 Zastosowanie mikrosystemów w biologii i medycynie (BioMEMS) oraz zależność pomiędzy mikroigłami, a chipami do amplifikacji DNA i RNA.

Urządzenia wykorzystujące mikrosystemy umożliwiają m.in. kontrolowane i ukierunkowane dostarczanie substancji czynnych, co przekłada się na zwiększoną biodostępność, zmniejszenie ich dawek oraz minimalizację efektów ubocznych. Jednym z najbardziej przełomowych rozwiązań w tej dziedzinie są zminiaturyzowane systemy transdermalnego dostarczania leków (ang. transdermal drug delivery systems, TDDS), które umożliwiają minimalnie inwazyjne przenikanie substancji aktywnych przez barierę skórną do krążenia ogólnoustrojowego. W porównaniu do tradycyjnych metod podawania leków, takich jak iniekcje czy podania doustne, systemy TDDS oferują szereg zalet, w tym eliminację bólu, pominięcie efektu pierwszego przejścia (czyli metabolizmu wstępnego zachodzącego głównie w wątrobie, wskutek działania enzymów, m.in. cytochromu P450), oraz lepszą kontrolę nad farmakokinetyką transportowanej substancji [7]. W ramach systemów TDDS szczególne miejsce zajmują mikroigły (ang. microneedles, MNs) - miniaturowe struktury o wysokości od kilkudziesięciu do kilkuset mikrometrów, które umożliwiają mikronakłucie warstwy rogowej naskórka bez stymulowania receptorów bólu [8]. MNs mogą być stosowane jako samodzielne nośniki leków (np. rozpuszczalne mikroigły z biodegradowalnych polimerów) lub jako elementy złożonych mikrosystemów diagnostyczno-terapeutycznych, w tym urządzeń typu „lab-on-a-chip”, łączących funkcje analityczne i dozujące. Integracja mikroigieł z biosensorami, mikrokanalami i inteligentnymi systemami kontrolującymi dawki tworzy podstawę nowoczesnych platform terapeutycznych, zdolnych do jednoczesnego monitorowania parametrów fizjologicznych oraz dostarczania leku w czasie rzeczywistym [9]. Obie technologie mogą być również stosowane oddzielnie - dostarczanie leku z użyciem mikroigieł może być podyktowane odpowiedzią o stanie organizmu (zakażenie wirusowe, bakteryjne, stan zapalny itp.) pochodzącą z urządzenia diagnostycznego. Rozwój tej technologii wpisuje się w ogólny trend miniaturyzacji urządzeń medycznych oraz dążenia do zwiększenia dostępności rozwiązań typu „point-of-care” (POC), również w medycynie weterynaryjnej. Raport Grand View Research wskazuje na wzrost wartości rynku diagnostyki POC w weterynarii na przestrzeni lat 2024-2030 o 10,4%. Według danych literaturowych liczba publikacji naukowych dotyczących mikroigieł i mikrosystemów TDDS wzrosła kilkakrotnie w ciągu ostatniej dekady, co świadczy o rosnącym zainteresowaniu środowisk naukowych i przemysłowych tą tematyką (Rys. 2). Pomimo, że większość dotychczasowych badań i wdrożeń technologii mikroigieł oraz mikrosystemów MEMS koncentruje się na zastosowaniach w medycynie ludzkiej, coraz więcej uwagi poświęca się ich

potencjalnemu wykorzystaniu w medycynie weterynaryjnej. W szczególności dotyczy to diagnostyki i terapii u zwierząt towarzyszących, gospodarskich oraz dzikich, gdzie kluczowe znaczenie mają rozwiązania minimalnie inwazyjne, szybkie i możliwe do zastosowania w warunkach terenowych [10-12].



Rysunek 2 Liczba publikacji związanych z mikroigłami na przestrzeni ostatnich lat. Sporządzona na podstawie bazy PubMed®, słowo kluczowe wyszukiwania: „microneedles”.

Wspomniane wcześniej platformy POC to zminiaturyzowane urządzenia diagnostyczne, które stanowią istotne narzędzie w szybkim i precyzyjnym wykrywaniu patogenów w warunkach poza laboratorium. Charakteryzują się kompaktową budową, krótkim czasem analizy, niskim kosztem eksploatacji oraz możliwością zastosowania przez niewykwalifikowany personel. Kluczowym elementem tego rodzaju technologii jest możliwość integracji reakcji biologicznych, takich jak amplifikacja materiału genetycznego, z elementami mikrofluidycznymi, optycznymi czy elektrochemicznymi, co pozwala na automatyzację i miniaturyzację całego procesu diagnostycznego [13].

Jedną z najbardziej obiecujących technik molekularnych stosowanych w tego typu urządzeniach jest izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych RT-LAMP (ang. reverse transcription loop-mediated isothermal amplification). W przeciwieństwie do klasycznego PCR (ang. polymerase chain reaction), RT-LAMP nie wymaga cyklicznej zmiany temperatury, co znacząco upraszcza konstrukcję urządzeń oraz obniża

wymagania energetyczne. Reakcja ta może być przeprowadzana w stałej temperaturze (około 60–65°C), a jej produkty mogą być wykrywane za pomocą metod kolorymetrycznych czy fluorescencyjnych, co umożliwia integrację z prostymi systemami optoelektronicznego odczytu [14].

Zminiaturyzowane systemy RT-LAMP mają coraz większe znaczenie w kontekście kontroli chorób zakaźnych ze względu na swoją szybkość, wysoką czułość oraz możliwość działania w warunkach terenowych. Choć ich główne zastosowania dotyczą diagnostyki ludzkiej (np. SARS-CoV-2, wirus Zika, HIV), rośnie liczba badań oraz prototypów ukierunkowanych na potrzeby weterynarii [15-16]. Diagnostyka patogenów zwierzęcych takich jak kalciwirus kotów (ang. feline calicivirus, FCV), wirus panleukopenii (ang. feline panleukopenia, FPV), wirus grypy ptaków (ang. avian influenza virus, AIV) czy choroba niebieskiego języka (ang. bluetongue disease, BTV) wymaga szybkich metod detekcji, które można wdrożyć bezpośrednio w środowiskach wysokiego ryzyka, takich jak gospodarstwa, schroniska czy miejsca kwarantanny [17-18].

Integracja mikrouządzeń diagnostycznych z technologiami minimalnie inwazyjnymi, np. mikroigłami do poboru płynu śródmiąższowego lub dostarczania szczepionek czy leków, stwarza nowe możliwości rozwoju weterynaryjnych platform diagnostycznych i terapeutycznych nowej generacji. Rozwój zintegrowanych urządzeń bazujących na mikrosystemach dedykowanych zwierzętom stanowi istotny krok w kierunku nowoczesnej, zrównoważonej opieki weterynaryjnej, wpisując się w globalny trend medycyny precyzyjnej oraz koncepcję „One Health” łączącą zdrowie ludzi, zwierząt i środowiska.

3 Technologia mikroigieł w dostarczaniu leków i jej potencjał w medycynie weterynaryjnej

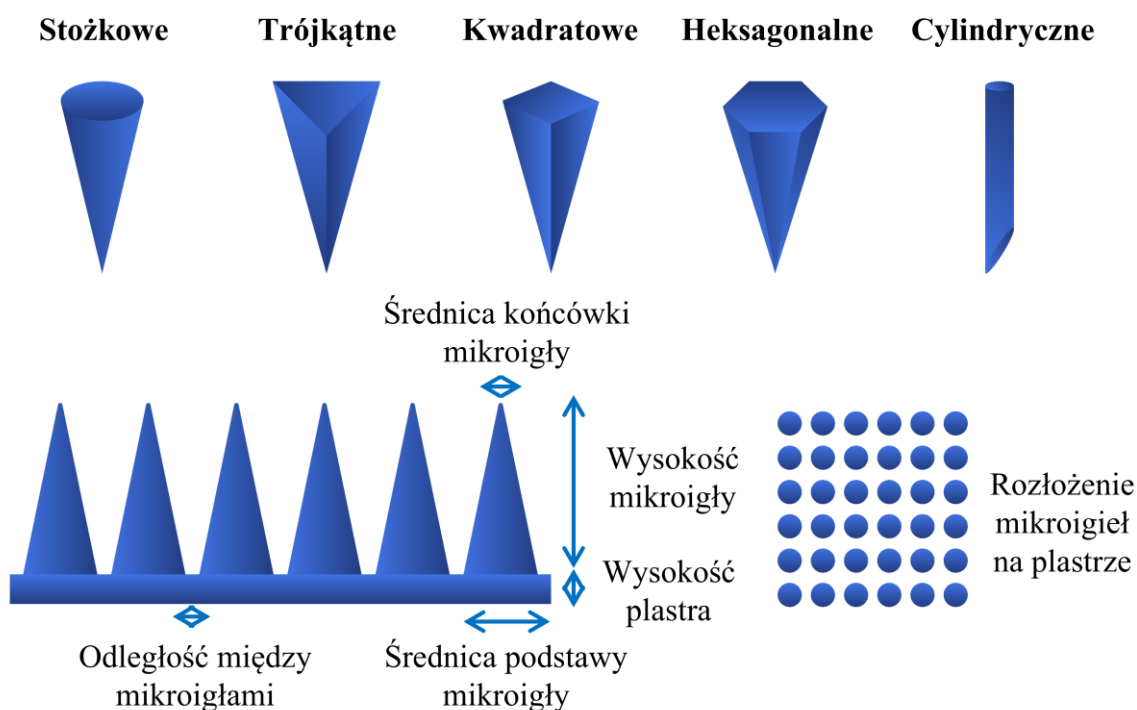
Metoda dostarczania leku odgrywa fundamentalną rolę w determinowaniu skuteczności terapeutycznej substancji leczniczej. Proces ten wymaga nie tylko precyzyjnej kontroli, ale także osiągnięcia maksymalnej efektywności i biodostępności, przy jednoczesnym zapewnieniu bezpieczeństwa i minimalizacji ryzyka działań niepożądanych [19]. Wybór odpowiedniej technologii podania leku stanowi element o zasadniczym znaczeniu dla

osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego, wpływając na tempo uwalniania substancji czynnej, jej stabilność chemiczną oraz zdolność do przenikania przez bariery biologiczne.

W praktyce klinicznej i weterynaryjnej powszechnie stosowane metody dostarczania leków obejmują różnorodne formy farmaceutyczne, takie jak tabletki, kapsułki, maści, syropy oraz iniekcje. Różnią się one nie tylko formą fizyczną, lecz także drogą podania, wśród których wyróżnia się głównie podanie doustne (oralne), miejscowe (topikalne), wziewne (inhalacyjne) oraz pozajelitowe (parenteralne), w tym m.in. domięśniowe, dożylnie i podskórne [20]. Choć wiele z tych metod zapewnia szybkie i skuteczne działanie, napotykają one istotne ograniczenia. Wśród kluczowych wyzwań wymienia się m.in. dyskomfort pacjenta, lęk przed iniekcjami, trudności w precyzyjnym dawkowaniu, ograniczoną biodostępność wynikającą z efektu pierwszego przejścia w przypadku podania doustnego, niewystarczającą penetrację substancji czynnej do miejsca docelowego, a także niepraktyczność lub inwazyjność niektórych technik [21]. W medycynie weterynaryjnej problematyka dostarczania leków staje się jeszcze bardziej złożona. Zróżnicowanie gatunkowe pomiędzy pacjentami obejmuje istotne różnice w anatomii, fizjologii, masie ciała, metabolizmie, tempie opróżniania żołądka, pH przewodu pokarmowego, aktywności enzymatycznej czy strukturze skóry, co znacząco wpływa na losy farmakokinetyczne leku. Ponadto, niektóre zwierzęta wykazują silny opór wobec określonych form podania, co utrudnia prowadzenie terapii i może prowadzić do nieregularnego przyjmowania leków lub ich całkowitego odrzucenia [22-23].

W odpowiedzi na te trudności opracowano innowacyjne podejścia oparte na nowoczesnych systemach nośnikowych. Technologie te oferują liczne korzyści, w tym istotną poprawę biodostępności substancji czynnych, możliwość kontrolowanego i przedłużonego uwalniania leku, redukcję częstotliwości dawkowania, a także ograniczenie ryzyka wystąpienia działań niepożądanych. Co więcej, zastosowanie nowoczesnych nośników sprzyja poprawie komfortu pacjenta poprzez minimalizację inwazyjności procedur medycznych oraz ograniczenie stresu związanego z ich stosowaniem, co ma szczególne znaczenie w terapii zwierząt, u których współpraca podczas leczenia bywa znacznie utrudniona [24-25].

Jedną z najbardziej obiecujących technologii nośnikowych w dziedzinie transdermalnego dostarczania leków są mikroigły (ang. microneedles, MNs). Ta innowacyjna metoda, będąca przedmiotem intensywnych badań prowadzonych przez liczne zespoły naukowe [26], opiera się na wykorzystaniu niewielkich plastrów pokrytych mikroigłami o wysokości zazwyczaj sięgającej od 25 do 2000 μm , podstawie od 50 do 300 μm i wierzchołku o wymiarach w przedziale od 1 do 100 μm . Mogą być one wykonane z różnorodnych materiałów i posiadać zróżnicowaną geometrię (Rys. 3) [27]. Mikroigły zostały zaprojektowane z myślą o minimalnie inwazyjnym, mało bolesnym przenikaniu przez barierę warstwy rogowej naskórka. Ich dobra tolerancja przez pacjenta wynika z mikroskopijnych rozmiarów, które pozwalają na penetrację wierzchniej warstwy skóry przy minimalnym uszkodzeniu tkanek i minimalnej stymulacji zakończeń nerwowych [28].



Rysunek 3 Różne geometrie mikroigieł oraz schematyczny obraz ich rozłożenia na plastrze.

Technologia mikroigieł wyróżnia się wyjątkową elastycznością w zakresie doboru materiałów i metod wytworzenia, co pozwala na ich szerokie zastosowanie w różnych obszarach dostarczania substancji leczniczych. Mikroigły mogą być wytwarzane z metali (np. stal nierdzewna), polimerów takich jak kwas polimlekowy (ang. polylactic acid, PLA), poliwinylpirolidon (ang. polyvinylypyrrolidone, PVP), kwas hialuronowy,

krzemu, ceramiki (np. tlenek glinu) oraz polisacharydów (np. sacharoza, trehaloza), co umożliwia ich adaptację do różnych strategii terapeutycznych [29]. W szczególności mikroigły polimerowe zyskały dużą popularność, jako że często charakteryzują się biokompatybilnością, biodegradowalnością i nietoksycznością [30]. Rozwój zaawansowanych metod wytwarzania, takich jak formowanie wtryskowe, fotolitografia czy druk 3D, umożliwia wytworzenie mikroigieł o zróżnicowanych kształtach, konfiguracjach i funkcjonalnościach, co otwiera nowe perspektywy w dziedzinie ukierunkowanego dostarczania substancji leczniczych, monitorowania parametrów biologicznych w czasie rzeczywistym, a także minimalnie inwazyjnej diagnostyki [31].

Zastosowanie mikroigieł w weterynarii stanowi obiecującą alternatywę dla konwencjonalnych metod podawania środków leczniczych. Ze względu na podobieństwa w schorzeniach i wyzwaniach terapeutycznych u ludzi i zwierząt, technologie opracowane dla medycyny ludzkiej mogą z powodzeniem znaleźć zastosowanie w praktyce weterynaryjnej [32]. Ponadto zwierzęta często pełnią rolę modeli eksperymentalnych w przedklinicznych badaniach farmaceutycznych, co umożliwia weryfikację skuteczności nowych technologii [33]. W świetle potencjału mikroigieł, ich zastosowanie w weterynarii może oferować skuteczne rozwiązania dla wielu schorzeń, analogicznie do ich wykorzystania w medycynie ludzkiej. Chociaż badania nad mikroigłami w weterynarii są wciąż ograniczone, przeprowadzono już kilka obiecujących analiz dotyczących ich zastosowania. Obejmują one m.in. łagodzenie bólu u bydła [34], śródskórne podawanie szczepionki przeciwko grypie u psów, pobieranie płynu śródmiąższowego u cieląt po podaniu szczepionki przeciwko *Mycobacterium bovis* BCG [35], a także leczenie schorzeń dermatologicznych [36].

Dzięki zdolności do omijania warstwy rogowej naskórka mikroigły umożliwiają dostarczanie makrocząsteczek, takich jak białka, kwasy nukleinowe czy szczepionki, które w przeciwnym razie byłyby problematyczne do efektywnego dostarczenia konwencjonalnymi drogami [37]. Jednakże, mimo licznych zalet, pełne wdrożenie mikroigieł do praktyki weterynaryjnej wymaga przezwyciężenia szeregu wyzwań technologicznych i logistycznych. Wśród najważniejszych problemów wymienia się trudności związane z precyzyjnym dawkowaniem substancji czynnych, zapewnieniem ich stabilności chemicznej i biologicznej, a także utrzymaniem wysokich standardów sterylności gotowych produktów. Istotnym problemem pozostaje również ograniczona pojemność ładunkowa mikroigieł, zwłaszcza w przypadku terapii wymagających

większych objętości substancji aktywnej. Dodatkowe wyzwania obejmują złożoność procesów produkcyjnych, kompatybilność materiałów z różnymi typami substancji aktywnych, a także konieczność spełnienia wymogów regulacyjnych dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności. Rozwiązanie tych kwestii będzie kluczowe dla dalszej komercjalizacji tej technologii i jej skutecznego zastosowania w codziennej praktyce klinicznej [38].

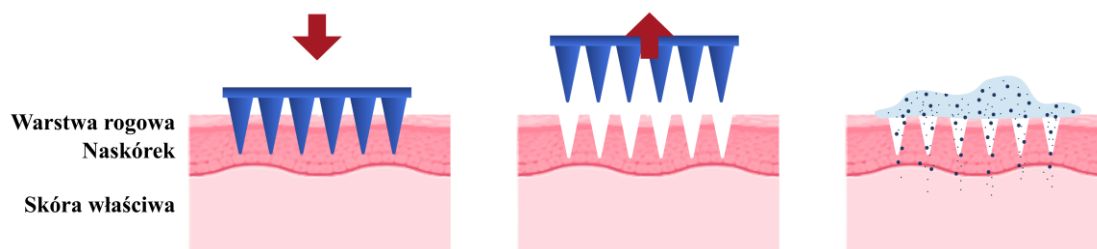
3.1 Rodzaje mikroigieł i metody ich wytworzenia

Jak wspomniano wcześniej, mikroigły są wytwarzane z szerokiej gamy materiałów, w tym metali czy polimerów, z których każdy charakteryzuje się odmiennymi właściwościami, takimi jak twardość, biokompatybilność i biodegradowalność. Ta różnorodność umożliwiła opracowanie różnych typów mikroigieł, w tym litych (stałych), powlekanych, rozpuszczalnych oraz pustych w środku, co otwiera szerokie spektrum potencjalnych zastosowań.

3.1.1 Lite (stałe) mikroigły

Lite (stałe) mikroigły tworzą mikroskopijne pory w skórze, co zwiększa jej przepuszczalność dla cząsteczek. Mechanizm ten określany jest mianem "nakłuj i nałóż" (ang. poke and patch) (Rys. 4). Mikroigły te mogą być wytwarzane z różnorodnych materiałów, takich jak krzem, metale, ceramika czy polimery [39]. Proces ich wytworzenia obejmuje techniki mikroobróbki, takie jak fotolitografia, trawienie na sucho i mokro oraz druk 3D, a więc technologii znanych z wytwarzania MEMS. Suche trawienie z użyciem difluorku ksenonu (XeF_2), wykorzystywane do usuwania materiału z powierzchni stałej, umożliwia precyzyjne formowanie mikroigieł o regulowanych wymiarach i geometriach na jednym płacie [40]. Z kolei mokre trawienie często przeprowadza się przy użyciu wodorotlenku potasu (KOH) do wytwarzania krzemowych mikroigieł [41]. Stereolitografia (ang. stereolithography, SLA) z użyciem żywicy dentystycznej klasy I (Dental SG) znalazł zastosowanie w przygotowaniu mikroigieł do dostarczania astaksantyny - silnego przeciwutleniacza [42]. Technologia druku 3D jest jedną z najbardziej efektywnych metod tworzenia litych mikroigieł, ponieważ jest zarówno prosta, jak i ekonomiczna. Szczególnie weterynarze mogą korzystać z repozytoriów projektów, aby drukować mikroigły dostosowane do specyficznych potrzeb związanych z dostarczaniem leków, co umożliwia spersonalizowaną terapię zwierząt towarzyszących [43]. Lite mikroigły wyróżniają się na tle innych typów większą

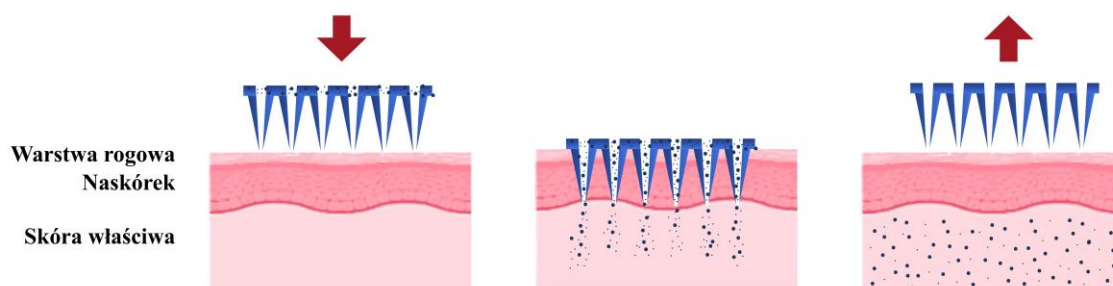
wytrzymałością mechaniczną, lepszą morfologią powierzchni (ostrzejsze końcówki) oraz łatwością wytwarzania [44].



Rysunek 4 Mechanizm działania mikroigieł stałych.

3.1.2 Puste w środku mikroigły

Puste mikroigły (ang. hollow microneedles, HMNs) są zaprojektowane do dostarczania leków poprzez mechanizm "nakłuj i przepuść" (ang. poke and flow) (Rys. 5), w którym lek przepływa przez pusty kanał wewnątrz mikroigły. Proces ten zależy od szeregu parametrów konstrukcyjnych, takich jak geometria końcówki oraz długość i średnica mikroigieł, ale także od napięcia powierzchniowego i ciśnienia kapilarnego wytworzonego w kanale. Parametry te mogą być kontrolowane w celu uzyskania różnych czasów uwalniania leku [26].



Rysunek 5 Mechanizm działania mikroigieł pustych w środku.

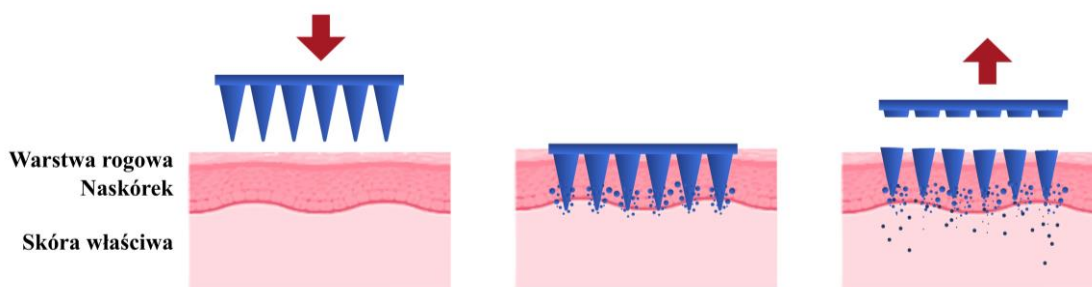
Puste mikroigły mogą być wytwarzane z różnych materiałów, takich jak krzem, metale, szkło i niektóre polimery [45]. Innowacyjne podejście obejmuje wykorzystanie nanorurek węglowych (ang. carbon nanotubes, CNT), które dzięki procesom kapilarnego samoskładania organizują się do trójwymiarowych, pustych w środku mikroigieł. Nanorurki węglowe, dzięki swojej wyjątkowej wytrzymałości mechanicznej,

elastyczności oraz gładkiej powierzchni wewnętrznej, znacząco poprawiają trwałość mikroigieł i zwiększają efektywność transportu cieczy [46]. Puste mikroigły są wytwarzane z wykorzystaniem technologii takich jak druk 3D, w tym polimeryzacja dwufotonowa (2PP) oraz techniki termicznego odciskania nanoimprintem, z użyciem materiałów takich jak Ormocomp i biodegradowalne termoplasty [47-48].

Warto podkreślić, że konstrukcja pustych mikroigieł często czerpie inspirację z natury, naśladując struktury występujące u zwierząt, takie jak kłujka komara [49] czy kiel węża [50]. Puste mikroigły oferują ogromny potencjał w zastosowaniach biomedycznych, takich jak dostarczanie leków i transport komórek. Badania wykazały, że mogą być zintegrowane z innowacyjnymi czujnikami do wykrywania biomarkerów, takich jak kwas moczowy czy glukoza w sztucznym płynie śródmiąższowym, co podkreśla ich potencjał w minimalnie inwazyjnych aplikacjach diagnostycznych [51]. Dodatkowo, puste mikroigły drukowane w technologii 3D zostały opracowane do minimalnie inwazyjnego dostarczania insuliny [52] oraz żywych komórek w terapii komórkowej [53]. Wskazuje to na wszechstronność i skuteczność pustych mikroigieł w usprawnianiu technologii medycznych, poprawiając diagnostykę i dostarczanie leków.

3.1.3 Rozpuszczalne mikroigły

Rozpuszczalne mikroigły (ang. dissolving microneedles, DMNs) stanowią kolejny przykład transdermalnej technologii dostarczania leków. Te mikroigły są zwykle wytwarzane z biodegradowalnych, rozpuszczalnych w wodzie polimerów. Zaprojektowane są w taki sposób, aby penetrowały warstwę rogową skóry, a następnie rozpuszczały się z jednoczesnym uwalnianiem zawartego w nich leku [54]. Mikroigły rozpuszczalne stosują proces aplikacji jednorazowej, ponieważ mikroigła nie jest wycofywana po jej wprowadzeniu. Mechanizm ten określany jest mianem typu „nakłuj i uwolnij” (ang. poke and release) (Rys. 6) [55].



Rysunek 6 Mechanizm działania mikroigieł rozpuszczalnych.

W procesie tworzenia rozpuszczalnych mikroigieł wykorzystuje się różne materiały, takie jak chitozan [56], poliwinylpirolidon [57], kwas poli- γ -glutaminowy [58], poliwiniloalkohol [59], żelatyna [60], celuloza [61] oraz alginian [62]. Ponadto, DMNs mogą być projektowane z połączenia różnych materiałów, na przykład z końcówką wykonaną z kwasu hialuronowego oraz bazą z chitozanu [63]. Badania wykazały, że mikroigły wielowarstwowe wykonane z kwasu polilaktydowo-glikolowego (PLGA) oraz poliwiniloalkoholu (PVP) mogą penetrować skórę bez łamania i zapewniać kontrolowane uwalnianie leku [64]. Wybór materiału do tworzenia rozpuszczalnych mikroigieł jest kluczowy, ponieważ determinuje on właściwości mechaniczne, czas rozpuszczania oraz profil uwalniania leku [65]. Rozpuszczalne mikroigły są zwykle wytwarzane przy użyciu technik mikroformowania (ang. micromolding). W tym procesie roztwór lub zawiesina zawierająca pożądane materiały wprowadzana jest do formy o kształcie mikroigieł. Następnie forma pozostaje do momentu całkowitego wyschnięcia i utwardzenia zawartości, po czym z formy wyjmuje się gotowe mikroigły uformowane z wybranych materiałów [66]. Do wytwarzania takich form często stosuje się tzw. metodę dwuetapowego odlewania. Polega ona na wykorzystaniu mikroigieł wykonanych ze stali nierdzewnej lub wytworzonych za pomocą druku 3D jako matrycy, na którą nanoszony jest silikonowy roztwór - najczęściej polidimetylosiloksan (PDMS). Po przeprowadzeniu polimeryzacji w podwyższonej temperaturze, utwardzony PDMS pełni funkcję formy odlewniczej do dalszego tworzenia mikroigieł [67].

Badacze zaproponowali również metodę dmuchania powietrzem (ang. dry air-blowing, DAB) do wytworzenia DMNs, która jest delikatnym, szybkim i efektywnym podejściem, w którym roztwór polimeru jest formowany w pożądany kształt mikroigły poprzez zastosowanie strumienia suchego powietrza [68]. Litografia poprzez wyciąganie (ang. drawing lithography) to kolejna technika, która może bezpośrednio wytwarzać pożądany kształt mikroigły, bez potrzeby stosowania form lub naświetlania światłem. W tym przypadku, ciekły lub miękki materiał (np. polimer) jest mechanicznie wyciągany w górę z powierzchni za pomocą igły, końcówki lub specjalnego narzędzia. W trakcie tego procesu materiał rozciąga się i formuje stożkowe struktury przypominające mikroigły [69].

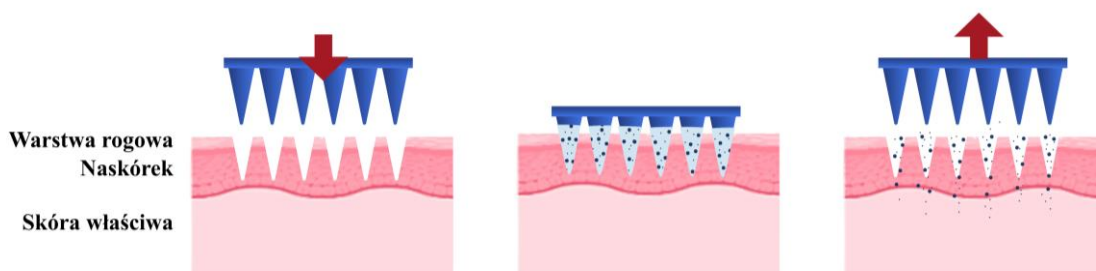
Rozpuszczalne mikroigły oferują wiele zalet, takich jak szybkie rozpuszczanie, krótki czas aplikacji, niskie koszty, brak ryzyka biologicznych zagrożeń oraz minimalne uszkodzenie skóry [70]. Ich zastosowania obejmują szeroki zakres dziedzin

biomedycznych, w tym leczenie dermatologiczne, diagnozowanie i monitorowanie chorób oraz dostarczanie leków [71]. DMNs okazały się obiecujące w dostarczaniu kosmetyków [72], szczepionek [73], terapii przeciwnowotworowych [74], zarządzaniu bólem [75], leczeniu stanów zapalnych [76], cukrzycy [77] oraz zaburzeń skórnych [78]. Pomimo ich potencjału, istnieją nadal bariery dla ich komercjalizacji. Przewidywane przyszłe kierunki rozwoju obejmują np. przeznaczone do noszenia plastry DMN, które będą integrować diagnozowanie i leczenie chorób [54].

Ze względu na liczne zalety, jakie oferują rozpuszczalne mikroigły, to właśnie ta technologia została wybrana do opracowania w ramach niniejszej pracy doktorskiej, co zostanie szerzej opisane w sekcji eksperymentalnej. W mikroigłach tych możliwe jest precyzyjne kształtowanie ich geometrii oraz kontrola nad właściwościami materiału nośnego, co pozwala na dostosowanie zarówno dawki, jak i profilu uwalniania substancji czynnej. Właściwości te czynią mikroigły szczególnie obiecującym narzędziem w medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza w kontekście bezpiecznego i mało bolesnego podawania leków zwierzętom. Zagadnienia te zostaną szczegółowo omówione w części eksperymentalnej, obejmującej opracowanie, charakterystykę i ocenę skuteczności zaprojektowanych systemów mikroigłowych.

3.1.4 Powlekane mikroigły

Powlekane mikroigły (ang. coated microneedles, CMNs) z warstwą leku na powierzchni zostały zaprojektowane w celu uwalniania substancji czynnej po ich wprowadzeniu do tkanek (Rys.7) [79]. Wytworzenie mikroigieł powlekanych jest często realizowane przy zastosowaniu podobnych metod i materiałów jak w przypadku wszystkich wcześniej opisanych typów mikroigieł, ponieważ mogą one być zarówno stałe, jak i biodegradowalne. Kluczowym etapem w tworzeniu powlekanych mikroigieł jest nałożenie powłoki leku (w tym małych cząsteczek, peptydów, białek czy kwasów nukleinowych), co można osiągnąć za pomocą różnych technik [80]. Powlekanie może



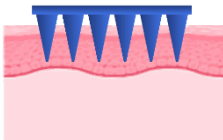
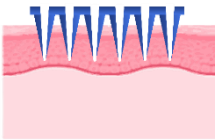
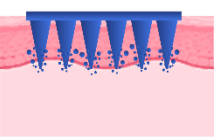
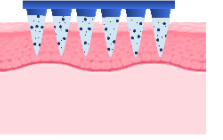
Rysunek 7 Mechanizm działania mikroigieł powlekanych.

obejmować całą powierzchnię mikroigieł, jednak obecnie coraz częściej stosuje się technikę, w której powłoka ogranicza się tylko do trzonków mikroigieł [81].

Badania wykazały, że mikroigły wykonane z polilaktydowego kwasu (PLA), drukowane w technologii 3D i powlekane metodą zanurzenia (ang. dip coating), polegającą na zanurzeniu mikroigły w cieczy powłokowej, mogą stanowić skuteczne systemy dostarczania leków, umożliwiając równomierne naniesienie substancji czynnej na mikroigłach [82]. Inne badania wskazują, że powlekanie lekiem może być przeprowadzone poprzez nałożenie kropli płynnej substancji bezpośrednio na powierzchnię mikroigły. Procedura ta, znana jako drukowanie atramentowe (ang. inkjet printing), została wykorzystana między innymi do dostarczania leków przeciwnowotworowych [83]. Do innych metod powlekania należą techniki takie jak powlekanie cienkowarstwowe, powlekanie rozpylaniem czy nakładanie powłok warstwa po warstwie [80].

Poniżej przedstawiono tabelę porównującą wszystkie wymienione rodzaje mikroigieł i ich właściwości (Tab. 1).

Tabela 1 Porównanie 4 typów mikroigieł: stałych, pustych w środku, rozpuszczalnych oraz powlekanych.

RODZAJ MIKROIGIEŁ	STAŁE	PUSTE W ŚRODKU	ROZPUSZCZALNE	POWLEKANE
				
Zasada działania	„Nakłuj i nałóż”	„Nakłuj i przepuść”	„Nakłuj i uwolnij”	„Pokryj i nakłuj”
Material	Krzem, metale, polimery, ceramika.	Krzem, metale, szkło i niektóre polimery.	Polimery rozpuszczalne (np. chitozan, PVP, kwas poli- γ -glutaminowy, PVA, żelatyna, celuloza, alginian, kwas hialuronowy).	Krzem, metale, polimery, szkło.
Technologia wytwarzania	Fotolitografia, trawienie na sucho i mokro oraz druk 3D (DLP, SLA).	Druk 3D, polimeryzacja dwufotonowa (2PP) oraz techniki termicznego odciskania nanoimprintem.	Mikroodlewanie (w formach silikonowych), druk 3D (DLP, SLA), dmuchanie powietrzem (DAB), litografia.	Technologie podobne jak w pozostałych mikroigłach + mikropowlekanie, naporowywanie, druk atramentowy, rozpylanie, zanurzanie.
Zastosowanie	Tworzenie mikrokanalików w skórze, zwiększenie penetracji leków miejscowych.	Pobieranie próbek diagnostycznych, dostarczanie insuliny, terapia komórkowa.	Dostarczanie kosmetyków, szczepionek, terapia przeciwnowotworowa, zarządzanie bólem, leczenie stanów zapalnych, cukrzyca oraz zaburzenia skórne.	Szybkie uwalnianie leków, szczepionki.
Przewaga	Duża wytrzymałość mechaniczna, dobra morfologia, prosta konstrukcja, możliwość wielokrotnego użycia, precyzyjna penetracja.	Możliwość podawania większej ilości substancji, funkcjonalność podobna do klasycznych igieł.	Szybkie rozpuszczanie, krótki czas aplikacji, niskie koszty, brak odpadów biohazardowych, bezpieczeństwo (brak ryzyka pozostania fragmentów w skórze).	Umożliwiają precyzyjne dawkowanie niewielkiej ilości substancji, szybkie działanie.

3.2 Przewagi mikroigieł w dostarczaniu leków

Jak wspomniano wcześniej mikroigły stanowią obiecującą alternatywę dla konwencjonalnych metod iniekcji, oferując liczne korzyści w szerokim zakresie zastosowań medycznych i farmaceutycznych. Te mikroskalowe struktury, umożliwiając podanie substancji leczniczych śródskórną, minimalizując odczuwanie bólu oraz zwiększając bezpieczeństwo procedury w porównaniu do tradycyjnych igieł hipodermicznych.

Z perspektywy immunologicznej, stosowanie klasycznych igieł wiąże się ze zwiększonym ryzykiem infekcji, kontaminacji w przypadku przypadkowego zakłucia, a także możliwością wystąpienia reakcji alergicznych, krwawienia lub obrzęku w miejscu podania [84]. Dzięki niewielkim rozmiarom oraz wysokiej biokompatybilności, wynikającej z materiału użytego do ich wytworzenia, mikroigły znacząco redukują te zagrożenia. Ich ograniczona głębokość penetracji i niewielki obszar działania pozwalają na dostarczenie leku przy jednoczesnym minimalnym uszkodzeniu warstw skóry, co przekłada się na ograniczone podrażnienie tkanek oraz lepszą tolerancję terapii przez pacjenta.

Mikroigły są w stanie penetrować warstwę rogową naskórka przy minimalnej aktywacji receptorów bólowych, co sprawia, że ich aplikacja jest w większości przypadków bezbolesna i może znacząco zwiększać akceptację oraz zgodę na terapię [85]. *Zvezdin* i in. wykazali, że mikroigły wykonane z kwasu hialuronowego są nieinwazyjne, przenikając jedynie naskórek bez osiągnięcia warstwy skórnej właściwej. Badania wykazały obecność 17 odrębnych miejsc penetracji mikroigieł natychmiast po aplikacji, z czego 4 były widoczne jeszcze po 2 godzinach. Pomimo pewnych różnic w głębokości penetracji naskórka, nie miały one wpływu na żywotność komórek skóry [86].

Badania z udziałem ludzi wykazały, że urządzenia z mikroigłami stałymi są bezpieczne i dobrze tolerowane po aplikacji na skórę osób różnej płci, o różnych typach skóry i w różnym wieku. Ponadto zastosowanie tych urządzeń na skórze twarzy wywołuje łagodną, samoograniczającą się i szybko ustępującą reakcję rumieniową [87]. Czynniki takie jak długość i konstrukcja mikroigieł mogą wpływać na stopień uszkodzenia bariery skórnej i podrażnienie, jednak ogólnie mikroigły powodują jedynie minimalne, krótkotrwałe podrażnienie [88]. Rozważania dotyczące bezpieczeństwa technologii mikroigieł obejmują ból, podrażnienie skóry, degradację *in vivo* oraz stabilność podczas

przechowywania [89]. Istotnymi aspektami są również biokompatybilność oraz mechaniczna wytrzymałość materiałów używanych do wytworzenia mikroigieł [90]. W miarę wprowadzania produktów z mikroigłami na rynek, ciągła ocena ich skuteczności i bezpieczeństwa pozostaje kluczowa dla ich powszechnego zastosowania w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej.

Ponadto, mikroigły stanowią obiecującą metodę kontrolowanego uwalniania leków, umożliwiając długotrwały efekt terapeutyczny poprzez stopniowe uwalnianie substancji czynnej przez kilka dni lub miesięcy po jednorazowej aplikacji [91]. Najnowsze badania podkreślają różnorodne podejścia do poprawy kinetyki uwalniania leków. Oh i Jung przedstawili integrację nanocząsteczek (NP) z mikroigłami, co zwiększa rozpuszczalność leku i jego skuteczność terapeutyczną [92]. Amer i Chen analizują matryce mikroigieł formujących hydrożel, wykazując, że matryce zawierające większą liczbę igieł mogą osiągać dłuższe uwalnianie substancji, przy czym matryca z 16 igłami w pełni uwalniała lek okulistyczny w ciągu czterech tygodni [93]. Dodatkowo, mikroigły o przedłużonym działaniu mogą być wytwarzane z polimerów nierozpuszczalnych w wodzie, co umożliwia długotrwałe dostarczanie leków [94].

Zebrane badania podkreślają zalety i potencjał mikroigieł w zakresie kontrolowanego i przedłużonego uwalniania leków w różnych zastosowaniach, co czyni tę technologię obiecującym rozwiązaniem w nowoczesnej medycynie, także weterynaryjnej.

Nowoczesne technologie mikroigieł, w szczególności te wykorzystujące materiały rozpuszczalne, wykazują potencjalne korzyści w ograniczaniu odpadów biologicznie niebezpiecznych i redukcji zanieczyszczenia środowiska w porównaniu do konwencjonalnych systemów opartych na igłach [95]. Ponadto eliminują ryzyko niezamierzonej kontaminacji oraz potrzebę utrzymywania łańcucha chłodniczego podczas przechowywania szczepionek [96]. Badania wskazują, że plastry mikroigłowe mogą zachować skuteczność szczepionek przeciwko grypie w temperaturze 60 °C przez 4 miesiące, nawet w niekorzystnych warunkach środowiskowych, co umożliwia ich przechowywanie na półkach aptecznych bez konieczności chłodzenia [97].

Mikroigły umożliwiają również bardziej opłacalne podejście do dostarczania leków. Szczególnie widoczna redukcja kosztów dotyczy produkcji szczepionek, gdzie efektywność kosztowa została oszacowana na 0,95 USD za dawkę w porównaniu do 1,65 USD dla iniekcji podskórnej [98]. Co więcej, mikroigły są przyjazną dla użytkownika

metodą podawania leków i szczepionek. Mogą być aplikowane ręcznie, bez potrzeby stosowania aplikatora, z wysoką skutecznością, co sprawia, że są zdecydowanie preferowane w porównaniu do tradycyjnych iniekcji igłą i strzykawką [99].

Zastąpienie igieł hipodermicznych mikroigłami może znaleźć zastosowanie również w weterynarii. Iniekcje leków weterynaryjnych, mimo swojej skuteczności, mogą wiązać się z istotnym ryzykiem, wpływając negatywnie na dobrostan zwierząt oraz praktykę weterynaryjną [100]. Urazy spowodowane igłami są powszechne w praktyce weterynaryjnej, potencjalnie zagrażając zarówno personelowi, jak i właścicielom zwierząt [101]. Iniekcje domięśniowe i podskórne mogą powodować znaczne uszkodzenia tkanek lokalnych u zwierząt, co potwierdzono poprzez zwiększoną aktywność kinazy kreatynowej w miejscach wstrzyknięcia u królików i świń [102]. Zakres uszkodzeń jest proporcjonalny do objętości wstrzyknięcia i różni się w zależności od gatunku. Powtarzane iniekcje mogą prowadzić do nieprawidłowości skórnych, takich jak stan zapalny, stwardnienie, zwłóknienie i owrzodzenie [103].

Potrzeba optymalnych metod przezskórnego dostarczania leków w medycynie weterynaryjnej wynika z kilku czynników. Przezskórne podawanie leków oferuje korzyści w porównaniu do konwencjonalnych metod doustnych i iniekcyjnych, w tym zmniejszenie efektu pierwszego przejścia w wątrobie, zwiększenie skuteczności terapeutycznej i poprawę przestrzegania terapii przez właścicieli zwierząt [104]. Stanowi nowatorskie podejście do podawania leków, szczególnie korzystne dla trudnych do leczenia pacjentów, jednak skuteczność dostarczania przezskórnego zależy od właściwości bariery skórnej i rozpuszczalności lipidowej leku. Chociaż terapie przezskórne z wykorzystaniem mikroigieł wykazują obiecujące wyniki, brakuje kontrolowanych badań w medycynie weterynaryjnej, co podkreśla potrzebę dalszych badań w celu oceny ich skuteczności i bezpieczeństwa. Rozwój systemów dostarczania leków, w tym plastrów mikroigłowych, ma na celu poprawę skuteczności terapeutycznej, redukcję stresu zwierząt podczas podawania oraz zmniejszenie zarówno kosztów finansowych, jak i czasowych w praktyce weterynaryjnej [105]. Najważniejsze przewagi mikroigieł w dostarczaniu leków zostały podsumowane poniżej (Tab. 2).

Tabela 2 Najważniejsze właściwości mikroigieł w kontekście ich zastosowania w medycynie ludzkiej oraz w weterynarii. Na podstawie [84-105].

Nr	Przewaga mikroigieł	Zastosowanie w medycynie ludzkiej	Potencjalne zastosowanie w medycynie weterynaryjnej
1.	Minimalnie inwazyjne	Aplikacja szczepionek, insuliny, leków przeciwbólowych i biologicznych przy minimalnym uszkodzeniu skóry; ograniczenie reakcji zapalnej w miejscu podania.	Podawanie szczepionek profilaktycznych u zwierząt towarzyszących i hodowlanych; podanie leków w przypadkach wymagających redukcji stresu i urazowości (np. u kotów, koni).
2.	Dobrze tolerowane	Redukcja bólu i lęku związanego z iniekcjami klasycznymi; większa skłonność pacjentów do przestrzegania zaleceń terapeutycznych.	Poprawa współpracy w terapii zwierząt lękliwych i agresywnych; ułatwienie podawania leków bez konieczności stosowania przymusu fizycznego czy sedacji.
3.	Zwiększona biodostępność	Skuteczne przenikanie substancji biologicznie czynnych (peptydy, białka, przeciwciała monoklonalne), które trudno podać drogą doustną z powodu degradacji enzymatycznej.	Aplikacja leków przeciwpasożytniczych, antybiotyków czy leków hormonalnych, które wymagają wysokiej biodostępności przy zachowaniu komfortu zwierzęcia.
4.	Szybkie działanie	Natychmiastowe wchłanianie leków przeciwbólowych, insulin czy glukagonu w stanach nagłych.	Zastosowanie w stanach nagłych u zwierząt, np. podanie leków przeciwdrgawkowych lub przeciwbólowych w nagłych przypadkach (psy, konie sportowe).
5.	Omijanie metabolizmu „pierwszego przejścia”	Dostarczanie substancji, które ulegają szybkiemu metabolizmowi wątrobowemu (np. hormony peptydowe, szczepionki DNA, leki eksperymentalne).	Podawanie leków hormonalnych (np. progestagenów w terapii rozrodu), leków uspokajających czy środków przeciwzapalnych u dużych zwierząt gospodarskich.
6.	Zwiększona stabilność składników aktywnych i cząsteczek biologicznych	Utrwalenie biologicznie aktywnych składników (szczepionki, przeciwciała, białka rekombinowane) dzięki wykorzystaniu polimerów przez co możliwa jest eliminacja potrzeby utrzymywania łańcucha chłodniczego.	Szczepionki dla bydła, drobiu i trzody chlewnej wymagające stabilności w trudnych warunkach środowiskowych lub wymagające dalekiego transportu; preparaty immunomodulujące dla zwierząt domowych.
7.	Kontrolowany profil uwalniania	Kontrolowane uwalnianie leku przez kilka godzin lub nawet dni.	Antybiotyki długodziałające, środki przeciwpasożytnicze (np. w walce z inwazjami u przeżuwaczy), hormony płciowe w regulacji cyklu rozrodczego.
8.	Zredukowane ryzyko zakłuć igłami	Eliminacja powikłań związanych z zakłuciami igłami u personelu medycznego; zmniejszenie ryzyka transmisji chorób zakaźnych.	Ograniczenie ryzyka ekspozycji lekarzy weterynarii i hodowców na choroby odzwierzęce oraz zoonozy przenoszone drogą parenteralną.

9.	Zredukowana ilość odpadów biologicznych	Brak klasycznych igieł - zmniejszenie ilości odpadów medycznych podlegających specjalistycznej utylizacji.	Ograniczenie generowania odpadów w dużych fermach drobiu i bydła; redukcja kosztów utylizacji materiałów zakaźnych.
10.	Możliwa samodzielna aplikacja	Samodzielne podawanie insuliny, szczepionek lub terapii eksperymentalnych przez pacjentów w warunkach domowych; zwiększenie dostępności terapii.	Samodzielne podawanie leków i szczepionek przez właścicieli zwierząt domowych oraz przez hodowców pod nadzorem lekarza weterynarii.
11.	Różnorodność	Mogą być projektowane i wytwarzane w wielu wariantach konstrukcyjnych, materiałowych i technologicznych, zależnie od: • rodzaju dostarczanej substancji (lek, szczepionka, białko, DNA, przeciwciało), • drogi podania (przezskórna, przezbłonowa), • wymagań biologicznych i anatomicznych pacjenta (człowiek, zwierzę, gatunek, wiek, grubość skóry), • oczekiwanego czasu i profilu uwalniania.	

3.3 Możliwość zastosowania w weterynarii

Potencjał wykorzystania plastrów mikroigłowych pojawia się przede wszystkim w podawaniu szczepionek, jako że takie podejście zostało szeroko zbadane w związku z pandemią COVID-19. W weterynarii szczepienia przede wszystkim chronią zdrowie zwierząt, zwiększają ich reprodukcyjność, a także zapobiegają zagrażającym ludziom zoonozom. Mimo skuteczności tradycyjnych szczepionek, mają one ograniczenia w zakresie bezpieczeństwa, efektywności i czasu produkcji. Plastry mikroigłowe stanowią obiecującą metodę dostarczania szczepionek śródskórnie, wykazując porównywalną lub wyższą immunogenność przy mniejszych dawkach niż wstrzyknięcia domięśniowe. Badania wskazują, że ta technologia może zwiększyć stabilność szczepionek, co ułatwi ich transport i podanie, ale także obniży koszty, co czyni ją innowacyjnym rozwiązaniem dla masowych szczepień w weterynarii. Co ciekawe, *Choi* i inni wykazali, że szczepionka przeciwko grypie psów może być skutecznie podawana przez uszy za pomocą mikroigieł reagujących na nacisk (ang. insertion-responsive microneedle, IRMN), przy pełnym i szybkim wprowadzeniu do skóry w ciągu 10 sekund [106].

Mikroigły stanowią również atrakcyjną alternatywę w przypadku podawania środków przeciwbólowych i znieczulających. Współczesne standardy podkreślają znaczenie proaktywnej, wielomodalnej terapii, która łączy różne mechanizmy działania leków przeciwbólowych i znieczulających. Proces ten rozpoczyna się od premedykacji przed

zabiegami chirurgicznymi i obejmuje ciągłą kontrolę bólu w okresie pooperacyjnym [107]. Szczególną uwagę należy poświęcić pacjentom z grup podwyższonego ryzyka - zwierzętom geriatrycznym, pediatrycznym, a także obciążonym chorobami przewlekłymi, takimi jak niewydolność serca, wątroby czy nerek [108]. W ostatnich latach MNs zyskały na znaczeniu jako innowacyjna alternatywa dla tradycyjnych igieł hipodermicznych w podawaniu środków przeciwbólowych i znieczulających. Przykładem jest zastosowanie mikroigieł pokrytych tramadolem, które u szczurów wykazały przedłużone działanie przeciwbólowe trwające do 48 godzin, w porównaniu do zaledwie 2 godzin po bezpośrednim wstrzyknięciu do stawu skroniowo-żuchwowego [109].

Interesującym kierunkiem badań jest również zastosowanie biodegradowalnych mikroigieł w leczeniu bólu u zwierząt gospodarskich. *Almodovar* i in. opracowali chitozanowy plaster z meloksykamem (niesteroidowy lekiem przeciwzapalnym stosowanym w łagodzeniu bólu), który po aplikacji na ucho bydła umożliwiał kontrolowane uwalnianie leku przez siedem dni [34]. Ta technologia otwiera nowe perspektywy w długoterminowej kontroli bólu u zwierząt hodowlanych, oferując nie tylko wygodę aplikacji, ale także minimalizację stresu związanego z iniekcjami.

Jednym z najpowszechniejszych, a jednocześnie często niedostatecznie diagnozowanych schorzeń u psów i kotów jest zwyrodnieniowa choroba stawów. Szczególne wyzwanie stanowi przewlekły ból neuropatyczny, wynikający z uszkodzenia lub chorób układu somatosensorycznego, którego diagnoza i leczenie wymagają interdyscyplinarnego podejścia [110]. Mikroigły stanowią obiecującą technologię w leczeniu bólu przewlekłego związanego z tymi chorobami [75]. Badania przeprowadzone na modelach szczurzych z reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazały, że mikroigły zawierające kwas hialuronowy mogą skutecznie dostarczać melitynę (peptyd o działaniu przeciwzapalnym) do skóry, hamując progresję choroby. Profil uwalniania leku sugeruje zwiększoną skuteczność terapeutyczną oraz redukcję częstotliwości podawania [111].

Inne badania potwierdziły skuteczność transdermalnych plastrów z mikroigłami wykonanymi z poliwinylpirolidonu (PVP) K90 i kwasu hialuronowego, stosując metodę dwustopniowego odlewania. Mikroigły załadowane melityną modulowały poziomy cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, co znacząco zahamowało postęp reumatoidalnego zapalenia stawów u modeli zwierzęcych [112]. MNs zyskały również

na znaczeniu w terapii onkologicznej, szczególnie w medycynie człowieka, gdzie są wykorzystywane do podawania leków, wczesnej diagnostyki oraz terapii skojarzonej. Wyniki badań przedklinicznych na modelach zwierzęcych, niezbędnych w opracowywaniu terapii dla ludzi, znajdują również zastosowanie w medycynie weterynaryjnej w ramach koncepcji „One Medicine” [113].

Nowoczesne rozwiązania, takie jak sensoryczne mikroigły umożliwiające wczesne wykrywanie nowotworów czy wielofunkcyjne systemy do jednoczesnej terapii, profilaktyki i diagnozy, stanowią obiecującą perspektywę w onkologii weterynaryjnej [114]. Czerniak, wywodzący się z melanocytów, jest częściej diagnozowany u psów niż u kotów i pozostaje istotnym problemem klinicznym [115]. Przełomowe badania *Liao* i in. proponują innowacyjną terapię czerniaka, łączącą chemioterapię z fototermiczną terapią synergistyczną, w której wykorzystano biodegradowalne mikroigły z alginianu sodu, żelatyny i kwasu hialuronowego, przenoszące nanocząstki kurkuminy. W modelu zwierzęcym wykazano zarówno skuteczność przeciwnowotworową, jak i przyspieszenie gojenia ran po usunięciu guza [116]. W innym badaniu rozpuszczalne mikroigły z poliwinylpirolidonu (PVP) i kwasu hialuronowego dostarczały oksydazę glukozy (GOx), stosowaną w terapii redukującej guza. Transdermalna aplikacja u myszy prowadziła do istotnego zahamowania wzrostu nowotworu bez widocznych skutków ubocznych oraz do zmian w unaczynieniu (angiogenezie) w obrębie guza [117]. Dodatkowo, Bhatnagar i in. opracowali światłoaktywowaną matrycę mikroigieł z PVP/PVA, umożliwiającą wielokrotne podanie doksorubicyny (leku stosowanego w chemioterapii) [118].

Zastosowanie mikroigieł w terapii nowotworów w medycynie weterynaryjnej otwiera nowe możliwości w zakresie minimalnie inwazyjnych metod leczenia. Umożliwiają one precyzyjne dostarczanie leków przeciwnowotworowych, zwiększenie skuteczności terapii skojarzonej oraz potencjalne ograniczenie skutków ubocznych, co czyni je obiecującym rozwiązaniem w onkologii weterynaryjnej.

Choroby dermatologiczne u małych zwierząt stanowią kolejny istotny problem w praktyce weterynaryjnej, obejmując m.in. alergie, atopowe zapalenie skóry, infekcje bakteryjne, łysienie, choroby autoimmunologiczne oraz nowotwory [119]. Mikroigły wykazują obiecujące zastosowanie w leczeniu tych schorzeń, w tym w terapii łysienia z zatrzymaniem cyklu wzrostu włosa, gdzie zastosowanie 3 mm mikroigieł u psów

zatrzymało postęp choroby na 3 miesiące [120]. Badania potwierdziły również skuteczność mikroigieł w przyspieszaniu gojenia ran poprzez transdermalne dostarczanie antybiotyków (np. azytromycyny) oraz ekstraktów roślinnych, takich jak zielona herbata [121-122]. Ponadto, mikroigły umożliwiają precyzyjne podawanie leków immunosupresyjnych (np. cyklosporyny A) w leczeniu stanów zapalnych skóry, takich jak atopowe zapalenie skóry i łuszczyca, co czyni je innowacyjnym narzędziem w dermatologii weterynaryjnej [123].

W kontekście weterynarii, zastosowanie mikroigieł w leczeniu chorób przyzębia i innych schorzeń jamy ustnej zwierząt stanowi obiecującą alternatywę dla konwencjonalnych metod terapeutycznych. Zhang i współpracownicy opracowali immunomodulujące mikroigły umożliwiające kontrolowane uwalnianie tetracykliny oraz cytokin (IL-4 i TGF- β), co w modelu myszy skutkowało regeneracją tkanek przyzębia po ośmiu tygodniach od aplikacji [124]. Inna grupa badawcza zaproponowała rozpuszczalne mikroigły na bazie kwasu hialuronowego i polisacharydu pochodzącego z rośliny z gatunku storczykowatych, zawierające nanonośniki triamcynolonu, które wykazały skuteczność w leczeniu owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej u szczurów [125]. Minocyklina - powszechnie stosowana w leczeniu chorób przyzębia u zwierząt, w formie mikroigłowego plastra (żelatyna/HA) wykazała znaczną redukcję utraty kości wyrostka zębodołowego, stanu zapalnego i aktywności *Porphyromonas gingivalis* w modelu zapalenia przyzębia u szczurów [126]. Poza mikroigłami rozpuszczalnymi, mikroigły lite w połączeniu z żelem z kwasu hialuronowego również wykazały zdolność do stymulacji regeneracji tkanek przyzębia i zwiększenia grubości dziąseł (szczególnie istotne u starszych psów), przewyższając efektywnością samodzielne iniekcje kwasu hialuronowego [127].

Choroby okulistyczne u zwierząt obejmują szerokie spektrum schorzeń, wpływających zarówno na dobrostan, jak i efektywność produkcji zwierzęcej, szczególnie w przypadku gatunków gospodarskich, u których często są one bagatelizowane [128-129]. Leczenie obejmuje miejscowe stosowanie preparatów farmakologicznych (np. cyklosporyna A, inhibitory anhidrazy węglanowej) oraz interwencje chirurgiczne, jednak biodostępność leków podawanych do oka jest znacząco ograniczona przez łzawienie, odruchowe wypłukiwanie oraz bariery anatomiczne [130]. Mikroskopijne igły mogą stanowić skuteczną alternatywę, umożliwiając minimalnie inwazyjne pokonanie barier oka i zwiększenie efektywności terapeutycznej leków [131]. Rozpuszczalne mikroigły

wykonane z PVP i PLGA, testowane na modelu zwierzęcym, umożliwiały dostarczanie makrocząsteczek (np. owoalbumin) do tkanek tylnego odcinka oka oraz zapewniały ich kontrolowane uwalnianie nawet przez 2 miesiące [132]. Wykazano również skuteczne przenikanie przez twardówkę i szybkie rozpuszczanie mikroigieł z triamcynolonem, co pozwalało osiągnąć efekt porównywalny z iniekcją dogąłkową, przy jednoczesnym zmniejszeniu dawki i ryzyka działań niepożądanych [133]. Dodatkowo, zastosowanie mikroigłowych systemów z PVP i PVA umożliwiło efektywne dostarczanie trudno rozpuszczalnych leków przeciwgrzybiczych (np. amfoterycyny B) oraz antybiotyków (np. besifloksacyny) w leczeniu zapaleń rogówki [134-135].

Technologia mikroigieł przyczyniła się również do rozwoju POC, umożliwiając minimalnie inwazyjne, dobrze tolerowane i szybkie pobieranie próbek, co ma szczególne znaczenie przy częstym monitorowaniu chorób przewlekłych, takich jak cukrzyca [136-137]. W weterynarii mikroigły ograniczają stres u zwierząt, zwiększając wiarygodność wyników diagnostycznych i ułatwiając integrację z biosensorami oraz systemami typu „lab-on-a-chip” [138-139]. Ich zastosowanie jest szczególnie obiecujące w hodowli zwierząt gospodarskich i rasowych, gdzie wczesne wykrywanie infekcji ma kluczowe znaczenie dla zdrowia, produktywności i zachowania wartości genetycznej [140-141]. Przykładowo, mikroigłowe testy POC mogą znacząco ograniczyć rozprzestrzenianie się chorób takich jak *mastitis* (zapalenie wymienia) u bydła, grypa świń czy ptasia grypa. Urządzenia oparte na mikroigłach, takie jak te zaproponowane przez Blicharz i in., umożliwiają pobieranie krwi w sposób bezpieczny, prosty i zatwierdzony przez FDA [142]. Dzięki niewielkim rozmiarom mikroigły minimalizują ryzyko urazu tkanek, co jest istotne u zwierząt nowo narodzonych, małych gatunków oraz zwierząt laboratoryjnych i hodowlanych [143]. Zaawansowane mikroigłowe systemy POC umożliwiają również ciągły, bezprzewodowy monitoring biomarkerów, takich jak glukoza¹⁴⁴, elektrolity (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) [145], czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF) [146] czy wskaźniki infekcji malarycznej [147]. Utrzymanie równowagi elektrolitowej ma kluczowe znaczenie w chorobach nerek, okresie okołoporodowym u krów mlecznych oraz dla kondycji fizycznej koni wyścigowych i psów pracujących [148-149]. Mikroigłowe systemy diagnostyczne mogą również wspierać szybkie wykrywanie zakażeń bakteryjnych i wirusowych, eliminując konieczność transportu próbek i skracając czas potrzebny na interwencję [150]. Główne

możliwości zastosowania mikroigłowych plastrów zostały podsumowane poniżej (Tab. 3).

Tabela 3 Możliwe zastosowania mikroigieł w weterynarii, na podstawie [106-150].

Obszar zastosowania	Przykłady
Diagnostyka	- Minimalnie inwazyjne pobieranie krwi i płynu śródmiąższowego do szybkiej diagnostyki. - Mikroigłowe biosensory do monitorowania glukozy, elektrolitów (Na^+, K^+, Ca^{2+}) oraz wybranych biomarkerów w czasie rzeczywistym.
Stomatologia	- Mikroigły z antybiotykami (np. tetracykliną, minocykliną) do wspomagania leczenia zapalenia przyzębia. - Mikroigły zawierające cytokiny lub glikokortykosteroidy (np. triamcynolon) do regeneracji tkanek przyzębia i leczenia owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej.
Leczenie bólu oraz znieczulanie	- Mikroigły z lekami miejscowo znieczulającymi (np. lidokaina). - Mikroigły powlekane lekami przeciwbólowymi (np. tramadol) do leczenia bólu stawowego. - Plastry mikroigłowe z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (np. meloksykam) do długotrwałej kontroli bólu u zwierząt gospodarskich.
Okulistyka	- Mikroigły z glikokortykosteroidami (np. triamcynolon) w leczeniu stanów zapalnych oka. - Mikroigły z cyklosporyną A w terapii zapaleń rogówki i spojówki. - Mikroigłowe systemy dostarczania leków przeciwgrzybiczych (np. amfoterycyna B) i antybiotyków w zapaleniach rogówki.
Onkologia	- Mikroigły zawierające związki przeciwnowotworowe (np. kurkuminę) w terapii skojarzonej (chemio- i fototermicznej). - Mikroigły z enzymami (np. oksydaza glukozy) jako strategię metabolicznej terapii przeciwnowotworowej (badania przedkliniczne). - Mikroigły z cytostatykami (np. dokсорubicyna) jako potencjalne systemy miejscowego dostarczania leków w nowotworach gruczołu mlekowego u psów.
Dermatologia i leczenie ran	- Stałe mikroigły do wspomagania terapii łysienia i regulacji cyklu wzrostu włosa. - Mikroigły na bazie kwasu hialuronowego do przyspieszania gojenia ran i ograniczania infekcji. - Mikroigły z glikokortykosteroidami (np. deksametazon) w leczeniu stanów zapalnych skóry (np. atopowe zapalenie skóry).
Szczepienia	- Rozpuszczalne plastry mikroigłowe do szczepień profilaktycznych u zwierząt towarzyszących i gospodarskich. - Mikroigły reagujące na wkłucie (IRMN) do szczepień psów przeciwko grypie (badania eksperymentalne).
Choroby przewlekłe	- Mikroigły z peptydami przeciwzapalnymi (np. melityna) w leczeniu przewlekłych zapaleń stawów (modele zwierzęce). - Plastry mikroigłowe do długotrwałego leczenia bólu w chorobie zwyrodnieniowej stawów. - Mikroigły z kwasem hialuronowym do wspomagania leczenia ran przewlekłych.

4 RT-LAMP w diagnostyce z potencjałem do zastosowania w medycynie weterynaryjnej

Drugim z obszarów badawczych poruszanych w niniejszej pracy doktorskiej jest diagnostyka POC do szybkiego wykrywania zakażeń wirusowych u zwierząt, wykorzystująca reakcję RT-LAMP. Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) i kwas rybonukleinowy (RNA) są najważniejszymi cząsteczkami występującymi w komórkach. DNA przechowuje informacje genetyczne, które kodują sekwencję aminokwasów budujących białka. RNA jest chemicznie podobne do DNA i pośredniczy w procesie translacji, a więc przepisywania języka DNA na język białek w rybosomach [151]. RNA często pełni funkcję materiału genetycznego wirusów, które stanowią istotne wyzwanie biologiczne i medyczne ze względu na wysoką częstość mutacji, co sprzyja powstawaniu dużej różnorodności genetycznej. Szybkie i dokładne wykrywanie wirusów RNA jest kluczowe, aby szybko diagnozować choroby zakaźne [152]. Dostępnych jest wiele metod wykrywania wirusów, a najczęściej stosowanymi metodami są wykrywanie przeciwciał i testy amplifikacji kwasu nukleinowego (ang. nucleic acid amplification techniques NAAT) [153].

Tradycyjne metody wykrywania wirusów RNA często wymagają złożonych i czasochłonnych procesów, co utrudnia szybką reakcję. Na przykład reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) jest złotym standardem w przypadku testu opartego na amplifikacji kwasu nukleinowego. Pomimo szerokiego zastosowania, PCR pozostaje ograniczone do dobrze wyposażonych laboratoriów. Potrzeba stosowania skomplikowanych i drogich termocyklerów utrudnia wykorzystanie metody PCR w analizie testów wykonywanych w miejscu opieki (ang. point-of-care-tests, POCT) [154].

W ostatnim czasie platformy oparte na izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych stały się potężnymi narzędziami do czułego, specyficznego i szybkiego wykrywania wirusów RNA. Izotermiczna amplifikacja DNA za pośrednictwem pętli (ang. loop-mediated isothermal amplification, LAMP), po raz pierwszy została opisana w roku 2000 przez T. Notomi i współpracowników [155]. Reakcja ta umożliwia szybkie i specyficzne namnażanie DNA (LAMP) lub RNA (ang. reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) w środowisku o stałej temperaturze, zwykle w zakresie 60–65

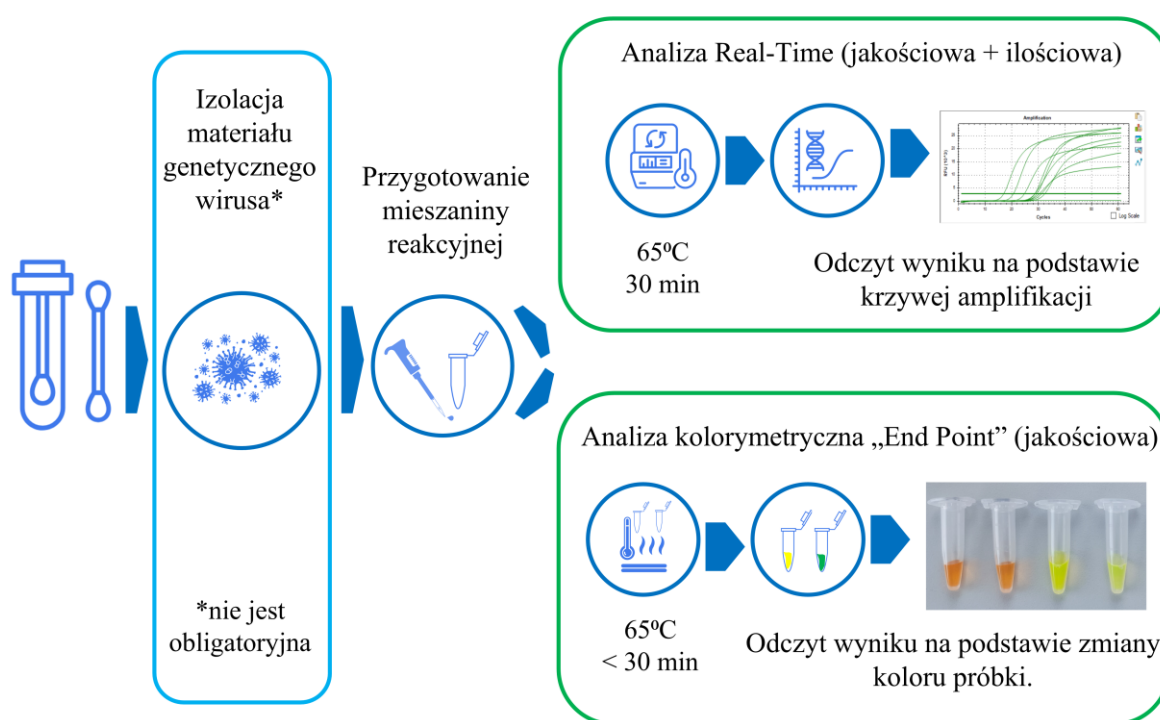
°C, bez konieczności zmian temperatury jak w przypadku konwencjonalnej reakcji PCR. Istotne wady związane z wymogiem drogiego i zaawansowanego sprzętu, w tym termocyklera oraz przeszkolonego personelu i wydłużonego czasu trwania reakcji ograniczają potencjał PCR jako szybkiej techniki diagnostycznej w punkcie opieki. Ponadto niespecyficzne wiązanie starterów i zwiększone ryzyko fałszywie dodatnich wyników skutkują niską specyficznością, co dodatkowo utrudnia rozwój technik opartych na PCR do diagnostyki terenowej [156]. Zestawienie głównych właściwości reakcji diagnostycznych RT-qPCR (ang. quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction) oraz RT-LAMP przedstawiono w tabeli poniżej (Tab.4).

Tabela 4 Właściwości genetycznych testów diagnostycznych: RT-qPCR oraz RT-LAMP, na podstawie [157].

Właściwość	RT-qPCR	RT-LAMP
Czułość reakcji	Niska	Wysoka
Specyficzność amplifikacji	Niższa niż RT-LAMP (2 starterów)	Wysoka (4-6 starterów)
Czas testu	Długi (ok. 3 h)	Krótki (mniej niż 1 h)
Cena testu	Wysoka	Niska
Detekcja	Fluorescencja (pomiar w czasie rzeczywistym “real-time” lub pomiar końcowy “end-point”).	Fluorescencja (pomiar w czasie rzeczywistym “real-time” lub pomiar końcowy “end-point”). Detekcja tzw. „gołym okiem” na podstawie zmiany koloru próbki.
Warunki temperaturowe	Różne cykle temperaturowe (95 °C, 45-65 °C, 72 °C)	Stała (60-65 °C)

Mechanizm LAMP opiera się na użyciu od czterech do sześciu starterów, w tym dwóch starterów pętlowych (pętla F i pętla B), starterów wewnętrznych (odpowiednio FIP i BIP) oraz dwóch starterów zewnętrznych (F3 i B3), które rozpoznają od sześciu do ośmiu specyficznych rejonów docelowej sekwencji. Specjalnie zaprojektowane startery umożliwiają powstawanie struktur w kształcie hantli (ang. dumbbell-shaped structures), które znacznie przyspieszają cykliczny proces amplifikacji. Produkty utworzone podczas etapu cyklicznej amplifikacji są wykorzystywane w fazie elongacji w celu wygenerowania amplifikowanego DNA o różnych rozmiarach. Oprócz starterów metoda LAMP wymaga polimerazy, trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP), siarczanu magnezu, betainy i roztworu buforowego. Reakcja wykorzystuje polimerazy DNA o silnej aktywności wypierania nici (ang. strand displacement) - najczęściej polimerazę Bst (wyizolowaną z *Bacillus stearothermophilus*), której kluczowa działalność umożliwia wydłużanie nici DNA przy jednoczesnym rozdzielaniu podwójnej helisy

[158]. W ten sposób pomijany jest etap denaturacji charakterystyczny dla reakcji PCR. Jednocześnie enzym ma maksymalną wydajność w stałej temperaturze 60–65 °C. Ze względu na te cechy enzymu proces amplifikacji kwasu nukleinowego może być przeprowadzany w warunkach izotermicznych bez potrzeby cykli i etapów obejmujących manipulacje czasem i temperaturą [159]. Do amplifikacji RNA wirusów potrzebny jest również enzym odwrotna transkryptaza, odporny na ciepło. Wykrycie ampikonów LAMP można potwierdzić zarówno wizualnie („end-point”, zmiana zmętnienia mieszaniny, zmiana koloru barwnika) [160], jak i za pomocą fluorescencji poprzez pomiar fluorescencji („end-point” lub „real-time”) z wbudowanych środków interkalujących DNA, takich jak SYBR Green I [161], a także za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (Rys. 8) [162].



Rysunek 8 Schematyczny przebieg diagnostyki opartej na reakcji RT-LAMP.

W testach opartych na obserwacji wizualnej, w których najczęściej stosowanym rozwiązaniem jest kolorymetryczny odczyt ilości końcowego produktu reakcji LAMP [163], można wykorzystywać proste źródła ciepła, takie jak łaźnia wodna, termos czy przenośne (w tym zasilane bateryjnie) urządzenia do izotermicznej amplifikacji materiału

genetycznego [164]. Wadą metody opartej na obserwacji tzw. gołym okiem jest konieczność posiadania „wytrenowanego oka” do prawidłowej interpretacji wyników oraz jej jakościowy charakter, pozwalający jedynie na stwierdzenie czy w próbce jest szukany gen, bez określenia jaka ilość materiału genetycznego jest obecna w próbce. W celu przezwyciężenia tych ograniczeń prowadzi się prace nad wykorzystaniem układów optoelektronicznych i cyfrowej analizy obrazu w mikroprzepływowych chipach o objętościach nano- lub mikrolitrowych, co pozwala na ilościową analizę koloru po zakończeniu reakcji [165].

Reakcja LAMP cechuje się wysoką specyficznością, dużą szybkością reakcji (zakończenie w 30–60 minut), prostotą oraz odpornością na niektóre inhibitory obecne w próbkach biologicznych, co czyni ją atrakcyjnym narzędziem w diagnostyce klinicznej, weterynaryjnej i środowiskowej, zwłaszcza w warunkach polowych [166]. Test LAMP może w krótkim czasie (w ciągu pół godziny) amplifikować i produkować dużą liczbę kopii DNA, zwykle 100 razy wyższą niż konwencjonalny PCR. Pomimo wielu zalet LAMP posiada również wady związane z możliwością niespecyficznego wiązania starterów i tworzenia ich dimerów, jako że stosowanie wielu starterów zwiększa ryzyko hybrydyzacji starter-starter skutkujących amplifikacją bez matrycy, co prowadzi do fałszywie dodatnich wyników [167]. Mając to na uwadze, etap projektowania i doboru odpowiednich stężeń starterów jest jednym z kluczowych etapów w projektowaniu testów opartych na reakcji RT-LAMP.

Wykorzystanie reakcji RT-LAMP może przyczynić się do szybkiej diagnostyki chorób wirusowych w hodowlach czy schroniskach, gdzie z powodu dużego zagęszczenia, stresu, obniżonej odporności i częstego kontaktu między osobnikami jest ona szczególnie istotna.

Do tej pory reakcja RT-LAMP została przetestowana do wykrywania wirusów zwierzęcych wywołujących choroby takie jak na przykład pomór małych przeżuwaczy (ang. *peste des petits ruminants*, PPR). Batten i współpracownicy przedstawili test PPRV RT-LAMP ze starannie dobranymi starterami (celującymi w gen N), które umożliwiają wykrycie wszystkich znanych linii PPRV w czasie < 20 min. Test został oceniony w porównaniu ze „złotym standardem”, czyli testem RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu ponad 200 próbek, obejmujących próbki z ognisk PPRV, eksperymentalnie zakażonych kóz, izolaty hodowli komórkowych i próbki pobrane od niezakażonych

zwierząt. Test RT-LAMP wykazał 100% swoistość diagnostyczną i ponad 97% czułość diagnostyczną w porównaniu z testem RT-PCR w czasie rzeczywistym. U zwierząt zakażonych eksperymentalnie, RT-LAMP mógł wykryć PPRV już 4 dni po zakażeniu - zanim zaobserwowano objawy kliniczne [168]. Testy LAMP zatwierdzone pod kątem chorób epizootycznych zwierząt gospodarskich obejmują także wirusa pryszczycy (FMDV), który wywołuje wysoce zaraźliwą i gospodarczo wyniszczającą chorobę u zwierząt z raciami [169]. Innym przykładem, w którym test RT-LAMP wykazał się wysoką skutecznością jest detekcja wirusa opryszczki bydła typu 1 (BHV-1), który jest poważnym patogenem wirusowym bydła i główną przyczyną poronień krów na całym świecie [170]. W kontekście hodowli trzody izotermiczna amplifikacja za pośrednictwem pętli została wykorzystana między innymi do wykrywania wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV) [171], afrykańskiego pomoru świń i dzików, powodującego poważne straty ekonomiczne [172], czy wirusa grypy typu A [173]. Skuteczne zastosowanie techniki LAMP wykazano również w diagnostyce wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBDV) [174], czy *Mycoplasma synoviae* u drobiu [175].

Pomimo wielu zalet test RT-LAMP nie został jeszcze szeroko zbadany pod kątem wykrywania wirusów atakujących małe zwierzęta jak psy i koty. W literaturze istnieją doniesienia związane z wykorzystaniem tego testu do wykrywania między innymi wirusa paragrypy psów (CPiV5) przy stałej temperaturze 62°C, reakcji prowadzonej przez 40 minut z granicą wykrywalności 10 kopii RNA/reakcję, co jest 10-krotnie bardziej czułe niż konwencjonalny test odwrotnej transkrypcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR) [176]. Wirus nosówki [177] oraz astrowirus (CaAstV) stanowią kolejną grupę opracowano testy izotermicznej amplifikacji pętli odwrotnej transkrypcji w czasie rzeczywistym (RT-LAMP) o wysokiej czułości, szybkości i niezawodności [178]. Dla kotów reakcja została wykorzystana w celu diagnostyki koronawirusa, powodującego zakaźne zapalenie otrzewnej u kotów (FIP), śmiertelną chorobę zakaźną. Kaliciwirus kotów jest kolejnym czynnikiem zakaźnym, dla którego naukowcy opracowali metodę detekcji opartą na RT-LAMP. FCV jest wysoce zaraźliwy i szeroko rozpowszechniony wśród populacji kotów, z którym wiele jest bezobjawowymi nosicielami. Często prowadzi do rozwoju choroby górnych dróg oddechowych zwaną kocią grypą. Opracowanie szybkich i czułych metod diagnostycznych ma kluczowe znaczenie dla zmniejszenia ryzyka poważnych objawów i zapobiegania rozprzestrzeniania się wirusa [179].

Niska liczba doniesień związanych z RT-LAMP w medycynie weterynaryjnej wynika przede wszystkim z mniejszej presji epidemiologicznej w medycynie weterynaryjnej, gdzie choroby wirusowe rzadko wywołują ogólnoświatowe pandemie jak jest to w przypadku ludzi. Dodatkowo ograniczenia finansowe, zwłaszcza dotyczące badań związanych z psami oraz kotami mają często niższy budżet niż projekty dotyczące ludzi czy zwierząt gospodarskich. Brak komercyjnego impulsu do rozwoju tanich, przenośnych testów RT-LAMP dla zwierząt, wynika również z faktu, iż generują one mniejszy zysk dla przemysłu diagnostycznego niż testy dla ludzi.

W diagnostyce złotym standardem nadal zostaje RT-qPCR jako precyzyjna i szeroko dostępna metoda. Chociaż RT-LAMP ma zalety, jego optymalizacja i standaryzacja są trudniejsze niż w przypadku PCR - zwłaszcza jeśli chodzi o projektowanie starterów i unikanie fałszywie dodatnich wyników. Brak gotowych, zatwierdzonych komercyjnie zestawów RT-LAMP dla chorób zwierząt domowych ogranicza jego wykorzystanie. Sytuacja jednak się zmienia, jako że rynek weterynaryjny rośnie z roku na rok, a właściciele czworonogów szukają najlepszych i szybkich metod diagnostyki i leczenia, co stwarza nowe możliwości rozwoju szybkich, tanich i prostych testów diagnostycznych, takich jak RT-LAMP. W miarę wzrostu świadomości właścicieli zwierząt na temat znaczenia wczesnego wykrywania chorób oraz rosnącej liczby chorób odzwierzęcych (zoonoz), zwiększa się również zapotrzebowanie na rozwiązania dostępne w punktach opieki weterynaryjnej, a nawet w warunkach domowych. Dodatkowo, postęp technologiczny w zakresie miniaturyzacji urządzeń, rozwoju tanich źródeł ciepła, barwników kolorymetrycznych, urządzeń typu „point-of-care” oraz aplikacji mobilnych umożliwiających analizę wyników, może znacząco zwiększyć dostępność i zastosowanie RT-LAMP w praktyce weterynaryjnej.

Celem prac własnych było zatem opracowanie autorskiego modelowego stanowiska, będącego laboratoryjnym odpowiednikiem urządzenia diagnostycznego typu POC, do prowadzenia reakcji RT-LAMP, w tym przede wszystkim opracowanie protokołu reakcji, metodologii diagnostyki oraz drukowanego 3D chipa mikrofluidycznego do tej reakcji współpracującego z optoelektronicznym układem do wzbudzania i detekcji fluorescencji.

5 Druk 3D w konstrukcji mikroigieł oraz miniaturowych urządzeń diagnostycznych

Druk 3D, znany również jako wytwarzanie przyrostowe (ang. additive manufacturing), polega na tworzeniu trójwymiarowych obiektów warstwa po warstwie poprzez kontrolowane nanoszenie materiału, co umożliwia uzyskanie złożonych geometrii z wysoką precyzją i minimalną ilością odpadów [180]. Charles W. Hull w 1986 roku jako pierwszy opisał i zastosował stereolitografię jako narzędzie do wytwarzania struktur 3D [181]. Od tego czasu postępujący rozwój technologiczny oraz rosnąca dostępność niedrogich, stacjonarnych drukarek 3D o wysokiej rozdzielczości druku, sięgającej nawet kilkunastu μm , wzbudziły zainteresowanie badaczy z różnych dziedzin nauki, takich jak protetyka, inżynieria biomedyczna, analityka chemiczna czy technologie magazynowania energii [182]. Obecnie do druku struktur 3D wykorzystuje się różnorodne materiały, takie jak szkło, metale, termoplasty, kompozyty na bazie CNT, ceramika, a nawet żywe komórki [183]. Druk 3D znalazł zastosowanie m.in. w wytwarzaniu urządzeń mikroprzepływowych przeznaczonych do syntezy chemicznej i produkcji nanocząstek [184], detekcji patogennych bakterii [120], diagnostyki białek [185], ilościowej oceny składników krwi w medycynie transfuzjologicznej [186], wykrywania uszkodzeń DNA [187], konstrukcji czujników elektrochemicznych [188] jak również w monitorowaniu proliferacji komórek [189].

Druk 3D umożliwia wytwarzanie zindywidualizowane oraz niskoseryjne z małą zależnością od kosztów wytwarzania i wielkości produkcji. Cecha ta idealnie wpisuje się w potrzeby związane z szybkim prototypowaniem i personalizacją plastrów mikroigieł i czipów mikrofluidycznych. Druk 3D, oparty na metodologii CAD, eliminuje konieczność stosowania szablonów, upraszcza proces tworzenia i skraca cykl projektowania układów mikromechanicznych i mikrofluidycznych. Dodatkowo możliwe jest wykorzystanie materiałów przezroczystych i biokompatybilnych. Do wytworzenia elementów mikroinżynieryjnych stosuje się różne techniki druku 3D, między innymi takie jak stereolitografia (SLA), polimeryzacja dwufotonowa (2PP), druk natryskowy (inkjet), selektywne spiekanie laserowe (SLS), ekstruzja materiału (FDM) oraz cyfrowe przetwarzanie światła (DLP). Każda z tych metod oferuje unikalne właściwości - SLA i DLP zapewniają wysoką precyzję, FDM wyróżnia się niskim kosztem i prostotą

obsługi, druk natryskowy szybkością, a 2PP umożliwia bardzo dokładne odwzorowanie mikrostruktur [180].

W porównaniu z tradycyjnymi mikroinżynierskimi metodami, takimi jak fotolitografia, mikrofrezowanie czy formowanie wtryskowe, druk 3D oferuje kompromis między precyzją i elastycznością projektową (Tab. 5). Fotolitografia zapewnia bardzo wysoką dokładność, lecz ogranicza się do dwuwymiarowych struktur i wymaga kosztownych warunków laboratoryjnych. Mikrofrezowanie pozwala na szybkie tworzenie struktur 3D, ale jest ograniczone do wybranych materiałów i geometrii. Formowanie wtryskowe sprawdza się w produkcji masowej, lecz jest nieopłacalne dla małych serii i prototypów [190].

Tabela 5 Porównanie kluczowych metod druku 3D, na podstawie [191-192].

Rodzaj druku 3D	Zalety	Wady
DLP	- Bardzo wysoka rozdzielczość - Szybkie utwardzanie całych warstw jednocześnie - Wysoka dokładność wymiarowa - mniejsze zużycie energii niż SLA laserowe	- Ograniczona objętość robocza (zależna od projektora) - Ograniczony wybór materiałów (fotopolimery)
FDM	- Prostota - Możliwość drukowania z różnych biomateriałów	- Niska rozdzielczość - Niska prędkość wytwarzania
Inkjet	- Wysoka prędkość wytwarzania - Niski koszt - Wysoka rozdzielczość	- Możliwy tylko dla cieczy lepkich - Słabe drukowanie w osi pionowej
SLA	- Technika bezdyszowa - Wysoka rozdzielczość - Czas druku niezależny od złożoności - Wysoka dokładność	- Toksyczność światła UV i bliskiego UV dla światła niebieskiego - Brak możliwości druku wielokomórkowego - Uszkodzenia komórek podczas fotoutwardzania
SLS	- Wysoka rozdzielczość - Dobre drukowanie w osi pionowej	- Wysoki koszt - Uszkodzenia termiczne wynikające z użycia lasera nano-/femtosekundowego - Ryzyko podrażnień

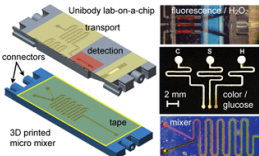
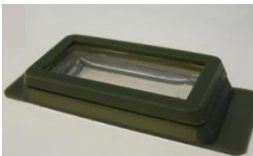
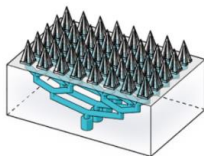
Należy jednak zaznaczyć, że druk 3D wiąże się również z pewnymi wyzwaniami. W zależności od wybranej techniki druku mogą występować ograniczenia w rozdzielczości druku (np. w FDM), chropowatość powierzchni może wpływać na przepływ cieczy, a materiały drukowane muszą charakteryzować się odpowiednią biokompatybilnością i stabilnością chemiczną. W przypadku technologii precyzyjnych,

takich jak DLP czy PolyJet (druk natryskowy), znaczącym ograniczeniem mogą być również koszty urządzeń. Dodatkowym wyzwaniem jest integracja komponentów elektronicznych, która często wymaga dodatkowych etapów wytwórczych [193].

Druk 3D jest technologią używaną również do wytwarzania większości rodzajów mikroigieł (stałe, puste w środku, powlekane oraz rozpuszczalne). W tym kontekście technologia ta została szerzej opisane w podrozdziale 3.1 w ramach opisu rodzajów i metod wytwarzania mikroigieł.

W diagnostyce druk 3D wykorzystywany jest do konstrukcji takich elementów jak nośniki i platformy diagnostyczne, elementy do detekcji i analizy, mikrostruktury i układy przepływowe oraz części wspierające użytkowanie POC (Tab. 6) [194].

Tabela 6 Możliwe zastosowania druku 3D w wytwarzaniu przenośnych urządzeń diagnostycznych POC.

DRUK 3D W DIAGNOSTYCE POC			
Nośniki i platformy diagnostyczne	Elementy do detekcji i analizy	Mikrostruktury i układy przepływowe	Elementy wspierające użytkowanie POC
- Chip diagnostyczny („lab-on-chip”), cała kasetka testowa do POC [195]. - Kasety wkładane do czytnika umożliwiające jednorazowe użycie [196]. - Adaptery i obudowy biosensorów do integracji z elektroniką (np. detekcja elektrochemiczna, optyczna) [197].	- Komory optyczne do fluorescencyjnej lub kolorometrycznej analizy wyników [198]. - Soczewki i przewodnice światła w przypadku testów opartych na sygnale optycznym [199]. - Platformy do integracji z elektrochemicznymi elektrodami [200].	- Mikrokanaliki i komory reakcyjne do prowadzenia reakcji biochemicznych (PCR, RT-LAMP) [201]. - Zawory i pompy pasywne do kontroli przepływu próbek [202]. - Mikroigły pobierania płynu śródmiąższowego lub krwi kapilarnej [203].	- Obudowy testów ergonomiczne, przenośne, odporne na kontaminację [204]. - Uchwyty na próbki / fiolki ułatwiające wielokrotne testy [205]. - Mobilne moduły do integracji ze smartfonem np. stojak do analizy zdjęć wyników testu [206].
Przykład:	Przykład:	Przykład:	Przykład:
			

Zminiaturyzowane, niedrogie i wielofunkcyjne urządzenie diagnostyczne POC drukowane w technologii 3D, zostało użyte do przeprowadzenia omawianej wcześniej reakcji izotermicznej LAMP (Rozdział 4) do wykrycia bakterii *P. falciparum* i *N. meningitidis*, odpowiednio z osocza i płynu mózgowo-rdzeniowego w ciągu 50 minut

w [207]. Druk 3D został również wykorzystany do wytworzenia ekonomicznego i przenośnego urządzenia do jednoczesnego wykrywania trzech koronawirusów świń (wirus biegunki epidemicznej świń (PEDV), wirus zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (TGEV) i deltakoronawirus świń (PDCoV) w ciągu 30 minut, bez potrzeby zaawansowanego sprzętu laboratoryjnego, również wykorzystując reakcję LAMP [208]. Co więcej, ta izotermiczna reakcja znalazła również zastosowanie w świecie roślin, gdzie przenośne urządzenie drukowane 3D z wysoką swoistością (100%) wykrywało patogen drzewa oliwnego *Verticillium dahliae* [204].

W niniejszej pracy druk 3D został wykorzystany do druku mikroigłowych plastrów oraz układu mikrofluidycznego diagnostycznego urządzenia POC. Ze względu na swoje właściwości (rozdzielczość) oraz dostęp do drukarki (Asiga Max 35UV) w pracach własnych wykorzystano technikę DLP.

Technika DLP (ang. digital light processing), będąca odmianą fotopolimeryzacji, wykorzystuje projektor cyfrowy do jednoczesnego utwardzania całej warstwy modelu światłem UV, co stanowi istotną przewagę nad innymi metodami, takimi jak SLA (stereolitografia), w których utwardzanie zachodzi punktowo. Kluczowym elementem tej metody jest układ mikroluster DMD (ang. digital micromirror device), złożony z setek tysięcy miniaturowych luster, które indywidualnie zmieniają swoje ustawienie, precyzyjnie kierując światło projektora na wybrane obszary powierzchni ciekłej żywicy fotopolimerowej. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie znacznie wyższej rozdzielczości oraz dokładności geometrycznej, często sięgającej nawet 10 - 25 μm , co jest szczególnie istotne w zastosowaniach wymagających mikrostruktur [209]. Wysoka jakość powierzchni, jaką zapewnia DLP, ma kluczowe znaczenie w przypadku mikrofluidyki, gdzie chropowatość ścian kanałów może wpływać na parametry przepływu i interakcje chemiczne lub biologiczne w układzie [210]. Co więcej, dzięki jednoczesnemu utwardzaniu całych warstw, czas wytwarzania modeli ulega znacznemu skróceniu - nawet skomplikowane struktury mogą zostać wydrukowane w czasie poniżej 30 minut, co czyni tę metodę bardzo efektywną w kontekście szybkiego prototypowania oraz niskoseryjnej produkcji. DLP, pomimo ograniczeń takich jak stosunkowo niewielka przestrzeń robocza, stosunkowo wysoki koszt urządzeń oraz konieczność stosowania specjalistycznych, światłoczułych materiałów, znajduje coraz szersze zastosowanie w zaawansowanych aplikacjach biomedycznych [211]. Przykłady obejmują m.in. wytworzenie mikrochipów przepływowych do analizy gradientów stężeń substancji

chemicznych, konstrukcję bioreaktorów do badań toksykologicznych, a także tworzenie przestrzennie precyzyjnych matryc do hodowli komórek i tkanek w układach typu „lab-on-a-chip”. Dodatkowo, wprowadzenie na rynek nowych żywic biokompatybilnych i funkcjonalnych otwiera możliwość zastosowania techniki DLP w obszarze biodrukowania oraz wytworzenia implantów dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjenta [212].

6 Rozpuszczalne plastry mikroigłowe

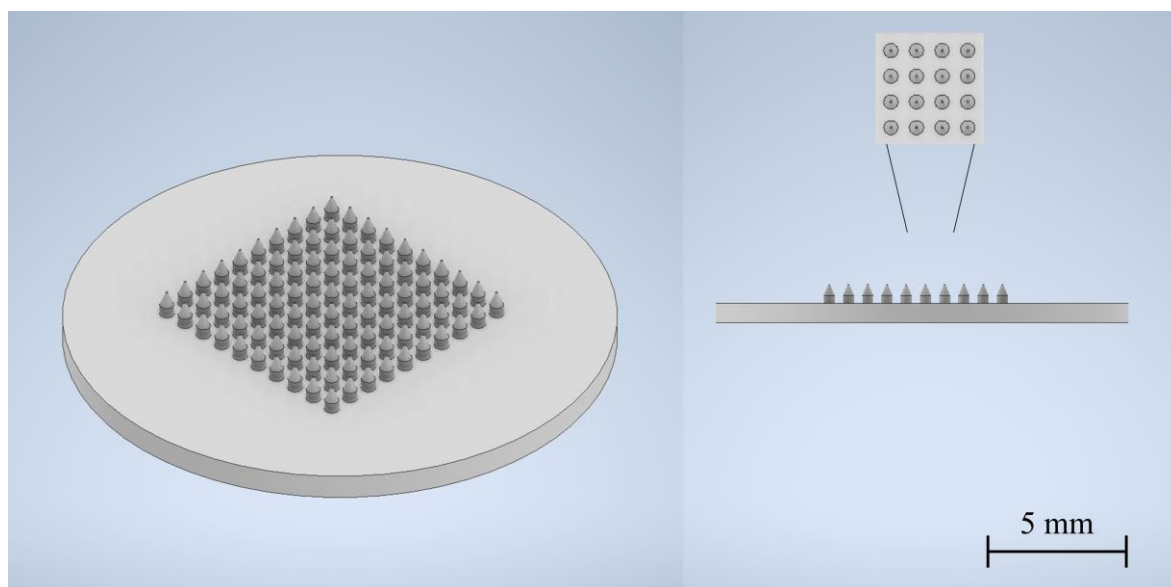
W niniejszym rozdziale przedstawiono założenia projektowe oraz wyniki prac własnych związanych z wytwarzaniem rozpuszczalnych plastrów mikroigłowych, ze szczególnym uwzględnieniem druku 3D metodą DLP oraz mikroformowania. Rozpuszczalne plastry mikroigłowe zostały wybrane ze względu na metodę ich wytworzenia, która umożliwia łatwą modyfikację projektu (kształt, wymiary, materiał), co pozwala na indywidualne dopasowanie plastra do gatunku zwierzęcia, a także miejsca aplikacji. Dodatkowo, różnorodność materiałów (głównie polimerów) pozwala na kontrolę rozpuszczania mikroigieł w skórze, a co za tym idzie czasu uwalniania leku. Z punktu widzenia praktyki weterynaryjnej, rozpuszczalne mikroigły mają również zalety logistyczne: są lekkie, łatwe w transporcie i utylizacji (nie pozostawiają odpadów ostrych, jak klasyczne igły), a sam proces aplikacji może być wykonywany nawet przez opiekuna zwierzęcia. Elastyczność projektowa została również zapewniona dzięki wykorzystaniu druku DLP, jako głównej technologii plastrów.

W rozdziale tym opisano różne warianty geometryczne mikroigieł zaprojektowanych w środowisku CAD, uwzględniające zarówno igły stożkowe, piramidalne, trójkątne, pięciokątne oraz grotowe o zróżnicowanych wymiarach. Przedstawiono parametry oraz żywice wykorzystane do druku, a także materiały wykorzystane do produkcji docelowych rozpuszczalnych plastrów. Szczegółowo zbadano także morfologię mikroigieł, wykonaną za pomocą mikroskopii optycznej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. scanning electron microscopy, SEM), z uwzględnieniem integralności strukturalnej, ostrości zakończeń oraz jednorodności formowania. Uzyskane dane umożliwiły ocenę jakości wytwarzanych struktur oraz ich przydatności w zastosowaniach transdermalnych. W dalszej części rozdziału przedstawiono wyniki badań *in vitro*. Analizowano profil uwalniania oraz efektywność penetracji substancji czynnych w modelu skóry.

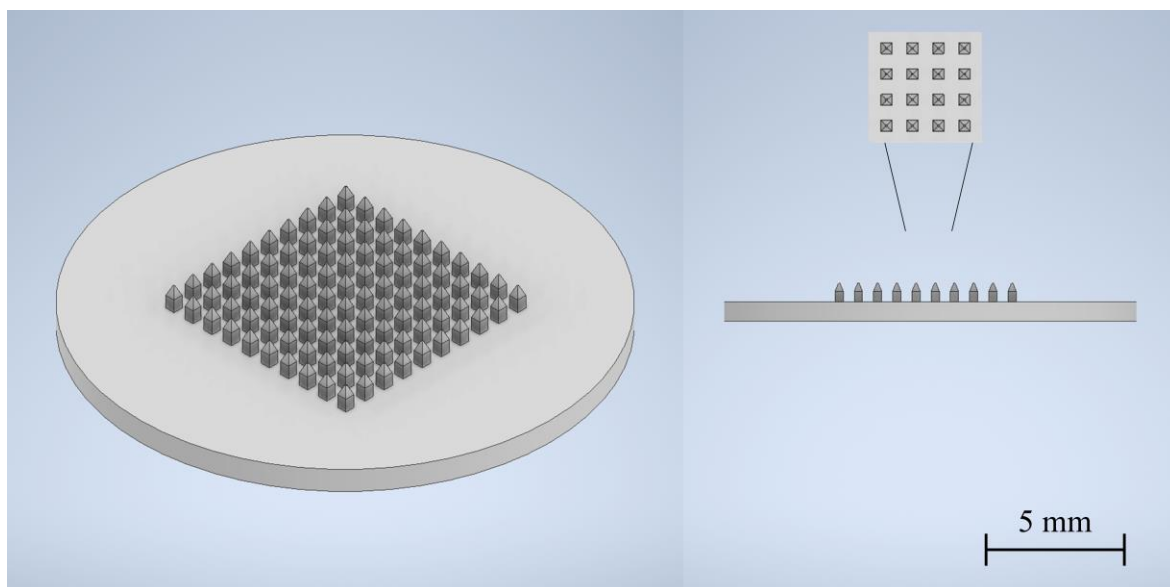
Przeprowadzono również badania cytotoksyczności materiału mikroigieł, wykonanych z polimerów PVP oraz PVA, przy użyciu komórek macierzystych dziąsła oraz rogówki, biorąc pod uwagę przyszłe wykorzystanie plastrów w aplikacji na dziąsła i oczy małych i dużych zwierząt.

6.1 Wytwarzanie mikroigłowych matryc

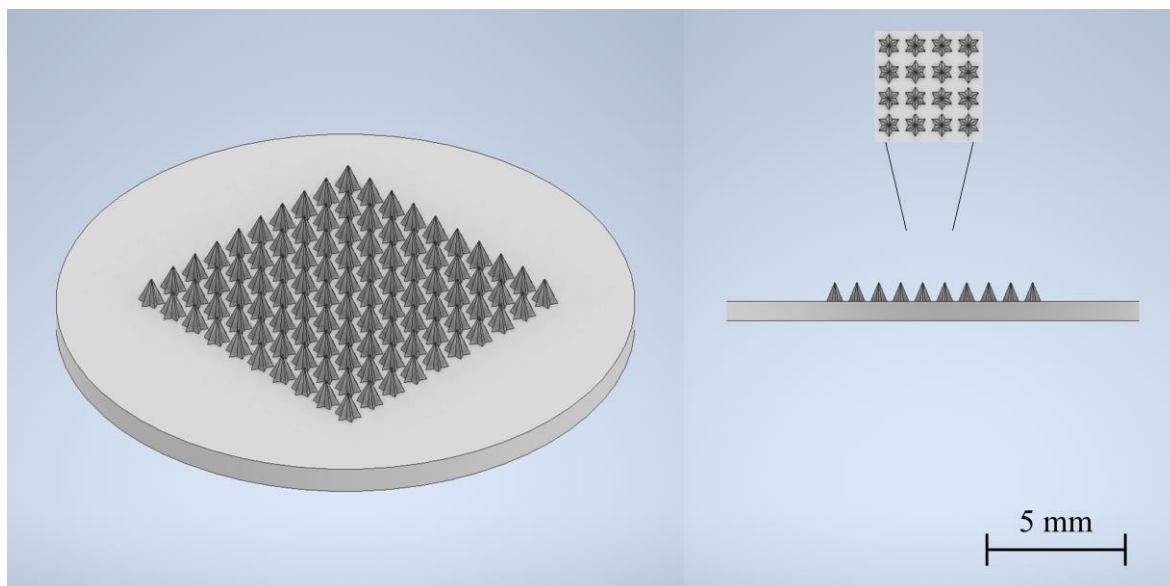
W ramach wytwarzania rozpuszczalnych plastrów mikroigłowych wykorzystano zintegrowane podejście projektowo-produkcyjne, łączące technikę druku 3D w wariantcie DLP (ang. digital light processing) z mikroformowaniem (ang. micromolding). Celem było uzyskanie precyzyjnych, powtarzalnych, biogodnych, rozpuszczalnych struktur mikroigłowych, zdolnych do efektywnego dostarczania substancji aktywnych poprzez warstwę naskórka. Proces wytwarzania oparto na projektach wykonanych w środowisku AutoCAD (Inventor), obejmujących różnorodne geometrie - od klasycznych stożków po struktury piramidalne, czy pięciokątne (Rys. 9-16). Stanowić miały one formy matrycowe, według których w dalszych pracach planowano odtworzyć mikroigły rozpuszczalne. Drugim testowanym podejściem było także wydrukowanie formy z mikroigłowymi wnękami do bezpośredniego wypełniania wybraną mieszaniną rozpuszczalnych polimerów.



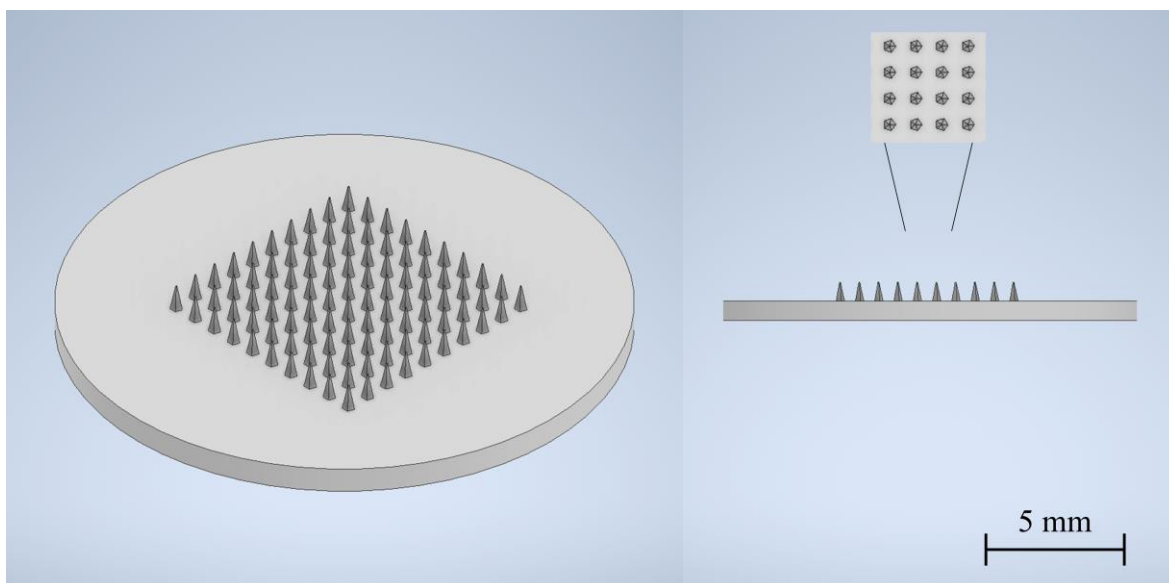
Rysunek 9 Projekt mikroigieł o kształcie grotu z kołem w podstawie, na okrągłej platformie.



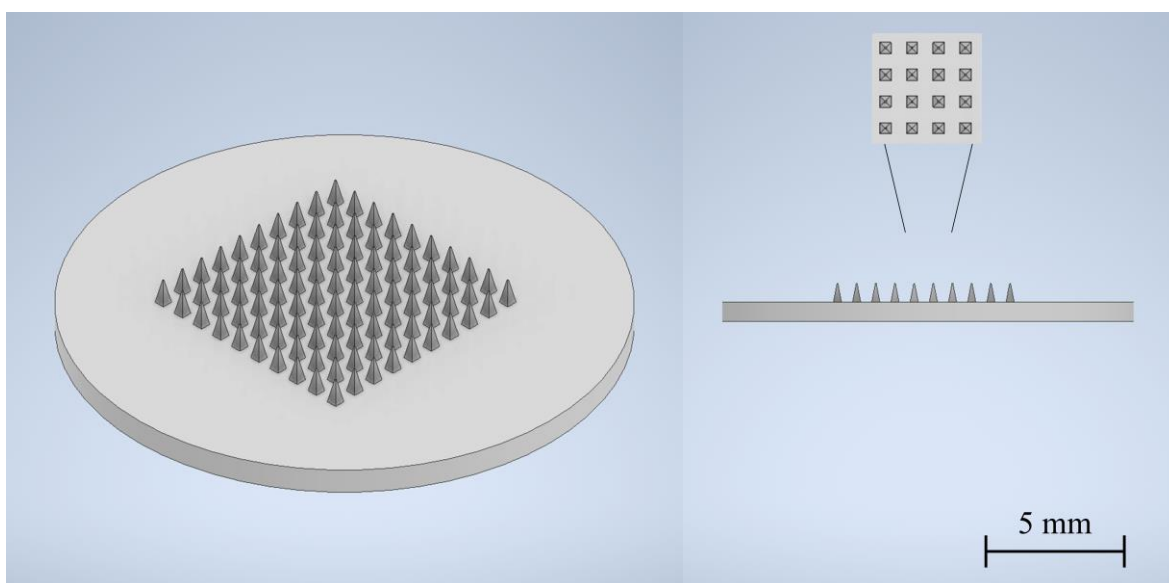
Rysunek 10 Projekt mikroigiel o kształcie grotu z kwadratem w podstawie, na okrągłej platformie.



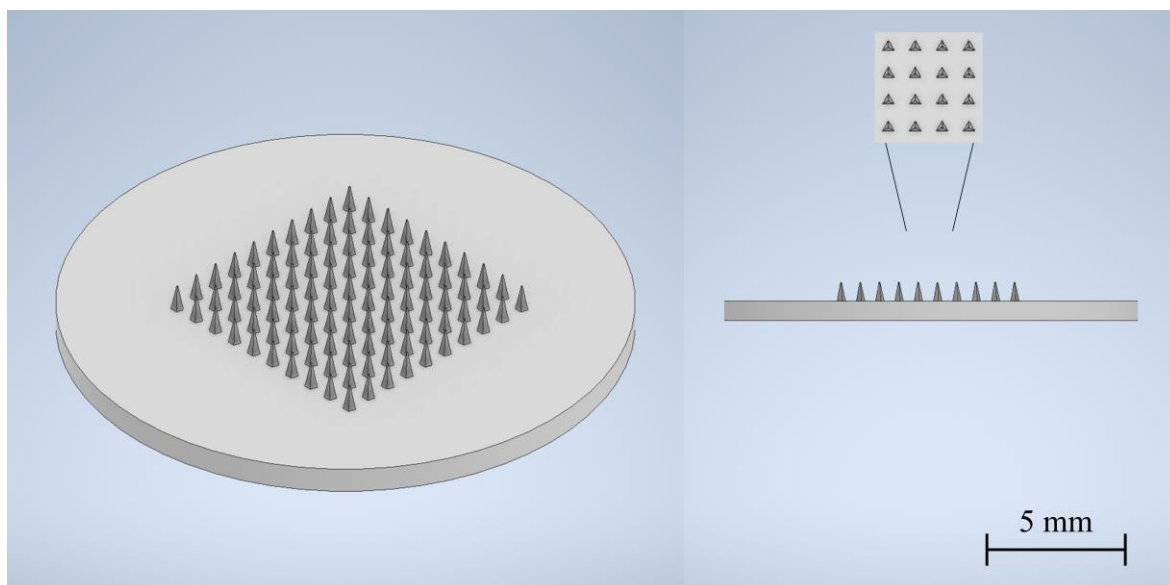
Rysunek 11 Projekt mikroigiel o kształcie gwiazdy, na okrągłej platformie.



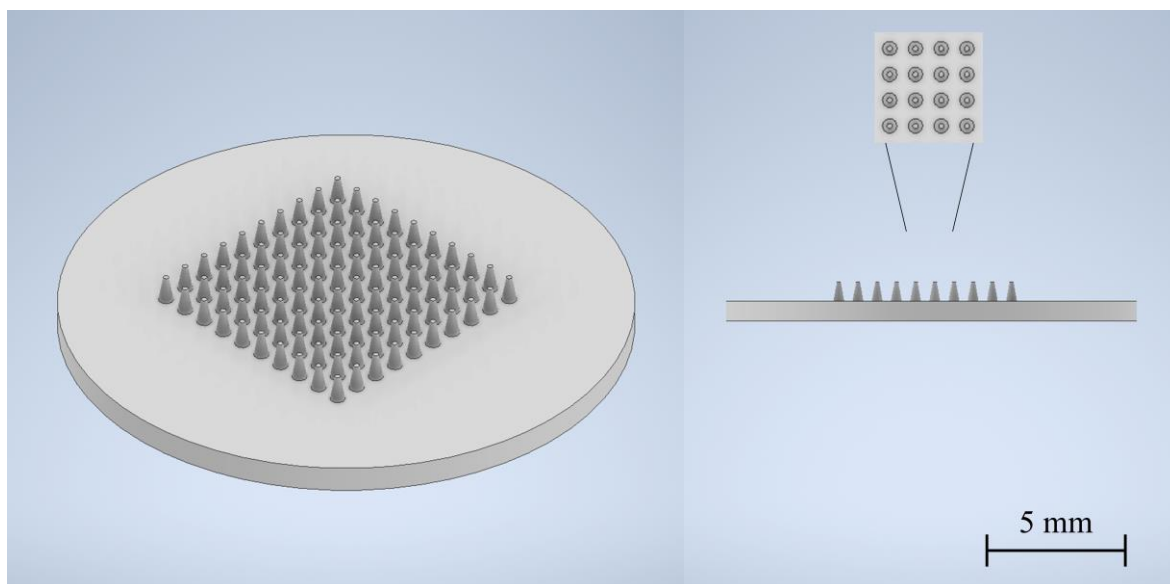
Rysunek 12 Projekt mikroigiel o kształcie piramidy z pięciokątem w podstawie, na okrągłej platformie.



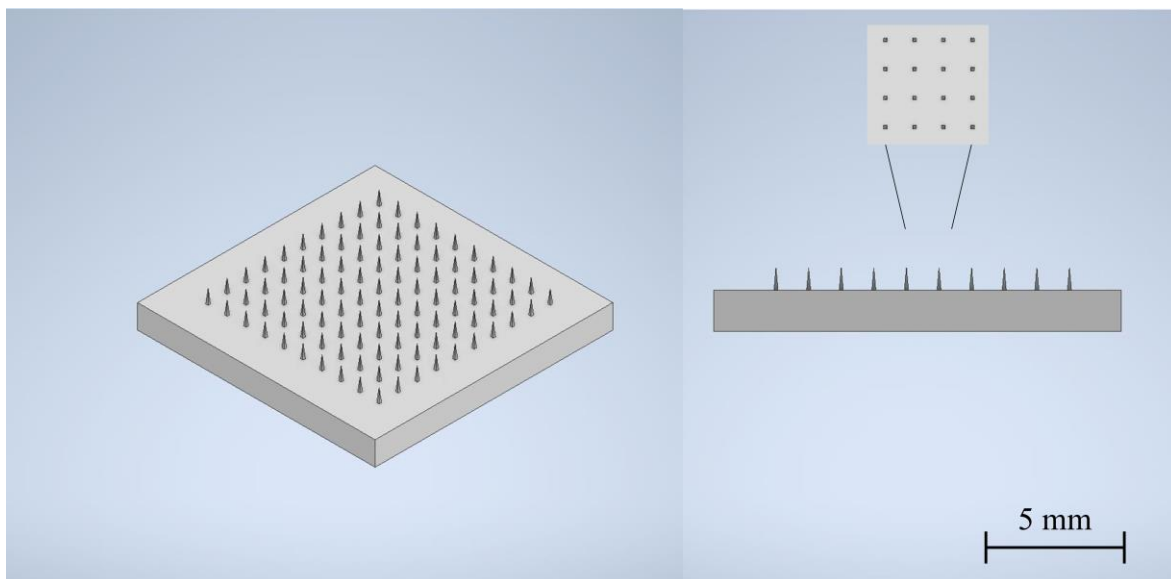
Rysunek 13 Projekt mikroigiel o kształcie piramidy z kwadratem w podstawie, na okrągłej platformie.



Rysunek 14 Projekt mikroigieł o kształcie piramidy z trójkątem w podstawie, na okrągłej platformie.



Rysunek 15 Projekt mikroigieł o kształcie stożka z kołem w podstawie, na okrągłej platformie.



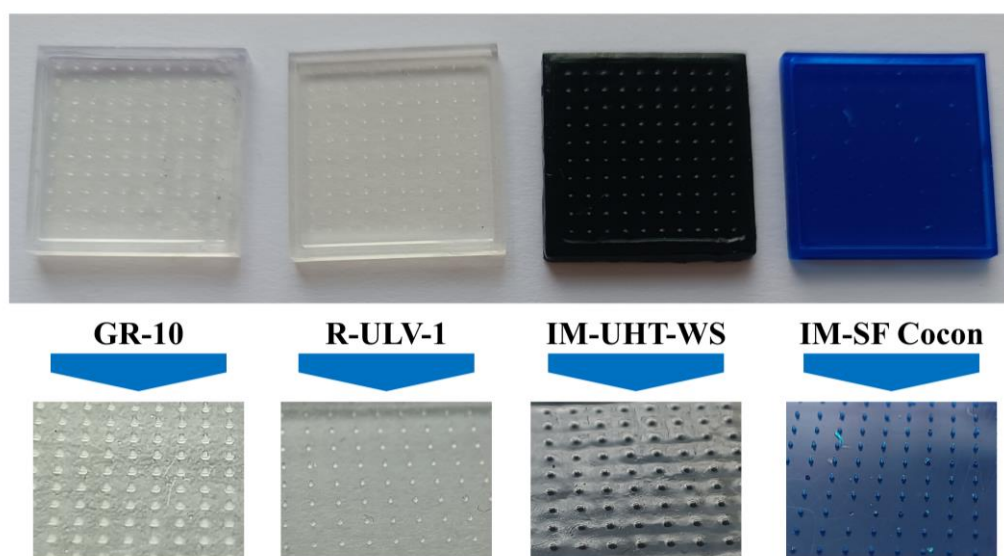
Rysunek 16 Projekt mikroigieł o kształcie piramidy z kwadratem w podstawie, na kwadratowej platformie.

W każdym z projektów mikroigły zostały rozmieszczone na platformie kwadratowej o wymiarach $17,5 \times 17,5$ mm lub okrągłej o średnicy 15 mm, tworząc za każdym razem matrycę składającą się z 10×10 mikroigieł. Wysokość mikroigieł we wszystkich projektach mieściła się w przedziale 600-680 μm . Wymiar charakterystyczny podstawy mikroigieł mieścił się w zakresie 260-600 μm , a średnica czubka między 21 a 45 μm (Tab. 7).

Tabela 7 Wszystkie zaprojektowane geometrie mikroigieł wraz z najważniejszymi wymiarami.

Geometria	Wysokość [μm]	Podstawa (średnica, bok) [μm]	Czubek (średnica, bok) [μm]
Piramidy (kwadrat)	600	300	45
Stożek (koło)	600	300	45
Gwiazda	680	600	21
Grot (koło)	600	300	45
Grot (kwadrat)	600	300	45
Pięciokąt	600	310	33
Trójkąt	615	260	37

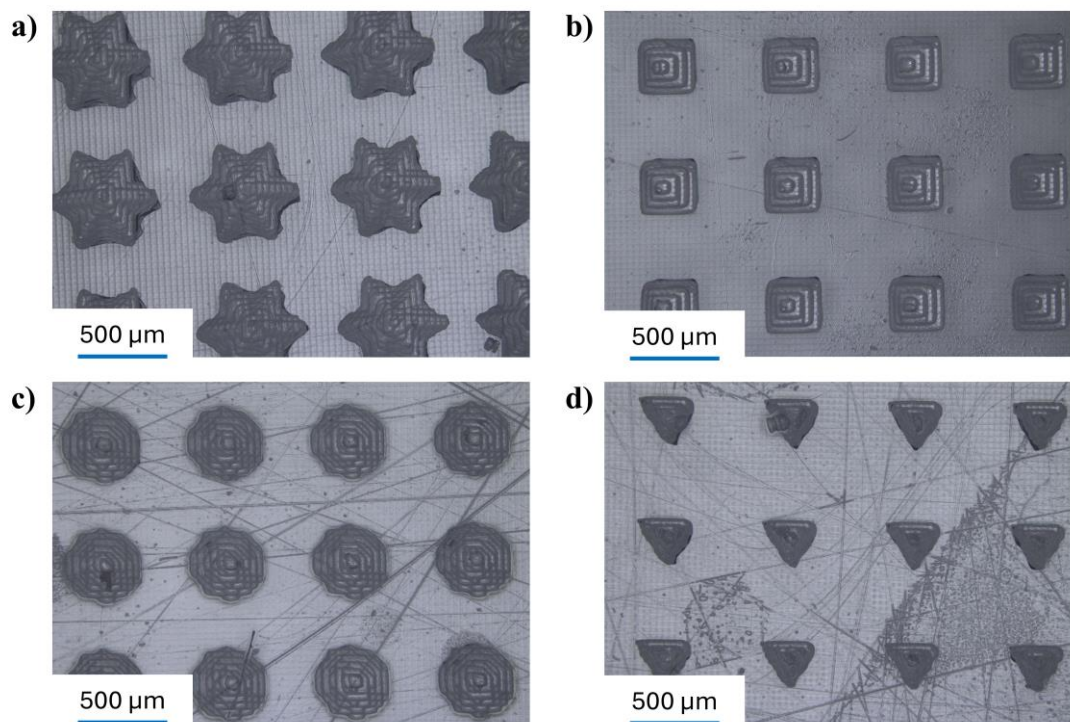
Plastry z mikroigłami zostały wydrukowane przy użyciu drukarki 3D (Asiga Max 35UV, Australia) o rozdzielczości XY 35 μm oraz grubości warstwy Z wynoszącej 50 μm . Do ich wykonania zastosowano żywicę GR-10 (Pro3dure, Niemcy) - biokompatybilny materiał (zgodnie wybranymi częściami normy ISO-10993) wykorzystywany m.in. w stomatologii, cechujący się wysoką plastycznością i dużym wydłużeniem przy zerwaniu oraz wysoką stabilnością UV, żywicę R-ULV-1 (3dresyns, Hiszpania), IM-SF Cocon (3dresyns, Hiszpania) odpowiednią do wytworzenia miękkich i elastycznych form przystosowanych do zalewania silikonem oraz rozpuszczalną w wodzie żywicę IM-UHT-WS (3dresyns, Hiszpania), która miała posłużyć jako bezpośrednia forma do wytworzenia igieł stałych lub trudno rozpuszczalnych w wodzie, w celu stworzenie platformy do długofalowego dostarczania leku (Rys. 17).



Rysunek 17 Wydruki mikroigłowych plastrów z różnych rodzajów żywic.

Proces postprodukcji obejmował kilka etapów. W przypadku żywicy GR-10 w pierwszej kolejności wydrukowane struktury były płukane przez 2 minuty w myjce ultradźwiękowej w dedykowanym środku czyszczącym (Opticlean, Optiprint). Następnie elementy delikatnie suszono strumieniem azotu. Ostatnim etapem była 10-minutowa ekspozycja na światło UV (Asiga, Australia), zapewniająca końcowe utwardzenie gotowych struktur. Dla żywicy R-ULV-1 zastosowano taki sam proces oczyszczania. W przypadku IM-SF Cocon wydłużono ekspozycję na światło UV do 30 minut. Rozpuszczalna w wodzie żywica IM-UHT-WS wymagała użycia płynu czyszczącego Cleaning Fluid WS1 Bio (3dresyns, Hiszpania).

Matryce wykonane z GR-10 charakteryzowały się wysoką szczegółowością oraz ostro zakończonymi czubkami we wszystkich geometriach, co było kluczowe dla dalszego odwzorowywania mikroigieł przy wytwarzaniu ich rozpuszczalnej wersji (Rys. 18).



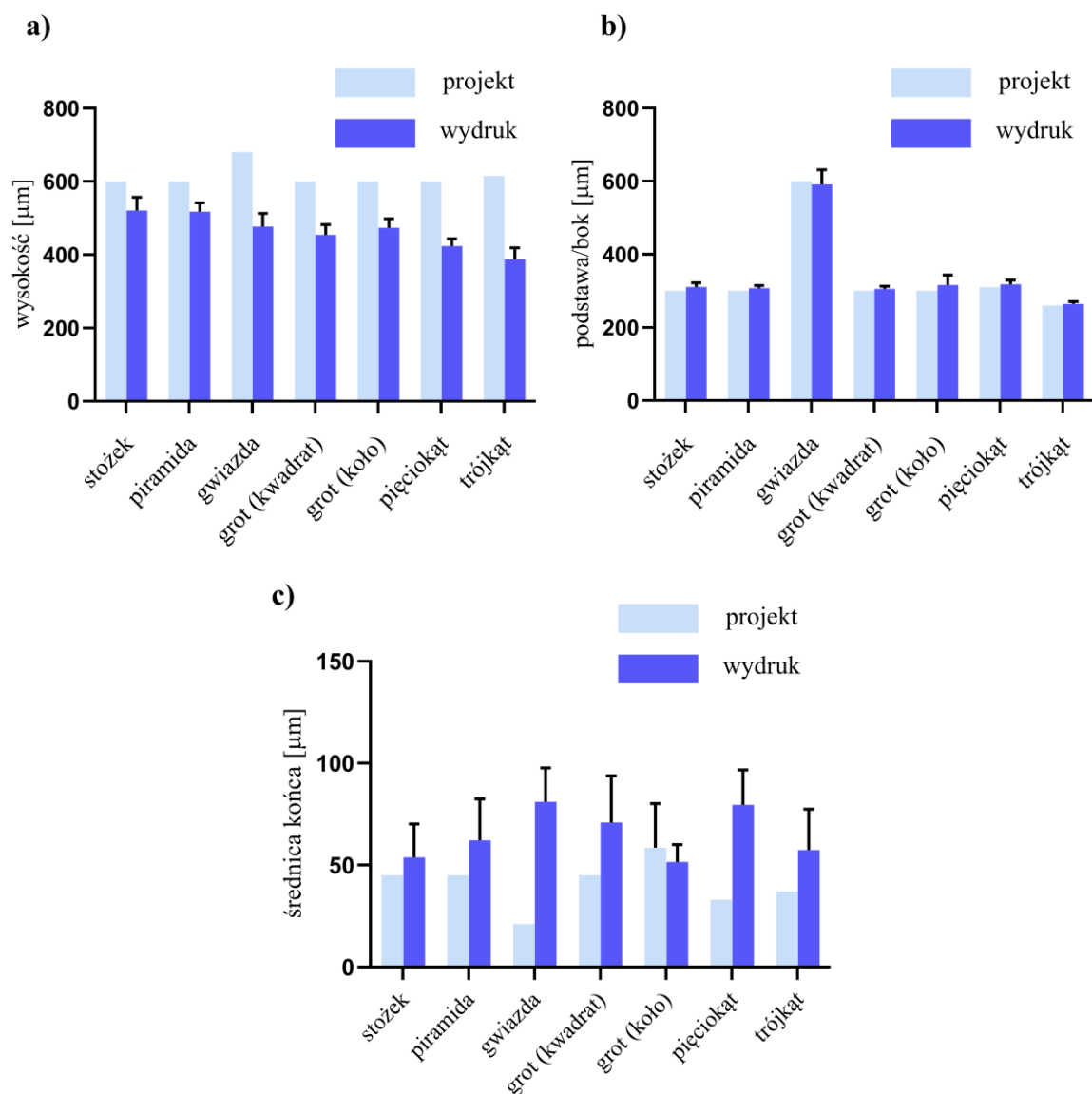
Rysunek 18 Obrazy mikroskopowe wydruków plastrów mikroigłowych o różnych geometriach z wykorzystaniem żywicy GR-10: a) gwiazda, b) piramida, c) stożek, d) trójkąt).

Podobnie było w przypadku igieł z R-ULV-1. Matryce wykonane z IM-SF Cocon oraz IM-UHT-WS charakteryzowały się bardzo niską wytrzymałością mechaniczną i niską jakością odwzorowania zaprojektowanej struktury, dlatego nie zostały użyte w kolejnych badaniach.

Na rysunku 19 (a-c) zestawiono parametry geometryczne mikroigieł zaprojektowanych w środowisku CAD oraz uzyskanych w procesie druku DLP. Pomiary mikroigieł (takie jak wysokość, wymiar podstawy lub wierzchołka) pochodzą z analizy obrazów mikroskopii cyfrowej (Keyence Seria VHX-7000) oraz wygenerowanych profili mikroigieł (dostępnych w załączniku nr 1). Pomiary te poddano analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism. Dla każdej analizowanej cechy wykonano serię niezależnych pomiarów ($n \geq 6$). Dla wszystkich analizowanych geometrii zaobserwowano systematyczne obniżenie wysokości struktur po wydruku względem wartości projektowych, co wskazuje na ograniczoną dokładność odwzorowania w osi Z.

Co ważne, najmniejsze względne odchylenia wysokości odnotowano dla geometrii stożkowej oraz piramidalnej. Analiza wymiaru podstawy wykazała bardzo dobrą zgodność pomiędzy projektem a wydrukiem właśnie dla tych dwóch kształtów, podczas gdy geometrie bardziej złożone (np. gwiazda czy wielokąty) charakteryzowały się wyraźniejszymi odchyleniami, sugerującymi większą podatność na deformacje. W przypadku średnicy końca mikroigieł, która jest parametrem krytycznym dla zdolności penetracji, wszystkie struktury wykazywały wzrost wartości względem projektu, jednak

stożek i piramida cechowały się relatywnie najmniejszymi różnicami oraz mniejszą zmiennością wyników. Obserwowane poszerzenie końcówki może wynikać zarówno z ograniczonej rozdzielczości przestrzennej procesu druku addytywnego ($35 \times 35 \mu\text{m}$ w płaszczyźnie XY), uniemożliwiającej wierne odwzorowanie bardzo ostrych wierzchołków, jak i z częściowego zaokrąglania lub uszkodzania końcówek mikroigieł podczas etapów obróbki końcowej (ang. postprocessing), takich jak czyszczenie. Dodatkowo, w przypadku geometrii bardziej złożonych lokalne koncentracje naprężeń w obszarze wierzchołka mogą sprzyjać mikropęknięciom lub odłamywaniu się końcówek.

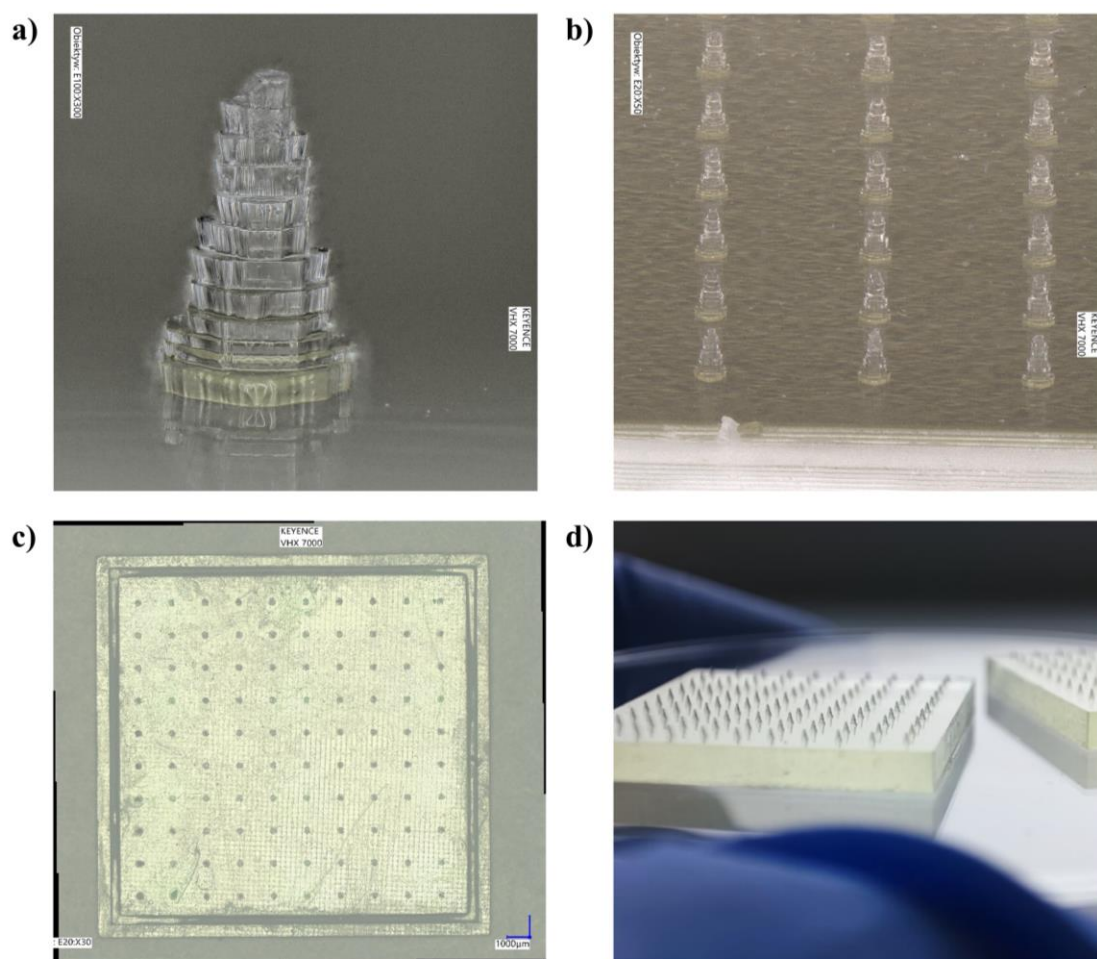


Rysunek 19 Porównanie wymiarów geometrycznych mikroigieł zaprojektowanych cyfrowo (projekt) oraz otrzymanych w procesie druku (wydruk) dla różnych geometrii: a) wysokość, b) podstawa/bok, c) średnica końca. Dane przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ SD, uzyskane na podstawie pomiarów morfometrycznych.

Na podstawie łącznej oceny trzech parametrów geometrycznych podsumowanych poniżej (Tab. 8), stwierdzono, że geometrie stożkowa i piramidalna najlepiej odwzorowywały założenia projektowe, co wynika z ich prostszej, osiowo symetrycznej formy, sprzyjającej stabilności procesu druku. W związku z tym, w dalszych etapach prac wykorzystano właśnie te dwie geometrie (Rys. 20).

Tabela 8 Porównanie wymiarów wysokości i podstawy między geometrią mikroigieł piramidalnych oraz stożkowych z projektu CAD oraz drukowanych na drukarce DLP.

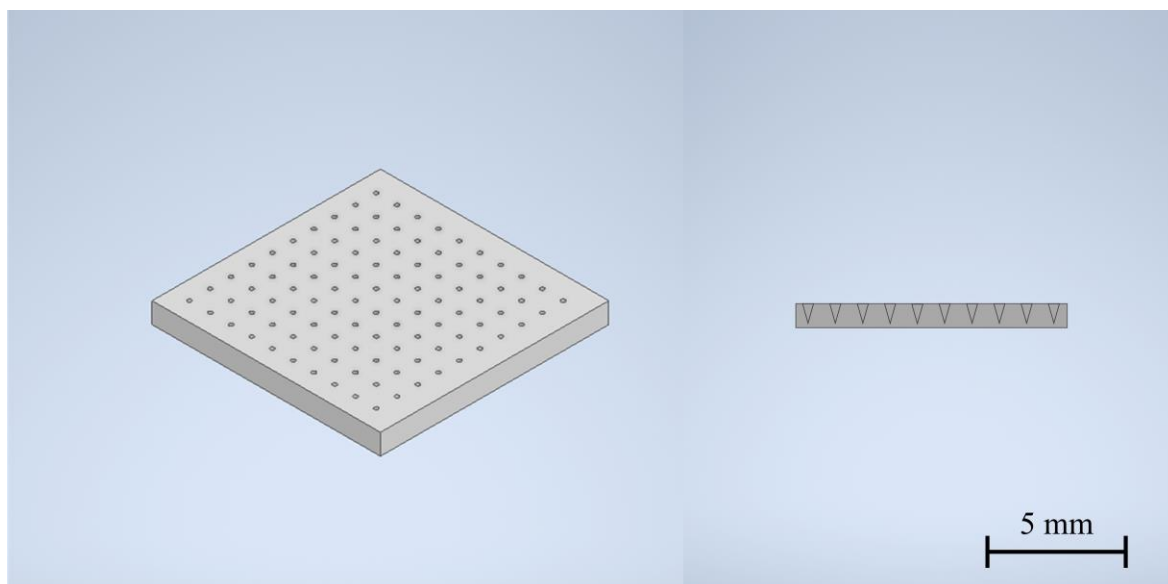
Geometria	Rodzaj	Wysokość [μm]	Podstawa [μm]	Końcówka [μm]
Stożek	CAD projekt	600	300	45
	DLP druk	521,3 $\pm$ 35,9	311 $\pm$ 11,4	54,8 $\pm$ 16,4
Piramida	CAD projekt	600	300	45
	DLP druk	501,4 $\pm$ 17	307,6 $\pm$ 7,2	62,2 $\pm$ 20,2
Gwiazda	CAD projekt	680	600	21
	DLP druk	477 $\pm$ 36,1	591,9 $\pm$ 39,5	81 $\pm$ 16,7
Grot (kwadrat)	CAD projekt	600	300	45
	DLP druk	454,2 $\pm$ 27,8	305,4 $\pm$ 7,4	70,9 $\pm$ 22,9
Grot (koło)	CAD projekt	600	300	45
	DLP druk	473,7 $\pm$ 24,4	316,5 $\pm$ 26,8	51,5 $\pm$ 8,6
Pięciokąt	CAD projekt	600	310	33
	DLP druk	423,7 $\pm$ 20,1	318,6 $\pm$ 11,3	79,5 $\pm$ 17,2
Trójkąt	CAD projekt	615	260	37
	DLP druk	387,8 $\pm$ 31,2	264,5 $\pm$ 6,6	57,4 $\pm$ 20,1



Rysunek 20 Wydrukowane z GR-10 struktury plastrów mikroigłowych: a) obraz mikroskopowy (Keyence Seria VHX-7000) pojedynczej mikroigły w 300x powiększeniu, ukazujący warstwową strukturę charakterystyczną dla procesu druku addytywnego oraz stopniowe zwężanie geometrii w kierunku wierzchołka, b) obraz mikroskopowy (Keyence Seria VHX-7000) fragmentu matrycy mikroigieł, przedstawiający regularne rozmieszczenie pojedynczych struktur na powierzchni podłoża oraz dobrą jednorodność kształtu w obrębie analizowanego obszaru w powiększeniu 50x, c) widok z góry całego plastra mikroigłowego, ukazujący periodyczny układ mikroigieł oraz jednorodność ich rozmieszczenia w powiększeniu 30x, d) widok perspektywiczny gotowej matrycy mikroigieł po procesie wytwarzania.

W prowadzonych badaniach wykonano również formy negatywowe (rewersy mikroigieł, Rys. 21) metodą druku addytywnego z wykorzystaniem materiałów GR-10 oraz IM-UHT-WS. Uzyskane struktury charakteryzowały się poprawnym odwzorowaniem geometrii mikroigieł w wgłębieniu, jednak nie spełniły wymagań technologicznych w procesie wytwarzania mikroigieł rozpuszczalnych oraz - w przypadku materiału IM-UHT-WS, mikroigieł trudno rozpuszczalnych w wodzie. Ograniczona skuteczność tych form mogła wynikać z niewystarczających właściwości powierzchniowych i adhezyjnych polimerów użytych do wytworzenia mikroigieł rozpuszczalnych, utrudniających pełne wypełnienie wnęk formy oraz bezpieczne wyjmowanie odlewów

bez uszkodzeń strukturalnych. Dodatkowo, sztywność oraz niska elastyczność drukowanych materiałów sprzyjały pękaniu oraz deformacji podczas procesu demoldingu. W związku z powyższym kolejnym etapem badań było wykonanie wtórnych, elastycznych form odlewniczych (na bazie wydrukowanych mikroigieł) z polidimetylosiloksanu (PDMS, Sylgard), które dzięki swojej wysokiej elastyczności, niskiej energii powierzchniowej oraz dobrej zdolności odwzorowania mikrostruktur są powszechnie stosowane w technologii mikroodlewów.



Rysunek 21 Projekt rewersu mikroigłowego plastra z pustymi wnękami mikroigłowymi (rewers).

6.2 Wytwarzanie rozpuszczalnych plastrów mikroigłowych.

Jak wspomniano wyżej, na podstawie analizy wydruków różnych żywic z drukarki DLP, wybrano mikroigły wydrukowane z materiału GR-10 o geometrii stożkowej oraz piramidalnej - to one posłużyły w kolejnym etapie do odtworzenia na ich podstawie mikroigieł rozpuszczalnych. W tym celu do utworzenia uniwersalnej formy, wydruki zostały zalane poli(dimetyloksanem). Struktura PDMS oparta na elastycznym szkielecie krzem-tlen (Si-O) nadaje mu wysoką elastyczność mechaniczną, niską energię powierzchniową oraz dobrą stabilność chemiczną i termiczną. Dzięki temu możliwe było wierne odwzorowanie mikrostruktur wydrukowanych platform mikroigłowych. Dodatkowo materiał ten charakteryzuje się znakomitą biokompatybilnością z szerokim zakresem materiałów, dzięki czemu w wybranym podejściu możliwe było wykorzystanie z dużym powodzeniem różnych mieszanin polimerów.

Wydrukowane wzorce mikroigłowe zostały zalane PDMS-em, a następnie umieszczone w inkubatorze o temperaturze 70°C na 2 godziny, celem przeprowadzenia polimeryzacji. Po utwardzeniu oddzielono utworzone formy silikonowe od struktur wydrukowanych w 3D. Gotowe formy zostały następnie zalane mieszaninami różnych polimerów, w tym:

1. PVP/PVA (10:5)

Aby przygotować mieszaninę zmieszano 10 g PVP K90 (Sigma-Aldrich) z 5 g PVA (Sigma-Aldrich) w 50 ml wody podgrzanej do temperatury 80°C przy ciągłym mieszaniu.

2. PVP/PVA/Alginian sodu

Do przygotowania powyższej mieszaniny rozpuszczono 10 g PVP w 40 ml wody dejonizowanej. PVA w ilości 5 g rozpuszczono w 40 ml wody podgrzanej do 80°C. Osobno rozpuszczono 1,5 g alginianu sodu (Sigma-Aldrich) w 20 ml wody przy intensywnym mieszaniu. Na koniec połączono wszystkie roztwory i mieszano do uzyskania jednorodnej mieszaniny.

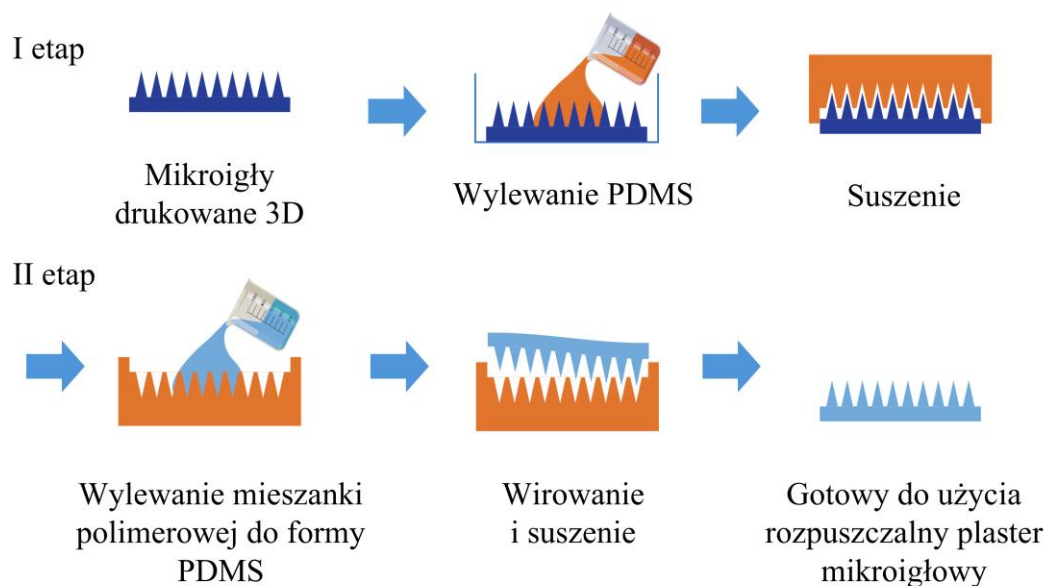
3. PVP/PVA/Hialuronian sodu

Rozpuszczono 10 g PVP w 40 ml wody. 5 g PVA rozpuszczono w 40 ml wody podgrzanej do 80°C. Powoli dodawano 5 g hialuronianu sodu do 20 ml wody, ciągle mieszając. Po uzyskaniu jednorodnych roztworów połączono je w jednej zlewce, mieszając na zimno i uzupełniono do 100 ml wodą dejonizowaną.

4. PVP/PVA/Chitozan

W 20 ml 0,5% kwasu octowego rozpuszczono 1,5 g chitozanu (Sigma-Aldrich). PVP i PVA rozpuszczono jak wyżej. Wszystkie roztwory następnie połączono i mieszano.

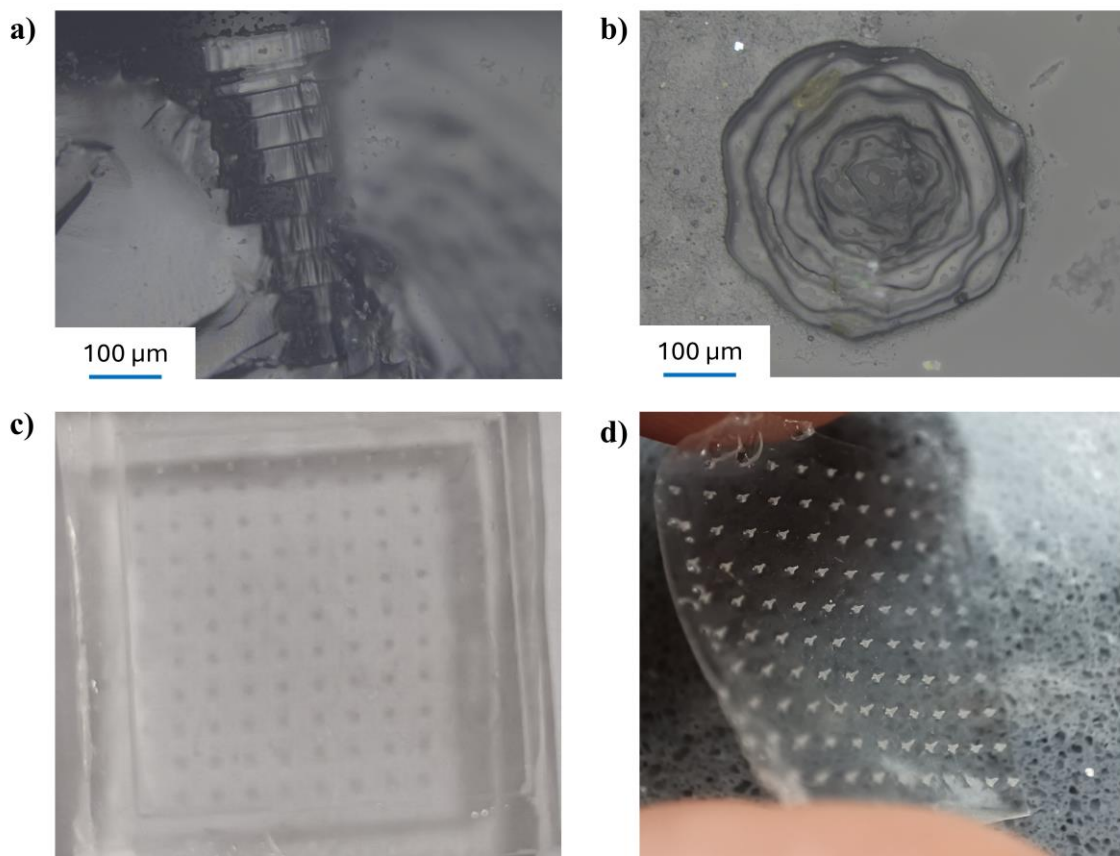
W celu równomiernego rozprowadzenia roztworu w mikrowgłębieniach formy, zastosowano wirowanie 4000 obr./min przez 30 minut (MPW-380R, Polska). Po usunięciu nadmiaru roztworu formę suszono na płycie grzewczej o temperaturze 40°C (Rys. 22). Gotowe mikroigły, po uzyskaniu odpowiedniej twardości, były ostrożnie usunięte z form i przechowywane w temperaturze pokojowej.



Rysunek 22 Schemat wytwarzania rozpuszczalnych mikroigieł.

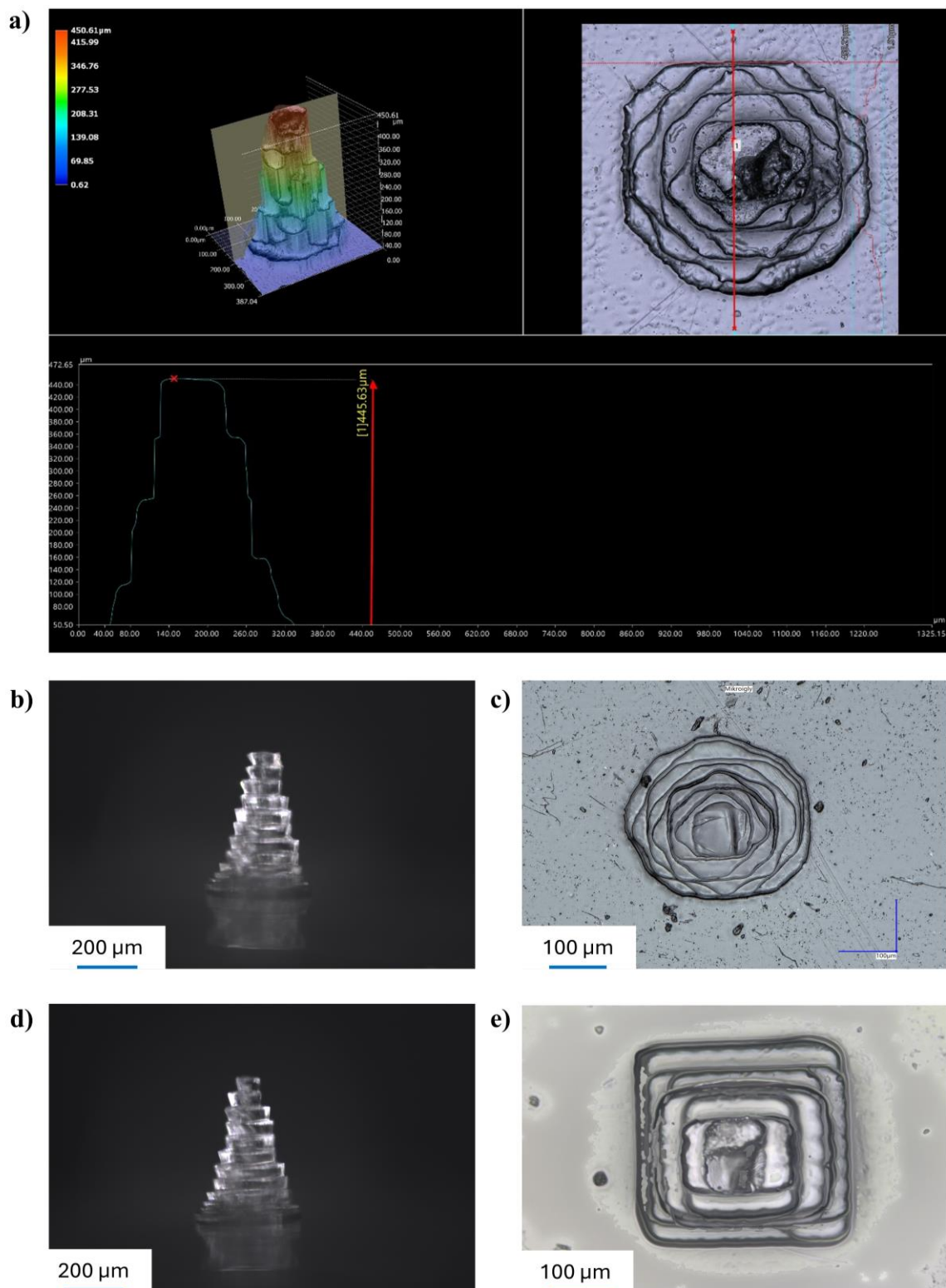
Dzięki dużej elastyczności form PDMS możliwe było łatwe oddzielenie materiałów od formy, bez ryzyka uszkodzenia ich delikatnych struktur, szczególnie jeżeli chodzi o delikatne i ostre końcówki mikroigieł. Wszystkie matryce zostały z powodzeniem wyjęte z formy, bez uszkodzeń końcówek igieł ani pozostawiania ich w formach. Uzyskane formy silikonowe były przejrzyste, kompletne i zawierały wyraźny układ otworów na 100 igieł (Rys. 23 a-c). Na podstawie wstępnych testów stwierdzono, że najbardziej wytrzymałe mechanicznie oraz wystarczająco elastyczne do sprawnego wyciągnięcia mikroigieł z formy były mikroigły PVP/PVA, dlatego to ta mieszanina polimerów została wykorzystana do dalszych badań (Rys. 23 d).

Morfologiczne cechy mikroigieł, takie jak ich wysokość, średnica, a przede wszystkim ostrość i odpowiednia średnica końcówki, stanowią kluczowe elementy umożliwiające przebicie warstwy rogowej naskórka i skuteczne dostarczenie leku. W związku z tym mikroigły muszą wykazywać odpowiednią wytrzymałość mechaniczną, aby zachować integralność strukturalną i nie ulec złamaniu.



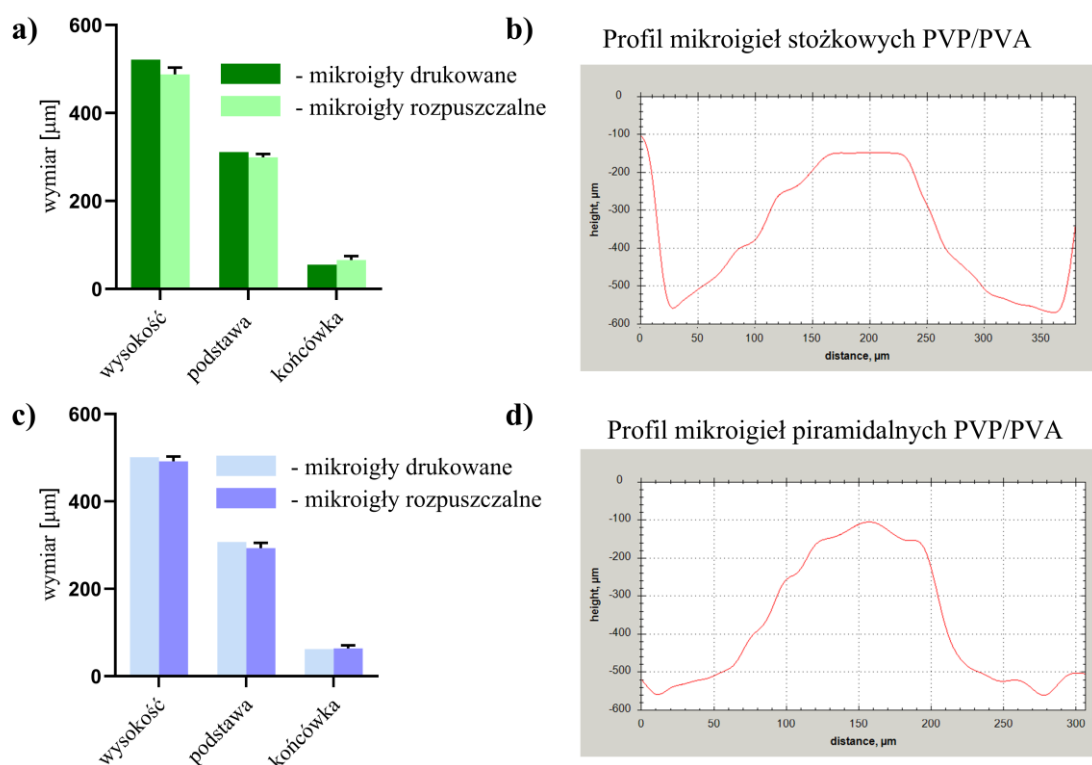
Rysunek 23 Forma PDMS i rozpuszczalne plastry mikroigłowe: a) obraz mikroskopowy (Leica, Niemcy) przekroju bocznego formy PDMS, b) obraz mikroskopowy (Leica, Niemcy), przekroju poprzecznego formy PDMS, c) zdjęcie wykonane przy użyciu aparatu fotograficznego formy PDMS d) zdjęcie mikroigłowego plastra wytworzonego z mieszaniny PVA/PVA.

Aby ocenić jakość i powtarzalność wykonania zarówno wydrukowanych platform mikroigłowych, jak i wykonanych na ich podstawie mikroigłowych plastrów rozpuszczalnych PVP/PVA analizowano je za pomocą trzech typów mikroskopów: skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Zeiss EVO LS15), mikroskopu cyfrowego (Keyence) oraz odwróconego mikroskopu optycznego (Leica), wyposażonego w obiektywy (np. HC PL FLUOTAR 10×/0.30 BD), kamerę wysokiej rozdzielczości do rejestracji obrazu (Leica DFC450) oraz dedykowane oprogramowanie do analizy obrazów (Leica LAS X) (Rys. 24).



Rysunek 24 Charakterystyka morfologiczna mikroigiel wykonanych z PVP/PVA: a) trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej wykonane mikroskopem cyfrowym, b) obraz mikroskopowy SEM pojedynczej mikroigły w widoku bocznym, ilustrujący jej stożkową geometrię oraz warstwową strukturę wynikającą z sekwencyjnego nakładania warstw materiału w procesie druku, c) widok z góry mikroigły stożkowej, o okrągłej podstawie (mikroskopia optyczna), d) widok boczny mikroigły o piramidalnej geometrii, przedstawiający podobną, schodkową morfologię (mikroskopia SEM), e) widok z góry piramidalnej mikroigły o kwadratowej podstawie (mikroskopia optyczna).

Stwierdzono, że wysokości rozpuszczalnych mikroigieł stożkowych różniły się od wydrukowanych matryc o około 6,5 %. Średnice igieł różniły się o około 4 %, a wierzchołek mikroigły o około 2 %. Z kolei wysokość mikroigieł piramidalnych różniły się od wydrukowanych matryc o około 2 %, średnice o około 5 %, a wierzchołek około 2 %. (Rys. 25). Różnice w wymiarach podsumowano poniżej (Tab. 9).

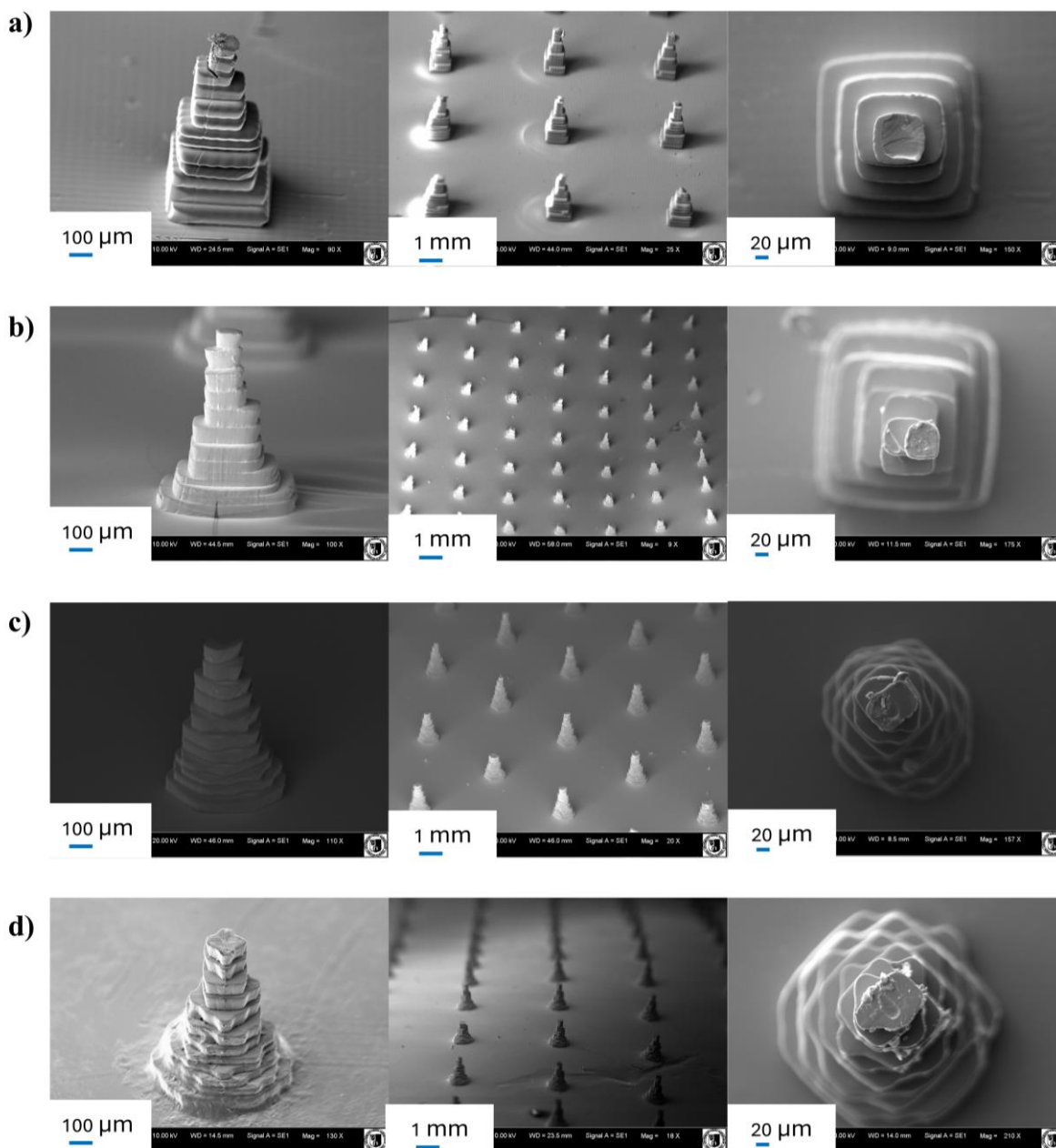


Rysunek 25 Porównanie wymiarów - wysokości, podstawy oraz końcówki - mikroigieł drukowanych oraz rozpuszczalnych z geometrią stożkową oraz piramidalną: a) wykres porównujący wymiar wysokości, podstawy oraz końcówki geometrii stożkowej mikroigieł drukowanych oraz rozpuszczalnych PVP/PVA, b) profil mikroigieł stożkowych rozpuszczalnych PVP/PVA, c) wykres porównujący wymiar wysokości, podstawy oraz końcówki geometrii piramidalnej mikroigieł drukowanych oraz rozpuszczalnych PVP/PVA, d) profil mikroigieł piramidalnych rozpuszczalnych

Tabela 9 Porównanie wymiarów wysokości, podstawy i końcówki (wierzchołka) między geometrią mikroigieł piramidalnych oraz stożkowych drukowanych na drukarce DLP oraz rozpuszczalnych PVP/PVA.

Geometria	Rodzaj	Wysokość [μm]	Podstawa [μm]	Kończówka [μm]
Stożek	druk	521	311	55
	PVP/PVA	487,6 $\pm$ 15,7	299,4 $\pm$ 7,4	65,5 $\pm$ 9,2
Piramida	druk	501	307	62
	PVP/PVA	491,8 $\pm$ 10,8	293,2 $\pm$ 12,2	63,5 $\pm$ 7,2

Analiza wykonana z użyciem mikroskopii elektronowej (SEM) wykazała, że mikroigły - zależnie od wariantu - stożkowa lub piramidalna - były równomiernie rozmieszczone i posiadały „ostre” końcówki, co jest kluczowe dla efektywnego przebicia skóry. Na zdjęciach mikroskopowych widoczne były charakterystyczne piksele drukowania DLP, będące wynikiem procesu nakładania warstw o grubości ok. 50 μm (Rys. 26).



Rysunek 26 Obrazy mikroskopowe (SEM) pokazujące morfologię mikroigły z boku, ułożenie mikroigieł na plastrze oraz widok z góry na końcówkę: a) drukowanej matrycy z geometrią piramidalną, b) rozpuszczalnego plastra PVP/PVA z geometrią piramidalną, c) drukowanej matrycy z geometrią stożkową, d) rozpuszczalnego plastra PVP/PVA z geometrią stożkową.

Niewielkie zmniejszenie wysokości może być wynikiem skurczu mieszaniny PVP/PVA po odparowaniu wody oraz zmian objętości PDMS podczas przejścia ze stanu ciekłego w stały [213]. Dodatkowo, niedokładne zalanie form lub obecność pęcherzyków powietrza mogły przyczynić się do obniżenia wysokości, podobnie jak siły mechaniczne podczas wyjmowania igieł z formy.

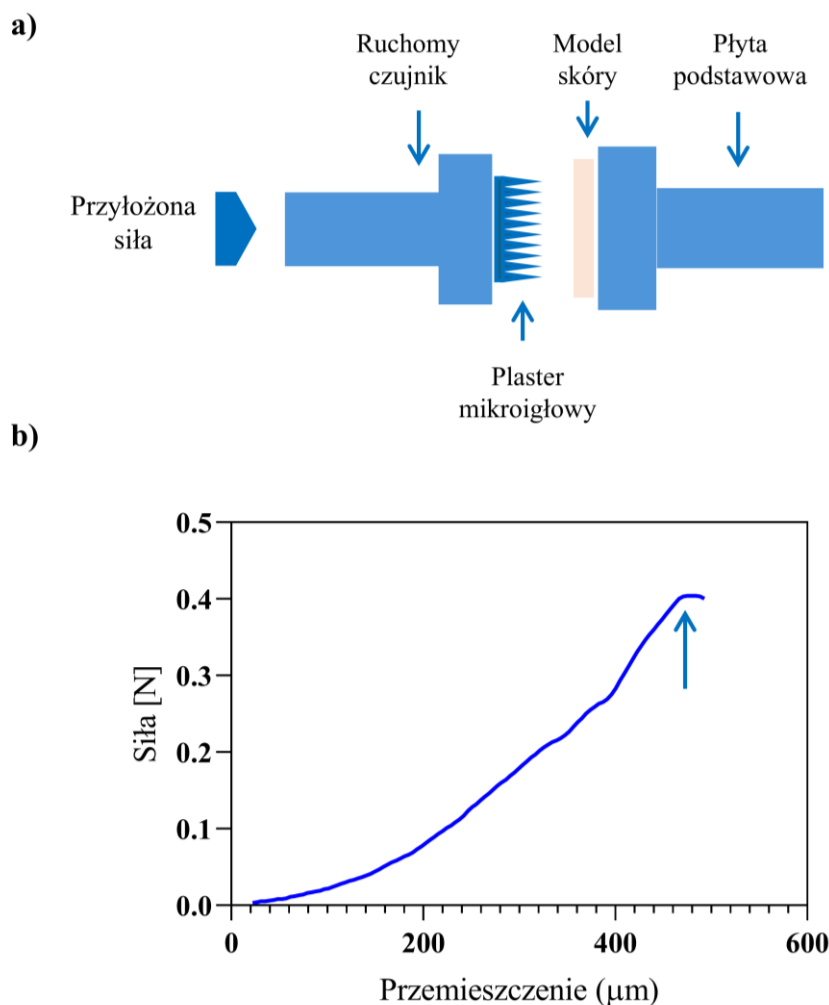
Niewielkie różnice wymiarów mikroigieł nie wpłynęły znacząco na skuteczność penetracji naskórka - kluczowej cechy dla ich zastosowania jako systemów dostarczania leków, co zostanie omówione w dalszej części pracy. Statystycznie nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy mikroigłami drukowanymi DLP a tymi wykonanymi z PVP/PVA w formach PDMS, niezależnie od ich geometrii. Zaobserwowano jednak trend wskazujący, że mikroigły piramidalne miały nieco większą wysokość niż mikroigły stożkowe. Co ciekawe, Lee i współpracownicy zasugerowali, że igły o geometrii piramidalnej wykazują większą wytrzymałość mechaniczną niż stożkowe, co wynika z większej powierzchni przekroju poprzecznego przy tej samej szerokości podstawy [214]. Wnioski te, w zestawieniu z wynikami niniejszego badania, mogą mieć istotne znaczenie przy doborze geometrii mikroigieł do konkretnych zastosowań biologicznych.

Tak opracowana technologia mikroigieł rozpuszczalnych umożliwiła szybkie iterowanie projektów igieł oraz testowanie różnych składów materiałowych w celu dopasowania właściwości mechanicznych i farmakokinetycznych plastrów do określonych zastosowań. Rozwiązanie to łączy zalety wysokiej precyzji techniki DLP z dostępnością i elastycznością mikroformowania opartego na formach PDMS.

6.3 Testy wytrzymałości mechanicznej i potencjału penetracji plastra mikroigłowego

W ramach przedstawionych badań przeprowadzono również analizę zdolności penetracyjnej mikroigieł wytworzonych z mieszaniny PVP/PVA. Testy odporności mechanicznej przeprowadzono z wykorzystaniem zestawionego stanowiska pomiarowego siły i przemieszczenia. Układ pomiarowy składał się z czujnika siły tensometrycznej (KM202 K3N, Megatron Elektronik), na którym zamocowano mikroigły, stołu przesuwne z mikrometryczną śrubą umożliwiającą precyzyjne przemieszczanie czujnika, nieruchomego podłoża z umieszczoną sztuczną skórą oraz kamery umożliwiającej obserwację pomiarów (Rys. 27). Zbieranie danych odbywało się za pośrednictwem komputera oraz wskaźnika pomiarowego współpracującego

z czujnikiem siły (MD150T, WObit). Testy przeprowadzono na plastrach zawierających 100 mikroigieł PVP/PVA. Jako model tkanki zastosowano hydrożel żelatynowy pochodzenia bydlęcego (Sigma-Aldrich), który ze względu na swoją przezroczystość optyczną i podobieństwo mechaniczne dobrze odwzorowuje właściwości skóry. Hydrożel żelatynowy 10% pozostawiono do zestalenia w lodówce, a następnie na jego powierzchni umieszczono polimerową membranę (Parafilm M®). Przygotowany model umieszczono na stanowisku pomiarowym w specjalnej konstrukcji służącej do badań penetracyjnych. Ruch stołu kontrolowano manualnie w zakresie siły oddziałującej na model skóry od 0 do 3 N. Układ rejestrował zależność wywieranej siły od przemieszczenia. Zaobserwowano, że procent mikroigieł, które przebiły warstwy modelu, zwiększał się wraz ze wzrostem przyłożonej siły. Stwierdzono, że minimalna siła potrzebna do pełnej penetracji wynosiła 0,4 N, niezależnie od geometrii mikroigieł (Rys. 27).



Rysunek 27 Testy wytrzymałości mechanicznej: a) schemat układu pomiarowego do oceny głębokości/siły penetracji plastra mikroigłowego, b) charakterystyka siła-przemieszczenie uzyskana podczas testu penetracji, przedstawiająca wzrost siły przypadającej na matrycę mikroigieł wraz ze zwiększającym się przemieszczeniem. Zaznaczony punkt odpowiada maksymalnej zarejestrowanej sile, interpretowanej jako moment pełnej penetracji modelu skóry.

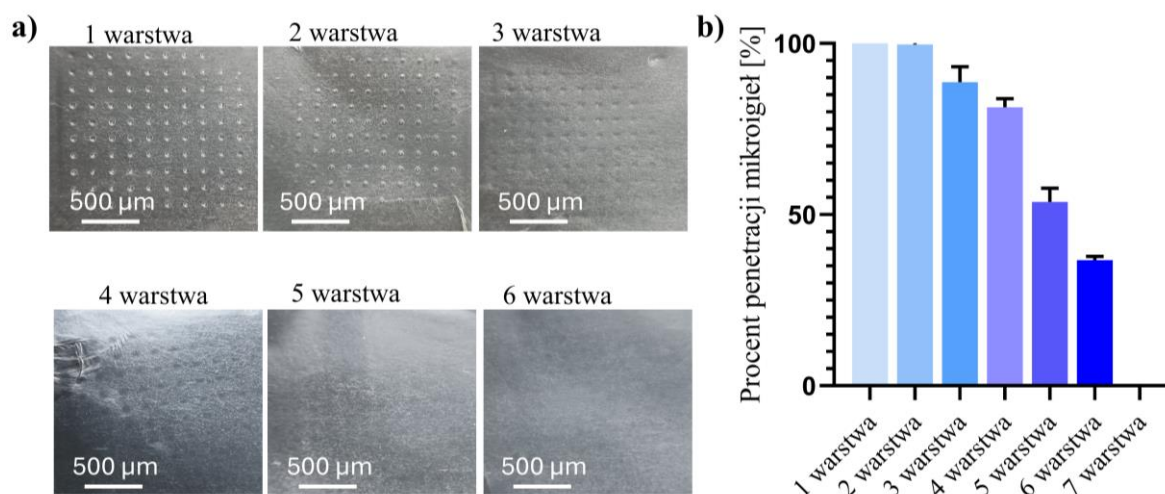
Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi, które wskazują, że siła aplikacyjna wymagana do skutecznego przebicia naskórka przez mikroigły mieści się w zakresie od 0,1 do 3 N, w zależności od geometrii igły i ostrości końcówki. Przedział ten jest w pełni osiągalny przy ręcznym nacisku kciukiem [215]. Nie zaobserwowano ugięcia ani złamania mikroigieł, co wskazuje na ich wystarczającą wytrzymałość mechaniczną - zarówno w przypadku geometrii stożkowej, jak i piramidalnej. Wyniki te potwierdzają, że zaprojektowane mikroigły mogą być z powodzeniem aplikowane nie tylko przez personel weterynaryjny, lecz także samodzielnie przez właścicieli zwierząt.

Zdolność penetracyjna wytworzonych biodegradowalnych mikroigieł PVP/PVA została oceniona z wykorzystaniem następującego modelu skóry. Arkusz Parafilmu M® o grubości 0,13 mm został złożony w siedem warstw w celu uzyskania całkowitej grubości 0,91 mm, tworząc powtarzalną barierę symulującą opór warstwy rogowej naskórka. Test penetracji wykonano manualnie, przy użyciu nacisku kciuka, w celu zasymulowania przyszłego sposobu aplikacji plastra.

Następnie warstwy Parafilmu M® zostały poddane analizie przy użyciu mikroskopu optycznego wyposażonego w kamerę cyfrową. Zliczono liczbę widocznych otworów powstałych w wyniku penetracji mikroigieł, a do oceny zależności pomiędzy przyłożoną siłą a stopniem penetracji Parafilm M® zastosowano równanie (1) [216].

$$\text{Procent penetracji mikroigieł} = \frac{\text{liczba otworów obserwowanych}}{\text{liczba otworów oczekiwanych}} \times 100\% \quad (1)$$

Zidentyfikowano i zliczono liczbę mikroigieł, które przebiły poszczególne warstwy parafilmu. Stwierdzono pełną penetrację warstwy pierwszej i drugiej, natomiast trzecia i czwarta warstwa wykazały odpowiednio 80% i 70% penetracji. W piątej warstwie było to 50 %, a w szóstej poziom ten spadł do 35% (Rys. 28). W warstwie siódmej nie zaobserwowano śladów po wprowadzeniu mikroigłowego plastra.

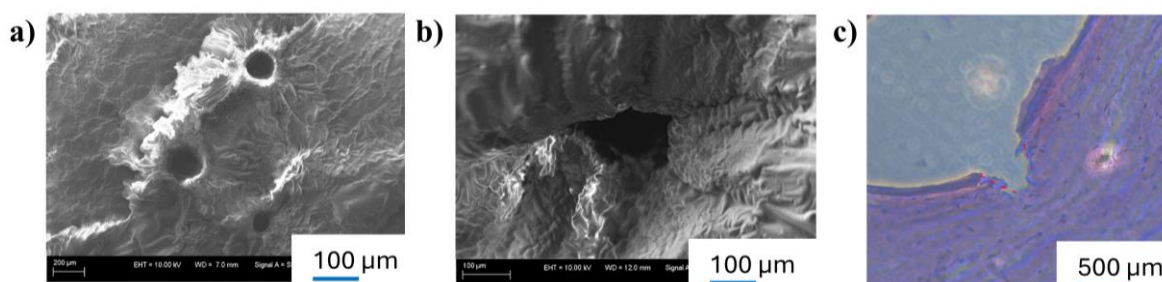


Rysunek 28 Skuteczność penetracji modelu skóry przez mikroigły: a) zdjęcia warstw parafilmu po aplikacji plastra mikroigłowego, b) wykres przedstawiający procent penetracji mikroigieł w poszczególnych warstwach.

Na tej podstawie można stwierdzić, że zaprojektowane mikroigły są w stanie skutecznie penetrować warstwę skóry o grubości do 0,52 mm. Grubość skóry u zwierząt domowych

jest zmienna w zależności od gatunku, rasy oraz lokalizacji na ciele i wynosi od 0,5 do 5 mm u psa oraz od 0,4 do 2 mm u kota [217]. Za jedno z najcieńszych miejsc uznaje się dziąsło, którego średnia grubość wynosi ok. 285 μm [218].

Dodatkowo przeprowadzono testy penetracji na skórze świńskiej. Po aplikacji mikroigłowych plastrów próbki skóry obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu skaningowego. Pozostałe próbki moczono w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA) przez 24 godziny. Następnie próbki myto i umieszczano w parafinie (Chempur, Polska) przez 24 godziny w temperaturze 65 °C. Następnie próbki przenoszono do bloków parafinowych i przycinano na plasterki o grubości 6 μm , które umieszczano na szkiełkach podstawowych. Próbki barwiono odpowiednio hematoksyliną i eozyną (Sigma Aldrich), zgodnie z protokołem producenta. Następnie próbki obserwowano za pomocą odwróconego mikroskopu DMi1 Leica (Rys. 29 c). Po aplikacji plastra mikroigłowego na skórę świńską zaobserwowano powstawanie wyraźnych, regularnie rozmieszczonych mikroporów, odpowiadających geometrii zastosowanych mikroigieł. Obrazy SEM w powiększeniach 50 $\times$ i 150 $\times$ (Rys. 29 a–b) potwierdzają skuteczne przebicie warstwy rogowej naskórka, przy jednoczesnym braku rozległych uszkodzeń otaczającej tkanki. Widoczne krawędzie porów są dobrze zdefiniowane, co świadczy o odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej mikroigieł oraz kontrolowanym charakterze penetracji. Analiza przekroju skóry (Rys. 29 c) wskazuje, że penetracja ograniczała się do warstw powierzchniowych, bez naruszenia głębiej położonych struktur skóry.

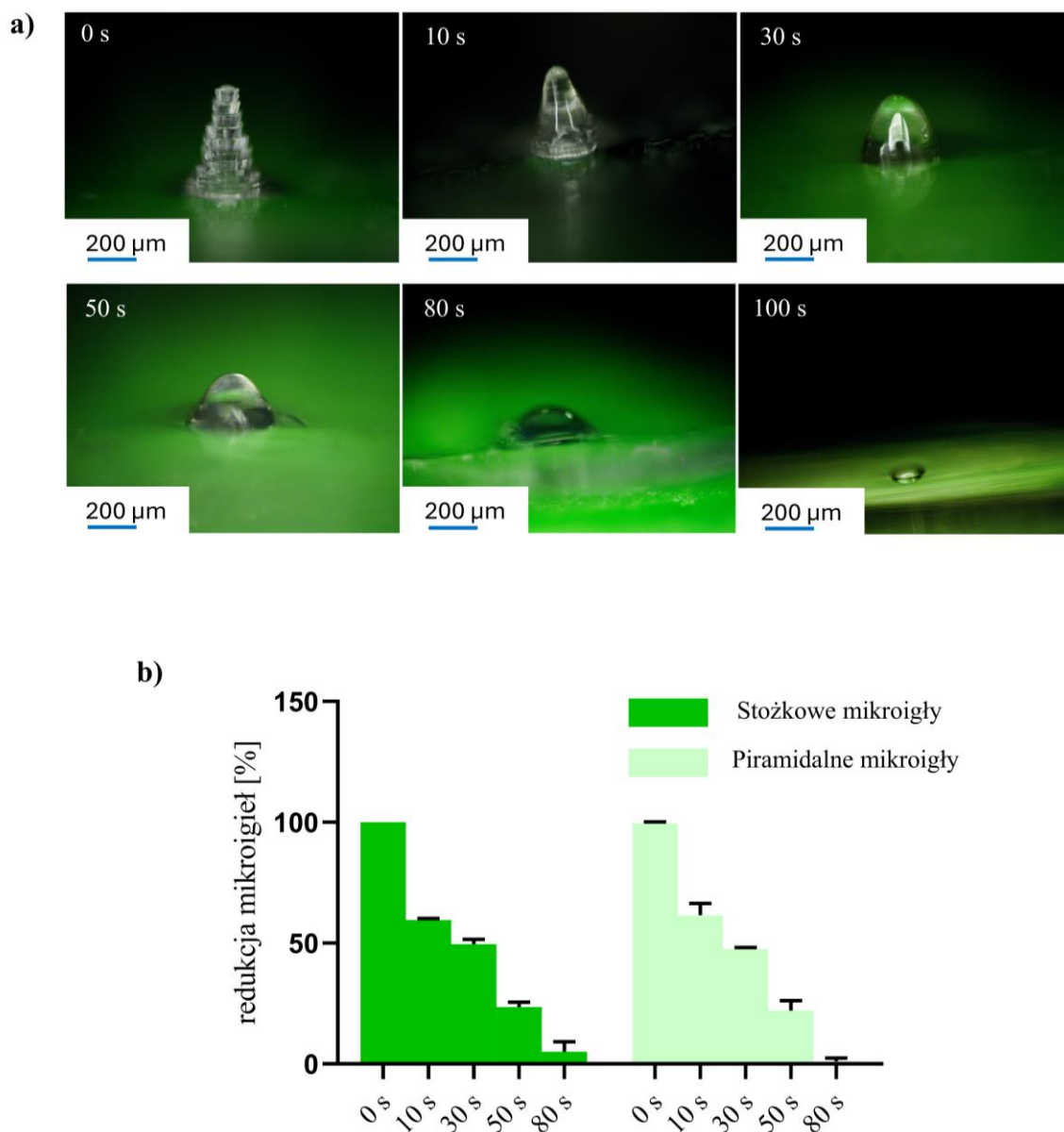


Rysunek 29 Testy penetracji skóry świńskiej: a) zdjęcie mikroskopowe (SEM) porów wytworzonych przez mikroigły w skórze świńskiej w powiększeniu 50x, b) zdjęcie mikroskopowe (SEM) porów wytworzonych przez mikroigły w skórze świńskiej w powiększeniu 150x, c) obrazy z mikroskopii optycznej przedstawiające przekrój skóry po aplikacji plastra mikroigłowego.

6.4 Rozpuszczalność mikroigieł i zdolność uwalniania leku

Celem niniejszej pracy było opracowanie mikroigieł zdolnych do rozpuszczania się w płynie śródmiąższowym skóry i umożliwienia w ten sposób dostarczania substancji czynnej. W związku z tym kluczowe było przeanalizowanie kinetyki rozpuszczania mikroigieł po ich wprowadzeniu do skóry.

Do badań uwalniania leku oraz kinetyki rozpuszczania wykorzystano hydrożel żelatynowy jako model tkanki, zgodnie z wcześniej opisanym protokołem. Plaster z mikroigłami wykonanymi z kompozycji PVP/PVA został dociśnięty do powierzchni membrany za pomocą kciuka, aby zasymulować warunki przyszłej aplikacji, umożliwiając penetrację mikroigieł do wnętrza żelatyny. Następnie plaster był odciągany od hydrożelu żelatynowego w różnych odstępach czasu, a mikroigły obserwowano i mierzono pod mikroskopem optycznym (Leica, Niemcy), w celu analizy kinetyki rozpuszczania (Rys. 30). Po aplikacji mikroigieł do modelu skóry metodą nacisku kciukiem, w różnych odstępach czasowych mierzono wysokość pozostałej części igły. Zaobserwowano, że wraz z wydłużaniem czasu kontaktu ze skórą wysokość igieł stopniowo się zmniejszała, zgodnie z oczekiwaniami. Co istotne, mikroigły - niezależnie od ich kształtu geometrycznego, osiągały zbliżoną wysokość w odpowiadających sobie punktach czasowych, co świadczy o jednorodnym przebiegu procesu rozpuszczania. Stwierdzono, że wysokość igieł stożkowych uległa redukcji o 55% już po 10 sekundach kontaktu z modelem skóry, a w przypadku igieł piramidalnych spadek ten wynosił 60%. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów stwierdzono, że całkowite rozpuszczenie mikroigieł następowało w ciągu 100 sekund od aplikacji.



Rysunek 30 Rozpuszczalność mikroigieł: a) obrazy uzyskane za pomocą mikroskopu optycznego podczas rozpuszczania mikroigieł po 0, 10, 30, 50, 80 oraz 100 sekundach, b) wykres porównujący szybkość rozpuszczania plastrów mikroigłowych wykonanych z PVP/PVA w geometrii stożkowej oraz piramidalnej.

Uzyskane wyniki dowodzą, że mikroigły skutecznie wchodziły w kontakt z modelem skóry i w interakcję z płynem śródmiąższowym, szybko ulegając rozpuszczeniu. Obserwacje te potwierdzają dobrą rozpuszczalność zastosowanych polimerów PVP i PVA w wodzie. Szybkie rozpuszczanie się mikroigieł z mieszaniny PVP/PVA stanowi istotną zaletę pod względem łatwości użycia i skuteczności uwalniania leku. W związku z tym testowane mikroigły mogą stanowić wartościowy materiał do wytworzenia szybko rozpuszczalnych mikroigieł, przewyższających pod tym względem inne materiały.

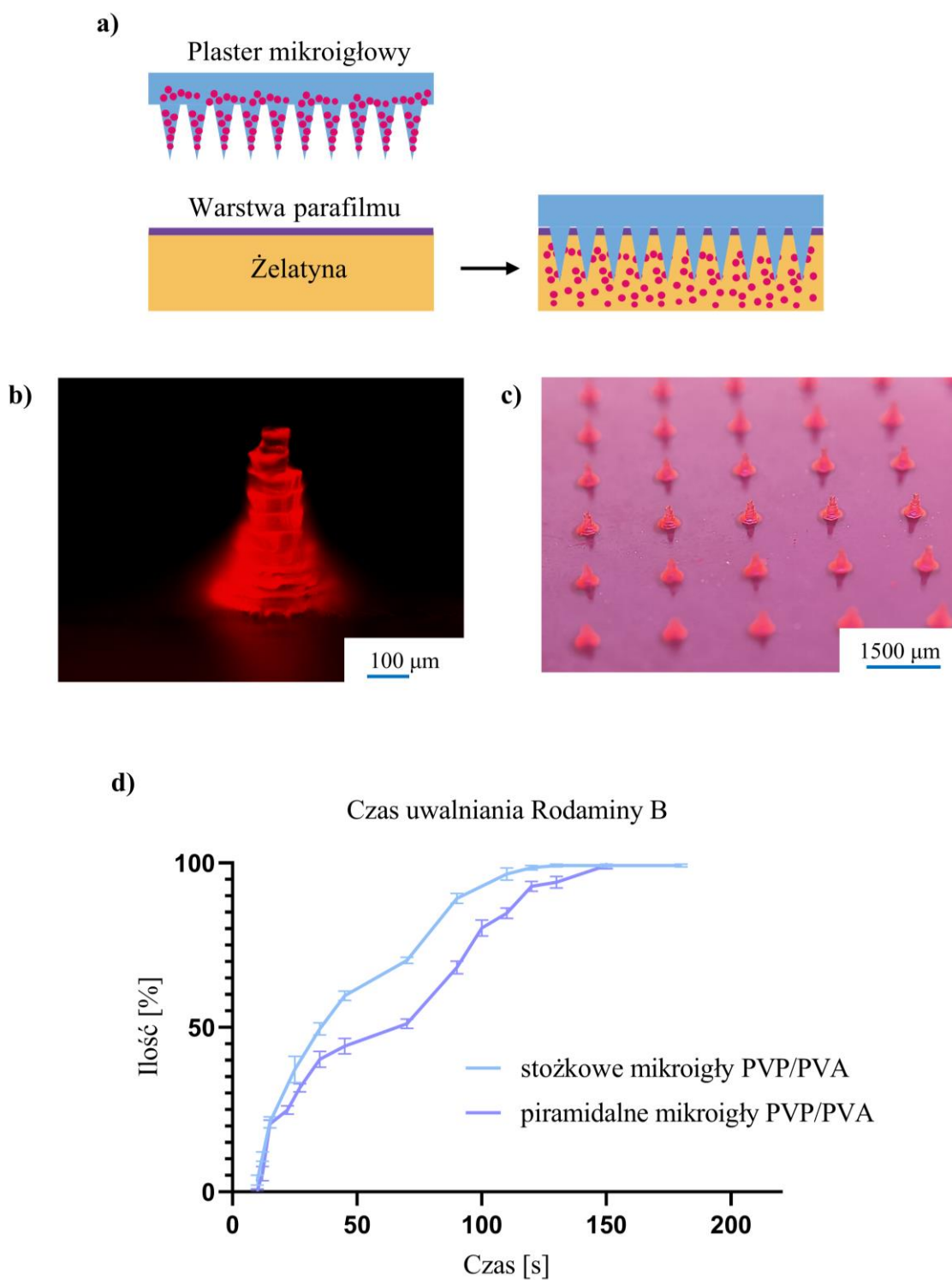
Oprócz szybkiego rozpuszczania, ważnymi wskaźnikami skuteczności transdermalnych systemów dostarczania leków (TDDS) są dokładność dawki oraz możliwość pełnego uwolnienia substancji czynnej po wprowadzeniu mikroigły do tkanki naskórka.

Jako modelową substancję czynną zastosowano rodaminę B (Sigma-Aldrich), cząsteczkę hydrofilową powszechnie stosowaną w badaniach uwalniania leku, dla której sporządzono krzywą wzorcową umożliwiającą ilościowe oznaczenie uwalniania. W tym celu roztwór rodaminy B w stężeniu 10% dodano do mieszaniny PVP/PVA, którą następnie wypełniano formy PDMS, zgodnie z wcześniej opisaną procedurą. Gotowe plastry mikroigłowe aplikowano na model skóry, a w określonych punktach czasowych odłączano je od hydrożelu żelatynowego, aby zatrzymać dalsze uwalnianie.

Poprzez zwiększenie temperatury uzyskano upłynnienie żelatyny, co umożliwiło pomiar stężenia rodaminy B uwolnionej z mikroigieł. Oznaczenia wykonano za pomocą spektroskopii UV–VIS (BMG Labtech) przy długości fali 554 nm.

Wykorzystując barwnik Rodamina B, wykazano, że kompozycja PVP 10% / PVA 5% wykazuje bardzo dobre właściwości enkapsulacji oraz kontrolowanego uwalniania substancji czynnej. Pełne uwolnienie leku zaobserwowano po 120 sekundach od aplikacji mikroigieł stożkowych do żelatynowego modelu skóry oraz po 150 sekundach w przypadku igieł piramidalnych (Rys. 31). Profil uwalniania wykazywał stabilną kinetykę bez gwałtownych wahań, co sugeruje, że substancja czynna była jednorodnie rozproszona w matrycy mikroigły.

Co więcej, czas uwalniania leku był dłuższy niż czas całkowitego rozpuszczenia mikroigły, co może wskazywać na stabilizację substancji czynnej w strukturze polimerowej. Uzyskane wyniki sugerują, że opracowane plastry z rozpuszczalnymi mikroigłami mogą znaleźć zastosowanie w medycynie weterynaryjnej, gdzie wymagane są szybkie, bezpieczne i precyzyjne systemy transdermalnego dostarczania leków [104].



Rysunek 31 Badanie uwalniania Rodaminy B z rozpuszczalnych mikroigieł: a) schemat plastra mikroigłowego wypełnionego rodaminą B oraz modelu skóry, b) zdjęcie mikroigły z rodaminą B uzyskane za pomocą systemu obrazowania ZOE, c) zdjęcie plastra mikroigłowego z rodaminą B wykonane za pomocą aparatu w smartfonie, d) wykres przedstawiający zależność uwalnianej rodaminy B od czasu dla dwóch geometrii mikroigieł.

6.5 Ocena biokompatybilności i cytotoxyczności *in vitro* oraz właściwości regeneracyjne mikroigieł

Testy biokompatybilności i cytotoxyczności *in vitro* przeprowadzono w celu oceny bezpieczeństwa biologicznego polimerów PVP i PVA przeznaczonych do wytwarzania rozpuszczalnych mikroigieł. Badania te miały na celu zweryfikowanie, czy kontakt materiałów z komórkami o wysokiej wrażliwości biologicznej nie prowadzi do obniżenia ich żywotności, aktywności metabolicznej ani zaburzeń strukturalnych. Uzyskane wyniki stanowiły kluczowy etap oceny przydatności opracowanych mikroigieł do potencjalnych zastosowań biomedycznych i transdermalnych.

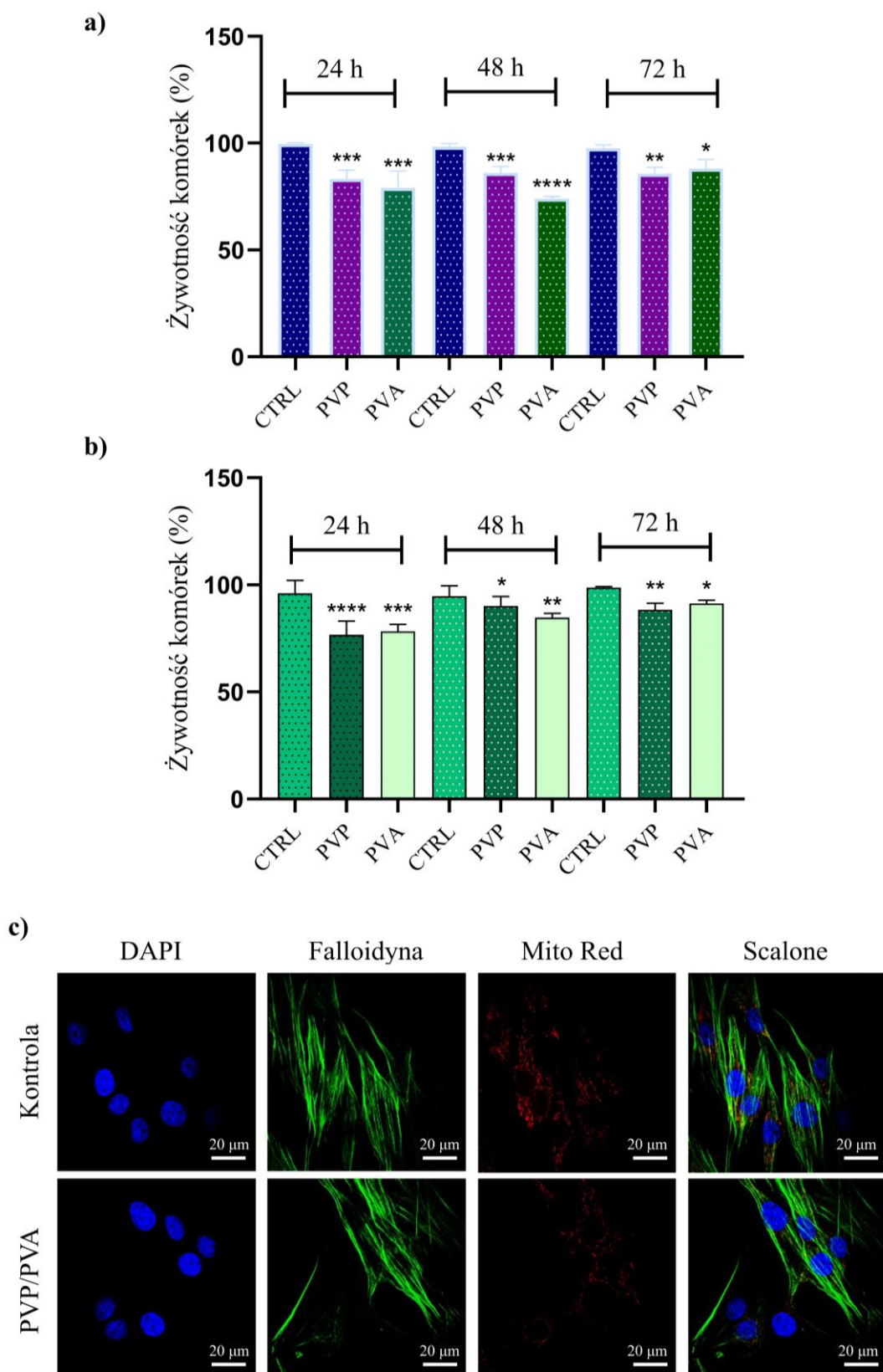
Komórki macierzyste dziąsłowe (ang. gingival mesenchymal stem cells, GMSCs) oraz komórki macierzyste izolowane z rogówki (ang. corneal stromal stem cells, CSSCs) wysiano na płytki 24-dołkowe w zagęszczeniu 25×10^4 komórek na dołek. Hodowlę prowadzono w zmodyfikowanym podłożu Eagle'a (DMEM, Gibco) zawierającym 1 g/L glukozy, uzupełnionym o 10% surowicy płodowej bydlęcej (FBS, Gibco) oraz 1% roztworu antybiotyku penicylina–streptomycyna (Gibco). Komórki inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂, atmosfera nasycona parą wodną). Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji komórki poddawano działaniu polimerów poliwinylpirolidonu (PVP) oraz alkoholu poliwinylowego (PVA) przez 24 godziny. Ekspozycja miała na celu ocenę potencjalnego wpływu badanych polimerów na żywotność, metabolizm oraz integralność struktur komórkowych.

Przeżywalność i aktywność metaboliczną komórek oceniano z wykorzystaniem testu opartego na barwniku rezazurynowym (TOX8 In Vitro Toxicology Assay Kit, Sigma-Aldrich). Metoda ta opiera się na zdolności żywych, metabolicznie aktywnych komórek do redukcji rezazuryny do resorufiny, co prowadzi do wzrostu sygnału fluorescencyjnego. Po 24-godzinnej inkubacji komórek z polimerami PVP i PVA podłoże hodowlane zastępowano medium zawierającym DMEM, 10% FBS, 1% PS oraz 10% (v/v) roztworu rezazuryny. Komórki inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Następnie medium po hodowli przenoszono do płytek 96-dołkowych w objętości 100 µL (w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych). Pomiar fluorescencji wykonywano przy długości fali emisyjnej 600 nm, stosując 690 nm jako długość referencyjną, co pozwalało na redukcję tła i poprawę dokładności pomiaru. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno PVP, jak i PVA były dobrze tolerowane przez komórki

macierzyste zrębu rogówki oraz dziąsła (Rys. 32 a-b). Nie zaobserwowano istotnego spadku aktywności metabolicznej komórek po 24, 48 ani 72 godzinach ekspozycji na badane polimery w porównaniu z próbą kontrolną. Brak efektu cytotoksycznego wskazuje na wysoką biokompatybilność zastosowanych materiałów oraz ich potencjalną przydatność w zastosowaniach biomedycznych, w szczególności w obszarze tkanek jamy ustnej oraz oka, charakteryzujących się wysoką wrażliwością na czynniki zewnętrzne.

W celu pogłębionej oceny wpływu polimerów PVP i PVA na stan fizjologiczny komórek przeprowadzono wieloparametrową analizę obrazową obejmującą wizualizację jądra komórkowego, cytoszkieletu aktynowego, mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej (Rys. 32 c). Badania wykonano z wykorzystaniem konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (Observer Z1 Confocal Spinning Disc V.2; Zeiss). Siateczkę śródplazmatyczną znakowano barwnikiem ER-Tracker™ Green w stężeniu 1 μ M (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Warszawa, Polska). W tym celu medium hodowlane zastępowano roztworem Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) zawierającym jony wapnia i magnezu oraz barwnik fluorescencyjny. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze 37°C komórki utrwalano zimnym 4% paraformaldehydem (PFA) przez 30 minut. Mitochondria barwiono na żywych komórkach przy użyciu barwnika MitoRed (100 nM; Sigma-Aldrich) przez 30 minut w ciemności w temperaturze 37°C. Następnie komórki płukano trzykrotnie PBS, utrwalano 4% PFA oraz permeabilizowano 0,1% roztworem Triton X-100 przez 20 minut. Cytoszkiet aktynowy znakowano przy użyciu znacznika PI sprzężonego z fluoroforem Atto-488 (Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:800, inkubując próbki przez 45 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności. Jądra komórkowe barwiono DAPI, stosując medium montażowe Faramount Aq Mounting Medium (Dako), zgodnie z zaleceniami producenta. Analiza obrazów konfokalnych wykazała, że ekspozycja komórek CSSCs i GMSCs na mieszaninę polimerów PVP/PVA nie prowadziła do istotnych zmian morfologicznych ani fizjologicznych. Jądra komórkowe zachowały regularny, owalny kształt, bez oznak kondensacji chromatyny, co wskazuje na brak indukcji apoptozy lub stresu genotoksycznego. Obrazowanie cytoszkieletu aktynowego umożliwiło ocenę zdolności adhezyjnych komórek. Zaobserwowano subtelne zmiany w organizacji filamentów aktynowych, co może sugerować przejściowe zaburzenia integralności mechanicznej komórek, potencjalnie wpływające na ich przyleganie do podłoża. Wizualizacja

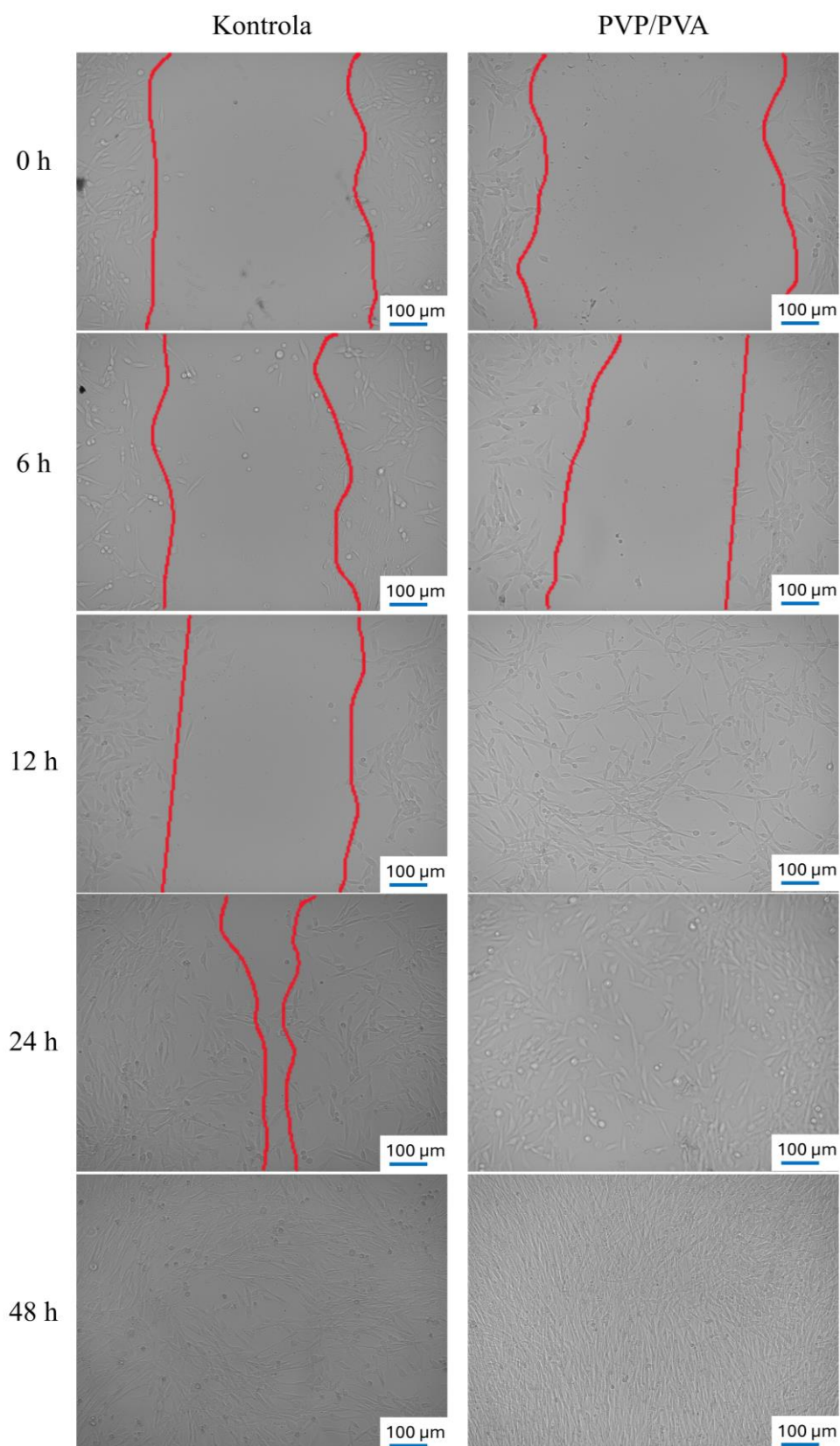
mitochondriów ujawniła nieznacznie obniżoną liczbę organelli w komórkach traktowanych PVP i PVA w porównaniu z kontrolą, jednak bez cech fragmentacji mitochondrialnej lub utraty potencjału, co sugeruje brak istotnego zaburzenia funkcji energetycznych komórek. Zastosowanie wielostrukturnego obrazowania potwierdziło, że badane polimery nie wywołują efektów cytotoksycznych ani znaczących zmian w podstawowych strukturach komórkowych. Analiza obrazów konfokalnych wykazała, że ekspozycja komórek CSSCs i GMSCs na mieszaninę polimerów PVP/PVA nie prowadziła do istotnych zmian morfologicznych ani fizjologicznych. Jądra komórkowe zachowały regularny, owalny kształt, bez oznak kondensacji chromatyny, co wskazuje na brak indukcji apoptozy lub stresu genotoksycznego. Obrazowanie cytoszkieletu aktynowego umożliwiło ocenę zdolności adhezyjnych komórek; zaobserwowane subtelne zmiany w organizacji filamentów aktynowych mogą sugerować przejściowe zaburzenia integralności mechanicznej komórek, potencjalnie wpływające na ich przyleganie do podłoża.



Rysunek 32 Stan fizjologiczny komórek pod wpływem działania polimerów PVP/PVA: a) żywotność komórek rogówki po poddaniu ich działaniu polimerów wykorzystanych do wytworzenia rozpuszczalnych mikroigieł, b) żywotność komórek dziąsła po poddaniu ich działaniu polimerów wykorzystanych do wytworzenia rozpuszczalnych mikroigieł c) Zdjęcia z mikroskopii konfokalnej, DAPI wybarwiające jądro komórkowe, falloidyna 488 wybarwiająca cytoskielet oraz Mito Red barwiący mitochondria.

W celu oceny zdolności migracyjnych komórek przeprowadzono test gojenia rany (ang. scratch assay), który pozwala na analizę ruchliwości komórek oraz ich zdolności do zamykania powstałej luki. Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w zagęszczeniu 10×10^4 komórek na dołek i hodowano do uzyskania zwartej monowarstwy. Następnie komórki traktowano badanymi polimerami PVP/PVA, natomiast w próbach kontrolnych stosowano standardowe medium hodowlane bez dodatku polimerów. Po zakończeniu inkubacji, w centralnej części każdego dołka wykonano liniowe nacięcie („ranę”) przy użyciu sterylnej końcówki pipety o objętości 10 μ L. W celu usunięcia oderwanych komórek oraz resztek po nacięciu, dołki przepłukiwano medium hodowlanym. Następnie dodawano świeże medium zawierające badane polimery. Obrazy komórek rejestrowano bezpośrednio po wykonaniu nacięcia (0 h) oraz po 6 h, 12 h, 24 h i 48 h inkubacji, z wykorzystaniem systemu obrazowania ZOE Fluorescent Cell Imager (Rys. 33). Analizę stopnia zamykania rany przeprowadzono mierząc szerokość obszaru pozbawionego komórek w kolejnych punktach czasowych. Otrzymane dane poddano analizie statystycznej w programie GraphPad Prism 8.

Na rysunku 33 zaprezentowano reprezentatywne obrazy testu scratch assay dla komórek kontrolnych oraz komórek traktowanych mieszaniną polimerów PVP/PVA w kolejnych punktach czasowych (0–48 h). Czerwone linie wyznaczają granice rany i ułatwiają ocenę stopnia migracji komórek do obszaru uszkodzenia. W próbie kontrolnej zaobserwowano stopniowe zmniejszanie szerokości rany wraz z upływem czasu, co świadczy o zachowanej zdolności migracyjnej komórek. Po 24 godzinach widoczne było znaczne zawężenie obszaru rany, natomiast po 48 godzinach luka została niemal całkowicie zamknięta, co wskazuje na efektywną migrację komórek oraz ich proliferację. W przypadku komórek traktowanych polimerami PVP/PVA zaobserwowano porównywalny, a miejscami nawet szybszy proces zamykania rany. Już po 12–24 godzinach widoczne było intensywne przemieszczanie się komórek w kierunku centralnej części nacięcia, a po 48 godzinach obszar rany był całkowicie wypełniony przez komórki tworzące jednolitą monowarstwę. Morfologia komórek pozostawała prawidłowa, bez widocznych oznak stresu komórkowego, takich jak zaokrąglenie komórek czy utrata adhezji.



Rysunek 33 Ocena migracji komórek w teście gojenia rany (ang. scratch assay). Reprezentatywne obrazy komórek kontrolnych oraz komórek traktowanych mieszaniną polimerów PVP/PVA zarejestrowane w czasie 0, 6, 12, 24 oraz 48 h po wykonaniu nacięcia. Czerwone linie wyznaczają granice rany i ilustrują stopniowe zamykanie obszaru pozbawionego komórek w czasie.

Uzyskane wyniki wskazują, że obecność polimerów PVP/PVA nie hamuje migracji komórek, a tym samym nie wpływa negatywnie na procesy związane z gojeniem rany *in vitro*. Zdolność komórek do efektywnego zamykania powstałej luki oraz zachowana prawidłowa morfologia potwierdzają wysoką biokompatybilność badanych polimerów. Wyniki te sugerują, że mieszanina PVP/PVA może być bezpiecznie stosowana w mikroigłach przeznaczonych do kontaktu z tkankami, w których kluczową rolę odgrywają procesy migracji komórkowej, takie jak regeneracja tkanek oka lub jamy ustnej.

6.6 Podsumowanie

W niniejszym rozdziale przedstawiono kompleksowe opracowanie własnej mikroinżynierskiej technologii rozpuszczalnych plastrów mikroigłowych przeznaczonych do zastosowań weterynaryjnych. Zastosowanie zintegrowanego podejścia łączącego precyzyjny druk 3D metodą DLP z mikroformowaniem w elastycznych formach PDMS umożliwiło szybkie prototypowanie oraz iteracyjne doskonalenie geometrii i składu materiałowego mikroigieł.

Przeprowadzona analiza morfologiczna wykazała, że geometrie stożkowe i piramidalne charakteryzują się najlepszym odwzorowaniem projektów CAD, wysoką powtarzalnością wymiarową oraz odpowiednią ostrością końcówek, kluczową dla skutecznej penetracji warstwy rogowej naskórka. Badania mechaniczne i penetracyjne potwierdziły, że wytworzone mikroigły z mieszaniny PVP/PVA wykazują wystarczającą wytrzymałość mechaniczną oraz zdolność skutecznego przebicia modeli skóry syntetycznej i skóry świńskiej przy siłach aplikacyjnych możliwych do uzyskania manualnie.

Wykazano również szybkie i jednorodne rozpuszczanie mikroigieł w modelu tkankowym oraz skuteczne, kontrolowane uwalnianie modelowej substancji czynnej, co potwierdza przydatność opracowanej technologii w zastosowaniach wymagających szybkiego dostarczenia leku. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały wysoką biokompatybilność zastosowanych polimerów względem komórek macierzystych chrząstki i rogówki oraz brak negatywnego wpływu na migrację komórek i procesy regeneracyjne.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że opracowana platforma rozpuszczalnych mikroigieł stanowi obiecujące, bezpieczne i funkcjonalne rozwiązanie dla transdermalnych

systemów dostarczania leków w medycynie weterynaryjnej, w szczególności w zastosowaniach wymagających minimalnej inwazyjności, precyzji dawkowania oraz wysokiej akceptowalności przez zwierzęta i ich opiekunów.

7 Urządzenie diagnostyczne RT-LAMP z drukowanym chipem

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań własnych dotyczących opracowania i wytworzenia systemu do detekcji wirusów, przeznaczonego do zastosowań w diagnostyce weterynaryjnej. Główny nacisk położono na zaprojektowanie i wykonanie drukowanych chipów oraz implementację skutecznego systemu optoelektronicznego, umożliwiającego precyzyjny i powtarzalny odczyt sygnału fluorescencyjnego, wzbudzanego za pomocą światła LED.

Istotną część prowadzonych badań stanowiło opracowanie oraz optymalizacja izotermicznej reakcji amplifikacji kwasu nukleinowego metodą RT-LAMP (ang. reverse transcription loop-mediated isothermal amplification). Zastosowanie tej techniki umożliwiło prowadzenie reakcji amplifikacji materiału genetycznego wirusa w warunkach stałej temperatury, co znacząco upraszcza procedurę diagnostyczną i zwiększa potencjał systemu w kontekście zastosowań poza specjalistycznym laboratorium.

W ramach badań własnych opracowany system wykorzystano do diagnostyki zakażeń kotów kaliciwirusem, będącym istotnym czynnikiem etiologicznym chorób zakaźnych układu oddechowego u kotów.

7.1 Opracowanie warunków reakcji RT-LAMP i jej optymalizacja w środowisku laboratoryjnym

W celu określenia warunków reakcji RT-LAMP w środowisku laboratoryjnym pozyskano wymazy z jamy ustnej kotów z objawami zapalenia dziąseł. Próbkę były pobrane przez lekarzy weterynarii sterylnymi wymazówkami i umieszczane w specjalnym medium transportowym służącym do stabilizacji RNA wirusowego. Płyn przenoszono do odczynnika TRIzol® (Invitrogen) mającego na celu homogenizację i inaktywację materiału biologicznego. Do homogenatu dodawano metanol celem

rozdzielenia mieszaniny na dwie fazy. Górną fazę przenoszono do probówki zawierającej izopropanol, który wytrącał RNA. Po wirowaniu RNA pozostał na dnie probówki w postaci osadu, następnie był przemywany 70% etanolem, osuszany i rozpuszczany w wodzie wolnej od nukleaz. Stężenie wyizolowanego RNA określano poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm za pomocą spektrofotometru NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) - wyniosło ono 10 ng/μL. Następnie oceniano jakość wyizolowanego RNA, analizując stosunek absorbancji A260/A280, który mieścił się w przedziale 1,8–2,0. Wartości te wskazują na wysoką czystość próbek. W kolejnym etapie wyłoniono osobniki będące nosicielami wirusa FCV. Zakażenie zostało zdiagnozowane za pomocą referencyjnej metody RT-qPCR, co umożliwiło wykorzystanie tych próbek jako materiału porównawczego do walidacji testu izotermicznego. Testy przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu AmpliTest FCV zgodnie z protokołem producenta (Amplicon, Polska).

Warunki reakcji RT-qPCR były następujące: ogrzewanie próbki w 45°C przez 15 min w celu syntezy cDNA (odwrotna transkrypcja), a następnie 5 min w 95°C w celu denaturacji wstępnej oraz 45 cykli amplifikacji w 58°C przez 25 s. Detekcja obecności wirusowych sekwencji nastąpiła dzięki wykorzystaniu specyficznej sondy typu TaqMan®, która przyłączając się do powstającego amplikonu (powielanego fragmentu wirusowego genomu) ulega hydrolizie. Podczas hydrolizy z sondy uwalniany jest barwnik fluorescencyjny FAM, który następnie został wykryty przez układ optyczny termocyklera (BioRad).

Poza materiałem genetycznym izolowanym bezpośrednio od chorych kotów, wykorzystano również syntetyczny fragment RNA odpowiadający konserwatywnemu regionowi genomu kaliciwirusa kotów [M86379.1]. Został on dostarczony przez firmę Twist Bioscience i wykorzystany jako kontrola pozytywna w testach RT-LAMP. Materiał ten rozcieńczono następnie 10-krotnie, uzyskując serię wzorców o liczbie kopii RNA w zakresie 10^9 – 10^0 na reakcję (Tab. 10), które posłużyły do określenia limitu detekcji (ang. limit of detection, LOD). Liczby te obliczono przy użyciu wzoru:

$$Y \text{ (kopii/}\mu\text{L)} = (6,02 \times 10^{23}) \times [X \text{ (ng/}\mu\text{L)}] \times 10^{-9} / (\text{długość RNA} \times 340)$$

gdzie X odpowiada stężeniu RNA.

Tabela 10 Stężenia i szereg rozcieńczeń syntetycznego fragmentu RNA.

Stężenie [ng/μL]	Liczba kopii [kopii/μL]
0,71	$4,19 \times 10^9$
0,071	$4,19 \times 10^8$
0,0071	$4,19 \times 10^7$
0,00071	$4,19 \times 10^6$
0,000071	$4,19 \times 10^5$
0,0000071	$4,19 \times 10^4$
0,00000071	$4,19 \times 10^3$
0,000000071	$4,19 \times 10^2$
0,0000000071	$4,19 \times 10^1$
0,00000000071	$4,19 \times 10^0$

Mając przygotowane matryce niezbędne do testu opartego na amplifikacji materiału genetycznego, przystąpiono do przygotowywania pozostałych składowych mieszaniny reakcyjnej RT-LAMP. W oparciu o sekwencję genetyczną kaliciwirusa dostępną w bazie GenBank [M86379.1] oraz przy wykorzystaniu narzędzia NEB® LAMP Primer Design Tool, zaprojektowano startery reakcyjne. Startery stanowią krótkie, syntetyczne oligonukleotydy, które rozpoznają komplementarne sekwencje nukleotydowe w materiale genetycznym i determinują miejsce inicjacji syntezy nowych nici. W metodzie RT-LAMP ich rola jest szczególnie istotna, ponieważ zestaw składa się z kilku typów starterów pełniących odrębne funkcje w mechanizmie amplifikacji izotermicznej. Prawidłowo zaprojektowane startery są fundamentalne dla specyficzności reakcji, ograniczenia amplifikacji nieswoistej i osiągnięcia wysokiej efektywności procesu [219]. Etap projektowania starterów jest zatem krytyczny, gdyż to od ich właściwości zależy zarówno selektywność wykrywania danego patogenu, jak i czułość analityczna całego testu. Zestawy starterów zaprojektowano w taki sposób, aby specyficznie identyfikowały odrębne regiony genu QKE71_gp1 (ORF1), kodującego polibiałko replikacyjne kaliciwirusa. Każdy zestaw obejmował sześć oligonukleotydów charakterystycznych dla reakcji RT-LAMP, rozpoznających łącznie osiem unikalnych obszarów sekwencji docelowej: dwa startery zewnętrzne (F3 i B3), dwa startery wewnętrzne (FIP i BIP) oraz dwa startery pętlowe (LF i LB). Startery zostały zsyntetyzowane przez Thermo Fisher Scientific i poddane standardowemu oczyszczaniu. W celu oceny ich swoistości przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji

z wykorzystaniem narzędzia BLASTn. Sekwencje dobranych starterów przedstawiono poniżej (Tab. 11 oraz Tab. 12).

Tabela 11 Startery zaprojektowane dla fragmentu 5179-5369 [191 bp] wirusa FCV

F3_P7L42	GCACTTTGAACCCCAACA
B3_P7L42	TTGAAATGGGGGTCCCAATC
FIP_P7L42	GTCGATCTGGTCAGACCGCGTATGCTTCGGCTTTGGATCA
BIP_P7L42	GAGTGGCATGACCGCCCTACTTAAGCACGTTAGCGCAGG
LF_P7L42	ACGCCATTGAACTGGCTGTT
LB_P7L42	CTGTGATGTGTTCGAAGTTTGAGC

Tabela 12 Startery zaprojektowane dla fragmentu 5200-5395 [196 bp] wirusa FCV.

F3_P24L1	TGCTTCGGCTTTGGATCA
B3_P24L1	GGAAGTTGTTGGGGTTGAT
FIP_P24L1	CACAGTGTAGGGCGGTCATGCAGTTCAATGGCGTGGAG
BIP_P24L1	TCGAAGTTTGAGCATGTGCTCAAAATGGGGGTCCCAATCA
LF_P24L1	TCGAGTCGATCTGGTCAGACC
LB_P24L1	ACCTGCGCTAACGTGCTTAA

Do reakcji zastosowano zestaw reakcyjny SuperScript™ IV RT-LAMP Master Mix (Thermo Fisher), który umożliwia jednoczesną odwrotną transkrypcję i amplifikację izotermiczną. Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta (Tab. 13).

Tabela 13 Skład mieszaniny reakcyjnej RT-LAMP.

Reagent	Detekcja RNA	Kontrola bez matrycy (ang. no-template control, NTC)	Końcowe stężenie
SuperScript™ IV RT-LAMP Master Mix (2X),	12.5 µL	12.5 µL	1 x
40 µM FIP/BIP starter	1 µL każdego	1 µL każdego	1.6 µM
10 µM F3/B3 starter	0.5 µL każdego	0.5 µL każdego	0.2 µM
10 µM LoopF/LoopB starter	1 µL każdego	1 µL każdego	0.4 µMµM
Świeży barwnik 50 µM SYTO™ 9 *	2.5 µL	2.5 µL	5 µM
Woda wolna od nukleaz	Uzupełnione do 24 µL	Uzupełnione do 24 µL	-

*dotyczy fluorescencyjnej detekcji „real-time”.

Z użyciem dwóch różnych zestawów starterów (opisanych powyżej) oraz zestawu SuperScript™ IV RT-LAMP Master Mix (2X), syntetycznego fragmentu RNA genu

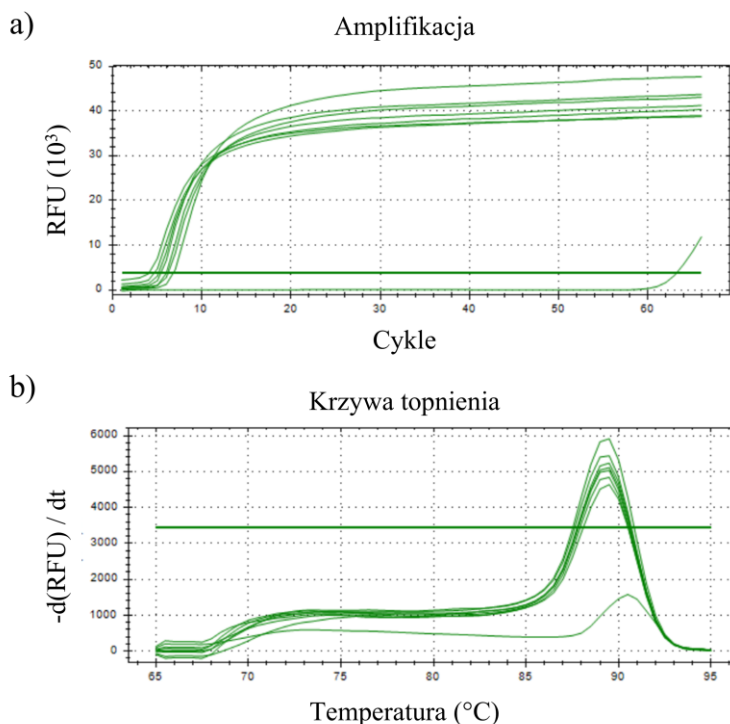
FCV jako kontrola pozytywna, oraz z wykorzystaniem RNA wyizolowanego z wymazu pobranego od konia (w celu określenia swoistości zaprojektowanych starterów) jako kontrola negatywna, przeprowadzono reakcję RT-LAMP Real Time (w czasie rzeczywistym) w termocyklerze (BioRad) w etapach podanych poniżej (Tab.14). Monitorowanie reakcji RT-LAMP realizowano w trybie cyklicznych odczytów fluorescencji, które w oprogramowaniu aparatu określane są jako „cykle”, choć sama reakcja miała charakter ciągły i izotermiczny.

Tabela 14 Etapy reakcji RT-LAMP.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli (odczytów)
Amplifikacja	50-70°C	30 sec	20-120
Inaktywacja	95°C	2 min	1
Krzywa topnienia	60-95°C	-	-

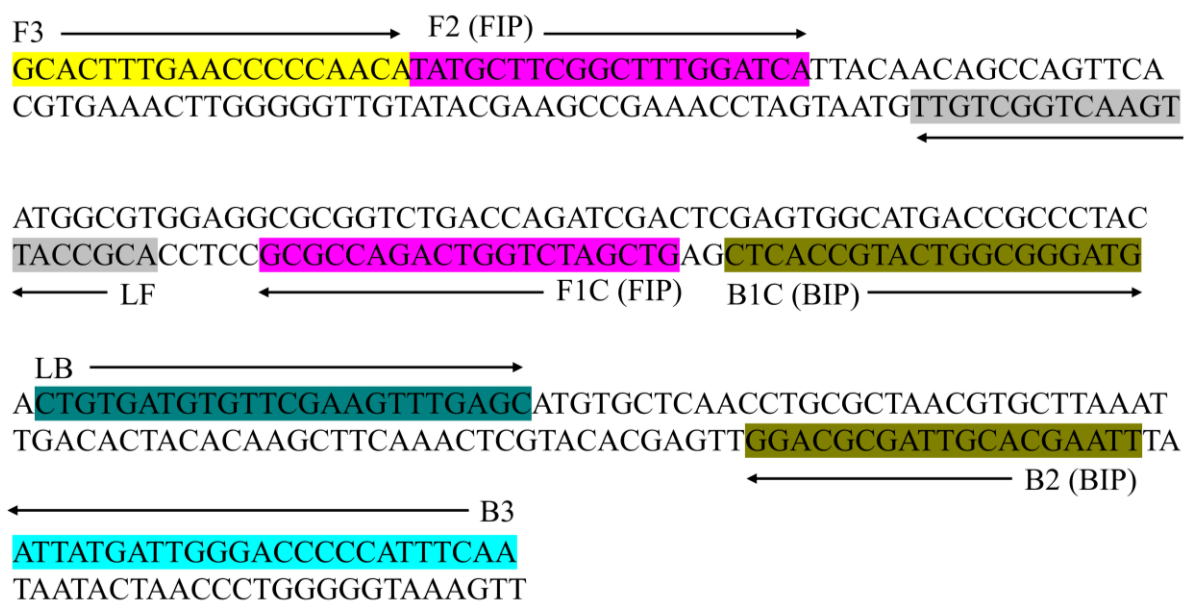
Wszystkie reakcje przeprowadzono w trzech powtórzeniach technicznych ($n = 3$) i trzech powtórzeniach biologicznych ($N = 3$). Powtórzenia techniczne obejmowały wielokrotne wykonanie tej samej reakcji z tej samej próbki RNA, co pozwalało ocenić precyzję pomiarów i zmienność wynikającą z procedury analitycznej oraz pracy aparatury. Natomiast powtórzenia biologiczne obejmowały trzy niezależne próbki RNA pochodzące od różnych kotów zakażonych FCV, co umożliwiało ocenę zmienności naturalnej, związanej z różnicami osobniczymi czy stanem klinicznym. Aby określić optymalne warunki dla RT-LAMP, zoptymalizowano następujące podstawowe parametry: temperatury amplifikacji (50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, i 70 °C) i czasy amplifikacji (10, 20, 30, 40, 50 i 60 min). Na podstawie przeprowadzonych reakcji określono optymalny czas amplifikacji w reakcji RT-LAMP (60 cykli po 30 sekund) oraz temperaturę amplifikacji (65°C). Wybrano również zestaw starterów do dalszych badań

(P24L1), charakteryzujący się krótszym czasem amplifikacji oraz wyższą czułością (Rys. 34).



Rysunek 34 Amplifikacja oraz krzywa topnienia dla starterów P24L1

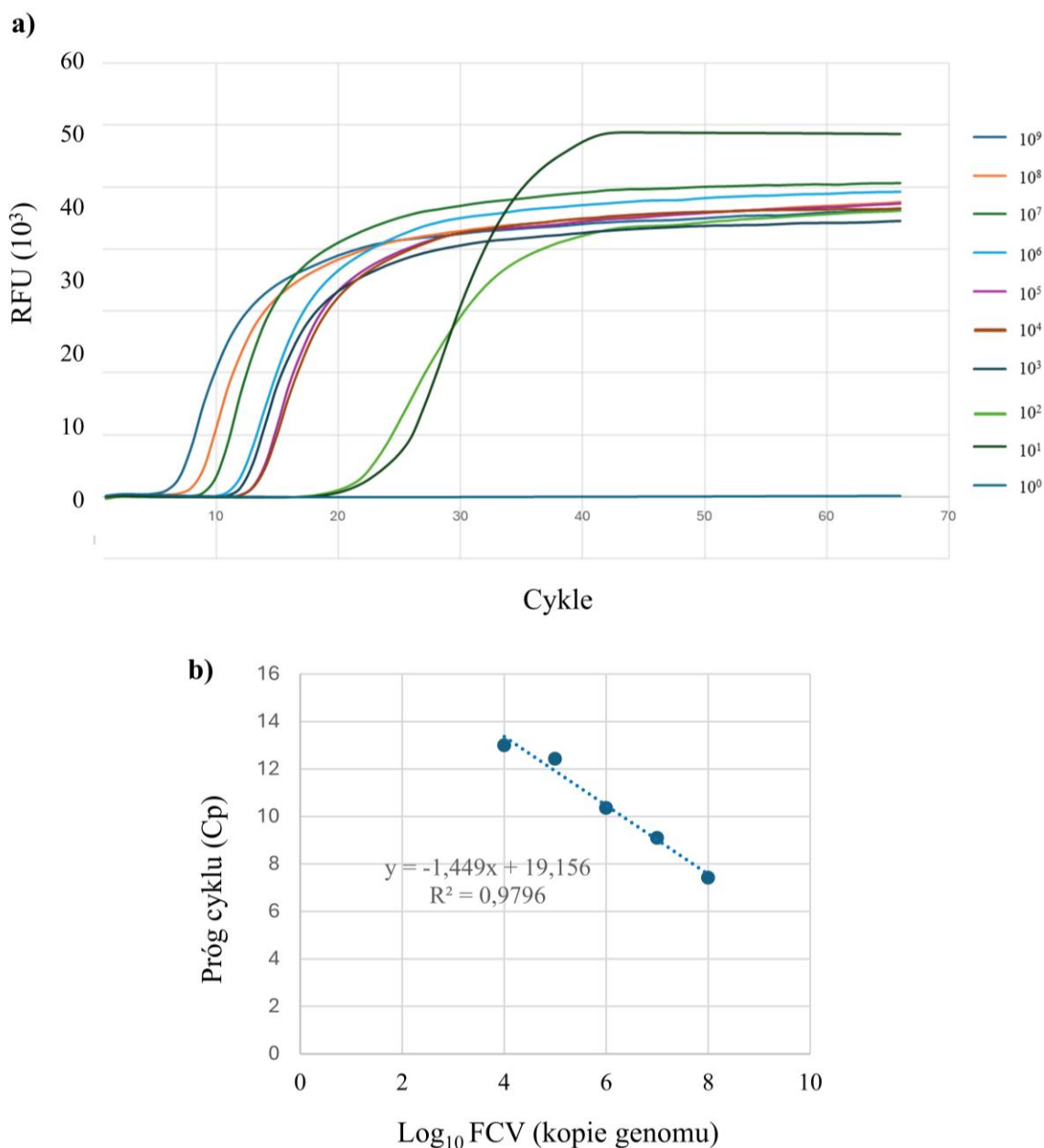
Miejsca przyłączania się wybranego zestawu starterów zostały przedstawione na rysunku poniżej (Rys. 35).



Rysunek 35 Fragment syntetycznego genu wirusa FCV oraz miejsca przyłączania starterów w reakcji RT-LAMP.

Po optymalizacji warunków reakcji określono limit detekcji LOD testu RT-LAMP w warunkach laboratoryjnych, aby stanowiła ona odniesienie do LOD urządzenia diagnostycznego. Czułość procedury RT-LAMP określono z wykorzystaniem 10-krotnych rozcieńczeń fragmentu RNA wirusa. Woda wolna od RNazy została użyta jako kontrola negatywna (NTC). Reakcję prowadzono zgodnie z parametrami opisanymi powyżej. Dla liczby kopii RNA wirusa $4,19 \times 10^9$ - $4,19 \times 10^3$ zaobserwowano szybki i stabilny wzrost fluorescencji, świadczący o poprawnej amplifikacji. Dla $4,19 \times 10^2$ - $4,19 \times 10^1$ sygnał pomimo, że był opóźniony wskazywał na obecność szukanego fragmentu RNA (Rys. 3 6a).

Na podstawie analizy krzywych amplifikacji oraz krzywej standardowej stwierdzono, że najniższe stężenie RNA wirusa FCV dające jednoznaczny sygnał amplifikacji w reakcji RT-LAMP w czasie rzeczywistym wynosiło $4,19 \times 10^1$ kopii RNA na reakcję, co zostało uznane za granicę wykrywalności (LOD) metody (Rys. 36 b). Wyniki pozytywne dla tego stężenia uzyskano dla 3 biologicznych powtórzeń. Wynik ten jest porównywalny z wynikami uzyskanymi przez inne grupy badawcze, gdzie limit detekcji dla wirusa FCV wyniósł $14,3 \times 10^1$ kopii/ μ L [220].



Rysunek 36 Czulość testu RT-LAMP w czasie rzeczywistym w wykrywaniu FCV: a) ocena czulości z wykorzystaniem reakcji RT-LAMP monitorowanej w czasie rzeczywistym metodą fluorescencyjną dla próbek zawierających od $7,1 \times 10^9$ do $7,1 \times 10^1$ kopii RNA/ μ L, b) wykres regresji wraz z dopasowaną linią trendu oraz odpowiadającym jej równaniem, sporządzony w celu oceny zależności pomiędzy ilością materiału genetycznego (liczbą kopii RNA) a cyklem progowym wymagany do uzyskania wykrywalnego sygnału w reakcji RT-LAMP.

Oprócz detekcji fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym („real-time”), w kolejnej części badań przeprowadzono także reakcję RT-LAMP z detekcją końcową „end-point”, opartą na zmianie koloru w próbce oraz odczycie poziomy fluorescencji, co pozwala na szybkie i łatwe wykrywanie obecności wirusowego RNA bez konieczności użycia zaawansowanego sprzętu. Probki przygotowano zgodnie z procedurą jak w przypadku detekcji „real-time” pomijając dodatek SYTO™ 9 i zastępując go wodą wolną od

nukleaz. Reakcję prowadzono zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabeli poniżej (Tab. 15) w termocyklerze T100 (BioRad).

Tabela 15 Etapy reakcji RT-LAMP.

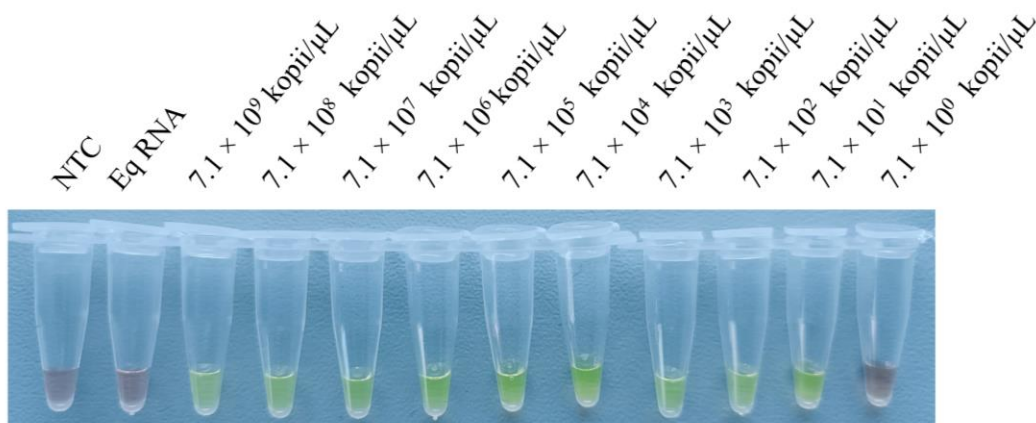
Etap	Temperatura	Czas
Amplifikacja	65°C	30 min
Inaktywacja	95°C	2 min

Po zakończeniu reakcji do próbek dodano 1 µL barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I (Thermo Fisher), który wiąże się z kwasami nukleinowymi i umożliwia identyfikację pozytywnych reakcji na podstawie różnicy barwy między próbką zawierającą analizowany fragment RNA, a próbką negatywną. Barwnik SYBR Green I nie był obecny w trakcie amplifikacji, co pozwalało uniknąć inhibicji reakcji RT-LAMP. W omawianej detekcji „end-point” zielony kolor oznaczał reakcję dodatnią (pozytywną), a pomarańczowy kolor oznaczał reakcję ujemną (negatywną). Po amplifikacji próbówki zostały sfotografowane w celu dokumentacji za pomocą aparatu w smartfonie (Rys. 37 a). Obecność amplikonów wirusa FCV po reakcji RT-LAMP została potwierdzona za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym 1,5% (w / v). Proszek agarozowy został przygotowany z buforem 50X TAE (2 M Tris-Acetate, 0,05 M EDTA), pH 8,3 (Thermo Fisher). Dziesięć mikrolitrów każdego amplikonu LAMP lub 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) zmieszanych z 1 µL barwnika ładującego 6X analizowano na żelu przy 80 V przez 45 min. Żel uwidoczniono za pomocą transiluminatora ChemiDoc (Bio Rad) (Rys. 37 b).

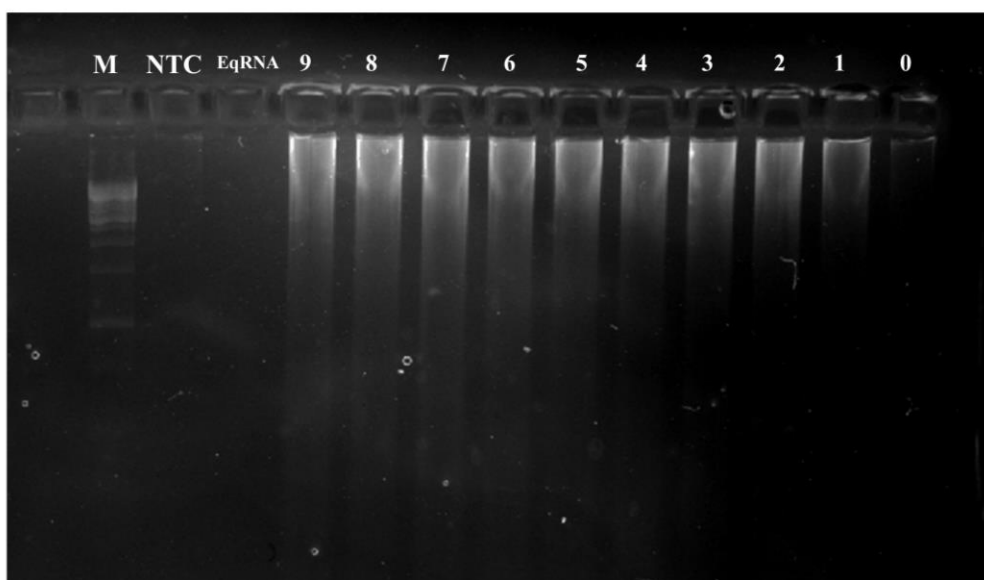
W przypadku oceny „end-point” jak i dla reakcji „real-time” limit detekcji dla reakcji RT-LAMP był jednakowy i wyniósł $4,19 \times 10^1$.

Specyficzność testu RT-LAMP oceniono poprzez porównanie RNA wyizolowanego z wymazu pobranego od kota z potwierdzonym dodatnim wynikiem qPCR w kierunku kaliciwirusa (FCV) z RNA uzyskanym z próbki końskiej, wykorzystanej jako kontrola negatywna. Monitorowanie fluorescencji w czasie rzeczywistym wykazało obecność pojedynczej krzywej amplifikacji odpowiadającej reakcji dodatniej dla FCV. Jednocześnie w próbce kontrolnej nie zaobserwowano żadnego wykrywalnego wzrostu sygnału fluorescencyjnego w całym czasie trwania reakcji (Rys. 38 a).

a)

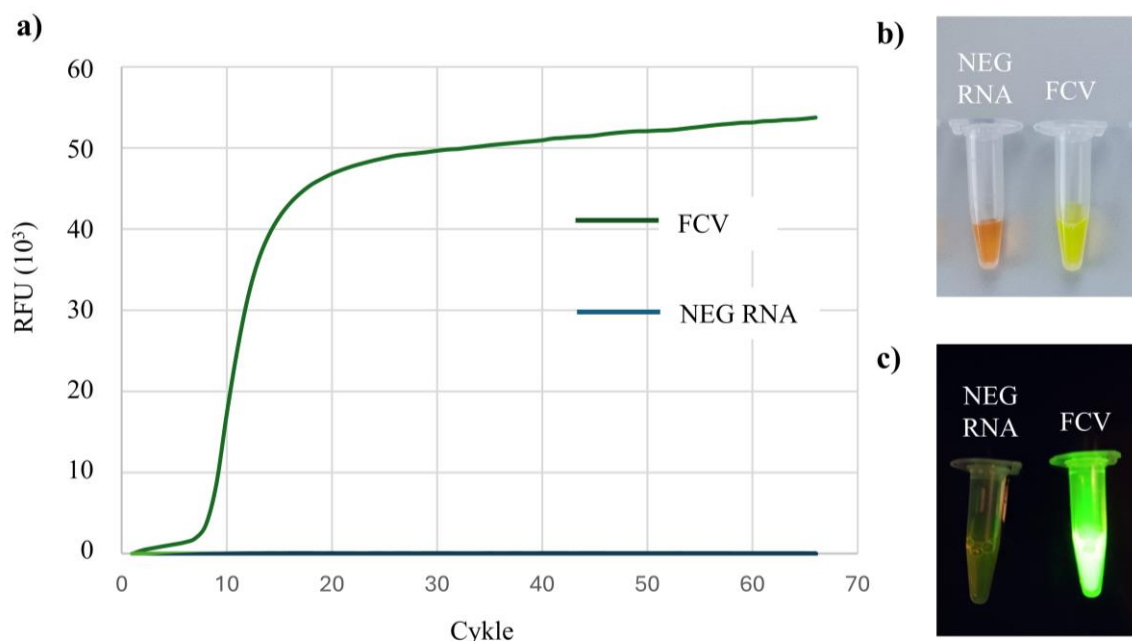


b)



Rysunek 37 Ocena czułości testu RT-LAMP w wykrywaniu FCV: a) wyniki wizualnej detekcji typu „end-point” reakcji RT-LAMP, w których reakcje dodatnie przyjmują barwę zieloną, natomiast reakcje ujemne pozostają pomarańczowe, b) Wyniki elektroforezy agarozowej przedstawiające produkty amplifikacji uzyskane w reakcji RT-LAMP. Tor M odpowiada markerowi masy DNA 100 bp (Invitrogen), NTC oznacza kontrolę bez matrycy, Eq RNA stanowi kontrolę negatywną, natomiast próbki oznaczone od 9 do 0 reprezentują kolejne zakresy stężeń syntetycznego genu FCV.

Zgodnie z tymi obserwacjami, w reakcjach RT-LAMP opartych na detekcji „end-point” z barwnikiem SYBR Green I wyraźna zmiana barwy na żółtą wystąpiła wyłącznie w próbce dodatniej zawierającej RNA wirusa FCV. RNA końskie nie wykazywało żadnej zmiany barwy, co wskazuje na brak amplifikacji (Rys. 38 b, c). Uzyskane wyniki potwierdzają, że test RT-LAMP swoiście rozpoznaje RNA FCV i nie generuje sygnałów fałszywie dodatnich w obecności niespokrewnionego RNA ssaków, co potwierdza jego przydatność do klinicznej diagnostyki zakażeń FCV.



Rysunek 38 Ocena specyficzności testu RT-LAMP: a) analiza z wykorzystaniem reakcji RT-LAMP monitorowanej w czasie rzeczywistym metodą fluorescencyjną, obejmująca jedną próbkę dodatnią oraz jedną próbkę ujemną zawierającą RNA pochodzące od innego gatunku, b) wyniki wizualnej detekcji typu „end-point” reakcji RT-LAMP z użyciem barwnika SYBR Green I, oceniane wizualnie, w których reakcje dodatnie przyjmują barwę zieloną, natomiast reakcje ujemne pozostają pomarańczowe w świetle naturalnym, c) obraz w świetle UV, podkreślający wyraźne różnice pomiędzy analizowanymi próbkami

Pomimo, iż ocena jakości reakcji „gołym okiem” na podstawie zmiany koloru jest szybka i niewymagająca dodatkowej aparatury, to jej istotnym ograniczeniem pozostaje subiektywność oceny oraz podatność na warunki oświetleniowe i różnice w intensywności sygnału. Z tego względu bardziej wiarygodnym rozwiązaniem jest wzbudzenie fluorescencji SYBRTM Green I i jej ilościowy pomiar. Intensywność fluorescencji jest bezpośrednio związana z ilością produktu amplifikacji, co umożliwia obiektywną, powtarzalną i bardziej czułą detekcję, a także jednoznaczną klasyfikację próbek na podstawie ustalonych progów decyzyjnych.

Znaczenie fluorescencyjnego sposobu detekcji jest szczególnie istotne w urządzeniach typu „point-of-care”, gdzie kluczowe są automatyzacja, niezależność od oceny użytkownika oraz możliwość cyfrowej rejestracji i analizy wyników. Ilościowy odczyt fluorescencji umożliwia integrację z kompaktowymi układami optycznymi i elektronicznymi, zwiększając czułość oraz niezawodność diagnostyczną systemu, zwłaszcza w przypadku próbek o niskiej zawartości materiału genetycznego. Z tych

względów w kolejnych etapach pracy skupiono się na opracowaniu systemu optoelektronicznego, który będzie spełniał wymienione założenia.

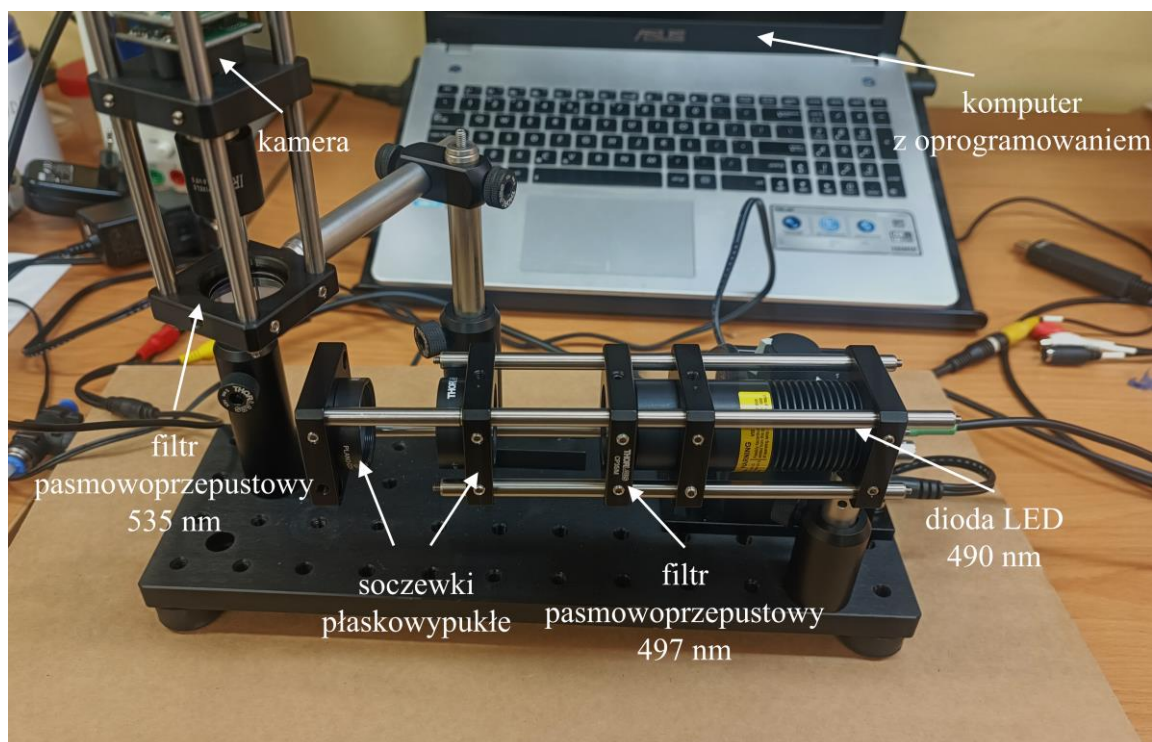
7.2 Konstrukcja własnego stanowiska pomiarowego

Kolejnym etapem badań było przygotowanie stanowiska pomiarowego, które stanowiło prototyp systemu detekcyjnego planowanego do implementacji w finalnym urządzeniu diagnostycznym. Zestawienie własnego układu pomiaru fluorescencji było kluczowe, ponieważ w trakcie reakcji RT-LAMP generowany jest sygnał fluorescencyjny, którego intensywność odzwierciedla przebieg procesu amplifikacji materiału genetycznego. Dokładny, powtarzalny i czuły pomiar tego sygnału jest niezbędny do prawidłowej oceny amplifikacji, a tym samym do rzetelnej interpretacji wyników diagnostycznych.

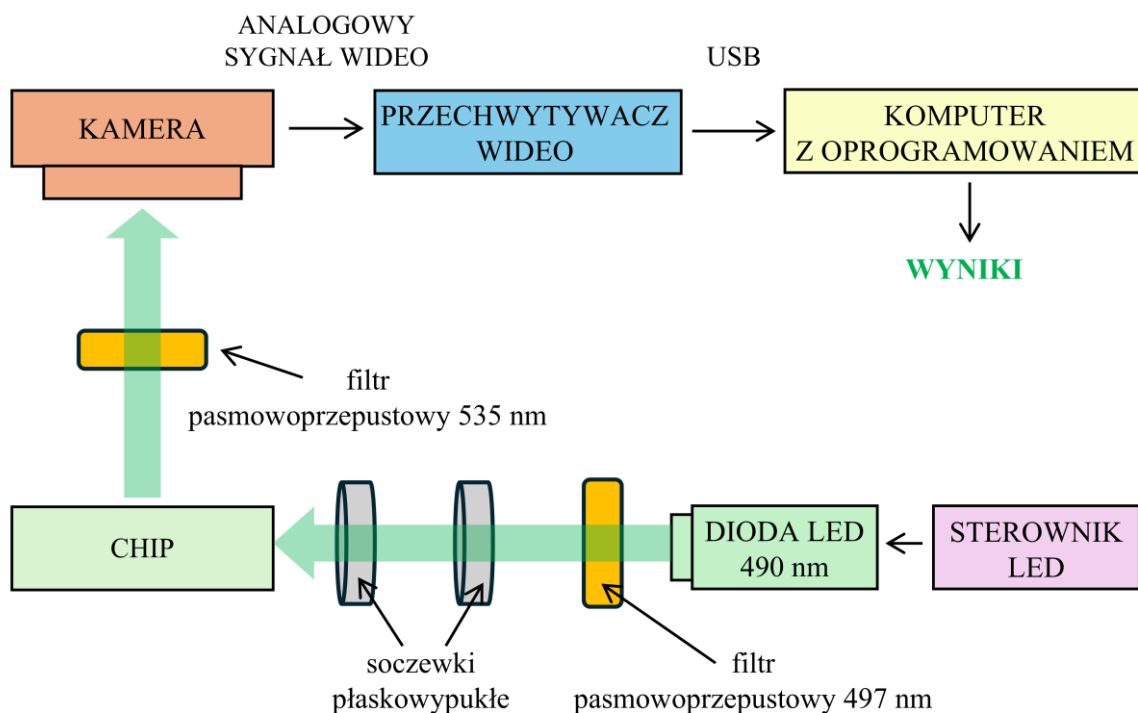
Zaprojektowany układ detekcyjny (Rys. 39, 40), bazujący na wcześniejszych pracach zespołu, oparto na fluorescencji indukowanej diodą LED. System składał się z diody elektroluminescencyjnej LED (Thorlabs, Inc.) o długości emitowanej fali 490 nm i mocy 350 mW, sprzężonej z układem soczewek płaskowypukłych, zapewniających jednorodne oświetlenie obszaru detekcyjnego. W torze optycznym zastosowano filtr pasmowo-przepustowy 497 nm (Thorlabs, Inc.) oraz soczewki o ogniskowej 60 mm i 40 mm (Thorlabs, Inc.). Detekcję realizowano za pomocą monochromatycznej kamery z przetwornikiem CCD. Światło wzbudzonej fluorescencji było filtrowane przez filtr pasmowo-przepustowy o nominalnej szerokości pasma 525 nm (Thorlabs, Inc.), który przepuszczał jedynie sygnał emisji fluoroforu przy jednoczesnym odcięciu światła wzbudzającego. Dobór długości fal wzbudzenia i emisji był zgodny z charakterystyką spektralną barwnika SYBR Green I oraz SYTO Green stosowanych do detekcji produktu amplifikacji. W celu stabilnego ułożenia chipa i zapewnienia powtarzalności pomiarów wykorzystano mechaniczne podesty drukowane w 3D oraz komercyjne elementy montażowe. Pozwoliło to na precyzyjne ustawienie chipa w torach układu optycznego, co jest szczególnie istotne w systemach fluorescencyjnych, gdzie niewielkie przesunięcia mogą prowadzić do znaczącej zmienności sygnału [221].

W obrębie każdego obszaru zainteresowania (ROI) wyznaczano trzy niezależne podobszary pomiarowe w celu oceny jednorodności sygnału fluorescencji oraz oszacowania niepewności pomiarowej. Wielokrotne próbkowanie intensywności sygnału w ramach tego samego ROI umożliwiało uwzględnienie lokalnych fluktuacji sygnału

wynikających z niejednorodności próbki oraz szumu detekcyjnego. Na tej podstawie obliczano wartość średnią intensywności fluorescencji oraz odpowiadające jej odchylenie standardowe, które przedstawiono na wykresach w postaci słupków błędów. Takie podejście jest szczególnie istotne w kontekście dalszych prac nad implementacją układu w przenośnym urządzeniu diagnostycznym, co zostanie omówione w kolejnych rozdziałach.



Rysunek 39 Widok stanowiska do wzbudzania i pomiaru fluorescencji w chipie.



Rysunek 40 Schemat stanowiska opto-elektronicznego do pomiaru fluorescencji.

7.3 Drukowane chipy i detekcja optyczna

Po zestawieniu stanowiska pomiarowego, rozpoczęto prace nad konstrukcją platformy mikrofluidycznej. Chipy do reakcji RT-LAMP zostały zaprojektowane w programie Solidworks przy współpracy z dr inż. W. Kubickim i wytworzone przy użyciu drukarki 3D DLP ASIGA Max 35UV (Asiga, Australia), takiej samej jak w wypadku badań nad plastrami mikroigłowymi. Urządzenie to jest szeroko stosowane w zastosowaniach biomedycznych, mikroinżynierii i wytwarzaniu elementów o wysokiej precyzji geometrycznej, ponieważ umożliwia uzyskanie rozdzielczości rzędu kilkudziesięciu mikrometrów, co jest kluczowe dla konstrukcji mikroprzepływowych układów diagnostycznych. Materiałem wybranym do druku, podobnie jak w przypadku mikroigłowych matryc, była światłoutwardzalna żywica GR-10 (Pro3dure, Niemcy). Jest to żywica wytwarzana na bazie metakrylanu, którą powszechnie wykorzystuje się w technologiach medycznych ze względu na jej zgodność z normami cytotoksyczności, wysoką stabilność wymiarową oraz niski poziom nieutwardzonych resztkowych monomerów. GR-10 charakteryzuje się również dobrą przezroczystością w zakresie

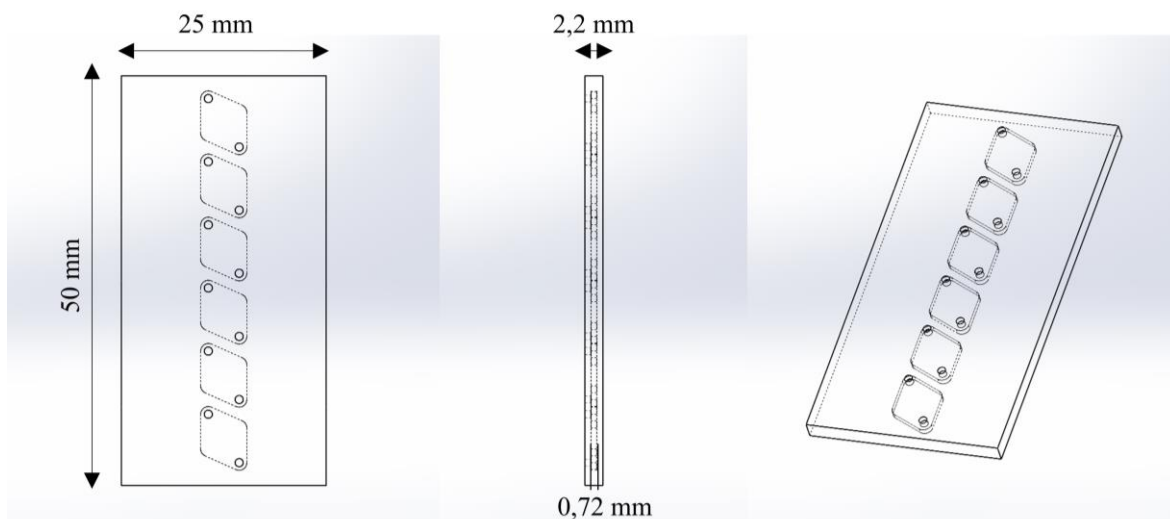
widzialnym oraz relatywnie niską absorpcją światła, co czyni ją materiałem odpowiednim do aplikacji wymagających precyzyjnej detekcji optycznej. Wysoka twardość powierzchni oraz odporność chemiczna tej żywicy sprzyjają natomiast wykorzystaniu jej w konstrukcji mikroprzepływowych urządzeń diagnostycznych, zapewniając trwałość elementów kontaktujących się z mieszaninami reakcyjnymi i minimalizując ryzyko adhezji zanieczyszczeń lub deformacji geometrii mikrokanалу [222-223].

W ramach prac, zaprojektowano i przetestowano trzy różne wersje chipów, których funkcjonalność zmieniała się wraz z postępem badań. Podsumowując, wytworzono trzy rodzaje chipów:

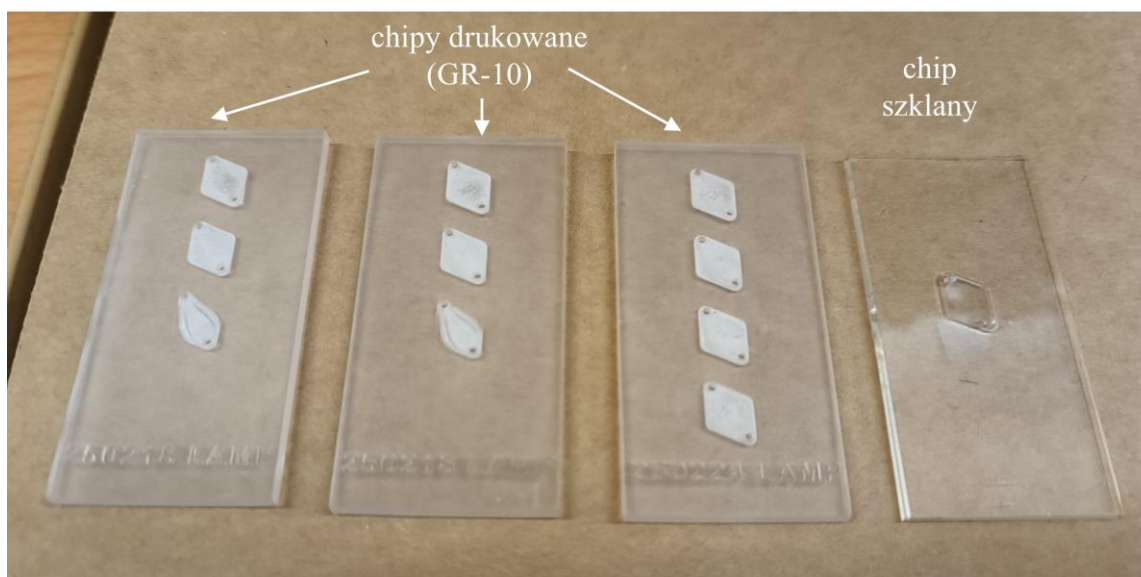
1. Chipy będące odwzorowaniem geometrii chipa szklanego (istniejącego w zespole oraz scharakteryzowanego we wcześniejszych pracach [224]), w którym prowadzono pomiary referencyjne. Wersja ta miała na celu bezpośrednie porównanie zdolności wydrukowanych chipów do transmisji światła LED wzbudzającego fluorescencję do wnętrza komory reakcyjnej oraz efektywnego przekazywania emitowanego sygnału fluorescencyjnego do układu detekcyjnego (kamery).
2. Chipy z podłużnymi komorami o różnych wymiarach. Wersja ta miała na celu zbadanie nowych funkcjonalności przewidzianych w ostatecznej wersji chipa. Szczególnie skupiono się na zaprojektowaniu podłużnych komór reakcyjnych oraz sprawdzeniu, jak taki układ zadziała w skonstruowanym układzie optycznym. Wersja ta miała również dostarczyć informacji, jak na pomiar fluorescencji będą wpływać różne odległości pomiędzy komorami.
3. Chipy z powiększonymi otworami przewidzianymi do odczytu fluorescencji, a także odseparowanymi miejscami wprowadzenia próbek. Ta wersja miała na celu dostosowanie wymiarów i otworów chipa do układu detekcyjnego, a także ułatwienie wprowadzania próbek oraz eliminację potencjalnego przeniesienia próbki pomiędzy komorami (kontaminacji).

Chipy we wszystkich wersjach drukowano w rozdzielczości 50 μm , następnie zdejmowano je z platformy, oczyszczano oraz płukano w izopropanolu i wodzie dejonizowanej. Następnie utwardzano za pomocą UV przez 10 min.

Wymiary chipa w wersji pierwszej były następujące: długość wynosiła 50 mm, szerokość 25 mm, a grubość 2,2 mm (Rys. 41, 42).



Rysunek 41 Schemat chipa w wersji pierwszej, będącego odwzorowaniem chipa szklanego.



Rysunek 42 Chipy drukowane metodą DLP z użyciem żywicy GR-10 oraz chip szklany.

Głównym celem badań z wykorzystaniem chipa szklanego i drukowanego, było porównanie zdolności obu materiałów do przenoszenia i odczytu sygnału fluorescencyjnego w kontekście przyszłego zastosowania w urządzeniu diagnostycznym opartym na reakcji RT-LAMP. W warunkach układu mikrofluidycznego, szkło, ze względu na wysoką przepuszczalność światła w zakresie widzialnym, niską autofluorescencję oraz stabilność chemiczną, stanowiło punkt odniesienia dla materiału

GR-10, który nie jest materiałem wykorzystywanym szeroko w diagnostyce optycznej. W odróżnieniu od szkła, polimer GR-10 charakteryzuje się innymi właściwościami optycznymi, między innymi niższą przepuszczalnością światła, możliwą absorpcją lub rozpraszaniem światła wzbudzającego fluorofor, czy też potencjalnie wyższą autofluorescencją [225]. Natomiast wykorzystanie druku 3D i polimeru GR-10 pozwala na szybkie i precyzyjne wytworzenie chipów oraz umożliwia łatwą zmianę ich funkcjonalności [226].

Równoczesne testowanie chipa szklanego i drukowanego pozwoliło ocenić, w jakim stopniu materiał GR-10 wpływa na:

- poziom sygnału tła (ang. baseline fluorescence) - istotny szczególnie w próbkach negatywnych,
- stosunek sygnału do szumu (ang. signal-to-noise ratio, SNR) - fundamentalny parametr oceny jakości sygnału fluorescencyjnego i LOD,
- stabilność sygnału przy zmianach natężenia światła wzbudzającego,
- efektywność wychwytywania sygnału fluorescencji po zakończonej reakcji RT-LAMP,
- różnice między sygnałem próbek pozytywnych i negatywnych.

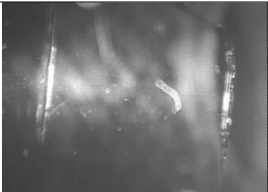
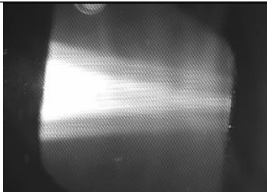
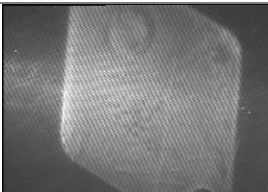
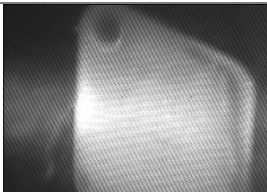
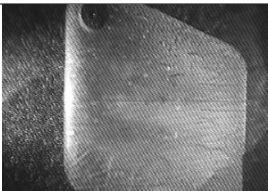
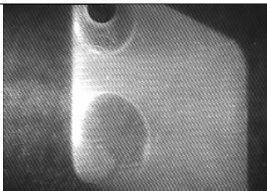
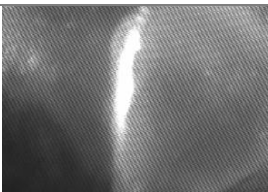
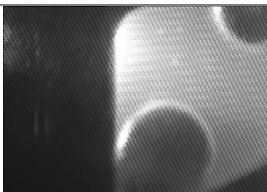
Pomiar fluorescencji wykonywano po zakończeniu reakcji RT-LAMP prowadzonej poza układem optycznym, analizując różnice w intensywności sygnału pomiędzy próbkami pozytywnymi i negatywnymi. Jako fluorofor zastosowano barwnik SYBR Green I, dodawany po zakończeniu amplifikacji w wariancie detekcji typu „end-point”, jak to zostało opisane w części związanej z optymalizacją reakcji RT-LAMP w środowisku laboratoryjnym. Do chipów (wykonanych z GR-10 oraz szklanych) wprowadzono mieszaninę reakcyjną, następnie umieszczono je na stanowisku pomiarowym, wzbudzano fluorescencję i wykonano zdjęcia służące do analizy jej poziomu. Wykonane zdjęcia jednoznacznie wskazały na znaczące różnice pomiędzy materiałami, wynikające z ich właściwości optycznych. W chipie szklanym, który jak wspomniano pełnił funkcję próby referencyjnej, próbki wykazały najwyższą intensywność i jednorodność sygnału fluorescencji. Odczyt charakteryzował się wysokim kontrastem pomiędzy sygnałem a tłem. Wynik taki jest zgodny z oczekiwaniami, uwzględniającymi właściwości optyczne szkła, jego wysoką przezroczystość, niską autofluorescencję i gładką powierzchnię, co minimalizuje rozpraszanie i absorpcję światła. Dzięki tym cechom chip

szklany stanowi naturalny punkt odniesienia w diagnostyce opartej na wzbudzeniu i odczycie fluorescencji. W przypadku chipa wykonanego z fotopolimeru GR-10 odnotowano wyraźnie słabszy sygnał fluorescencji. Na obrazach pojawiło się większe rozpraszanie światła, obniżony kontrast oraz ślady niejednorodności powierzchni. Prawdopodobnymi przyczynami są:

- niższa przepuszczalność światła przez GR-10 w zakresie fal wzbudzających SYBR Green (490 nm),
- możliwa autofluorescencja fotopolimeru,
- większa chropowatość powierzchni kanałów i komór reakcyjnych, co sprzyja dyfuzji i rozpraszaniu światła.

Tego typu ograniczenia są typowe dla materiałów drukowanych addytywnie, co potwierdzają publikacje dotyczące optyki mikrouządzeń drukowanych 3D [180]. W celu poprawy właściwości optycznych chipa GR-10 zastosowano modyfikacje po wydruku - „post-processingowe”, polegające na naniesieniu i utwardzeniu dodatkowej warstwy żywicy GR-10 na boczną stronę chipa, w miejscu, w którym przechodziła wiązka światła wzbudzającego. Zabieg ten miał na celu redukcję chropowatości powierzchni oraz ograniczenie niekontrolowanego rozpraszania światła wzbudzającego, co przekłada się na poprawę jednorodności toru optycznego i zwiększenie stosunku sygnału do tła podczas detekcji fluorescencji. Na tej podstawie wyróżniono trzy warianty konstrukcyjne: GR-10 (1) - chip referencyjny, bez modyfikacji, detekcja od górnej strony chipa; GR-10 (2) - chip z dodatkową warstwą żywicy GR-10 naniesioną na boczne ściany; GR-10 (3) - chip z dodatkową warstwą żywicy GR-10 naniesioną na boczne ściany, z pomiarem fluorescencji prowadzonym od spodniej strony chipa (Tab. 16).

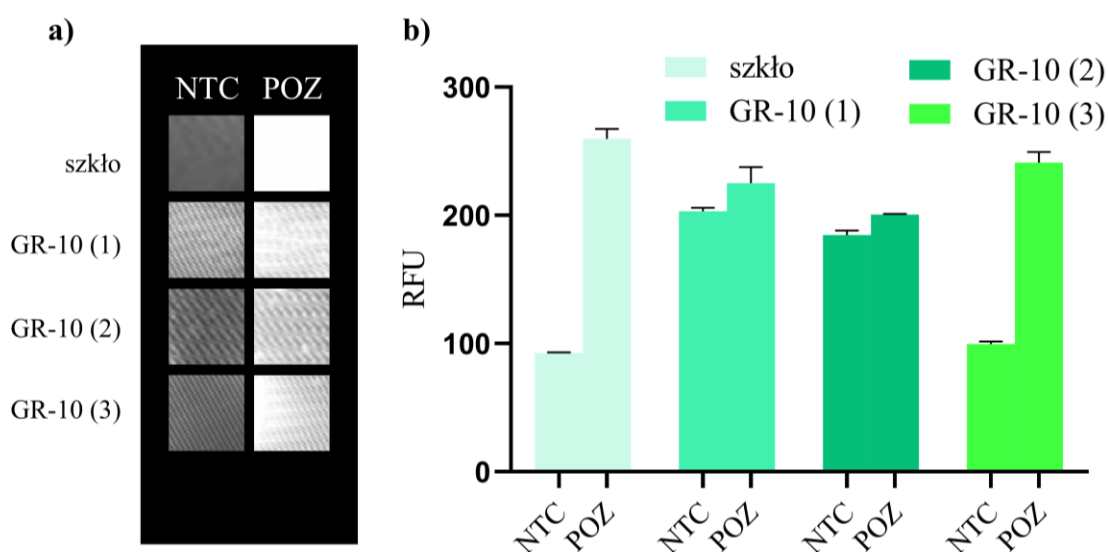
Tabela 16 Zdjęcia próbek po reakcji RT-LAMP w komorach chipa szklanego oraz wydrukowanego z GR-10, wykorzystane do obliczenia ROI.

	DI (woda destylowana)	Próbka pozytywna (SYBR Green)
SZKŁO		
GR-10 (1)		
GR-10 (2)		
GR-10 (3)		

Analizę ilościową sygnału fluorescencyjnego ze zdjęć wykonanych kamerą przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Obrazy rejestrowano w stałych i powtarzalnych warunkach, obejmujących niezmienną odległość kamery od próbek, identyczne parametry ekspozycji oraz balans bieli, co pozwalało na minimalizację różnic sygnału niezwiązanych z sygnałem fluorescencyjnym. Dla każdej próbki definiowano region zainteresowania (ROI). Ze względu na jednorodny charakter sygnału fluorescencyjnego, średnia wartość intensywności pikseli w obrębie ROI (ang. mean gray value) była bezpośrednio traktowana jako miara sygnału fluorescencyjnego i wyrażana w jednostkach względnej fluorescencji (RFU). Wszystkie ROI oraz podobszary detekcji miały identyczne wymiary i kształt oraz były umieszczane w porównywalnych pozycjach na obrazie, co zapewniało porównywalność wyników pomiędzy analizowanymi próbkami. W celu korekcji sygnału bazowego dla każdego obrazu wyznaczano dodatkowy ROI tła, zlokalizowany w obszarze pozbawionym

fluorescencji. Z każdego obszaru pomiar wykonywano w trzech powtórzeniach wyliczając średnią wartość RFU $\pm$ odchylenie standardowe. Ostateczną wartość RFU dla danej próbki obliczano poprzez odjęcie średniej intensywności tła od średniej intensywności ROI próbki. Analizę ROI oraz zarządzanie obszarami pomiarowymi prowadzono przy użyciu narzędzia ROI Manager w ImageJ.

Uzyskane dane wykorzystano do porównania intensywności sygnału fluorescencyjnego pomiędzy kontrolą negatywną (NTC) i próbką dodatnią (POZ), a także pomiędzy różnymi typami materiału chipa (Rys. 43).



Rysunek 43 Analiza poziomu fluorescencji w chipie drukowanym oraz szklanym: a) fragmenty ROI dla próbek negatywnych (NTC) oraz pozytywnych (POZ) w chipach szklanych oraz drukowanych, b) poziomy RFU obliczone w ROI.

Najlepszy wynik wśród wszystkich konfiguracji drukowanych uzyskano dla wariantu GR-10 (3). Obraz fluorescencji w tej konfiguracji cechował się najwyższą klarownością spośród chipów drukowanych i największym kontrastem między sygnałem próbek pozytywnych i negatywnych. Wynik ten sugeruje, że jedna ze stron wydrukowanego chipa (znajdująca się podczas wydruku od strony platformy roboczej na gładkiej folii nośnej) posiada mniej chropowatą powierzchnię i jej ustawienie w kierunku kamery redukuje zjawisko rozpraszania. Z dużym prawdopodobieństwem odpowiada za to orientacja warstw druku oraz struktura powierzchni powstająca w trakcie polimeryzacji materiału GR-10 w kontakcie z folią nośną, jako że każda z warstw oddzielających komory reakcyjne była tej samej grubości i wynosiła 500 μm . Konfiguracja ta wymaga

jednak dodatkowych czynności, takich jak zabezpieczanie otworów i precyzyjne obracanie chipa, co stanowi istotne ograniczenie przy projektowaniu przyszłego urządzenia diagnostycznego.

Podsumowując, wyniki jednoznacznie wskazują, że możliwa jest detekcja fluorescencji w drukowanym chipie, ale materiał chipa oraz jego orientacja względem źródła światła i detektora mają kluczowy wpływ na intensywność i jakość sygnału fluorescencyjnego. Szkło pozostaje materiałem optymalnym, natomiast fotopolimer GR-10 może być wykorzystywany w chipach diagnostycznych pod warunkiem kontroli objętości próbki, doboru właściwego ułożenia chipa oraz eliminacji efektów wynikających z chropowatości drukowanych powierzchni i autofluorescencji materiału. Ocena tych parametrów była niezbędna, ponieważ w diagnostyce izotermicznej zwłaszcza gdy stosuje się barwniki interkalujące, nawet niewielkie zwiększenie autofluorescencji materiału może prowadzić do fałszywych wyników pozytywnych [227].

Uzyskane dane stanowią więc kluczowy etap oceny technologicznej, pozwalając na wybór materiału do miniaturyzacji reakcji RT-LAMP w przyszłych generacjach urządzenia diagnostycznego.

Chip w wersji drugiej został zaprojektowany tak, aby nawiązywał do finalnej formy planowanego urządzenia diagnostycznego. W odróżnieniu od wcześniejszych prototypów testowych, których głównym celem była ocena właściwości optycznych materiału GR-10 oraz samej możliwości odczytu fluorescencji, niniejszy chip został zaprojektowany jako funkcjonalna struktura, posiadająca cechy pozwalające na realizację rzeczywistej reakcji RT-LAMP „on chip”.

Chip ten powinien spełniać następujące kryteria funkcjonalne:

1. Możliwość analizy wielu próbek - przewidziano kilka komór reakcyjnych, co umożliwia prowadzenie reakcji dla próbek pozytywnych (P), negatywnych (N), kontroli matrycy oraz powtórzeń biologicznych.
2. System dwóch otworów w komorze - tak jak we wcześniejszym projekcie, tutaj również uwzględniono otwór do wprowadzania mieszaniny reakcyjnej oraz otwór odpowietrzający, ułatwiający równomierne i szybkie wypełnienie kanału. Takie rozwiązanie zminimalizowało ryzyko powstania pęcherzyków gazu, które

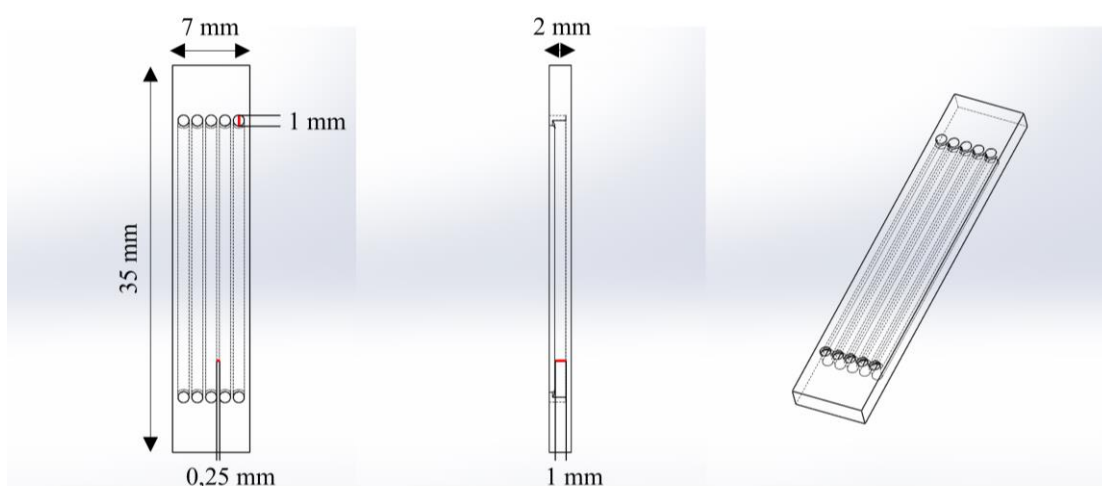
w mikrofluidyce stanowią istotny problem wpływający na jednorodność reakcji i odczyt fluorescencji.

3. Modułowość i kompatybilność z urządzeniem diagnostycznym - chip zaprojektowano tak, aby możliwe było jego stabilne umieszczenie w gnieździe urządzenia, z zachowaniem stałej pozycji względem źródła światła i detektora, co było kluczowe dla powtarzalności pomiarów.

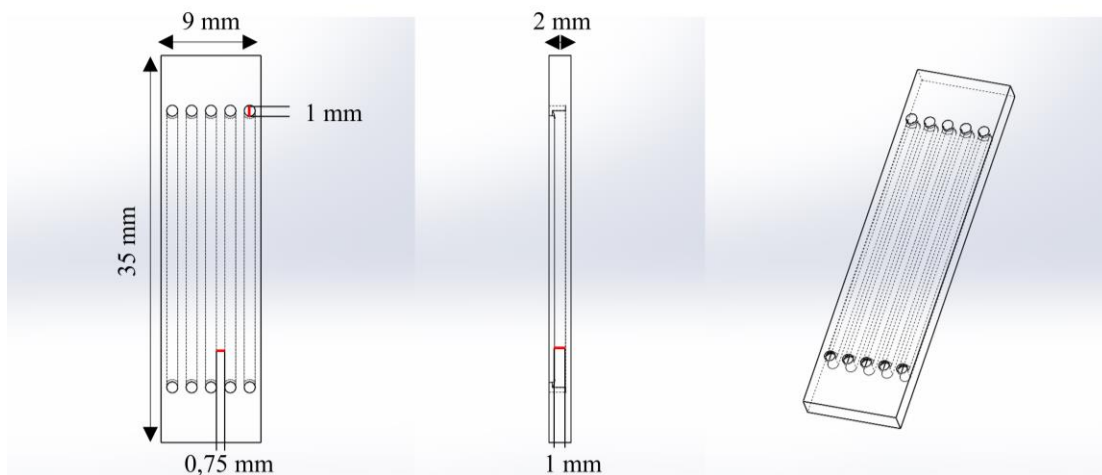
4. Możliwość odczytu „end-point” oraz planowanej wersji odczytu „real-time”.

Różne wersje zaprojektowanego chipa charakteryzowały się różną wielkością komór oraz odległością między nimi, co pozwalało na ocenę możliwie maksymalnej miniaturyzacji chipa przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowego odczytu fluorescencji. Tak powstały cztery typy chipa w wersji drugiej o wymiarach:

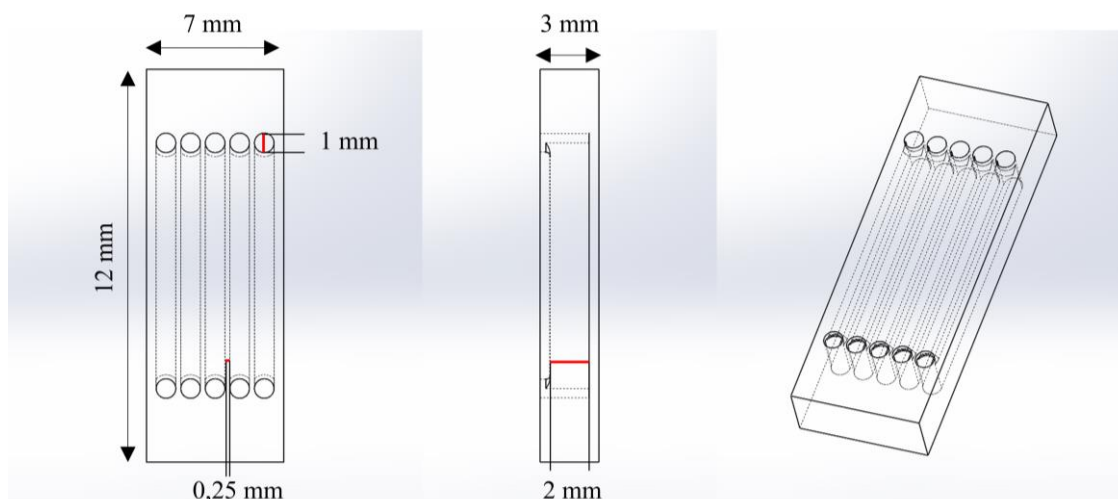
- I. Długość 35 mm, szerokość 7 mm, grubość 2 mm, **odległość między komorami: 0,25 mm** (Rys. 44, Rys. 48a).
- II. Długość 35 mm, szerokość 9 mm, grubość 2 mm, **odległość między komorami: 0,75 mm** (Rys. 45, 48b).
- III. Długość 12 mm, szerokość 7 mm, grubość 2 mm, **odległość między komorami: 0,25 mm** (Rys. 46, 48c).
- IV. Długość 12 mm, szerokość 9 mm, grubość 2 mm, **odległość między komorami: 0,75 mm** (Rys. 47, 48d).



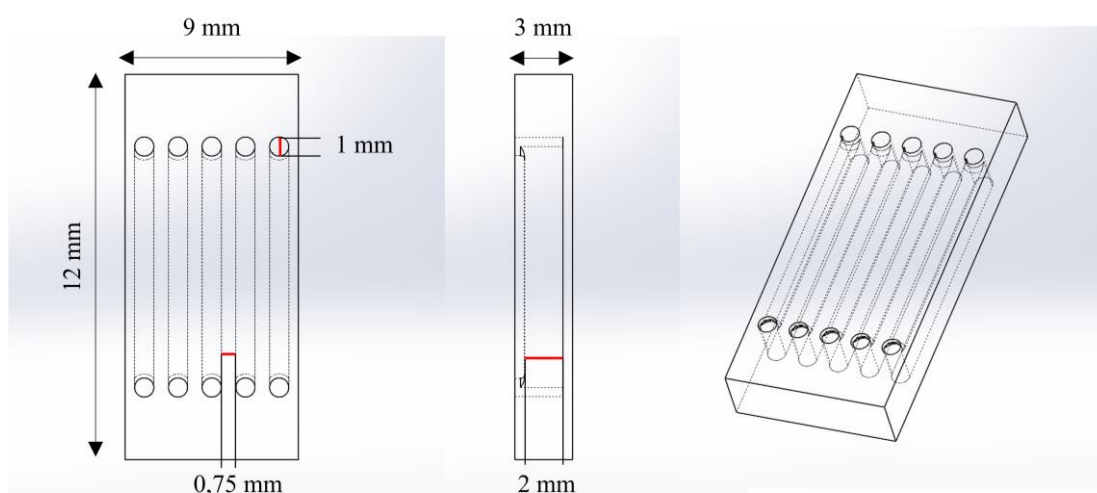
Rysunek 44 Schemat oraz wymiary chipa w wersji drugiej typ I.



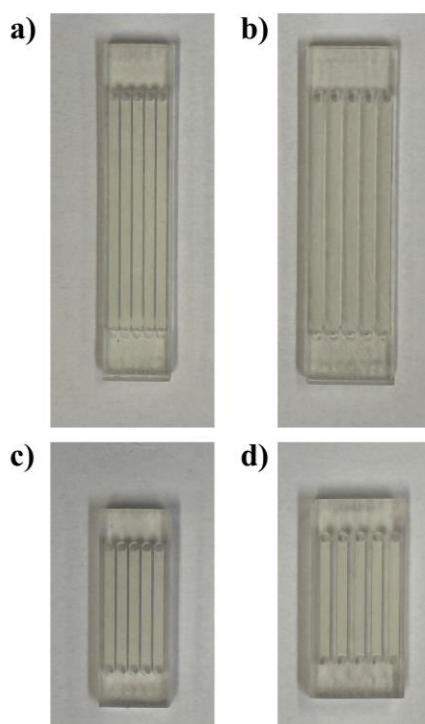
Rysunek 45 Schemat oraz wymiary chipa w wersji drugiej typ II.



Rysunek 46 Schemat oraz wymiary chipa w wersji drugiej typ III.



Rysunek 47 Schemat oraz wymiary chipa w wersji drugiej typ IV.



**Rysunek 48 Zdjęcia wydrukowanych chipów w wersji drugiej:
a) typ I, b) typ II, c) typ III, d) typ IV.**

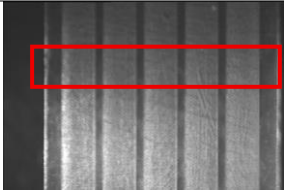
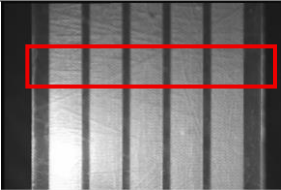
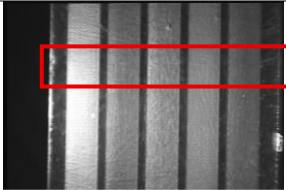
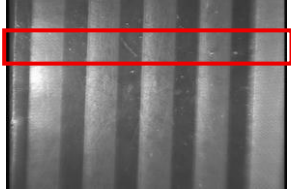
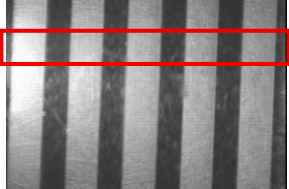
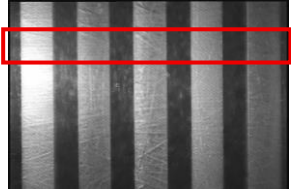
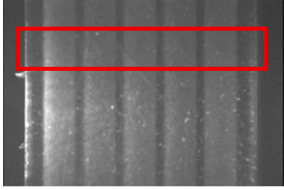
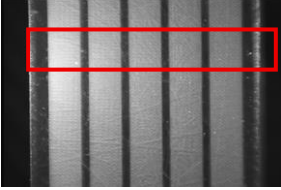
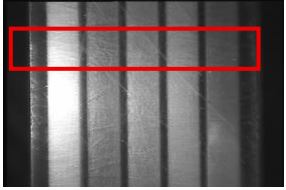
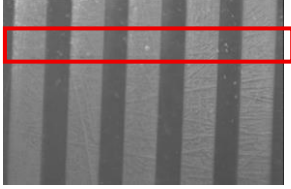
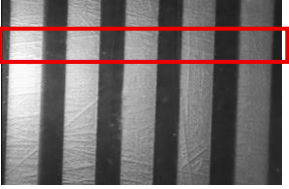
Geometria i rozmieszczenie komór umożliwiały jednoczesny odczyt fluorescencji wszystkich próbek po zakończeniu reakcji jak i potencjalne monitorowanie sygnału w czasie rzeczywistym po przyszej przebudowie platformy diagnostycznej.

W pierwszej kolejności, analogicznie do badań przeprowadzonych dla wersji pierwszej chipa, oceniono zdolność układu detekcyjnego do odczytu sygnału fluorescencyjnego próbek po reakcji RT-LAMP prowadzonej poza chipem. Celem eksperymentu było określenie, czy fluorescencja generowana w poszczególnych komorach chipa może być skutecznie wzbudzana i rejestrowana w zależności od ich położenia względem źródła światła wzbudzającego. Komory chipa wypełniano kolejno objętością 25 μ L próbek po zakończonej reakcji RT-LAMP. Pomiary wykonywano dla trzech wariantów konfiguracji:

- wszystkie komory wypełnione próbką negatywną,
- wszystkie komory wypełnione próbką pozytywną
- układ naprzemienny, w którym kolejne komory zawierały próbkę pozytywną, negatywną, komora środkowa pozostawała pusta, następnie ponownie próbkę pozytywną oraz próbkę negatywną.

Taki układ umożliwiał jednoczesną ocenę selektywności detekcji oraz wpływu położenia komory na intensywność rejestrowanego sygnału fluorescencyjnego. Zdjęcia chipów (Tab. 17) zostały zarejestrowane i użyte do obliczenia RFU jak opisano wcześniej.

Tabela 17 Zdjęcia chipów w trakcie detekcji optycznej. Czerwone ramki wyznaczają miejsce odczytu ROI.

Typ Chipa	Próbki N	Próbki P	Próbki PNxPN
I			
II			
III			
IV			

Fluorescencja była wzbudzana poprzecznie do osi chipa, przy użyciu pojedynczego źródła światła LED umieszczonego po jednej stronie układu (na zdjęciach od strony lewej). W związku z tym każda kolejna komora znajdowała się w coraz większej odległości od źródła wzbudzenia. Światło wzbudzające, przemieszczające się przez strukturę chipa, ulegało stopniowemu osłabieniu na skutek absorpcji i rozpraszania w kolejnych warstwach chipa oraz na granicach faz (materiał chipa-próbka). W rezultacie natężenie światła docierającego do dalszych komór było mniejsze, co prowadziło do obniżenia efektywności wzbudzenia fluoroforu zawartego w próbce. Zjawisko to skutkowało obserwowanym stopniowym spadkiem intensywności sygnału fluorescencyjnego rejestrowanego w komorach położonych coraz dalej od źródła LED, mimo identycznego składu i objętości próbek (Rys. 49). Zastosowanie konfiguracji z naprzemiennym rozmieszczeniem próbek pozytywnych i negatywnych pozwoliło jednoznacznie wykazać, że obserwowane różnice intensywności sygnału nie wynikają z niespecyficznej amplifikacji ani z rozpraszania się fluorescencji pomiędzy komorami, lecz są bezpośrednio związane z geometrią układu optycznego oraz kierunkiem wzbudzenia fluorescencji.

Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność układu do detekcji sygnału fluorescencyjnego w całym zakresie chipa, jednak wykazały istotną niejednorodność intensywności sygnału wynikającą z efektów tłumienia i rozproszenia optycznego.

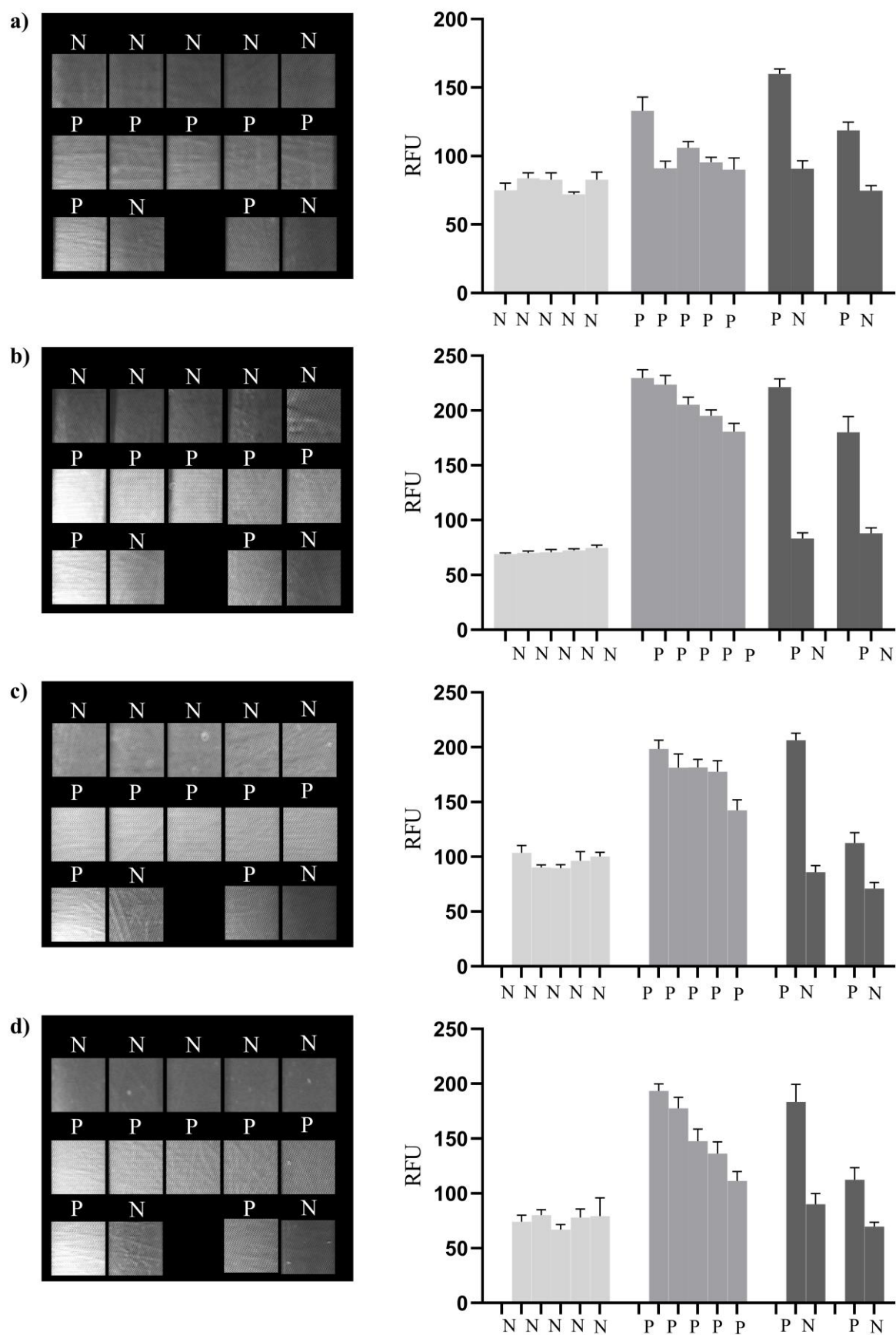
Różnice w intensywności fluorescencji pomiędzy próbkami pozytywnymi i negatywnymi były zauważalne, jednak jakość sygnału wymagała dalszego udoskonalenia, dlatego też w kolejnym projekcie uwzględniono powiększone otwory odpowietrzające, które mogą jednocześnie stanowić miejsce odczytu fluorescencji, aby pominąć wysokie tło generowane przez materiał GR-10.

Przeprowadzone testy pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Ułożenie komór chipa prostopadłe do wiązki światła powoduje stopniowy spadek intensywności fluorescencji wraz ze wzrostem odległości komory od źródła wzbudzenia, mimo identycznego składu i objętości próbek.
2. Jednopunktowe wzbudzenie fluorescencji wzdłuż osi chipa prowadzi do niejednorodnego rozkładu sygnału, co wymaga dalszej optymalizacji geometrii chipa, sposobu wzbudzenia lub zastosowania algorytmów normalizacji sygnału.

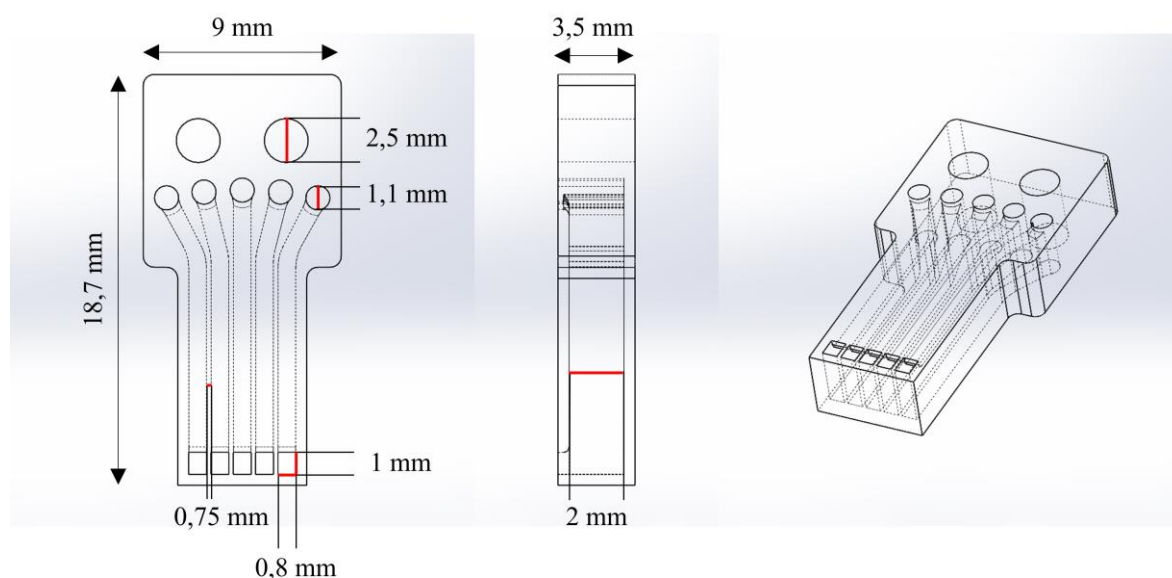
3. Układ naprzemienny próbek pozytywnych i negatywnych potwierdził brak przenikania fluorescencji pomiędzy komorami oraz wysoką selektywność detekcji.

Wyniki te wskazały na konieczność modyfikacji konstrukcji chipa, w której postanowiono powiększyć otwory odpowietrzające, tak aby pełniły one jednocześnie funkcję okien detekcyjnych.



Rysunek 49 Analiza obrazów ROI oraz RFU dla próbek w chipach: a) typu I, b) typu II) c) typu III), d) typu IV (N – próbka negatywna, P - próbka pozytywna).

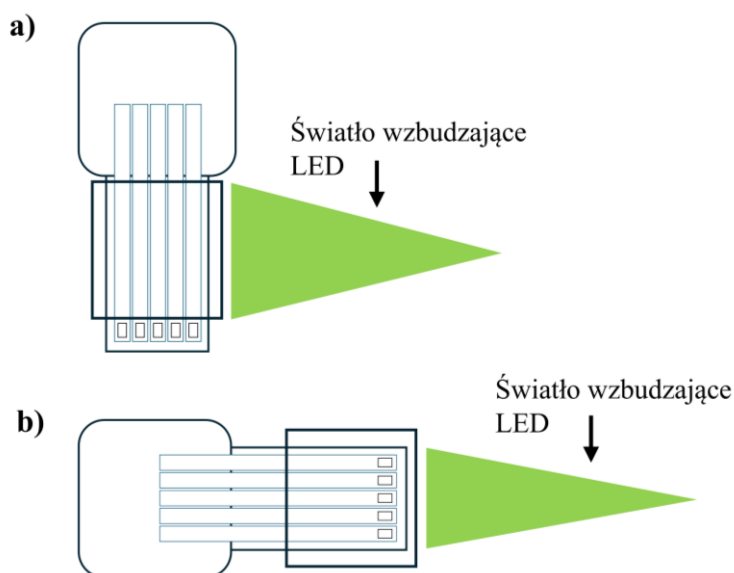
W projekcie trzeciej wersji chipa skupiono się na integracji funkcjonalności optycznych, poprawie ergonomii użytkowania oraz zwiększeniu powtarzalności odczytu fluorescencji (Rys. 50). Chip posiadał wymiary 18,7 mm x 9 mm x 3,5 mm i zawierał pięć mikroreaktorów (po 25 μ L każdy), umożliwiające jednoczesną amplifikację pięciu próbek, na przykład jedną kontrolę negatywną i jedną pozytywną oraz dwie badane próbki DNA/RNA. Każdy mikroreaktor zawierał wlot i wylot do wprowadzania próbki i wyrównywania ciśnienia. Średnica portu wlotowego wynosiła 1,1 mm, co ściśle odpowiadało wymiarom końcówki do pipety o objętości 100 μ L, a port wylotowy (okno detekcyjne) miał wymiary 1 mm x 0,8 mm. Czas wytworzenia pojedynczego układu wydrukowanego w 3D wyniósł około 1 godziny, wliczając obróbkę końcową po wydruku.



Rysunek 50 Schemat oraz wymiary chipa w wersji trzeciej.

Jedną z ważniejszych zmian wprowadzonych w chipie było polepszenie odczytu fluorescencji poprzez wprowadzenie powiększonych otworów odpowietrzających jako nowego miejsca odczytu fluorescencji. W chipie wprowadzono również dwa symetryczne otwory montażowe, pełniące funkcje zaczepów pozwalających na stabilne umieszczenie chipa w precyzyjnie zaprojektowanym statywie pomiarowym. Statyw również został wydrukowany addytywnie i wyposażony w dwa wystające kołki, które odpowiadają położeniu otworów w chipie. Umożliwiło to stabilne i powtarzalne pozycjonowanie chipa względem źródła światła i detektora, eliminację przesunięć mogących wpływać na odczyt fluorescencji oraz krótszy czas przygotowywania

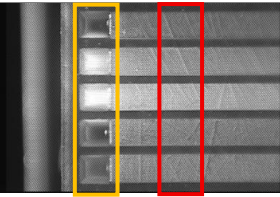
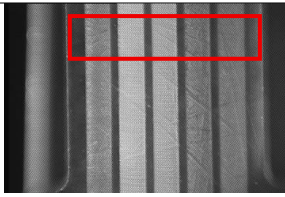
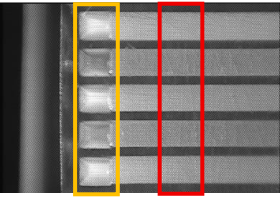
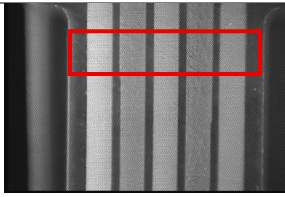
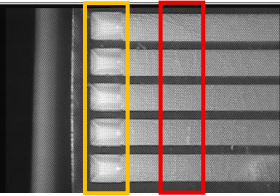
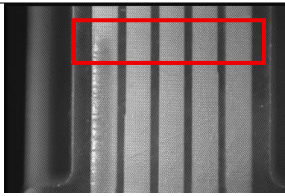
stanowiska pomiarowego. Dzięki temu uzyskane wyniki były bardziej precyzyjne i powtarzalne. Na podstawie wniosków wyciągniętych z testów z wykorzystaniem chipa w wersji drugiej, przetestowano dwa położenia chipa w układzie optoelektronicznym - prostopadłe do kierunku światła wzbudzającego fluorescencję oraz równoległe do kierunku światła wzbudzającego fluorescencję (Rys. 51).



Rysunek 51 Położenie chipa w układzie optoelektronicznym z zaznaczonym miejscem odczytu/zasięgu kamery: a) prostopadłe do kierunku światła wzbudzającego fluorescencję, b) równoległe do kierunku światła wzbudzającego fluorescencję.

Zdjęcia chipów (Tab. 18) oraz analizę poziomu fluorescencji wykonano jak wcześniej. Obszary ROI wyznaczono zarówno dla chipa zorientowanego prostopadłe względem źródła światła wzbudzającego - tutaj miejsce to znajdowało się w wyznaczonym do tego otworze na końcu chipa oraz w części zamkniętej komory, a także dla położenia równoległego - w tym przypadku, ze względu na ograniczony obszar detekcji przez kamerę wykonano pomiary jedynie dla części zamkniętej komory reakcyjnej. Analizę obrazów przeprowadzono dla trzech różnych konfiguracji eksperymentalnych, polegających na wypełnieniu komór różnymi próbkami (pozytywnymi lub negatywnymi) (Rys.52 a-c). Dla wszystkich konfiguracji (a-c) negatywnymi w położeniu równoległym chipa zaobserwowano wyraźne różnice pomiędzy próbkami pozytywnymi i negatywnymi. Różnica ta była widoczna zarówno dla odczytu ROI z otworu jak i z komory, jednak dla tych pierwszych próbki pozytywne wykazały znacznie wyższy poziom fluorescencji (RFU) niż próbki negatywne.

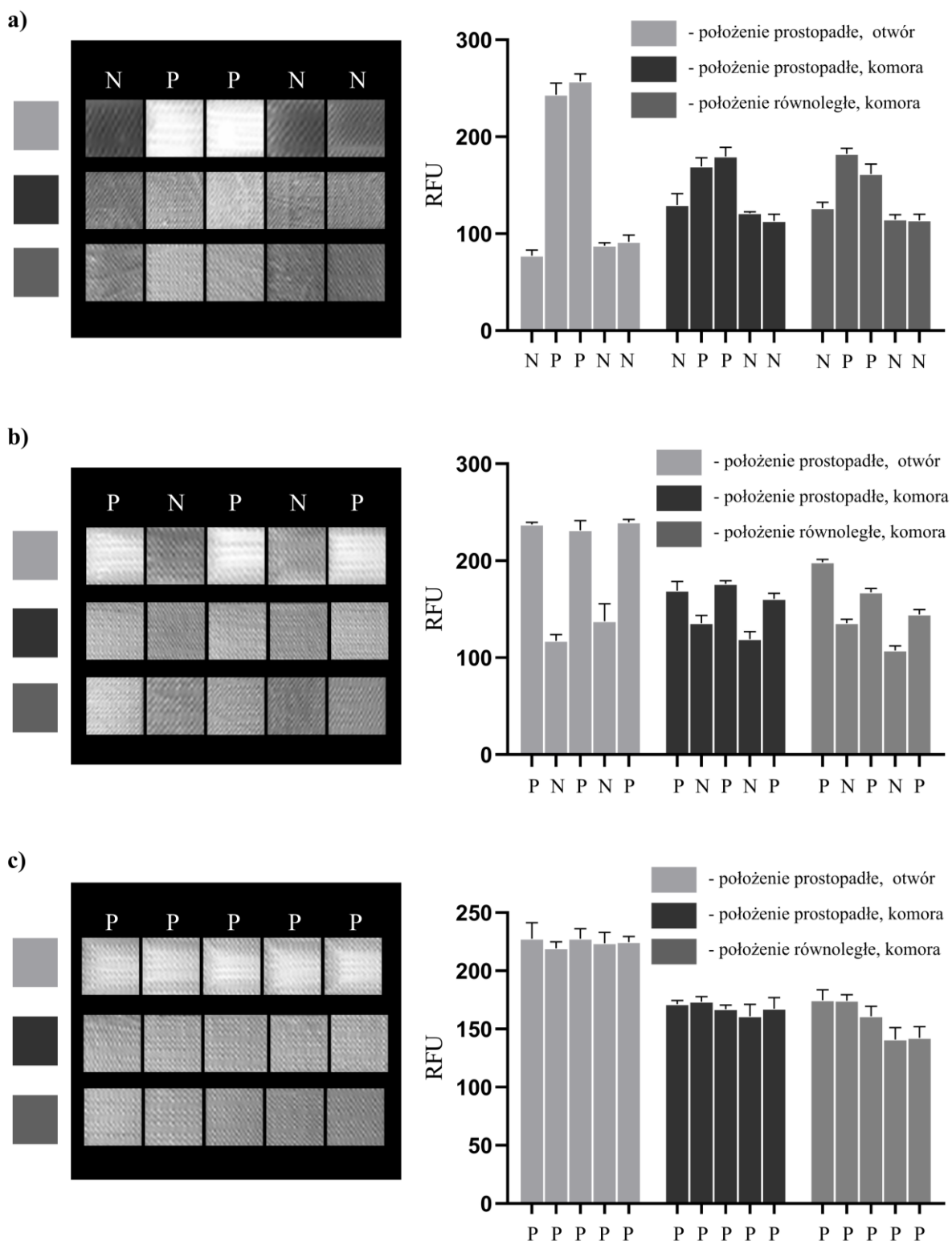
Tabela 18 Zdjęcia chipów wygenerowane w układzie optycznym. Miejsca odczytu ROI zaznaczono kolorem czerwonym oraz żółtym.

Kolejność próbek	Położenie równoległe	Położenie prostopadłe
Próbka negatywna (N)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka negatywna (N)		
Próbka negatywna (N)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka negatywna (N)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka negatywna (N)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka pozytywna (P)		
Próbka pozytywna (P)		

Wynik ten wskazuje jednak na skuteczne wzbudzenie i detekcję fluorescencji SYBR związanej z produktem reakcji RT-LAMP. W położeniu prostopadłym różnice pomiędzy próbkami P i N są mniejsze, a całkowite wartości RFU obniżone, co sugeruje ograniczoną efektywność w rejestracji emitowanego z komory sygnału, wynikającego z obecności GR-10 stanowiącego warstwę komory. Potwierdzają to wyniki RFU uzyskane dla położenia równoległego ze zbliżonym miejscem odczytu na komorze co w położeniu prostopadłym.

Wyniki te pozwoliły na jednoznaczne potwierdzenie, że zaprojektowane modyfikacje konstrukcyjne chipa, w szczególności wprowadzenie dedykowanego miejsca odczytu fluorescencji oraz kontrolowanego pozycjonowania względem toru optycznego, istotnie poprawiły zdolność rozróżniania sygnałów pomiędzy próbkami dodatnimi i ujemnymi oraz zwiększyły powtarzalność pomiarów fluorescencji.

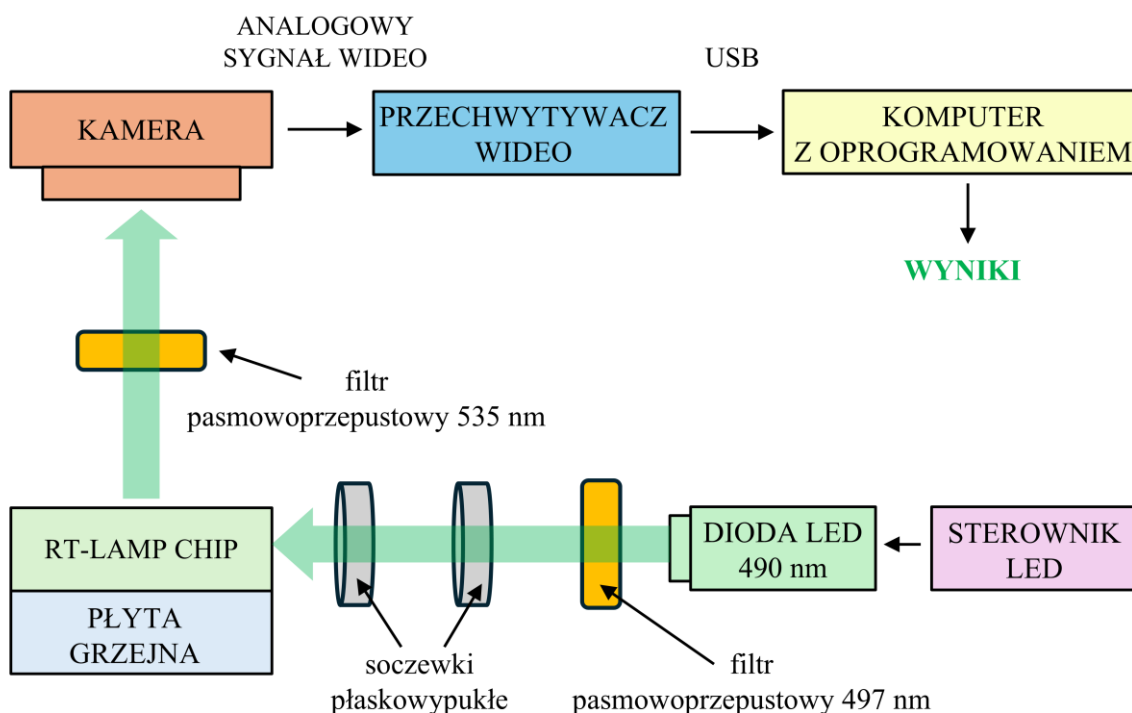
Opracowana wersja chipa posłużyła w kolejnej części badań jako docelowa platforma do przeprowadzenia reakcji RT-LAMP w warunkach „on-chip”, obejmujących ocenę czułości analitycznej testu, wyznaczenie granicy wykrywalności oraz weryfikację działania systemu z wykorzystaniem rzeczywistych próbek klinicznych



Rysunek 52 Analiza obrazów ROI w chipach o różnym położeniu względem wiązki światła wzbudzającego: a) z naprzemiennym ułożeniem próbek (N, P, P, N, N), b) z naprzemiennym ułożeniem próbek (P, N, P, N, P), c) z wszystkimi próbkami pozytywnymi (P, P, P, P, P), P-próbka pozytywna, N-próbka negatywna.

7.4 Reakcja RT-LAMP w chipie

W badaniach RT-LAMP w chipie wykorzystano stanowisko pomiarowe opisane wcześniej, w tym przypadku uwzględniając jednak miejsce na płytę grzejącą do ogrzania chipa do temperatury przebiegu reakcji (Rys. 53). Dobraną wcześniej mieszaninę RT-LAMP wprowadzano do drukowanego w technologii 3D chipa poprzez port wlotowy. Każdą komorę reakcyjną napełniano objętością $23 \pm 1 \mu\text{L}$ mieszaniny RT-LAMP, zawierającą: 12,5 μL SuperScript™ IV RT-LAMP Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific), po 1 μL starterów FIP i BIP, po 1 μL starterów LoopF i LoopB, po 0,5 μL starterów F3 i B3, 1 μL próbki RNA oraz 5,5 μL wody wolnej od nukleaz. Następnie wprowadzano po 1 μL badanych próbek do odpowiednich komór, po czym chip mikrofluidyczny był uszczelniany folią adhezyjną, co zapobiegało parowaniu i kontaminacji. Następnie chip umieszczono na płycie grzewczej Stuart SD162 (Bibby Scientific Ltd., UK) o kontrolowanej temperaturze, ustawionej na 65°C, i inkubowano przez 30 minut, co umożliwiało przebieg reakcji RT-LAMP w warunkach izotermicznych. Temperatura była kontrolowana z wykorzystaniem czujnika temperatury PT100 (TEWA, Polska). Po zakończeniu reakcji do każdej z pięciu komór reakcyjnych dodawano 1 μL barwnika SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific), aby umożliwić odczyt fluorescencji po zakończonej amplifikacji.

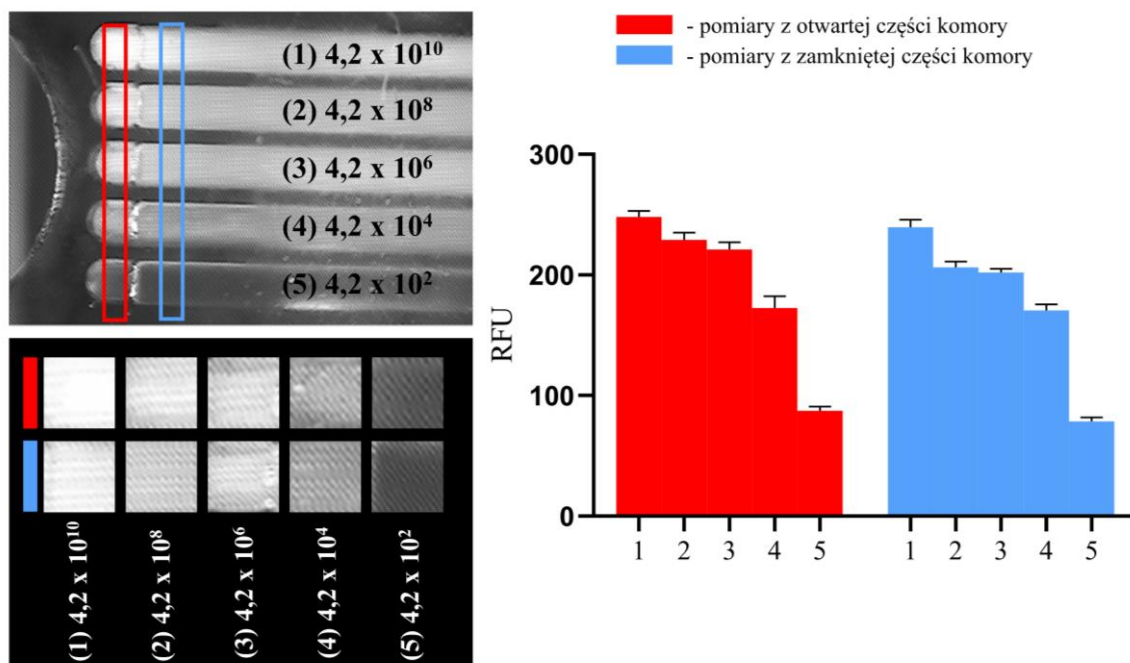


Rysunek 53 Schemat układu opto-elektronicznego do reakcji RT-LAMP na chipie.

Na tym etapie zachowano szczególną ostrożność i przestrzegano zasady minimalizacji kontaminacji, w tym stosowanie jednorazowych, sterylnych końcówek oraz dekontaminację powierzchni roboczych pomiędzy seriami eksperymentów.

Mieszanie odczynników realizowano wyłącznie poprzez ręczne pipetowanie, bez zastosowania mechanicznych lub aktywnych systemów mieszania. Następnie analizowano sygnał odbierany przez kamerę.

Zarejestrowane obrazy poddano obróbce i analizie z użyciem programu ImageJ w celu ilościowego określenia intensywności fluorescencji w każdej komorze. Dla każdej reakcji ręcznie zdefiniowano regiony zainteresowania (ROI) zgodnie ze wcześniejszym opisem. Uzyskane dane wykorzystano następnie do porównania sygnału fluorescencji pomiędzy próbkami dodatnimi, ujemnymi oraz badanymi. Aby określić najmniejszą liczbę kopii genomowego RNA FCV wykrywalną przez test RT-LAMP wykorzystano rozcieńczenia seryjne syntetycznego RNA FCV w zakresie 10^8 – 10^0 kopii na reakcję. Każde rozcieńczenie analizowano w siedemnastu powtórzeniach, aby ocenić czułość analityczną oraz powtarzalność. Uzyskane wyniki posłużyły do określenia granicy wykrywalności (LOD) i porównania jej z testem prowadzonym w środowisku laboratoryjnym w probówkach typu Eppendorf. Pomiary z otwartej jak i zamkniętej części komory były zbliżone i pozwoliły na rozróżnienie próbek pozytywnych i negatywnych (Rys. 54).



Rysunek 54 Zdjęcia chipa z zaznaczonymi obszarami ROI oraz wyniki analizy RFU dla reakcji prowadzonej „on-chip” w układzie optoelektronicznym dla szeregu rozcieńczeń syntetycznego fragmentu wirusa FCV.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów określono czułość analityczną reakcji RT-LAMP prowadzonej w drukowanym 3D układzie mikrofluidycznym. W badanym zakresie stężeń syntetycznego RNA FCV (od 10^8 do 10^0 kopii na reakcję) uzyskano charakterystyczny profil odpowiedzi reakcji, zgodny z oczekiwanym przebiegiem amplifikacji izotermicznej (Tab. 19).

Tabela 19 Wyniki reakcji prowadzonych „on-chip” dla syntetycznego fragmentu RNA wirusa FCV.

Liczba kopii wirusa	Liczba powtórzeń	Pozytywne	Negatywne
$2,3 \times 10^2$	17	0	17
$2,3 \times 10^3$	17	16	1
$2,3 \times 10^4$	17	17	0
$2,3 \times 10^5$	17	17	0
$2,3 \times 10^6$	17	17	0
$2,3 \times 10^7$	17	16	1
$2,3 \times 10^8$	17	17	0
$2,3 \times 10^9$	17	17	0

Dla najwyższych stężeń, tj. $2,3 \times 10^8$ oraz $2,3 \times 10^9$ kopii na reakcję, odnotowano 100% wyników dodatnich (17/17), co potwierdza wysoką powtarzalność reakcji w warunkach wysokiego obciążenia materiałem genetycznym. Podobną skuteczność uzyskano w zakresie $2,3 \times 10^4$ - $2,3 \times 10^6$ kopii na reakcję (17/17 reakcji pozytywnych), co wskazuje na stabilność układu w obszarze stężeń powyżej granicy wykrywalności. Dla $2,3 \times 10^3$ kopii pozytywny wynik uzyskano dla 94,1% przeprowadzonych reakcji (16/17 reakcji pozytywnych), natomiast dla $2,3 \times 10^2$ kopii wszystkie reakcje pozostały ujemne (0/17 reakcji pozytywnych). Granica wykrywalności (LOD) definiowana jest jako najmniejsze stężenie analizowanego RNA, dla którego ~95% reakcji daje wynik dodatni [228]. W niniejszym badaniu uznano spełnienie tego kryterium dla stężenia $2,3 \times 10^3$ kopii na reakcję, co pozwala na określenie LOD testu RT-LAMP w mikroukładzie drukowanym 3D na poziomie $2,3 \times 10^3$ kopii genomowego RNA FCV.

W literaturze opisującej reakcję RT-LAMP w klasycznych probówkach często uzyskuje się LOD rzędu 10 – 10^2 kopii na reakcję [229]. Podobnie było w przypadku opisanej wcześniej reakcji w środowisku laboratoryjnym. Jednak w systemach mikrofluidycznych, zwłaszcza prototypowych lub wykonanych metodą druku 3D, czułość bywa obniżona ze względu na:

- adsorpcję kwasów nukleinowych oraz białek enzymatycznych na powierzchniach kanałów,
- straty reagentów podczas manipulacji oraz transferu do komór reakcyjnych,
- niższą czułość toru optycznego w porównaniu z wyspecjalizowanymi urządzeniami do pomiaru fluorescencji.

Czynniki te działają synergistycznie, prowadząc do kumulatywnego obniżenia efektywności amplifikacji i detekcji w układach "on-chip" w porównaniu z warunkami probówkowymi.

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie reakcji amplifikacji z wykorzystaniem rzeczywistych próbek klinicznych, których sposób pozyskania, przygotowania oraz izolacji materiału genetycznego został szczegółowo opisany w poprzednim rozdziale. Celem tego etapu było zweryfikowanie przydatności opracowanego układu mikrofluidycznego oraz zastosowanej metody detekcji w warunkach zbliżonych do rzeczywistych zastosowań diagnostycznych. Do pięciu niezależnych komór reakcyjnych

chipa wprowadzono po 23 μ L mieszaniny reakcyjnej, zawierającej wszystkie niezbędne składniki reakcji amplifikacji, z wyjątkiem matrycy nukleinowej. Następnie do poszczególnych komór dodano próbki badane zgodnie z następującym schematem: pierwsza komora stanowiła próbę kontrolną NTC, do której zamiast RNA dodano wodę wolną od nukleaz, do dwóch kolejnych komór wprowadzono po 1 μ L RNA wyizolowanego z próbek klinicznych, stanowiących próbki potencjalnie dodatnie, natomiast do dwóch ostatnich komór dodano heterologiczne RNA, pełniące rolę negatywnej kontroli specyficzności reakcji (Rys. 55 a).

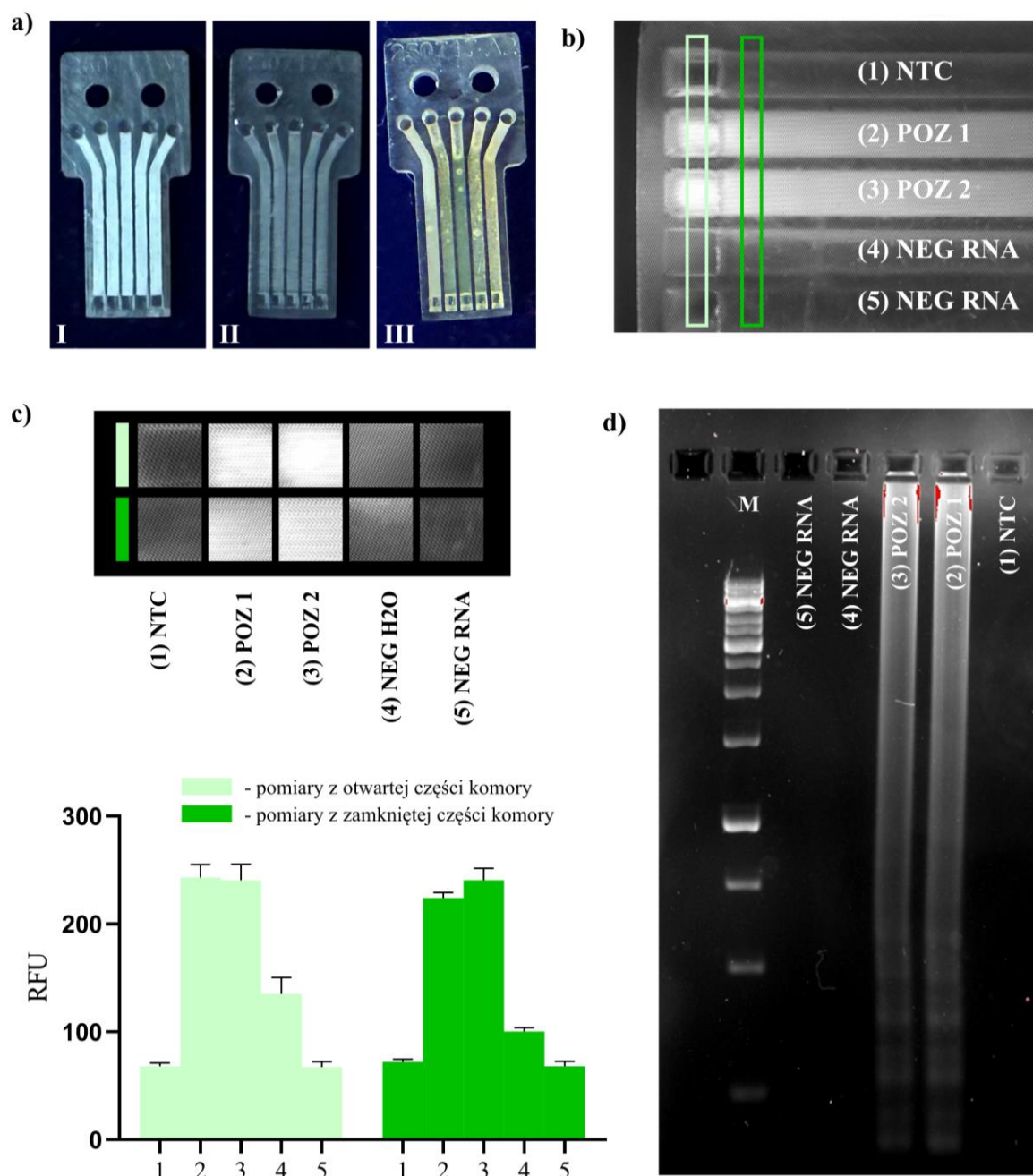
Reakcje amplifikacji oraz rejestrację sygnału fluorescencyjnego przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym powyżej. Obrazy generowane w opracowanym układzie optycznym (Rys. 55b) zostały następnie poddane analizie ilościowej. Na ich podstawie wyznaczono obszary zainteresowania (ROI) odpowiadające poszczególnym komórkom reakcyjnym oraz obliczono wartości względnej intensywności fluorescencji (RFU), zgodnie z procedurą przedstawioną wcześniej (Rys. 55c). Reakcję uznawano za dodatnią, gdy wartość RFU przekraczała średnią wartość RFU prób kontrolnych ujemnych (NTC) powiększoną o trzykrotność odchylenia standardowego ($NTC + 3SD$). Analiza uzyskanych wyników wykazała, że w komorze stanowiącej kontrolę negatywną NTC (1), jak również w komorach zawierających heterologiczne RNA (4) i (5) (pełniących funkcję negatywnej kontroli specyficzności), nie zaobserwowano istotnego wzrostu sygnału fluorescencyjnego w czasie trwania reakcji. Świadczy to o braku niespecyficznej amplifikacji oraz wysokiej selektywności zastosowanego układu reakcyjnego.

Z kolei w komorach zawierających RNA wyizolowane z próbek klinicznych (2) i (3) zaobserwowano wyraźny wzrost intensywności fluorescencji. Obliczone wartości RFU jednoznacznie potwierdziły obecność produktu amplifikacji, co wskazuje na prawidłowy przebieg reakcji oraz skuteczną detekcję materiału genetycznego w opracowanym chipie mikrofluidycznym. Weryfikacja produktów końcowych za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (zgodnie z protokołem opisanym w Rozdziale 7.1.) pozwoliła zaobserwować charakterystyczny dla RT-LAMP wielopasmowy wzór amplikonów (ang. LAMP ladder), co potwierdza specyficzność amplifikacji oraz zgodność detekcji fluorescencyjnej na chipie z klasycznymi metodami laboratoryjnymi (Rys. 55d). Reakcję RT-LAMP przeprowadzono dziesięciokrotnie w identycznych warunkach

eksperymentalnych w osobnych chipach, każdorazowo uzyskując spójne i powtarzalne wyniki, tj. brak sygnału fluorescencyjnego w próbkach negatywnych oraz wyraźny wzrost intensywności fluorescencji w próbkach pozytywnych, co potwierdza wysoką powtarzalność i niezawodność opracowanego układu detekcyjnego.

Wartości RFU mierzone dla różnych części chipa - otwartych oraz zamkniętych części komory, były w tym przypadku zbliżone. Niemniej jednak otwarta strona chipa pozostaje rozwiązaniem docelowym, ponieważ eliminuje ryzyko tłumienia lub zakłócenia sygnału fluorescencyjnego w obszarach, w których obecny jest materiał GR-10.

Uzyskane dane potwierdzają możliwość zastosowania zaproponowanego rozwiązania do analizy próbek klinicznych oraz jego potencjał w kontekście dalszego rozwoju narzędzia diagnostycznego typu „point-of-care”.



Rysunek 55 Analiza reakcji prowadzonych w komorach chipów na stanowisku optoelektronicznym: a) zdjęcia chipów do reakcji RT-LAMP: I) pusty, II) wypełniony mieszaniną reakcyjną, III) po reakcji z dodatkiem barwnika SYBR Green, b) zdjęcia chipów wygenerowane w układzie optycznym z zaznaczonymi obszarami ROI, c) miejsca ROI i analiza porównawcza pomiarów z różnych części chipów, d) analiza elektroforetyczna produktów reakcji prowadzonej w chipie.

7.5 Podsumowanie

W ramach przeprowadzonych badań opracowano i zwalidowano mikrofluidyczny chip drukowany w technologii 3D, przeznaczony do detekcji genomowego RNA wirusa FCV metodą RT-LAMP.

Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność metody RT-LAMP w połączeniu z detekcją fluorescencyjną jako szybkiego i czułego narzędzia diagnostycznego w weterynarii. Dodatkowym, nowatorskim elementem przeprowadzonych badań było wykonanie i wykorzystanie mikrokomór reakcyjnych w chipie wytworzonym metodą druku 3D techniką DLP. Zastosowanie tej technologii umożliwiło precyzyjne formowanie struktur mikrofluidycznych oraz integrację reakcji biologicznej z układem detekcyjnym, co stanowi istotny krok w kierunku miniaturyzacji automatyzacji systemów diagnostycznych.

Zoptymalizowana reakcja RT-LAMP wykazała wysoką swoistość zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w układzie mikrofluidycznym, co potwierdzono brakiem amplifikacji w próbach kontrolnych oraz obecnością charakterystycznego wzoru amplikonów wyłącznie w próbkach dodatnich po elektroforezie. Granica wykrywalności reakcji prowadzonej na chipie wyniosła $2,3 \times 10^3$ kopii RNA na reakcję, co mimo obniżenia w porównaniu do warunków probówkowych pozostaje wystarczające dla zastosowań diagnostycznych w weterynarii, szczególnie w diagnostyce chorób o ostrym przebiegu, obserwowane poziomy materiału genetycznego patogenu w próbkach klinicznych mogą mieścić się w tym zakresie. Różnica ta jest zgodna z licznymi doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na pogorszenie czułości w zminiaturyzowanych systemach „on-chip”, wynikające m.in. z adsorpcji analitu i enzymów na powierzchni polimeru, gorszej jednorodności warunków temperaturowych oraz ograniczeń toru optycznego (autofluorescencja, rozpraszanie światła w materiale) [230-232]. Stanowi to typowe ograniczenie w pierwszej generacji urządzeń drukowanych addytywnie i wskazuje potencjalne kierunki optymalizacji, obejmujące modyfikację powierzchni kanałów (np. blokowanie BSA), poprawę kontaktu termicznego z płytą grzewczą oraz udoskonalenie układu optycznego.

Pozostałe potencjalne kierunki optymalizacji obejmują:

- modyfikację powierzchni kanałów i komór (powłoki hydrofilowe, blokery adsorpcji),
- zastosowanie bardziej czułych filtrów i źródeł wzbudzenia fluorescencji,
- automatyzację analizy obrazu w celu zwiększenia stosunku sygnału do szumu.

Niemniej jednak opracowany system, jak również sama reakcja prowadzona w strukturze chipa, umożliwiły skuteczne wykrycie materiału genetycznego wirusa FCV w próbkach klinicznych pochodzących od zakażonych kotów, co pozwoliło na prawidłowe rozróżnienie próbek dodatnich i ujemnych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że drukowane w technologii 3D układy mikrofluidyczne mogą stanowić funkcjonalną platformę do miniaturyzacji testów molekularnych opartych na RT-LAMP. Opracowane rozwiązanie stanowi istotny krok w kierunku budowy kompaktowych, tanich i szybkich urządzeń diagnostycznych typu „point-of-care”, przeznaczonych do zastosowań poza wyspecjalizowanymi laboratoriami. Zastosowane podzespoły optoelektroniczne i stół grzewczy w wersji laboratoryjnej (model urządzenia) zestawiane były do postaci funkcjonalnego stanowiska laboratoryjnego. W warunkach dalszego rozwoju tego stanowiska możliwa jest głębsza integracja i budowa kompaktowego urządzenia typu POC.

8 Wnioski końcowe

Druk 3D to technologia, która obecna jest w wielu dziedzinach i obszarach badawczych, w przemyśle i naszym codziennym życiu. Od wielu lat jest to technologia obecna w medycynie, a coraz częściej sięgają po nią również osoby związane z poprawą jakości życia i zdrowia zwierząt. Druk 3D w weterynarii to już nie tylko ciekawostka technologiczna, ale realne narzędzie, które ratuje i poprawia komfort życia zwierząt. Od personalizowanych protez po precyzyjne planowanie operacji - możliwości są ogromne, a jednym z najnowszych tematów badawczych jest wykorzystanie druku 3D w terapii i diagnostyce weterynaryjnej.

W niniejszej dysertacji opisano wyniki badań własnych nad możliwością wykorzystania druku 3D do opracowania nowoczesnych rozwiązań terapeutyczno-diagnostycznych:

- mikroigłowych plastrów, służących do transdermalnego dostarczania leków dla zwierząt,
- chipów, stanowiących kluczowy element optoelektronicznego, przenośnego urządzenia diagnostycznego do reakcji izotermicznej RT-LAMP do wykrywania wirusa FCV.

Analiza literatury wykazała, że w chwili rozpoczynania badań nie istniały rozwiązania pozwalające na jednoczesne zapewnienie wysokiej elastyczności konstrukcyjnej, możliwości szybkiej personalizacji oraz integracji funkcji terapeutycznych i diagnostycznych, przy jednoczesnym wykorzystaniu technologii addytywnych. Dostępne w literaturze rozwiązania charakteryzowały się ograniczoną skalowalnością, złożonym procesem wytwarzania lub brakiem możliwości dostosowania geometrii i właściwości funkcjonalnych do specyficznych wymagań aplikacyjnych, w szczególności w obszarze weterynarii.

W związku z powyższym celem niniejszej dysertacji było opracowanie, wytworzenie oraz scharakteryzowanie innowacyjnych rozwiązań terapeutyczno-diagnostycznych, wykorzystujących potencjał technologii druku 3D. Prace badawcze obejmowały zarówno etap projektowania i optymalizacji struktur, jak i ocenę ich właściwości mechanicznych, optycznych, użytkowych oraz funkcjonalnych.

W przypadku mikroigłowych plastrów szczególny nacisk położono na optymalizację druku 3D oraz wybór odpowiedniego materiału, który zapewni wystarczającą wytrzymałość mechaniczną oraz powtarzalność drukowanych struktur. Skupiono się również na analizie zdolności do skutecznego i kontrolowanego transdermalnego dostarczania substancji czynnych przez plastry rozpuszczalne wytworzone z polimerów PVP/PVA - będące odwzorowaniem plastrów drukowanych. Technologia mikroigieł dzięki swojej uniwersalności i elastyczności projektowej pozwoli na tworzenie plastrów zaprojektowanych „na miarę” pod konkretnego pacjenta i jego wymagania. Zastosowanie różnych polimerów jako nośników substancji aktywnych pozwoli nie tylko na dobór odpowiednich właściwości mechanicznych struktur, lecz również na kontrolowane kształtowanie profilu oraz czasu uwalniania substancji czynnych. Zaproponowane podejście ma potencjał, aby znacząco zwiększyć komfort zwierząt oraz bezpieczeństwo

personelu, ograniczając stres związany z iniekcjami lub powtarzalnym podawaniem leków doustnych. Ponadto możliwość precyzyjnego dawkowania, kontrolowanego uwalniania oraz personalizacji składu plastrów czyni to rozwiązanie szczególnie obiecującym w kontekście rozwoju nowoczesnych, nieinwazyjnych systemów terapeutycznych w weterynarii.

W odniesieniu do chipów diagnostycznych skupiono się na opracowaniu konstrukcji chipów, zapewnieniu odpowiednich warunków prowadzenia reakcji izotermicznej RT-LAMP oraz współpracy chipa z elementami optoelektronicznymi modelowego urządzenia diagnostycznego. Jednym z kluczowych etapów prowadzonych badań była weryfikacja przydatności chipa wytworzonego z wykorzystaniem materiału GR-10 pod kątem jego właściwości optycznych oraz wpływu na przebieg reakcji izotermicznej RT-LAMP. Analiza ta miała na celu potwierdzenie, czy zastosowany materiał zapewnia odpowiednią transparentność i jednorodność optyczną, niezbędną do prawidłowej detekcji sygnału w układzie opto-elektronicznym, a jednocześnie nie powoduje inhibicji reakcji enzymatycznej zachodzącej w obrębie komórek reakcyjnych.

Zestawiony system detekcji umożliwił ocenę jakości sygnału fluorescencyjnego oraz potwierdzenie efektywności reakcji RT-LAMP przy minimalnym wykorzystaniu specjalistycznej aparatury. Uzyskane dane posłużyły jako fundament do planowanego w kolejnych etapach badań rozszerzenia systemu o pomiar fluorescencji w czasie rzeczywistym, co umożliwi analizę kinetyki amplifikacji, określenie czasu detekcji (T_t) oraz dalszą automatyzację prototypu urządzenia diagnostycznego.

Należy także zaznaczyć, że z zakresu niniejszej rozprawy świadomie wyłączono prace związane z implementacją zamkniętego systemu detekcji fluorescencyjnej, obejmującego m.in. automatyczne dozowanie barwnika (SYBR Green) lub jego separację przestrzenną w strukturze chipa, ograniczającego możliwość kontaminacji, jak również liofilizację reagentów reakcyjnych, gdyż zostały one zaplanowane jako kolejny etap rozwoju technologii. Ich realizacja wymaga bowiem przejścia z etapu badań koncepcyjnych do etapu optymalizacji konstrukcyjnej, co wykracza poza cele pracy doktorskiej. Obecna konfiguracja systemu ma charakter prototypowy (ang. proof-of-concept) i służy przede wszystkim do weryfikacji zasadności wykorzystania druku 3D do zaproponowanego podejścia diagnostycznego bazującego na reakcji RT-LAMP. Ograniczona automatyzacja oraz większa liczba kroków manualnych są typowe dla tego etapu rozwoju

i umożliwiają elastyczne modyfikowanie poszczególnych elementów układu w trakcie badań. Docelowo, w ramach dalszych prac badawczo-rozwojowych, planowana jest integracja modułu grzewczego, układu optycznego oraz zabudowy urządzenia, co pozwoli na redukcję interakcji użytkownika oraz stworzenie w pełni funkcjonalnej platformy diagnostycznej typu „point-of-care”.

Tym samym zakres badań przedstawionych w niniejszej rozprawie należy traktować jako zamknięty i spójny etap rozwoju technologii, którego wyniki stanowią solidną podstawę do dalszej translacji opracowanego rozwiązania w kierunku systemu POC. Uzyskane wyniki potwierdziły zasadność zastosowania druku 3D jako narzędzia umożliwiającego szybkie prototypowanie, funkcjonalną integrację oraz potencjalną personalizację proponowanych rozwiązań. Opracowane struktury (plastry mikroigłowe oraz chipy) wykazały właściwości predestynujące je do dalszych badań aplikacyjnych oraz rozwoju w kierunku zastosowań praktycznych i wdrożeń, a cel rozprawy został osiągnięty.

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

W szczególności dziękuję:

- Panu Prof. dr hab. inż. Rafałowi Walczakowi za cenne wskazówki oraz wsparcie naukowe i organizacyjne podczas realizacji badań,
- Pani Dr inż. Patrycji Śniadek za pomoc merytoryczną oraz wsparcie na etapie opracowywania technologii mikroigieł,
- Panu r inż. Wojciechowi Kubickiemu za pomoc w tworzeniu urządzenia diagnostycznego oraz przygotowanie projektów chipów diagnostycznych,
- Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrosystemów Politechniki Wrocławskiej za cenne rady, inspirujące dyskusje oraz życzliwą atmosferę pracy.

9 Bibliografia

1. Chircov, C. & Grumezescu, A. M. Microelectromechanical Systems (MEMS) for Biomedical Applications. *Micromachines* **13**, 164 (2022).
2. Galan, E. A. *et al.* Intelligent Microfluidics: The Convergence of Machine Learning and Microfluidics in Materials Science and Biomedicine. *Matter* **3**, 1893–1922 (2020).
3. Kaisti, M. *et al.* Clinical assessment of a non-invasive wearable MEMS pressure sensor array for monitoring of arterial pulse waveform, heart rate and detection of atrial fibrillation. *npj Digit. Med.* **2**, 1–10 (2019).
4. Balan, V. & Vereștiuc, L. 3 - Magnetic materials-based medical devices for diagnosis, surgery, and therapy. in *Magnetic Sensors and Actuators in Medicine*, 27–80 (2023).
5. Welburn, L., Javadi, A. M. M., Nguyen, L. & Desai, S. Prospects and Trends in Biomedical Microelectromechanical Systems (MEMS) Devices: A Review. *Biomolecules* **15**, 898 (2025).
6. Dimaki, M. & Okkels, F. Design and Simulation of Lab-on-a-Chip Devices. in *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems: A Practical Guide* (eds Castillo-León, J. & Svendsen, W. E.) 27–51 (Springer International Publishing, Cham, 2015).
7. Arora, A., Prausnitz, M. & Mitragotri, S. Micro-scale Devices for Transdermal Drug Delivery. *Int J Pharm* **364**, 227–236 (2008).
8. Lall, D., Naim, M. J. & Rathore, S. An Emerging Transdermal Drug Delivery System: Fabrication and Characterization of Natural and Biodegradable Polymeric Microneedles Transdermal Patch. *Journal of Pharmaceutical Research International* 46–54 (2021)
9. Wang, J. *et al.* Microneedle-based transdermal detection and sensing devices. *Lab Chip* **23**, 869–887 (2023).
10. Plickert, H. D., Einspanier, R., Arndt, G., Brunnberg, L. & Kohn, B. Evaluation of a point-of-care test for canine C-reactive protein. *Veterinary Clinical Pathology* **40**, 384–388 (2011).
11. Henderson, D. W. & Schlesinger, D. P. Use of a point-of-care beta-hydroxybutyrate sensor for detection of ketonemia in dogs. *Can Vet J* **51**, 1000–1002 (2010).
12. Amin, N. *et al.* Recent Advances of Optical Biosensors in Veterinary Medicine: Moving Towards the Point of Care Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **23**, 2242–2265 (2023).
13. Harpaz, D., Eltzov, E., Seet, R., Marks, R. & Tok, A. Point-of-Care-Testing in Acute Stroke Management: An Unmet Need Ripe for Technological Harvest. *Biosensors* **7**, (2017).
14. Alves, P. A. *et al.* Optimization and Clinical Validation of Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, a Fast, Highly Sensitive and Specific COVID-19 Molecular Diagnostic Tool That Is Robust to Detect SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
15. Xie, Z. *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Bovine Rotavirus. *BMC Veterinary Research* **8**, 133 (2012).
16. Hifumi, T., Akioka, K., Tanaka, T. & Miyoshi, N. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the mitochondrial cytochrome *b* gene for the rapid detection of alveolar echinococcosis in hepatic nodules of horses. *Veterinary Parasitology* **299**, 109573 (2021).
17. Crowther, J. R. Detection of viruses in livestock. *Parasitology* **117**, 29–40 (1999).
18. Wu, S. *et al.* Advances in Virus Detection Techniques Based on Recombinant Polymerase Amplification. *Molecules* **29**, 4972 (2024).
19. Adepu, S. & Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* **26**, 5905 (2021).
20. Verma, P., Thakur, A. S., Deshmukh, K., Jha, D. A. K. & Verma, S. ROUTES OF DRUG ADMINISTRATION.
21. da Silva, C. F. *et al.* New Trends in Drug Delivery Systems for Veterinary Applications. *Pharm Nanotechnol* **9**, 15–25 (2021).

22. Rathbone, M. & Brayden, D. Controlled Release Drug Delivery in Farmed Animals: Commercial Challenges and Academic Opportunities. *Current Drug Delivery* **6**, 383–390.
23. Ahmed, I. & Kasraian, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 871–882 (2002).
24. Carvalho, S. G. *et al.* Polymeric-based drug delivery systems for veterinary use: State of the art. *International Journal of Pharmaceutics* **604**, 120756 (2021).
25. Lavy, E. *et al.* Aspects in controlled drug delivery for topical applications in veterinary medicine. *Veterinary and Animal Science* **15**, 100235 (2022).
26. Waghule, T. *et al.* Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **109**, 1249–1258 (2019).
27. Singh, T. R. R., Mcmillan, H., Mooney, K., Alkilani, A. Z. & Donnelly, R. F. 6 - Microneedles for drug delivery and monitoring. in *Microfluidic Devices for Biomedical Applications* (eds Li, X. (James) & Zhou, Y.) 185–230 (Woodhead Publishing, 2013).
28. Drug Delivery Using Microneedles. 625–642 (2011)
29. Kulkarni, D. *et al.* Polymeric Microneedles: An Emerging Paradigm for Advanced Biomedical Applications. *Scientia Pharmaceutica* **91**, 27 (2023).
30. Ebrahiminejad, V., Rad, Z. F., Prewett, P. D. & Davies, G. J. Fabrication and testing of polymer microneedles for transdermal drug delivery. *Beilstein J. Nanotechnol.* **13**, 629–640 (2022).
31. Luo, X., Yang, L. & Cui, Y. Microneedles: materials, fabrication, and biomedical applications. *Biomed Microdevices* **25**, 20 (2023).
32. King, T. A. The One Medicine concept: its emergence from history as a systematic approach to re-integrate human and veterinary medicine. *Emerg Top Life Sci* **5**, 643–654 (2021).
33. Harloff-Helleberg, S., Nielsen, L. H. & Nielsen, H. M. Animal models for evaluation of oral delivery of biopharmaceuticals. *Journal of Controlled Release* **268**, 57–71 (2017).
34. Castilla-Casadiago, D. A. *et al.* Biodegradable microneedle patch for delivery of meloxicam for managing pain in cattle. *PLoS One* **17**, e0272169 (2022).
35. Steinbach, S. *et al.* Temporal dynamics of intradermal cytokine response to tuberculin in Mycobacterium bovis BCG-vaccinated cattle using sampling microneedles. *Sci Rep* **11**, 7074 (2021).
36. Stoll, S., Dietlin, C. & Nett-Mettler, C. S. Microneedling as a successful treatment for alopecia X in two Pomeranian siblings. *Vet Dermatol* **26**, 387–390, e88 (2015).
37. Jung, J. H. & Jin, S. G. Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication. *J Pharm Investig* **51**, 503–517 (2021).
38. Ita, K. Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles-Potential and Challenges. *Pharmaceutics* **7**, 90–105 (2015).
39. Aldawood, F. K., Andar, A. & Desai, S. A Comprehensive Review of Microneedles: Types, Materials, Processes, Characterizations and Applications. *Polymers* **13**, 2815 (2021).
40. Xenon Difluoride Dry Etching for the Microfabrication of Solid Microneedles as a Potential Strategy in Transdermal Drug Delivery (Small 27/2023). *Small* **19**, (2023).
41. Wilke, N., Mulcahy, A., Ye, S.-R. & Morrissey, A. Process optimization and characterization of silicon microneedles fabricated by wet etch technology. *Microelectronics Journal* **36**, 650–656 (2005).
42. Kaur, R., Arora, S. & Goswami, M. EVALUATION OF FABRICATED SOLID MICRONEEDLES AS SMART APPROACH FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEM OF ASTAXANTHIN. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 255–262 (2023)
43. Muftić, A. *et al.* Development of solid microneedles for transdermal drug delivery in companion animals. *Veterinarska stanica* **55**, 87–97 (2024).
44. Mahato, R. Chapter 13 - Microneedles in Drug Delivery. in *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices* (eds Mitra, A. K., Cholkar, K. & Mandal, A.) 331–353 (Elsevier, Boston, 2017).
45. Ita, K. Chapter 12 - Hollow microneedles. in *Microneedles* (ed. Ita, K.) 221–231 (Academic Press, 2022).

46. Unver, N., Odabas, S., Demirel, G. B. & Gul, O. T. Hollow microneedle array fabrication using a rational design to prevent skin clogging in transdermal drug delivery. *J. Mater. Chem. B* **10**, 8419–8431 (2022).
47. 3D-Printed Hollow Microneedles Array with Luer Lock Connection for Facile and Painless Intradermal Injection: A Proof of Concept (2024) | Amirreza Ghaznavi. <https://typeset.io/papers/3d-printed-hollow-microneedles-array-with-luer-lock-2rehnnjyoa>.
48. *Simulation of Hollow Ormocomp Microneedles and Fabrication by Two Photon Photolithography*. (Research Square (Research Square), 2024).
49. Sakamoto, J., Shiratori, T., Suzuki, M., Takahashi, T. & Aoyagi, S. Fabrication of hollow microneedles with jagged edges mimicking mosquito's needles by thermal nanoimprint method using a mold combining soft and hard materials. *Japanese Journal of Applied Physics* **63**, (2024).
50. Mei, X. *et al.* Minimally invasive snakebite inspired microneedle delivery system for internal organs. *Bioactive Materials* **49**, 576–585 (2025).
51. Luo, F. *et al.* Integration of Hollow Microneedle Arrays with Jellyfish-Shaped Electrochemical Sensor for the Detection of Biomarkers in Interstitial Fluid. *Sensors* **24**, 3729 (2024).
52. Zhang, S. *et al.* Design and characterization of 3D-printed hollow microneedle arrays for transdermal insulin delivery. *AIP Advances* **14**, 065234 (2024).
53. Sarker, S. *et al.* Geometric Determinants of Cell Viability for 3D-Printed Hollow Microneedle Array-Mediated Delivery. in *2024 IEEE 37th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)* 429–432 (2024).
54. Sartawi, Z., Blackshields, C. & Faisal, W. Dissolving microneedles: Applications and growing therapeutic potential. *Journal of Controlled Release* **348**, 186–205 (2022).
55. Bariya, S. H., Gohel, M. C., Mehta, T. A. & Sharma, O. P. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. *J Pharm Pharmacol* **64**, 11–29 (2012).
56. Gorantla, S. *et al.* Chitosan-based microneedles as a potential platform for drug delivery through the skin: Trends and regulatory aspects. *Int J Biol Macromol* **184**, 438–453 (2021).
57. Yang, S.-J., Jeong, J.-O., Lim, Y.-M. & Park, J.-S. Synthesis and characterization of PVP microneedle patch using metal bioelectrodes for novel drug delivery system. *Materials & Design* **201**, 109485 (2021).
58. Chen, M.-C., Chen, C.-S., Wu, Y.-W. & Yang, Y.-Y. Poly- γ -Glutamate microneedles as transdermal immunomodulators for ameliorating atopic dermatitis-like skin lesions in Nc/Nga mice. *Acta Biomaterialia* **114**, 183–192 (2020).
59. Nguyen, H. X. *et al.* Poly (vinyl alcohol) microneedles: Fabrication, characterization, and application for transdermal drug delivery of doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **129**, 88–103 (2018).
60. Luo, Z. *et al.* Biodegradable Gelatin Methacryloyl Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Adv Healthc Mater* **8**, e1801054 (2019).
61. Silva, A. C. Q. *et al.* Dissolvable Carboxymethylcellulose Microneedles for Noninvasive and Rapid Administration of Diclofenac Sodium. *Macromol Biosci* **23**, e2200323 (2023).
62. Zhang, Y., Jiang, G., Yu, W., Liu, D. & Xu, B. Microneedles fabricated from alginate and maltose for transdermal delivery of insulin on diabetic rats. *Materials Science and Engineering: C* **85**, 18–26 (2018).
63. Chiu, Y.-H., Chen, M.-C. & Wan, S.-W. Sodium Hyaluronate/Chitosan Composite Microneedles as a Single-Dose Intradermal Immunization System. *Biomacromolecules* **19**, 2278–2285 (2018).
64. Kim, M. J. *et al.* Fabrication of Circular Obelisk-Type Multilayer Microneedles Using Micro-Milling and Spray Deposition. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **6**, (2018).
65. Ando, D. *et al.* Mechanical Characterization of Dissolving Microneedles: Factors Affecting Physical Strength of Needles. *Pharmaceutics* **16**, 200 (2024).
66. Chen, H. *et al.* A novel scalable fabrication process for the production of dissolving microneedle arrays. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **9**, 240–248 (2019).
67. Caffarel-Salvador, E. *et al.* A microneedle platform for buccal macromolecule delivery. *Science Advances* **7**, eabe2620 (2021).

68. Kim, J. D., Kim, M., Yang, H., Lee, K. & Jung, H. Droplet-born air blowing: Novel dissolving microneedle fabrication. *Journal of Controlled Release* **170**, 430–436 (2013).
69. Lee, K., Lee, H., Lee, D.-S. & Jung, H. Drawing Lithography: Three-Dimensional Fabrication of an Ultrahigh-Aspect-Ratio Microneedle. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **22**, 483–6 (2010).
70. Bauleth-Ramos, T. *et al.* Recent approaches for enhancing the performance of dissolving microneedles in drug delivery applications. *Materials Today* **63**, 239–287 (2023).
71. Yu, X., Zhao, J. & Fan, D. The Progress in the Application of Dissolving Microneedles in Biomedicine. *Polymers* **15**, 4059 (2023).
72. Park, Y. *et al.* Transdermal delivery of cosmetic ingredients using dissolving polymer microneedle arrays. *Biotechnol Bioproc E* **20**, 543–549 (2015).
73. Sullivan, S. P. *et al.* Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat Med* **16**, 915–920 (2010).
74. Pei, P. *et al.* Composite-dissolving microneedle patches for chemotherapy and photothermal therapy in superficial tumor treatment. *Biomater. Sci.* **6**, 1414–1423 (2018).
75. Priya, S. & Singhvi, G. Microneedles-based drug delivery strategies: A breakthrough approach for the management of pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **155**, 113717 (2022).
76. Dawud, H. & Abu Ammar, A. Rapidly Dissolving Microneedles for the Delivery of Steroid-Loaded Nanoparticles Intended for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *Pharmaceutics* **15**, 526 (2023).
77. Chen, C.-H., Shyu, V. B.-H. & Chen, C.-T. Dissolving Microneedle Patches for Transdermal Insulin Delivery in Diabetic Mice: Potential for Clinical Applications. *Materials* **11**, 1625 (2018).
78. Wang, H. *et al.* Supramolecular Dissolving Microneedle Patch Loading Hydrophobic Glucocorticoid for Effective Psoriasis Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **15**, 15162–15171 (2023).
79. Gill, H. S. & Prausnitz, M. R. Coated microneedles for transdermal delivery. *J Control Release* **117**, 227–237 (2007).
80. Ingrole, R. S. J. & Gill, H. S. Microneedle Coating Methods: A Review with a Perspective. *J Pharmacol Exp Ther* **370**, 555–569 (2019).
81. Cormier, M. *et al.* Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system. *Journal of Controlled Release* **97**, 503–511 (2004).
82. Camović, M. *et al.* Coated 3D Printed PLA Microneedles as Transdermal Drug Delivery Systems. in *CMBEBIH 2019* (eds Badnjevic, A., Škrbić, R. & Gurbeta Pokvić, L.) 735–742 (Springer International Publishing, Cham, 2020).
83. Uddin, M. J. *et al.* Inkjet printing of transdermal microneedles for the delivery of anticancer agents. *International Journal of Pharmaceutics* **494**, 593–602 (2015).
84. Ingrole, R. S. J. *et al.* Trends of microneedle technology in the scientific literature, patents, clinical trials and internet activity. *Biomaterials* **267**, 120491 (2021).
85. Lim, D.-J., Vines, J. B., Park, H. & Lee, S.-H. Microneedles: A versatile strategy for transdermal delivery of biological molecules. *International Journal of Biological Macromolecules* **110**, 30–38 (2018).
86. Zvezdin, V., Peno-Mazzarino, L., Radionov, N., Kasatkina, T. & Kasatkin, I. Microneedle patch based on dissolving, detachable microneedle technology for improved skin quality – Part 1: ex vivo safety evaluation. *International Journal of Cosmetic Science* **42**, 369–376 (2020).
87. Hoesly, F. J. *et al.* Safety of a Novel Microneedle Device Applied to Facial Skin: A Subject- and Rater-Blinded, Sham-Controlled, Randomized Trial. *Archives of Dermatology* **148**, 711–717 (2012).
88. Bal, S. M., Caussin, J., Pavel, S. & Bouwstra, J. A. *In vivo* assessment of safety of microneedle arrays in human skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **35**, 193–202 (2008).

89. Zhu, D. D., Zhang, X. P., Zhang, B. L., Hao, Y. Y. & Guo, X. D. Safety Assessment of Microneedle Technology for Transdermal Drug Delivery: A Review. *Advanced Therapeutics* **3**, 2000033 (2020).
90. Jeong, H.-R., Lee, H.-S., Choi, I.-J. & Park, J.-H. Considerations in the use of microneedles: pain, convenience, anxiety and safety. *Journal of Drug Targeting* **25**, 29–40 (2017).
91. Yang, L., Yang, Y., Chen, H., Mei, L. & Zeng, X. Polymeric microneedle-mediated sustained release systems: Design strategies and promising applications for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **17**, 70–86 (2022).
92. Oh, S. J. & Jung, J. H. Sustainable Drug Release Using Nanoparticle Encapsulated Microneedles. *Chemistry – An Asian Journal* **17**, e202200333 (2022).
93. Amer, M. & Chen, R. K. Hydrogel-Forming Microneedle Arrays for Sustained and Controlled Ocular Drug Delivery. *ASME J of Medical Diagnostics* **3**, (2020).
94. Singh, P. *et al.* Polymeric microneedles for controlled transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* **315**, 97–113 (2019).
95. Hong, X. *et al.* Dissolving and biodegradable microneedle technologies for transdermal sustained delivery of drug and vaccine. *DDDT* **7**, 945–952 (2013).
96. Phoka, T. *et al.* Detachable-dissolvable-microneedle as a potent subunit vaccine delivery device that requires no cold-chain. *Vaccine: X* **15**, 100398 (2023).
97. Mistilis, M. J. *et al.* Long-term stability of influenza vaccine in a dissolving microneedle patch. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **7**, 195–205 (2017).
98. Adhikari, B. B., Goodson, J. L., Chu, S. Y., Rota, P. A. & Meltzer, M. I. Assessing the Potential Cost-Effectiveness of Microneedle Patches in Childhood Measles Vaccination Programs: The Case for Further Research and Development. *Drugs R D* **16**, 327–338 (2016).
99. Arya, J. *et al.* Tolerability, usability and acceptability of dissolving microneedle patch administration in human subjects. *Biomaterials* **128**, 1–7 (2017).
100. Robertson, C. E., Ackerman, N. A., Burke, F. D. & Reilly, W. J. Sharps and high-pressure injection injuries in veterinary and animal workers. *European Journal of Emergency Medicine* **23**, 8 (2016).
101. Kovachevich, R. & Kaplan, F. T. D. Animal Injection Injuries. *Journal of Hand Surgery* **37**, 2408–2411 (2012).
102. Diness, V. Local Tissue Damage after Intramuscular Injections in Rabbits and Pigs: Quantitation by Determination of Creatine Kinase Activity at Injection Sites. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **56**, 410–415 (1985).
103. Parks, D. L. Cutaneous Complications of Pentazocine Injections. *Arch Dermatol* **104**, 231 (1971).
104. Ansari, A., Dar, A. A., Dimr, U., Kumar, P. & Sharma, M. Transdermal Drug Delivery System in Veterinary Practice: An Overview. *Journal of Advanced Veterinary Research* **1**, (2011).
105. Souto, E. B. *et al.* Modified Drug Delivery Systems for Veterinary Use: Pharmaceutical Development and Applications. *Current Bioactive Compounds* **19**, 69–76.
106. Choi, I.-J. *et al.* Patchless administration of canine influenza vaccine on dog's ear using insertion-responsive microneedles (IRMN) without removal of hair and its in vivo efficacy evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **153**, 150–157 (2020).
107. Woodward, T. M. Pain Management and Regional Anesthesia for the Dental Patient. *Topics in Companion Animal Medicine* **23**, 106–114 (2008).
108. Bvms, S. R. & Decawbm, D. D. Duncan Lascelles BSc BVSc PhD DSAS DECVS DACVS MRCVS (USA).
109. Abdalla, H. B., Jain, A. K., Napimoga, M. H., Clemente-Napimoga, J. T. & Gill, H. S. Microneedles Coated with Tramadol Exhibit Antinociceptive Effect in a Rat Model of Temporomandibular Hypernociception. *J Pharmacol Exp Ther* **370**, 834–842 (2019).
110. Grubb, T. Chronic Neuropathic Pain in Veterinary Patients. *Topics in Companion Animal Medicine* **25**, 45–52 (2010).

111. Du, G. *et al.* Polymeric microneedle-mediated transdermal delivery of melittin for rheumatoid arthritis treatment. *Journal of Controlled Release* **336**, 537–548 (2021).
112. Zheng, L. *et al.* Co-delivery of drugs by adhesive transdermal patches equipped with dissolving microneedles for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release* **365**, 274–285 (2024).
113. Fördös, I., Fazekas, J., Singer, J. & Jensen-Jarolim, E. Translating clinical trials from human to veterinary oncology and back. *Journal of Translational Medicine* **13**, 265 (2015).
114. Jiang, Y., Feng, C., Wang, W., Qian, H. & Xu, L. Recent Advances in the Multifunctional Microneedles: From Design to Cancer Preventing, Diagnosis, and Treatment. *Advanced Materials Technologies* **8**, 2300688 (2023).
115. Polton, G. *et al.* Melanoma of the dog and cat: consensus and guidelines. *Front Vet Sci* **11**, 1359426 (2024).
116. Shan, Y., Tan, B., Zhang, M., Xie, X. & Liao, J. Restorative biodegradable two-layered hybrid microneedles for melanoma photothermal/chemo co-therapy and wound healing. *Journal of Nanobiotechnology* **20**, 238 (2022).
117. Zeng, Y., Zhou, H., Ding, J. & Zhou, W. Cell membrane inspired nano-shell enabling long-acting Glucose Oxidase for Melanoma starvation therapy via microneedles-based percutaneous delivery. *Theranostics* **11**, 8270–8282 (2021).
118. Bhatnagar, S., Bankar, N. G., Kulkarni, M. V. & Venuganti, V. V. K. Dissolvable microneedle patch containing doxorubicin and docetaxel is effective in 4T1 xenografted breast cancer mouse model. *Int J Pharm* **556**, 263–275 (2019).
119. Pustular Diseases of the Epidermis. in *Skin Diseases of the Dog and Cat* 1–26 (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
120. Lee, W. *et al.* 3D-Printed Microfluidic Device for the Detection of Pathogenic Bacteria Using Size-based Separation in Helical Channel with Trapezoid Cross-Section. *Sci Rep* **5**, 7717 (2015).
121. Arshad, M. S. *et al.* Antibiofilm Effects of Macrolide Loaded Microneedle Patches: Prospects in Healing Infected Wounds. *Pharm Res* **38**, 165–177 (2021).
122. Park, S. Y. *et al.* Wound healing potential of antibacterial microneedles loaded with green tea extracts. *Materials Science and Engineering: C* **42**, 757–762 (2014).
123. Martínez-Navarrete, M. *et al.* Cyclosporin A-loaded dissolving microneedles for dermatitis therapy: Development, characterisation and efficacy in a delayed-type hypersensitivity in vivo model. *Drug Deliv Transl Res* **14**, 3404–3421 (2024).
124. Zhang, X. *et al.* Immunomodulatory microneedle patch for periodontal tissue regeneration. *Matter* **5**, 666–682 (2022).
125. Qu, X. *et al.* Microneedle patches containing mesoporous polydopamine nanoparticles loaded with triamcinolone acetonide for the treatment of oral mucositis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, (2023).
126. Li, H. *et al.* Facile minocycline deployment in gingiva using a dissolvable microneedle patch for the adjunctive treatment of periodontal disease. *Bioeng Transl Med* **10**, e10730 (2024).
127. Fan, L., He, D., Ren, S. & Sun, J. Topical Application of Microneedling and a Hyaluronic Acid Gel Promotes Periodontal Soft Tissue Regeneration *in Vivo* . *J. hard tissue biol.* **32**, 167–176 (2023).
128. Sengoz Sirin, O., Çetin, M. & Neyse, B. Evaluation of eye diseases in cats and dogs: A retrospective study: 200 cases (2021-2022). *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **8**, 44–49 (2023).
129. Williams, D. L. Welfare issues in farm animal ophthalmology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **26**, 427–435 (2010).
130. Baeyens, V. *et al.* Ocular drug delivery in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* **28**, 335–361 (1997).
131. Thakur Singh, R. R. *et al.* Minimally invasive microneedles for ocular drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **14**, 525–537 (2017).
132. Thakur, R. R. S. *et al.* Rapidly dissolving polymeric microneedles for minimally invasive intraocular drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* **6**, 800–815 (2016).

133. Roy, G., Garg, P. & Venuganti, V. V. K. Microneedle scleral patch for minimally invasive delivery of triamcinolone to the posterior segment of eye. *International Journal of Pharmaceutics* **612**, 121305 (2022).
134. Roy, G. *et al.* Amphotericin B containing microneedle ocular patch for effective treatment of fungal keratitis. *International Journal of Pharmaceutics* **572**, 118808 (2019).
135. Bhatnagar, S. *et al.* Corneal delivery of besifloxacin using rapidly dissolving polymeric microneedles. *Drug Deliv Transl Res* **8**, 473–483 (2018).
136. Ribet, F. *et al.* Microneedle Patch for Painless Intradermal Collection of Interstitial Fluid Enabling Multianalyte Measurement of Small Molecules, SARS-CoV-2 Antibodies, and Protein Profiling. *Adv Healthc Mater* **12**, e2202564 (2023).
137. Liu, Y., Yu, Q., Luo, X., Yang, L. & Cui, Y. Continuous monitoring of diabetes with an integrated microneedle biosensing device through 3D printing. *Microsyst Nanoeng* **7**, 1–12 (2021).
138. Ertas, Y. N. *et al.* Diagnostic, Therapeutic, and Theranostic Multifunctional Microneedles. *Small* **20**, 2308479 (2024).
139. I, S. A., Priya, C., Premkumar, R. & S.M, H. N. Real Time Cattle Health Monitoring and Early Disease Detection Using IoT and Machine Learning. in *2024 5th International Conference on Electronics and Sustainable Communication Systems (ICESC)* 450–455 (2024).
140. Kappes, A. *et al.* Livestock health and disease economics: a scoping review of selected literature. *Front Vet Sci* **10**, 1168649 (2023).
141. Singh, R. K. *et al.* A Comprehensive Review on Equine Influenza Virus: Etiology, Epidemiology, Pathobiology, Advances in Developing Diagnostics, Vaccines, and Control Strategies. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
142. Blicharz, T. M. *et al.* Microneedle-based device for the one-step painless collection of capillary blood samples. *Nat Biomed Eng* **2**, 151–157 (2018).
143. Selander, D., Dhunér, K.-G. & Lundborg, G. Peripheral Nerve Injury due to Injection Needles used for Regional Anesthesia. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **21**, 182–188 (1977).
144. Tehrani, F. *et al.* An integrated wearable microneedle array for the continuous monitoring of multiple biomarkers in interstitial fluid. *Nat. Biomed. Eng* **6**, 1214–1224 (2022).
145. Li, H. *et al.* Microneedle-Based Potentiometric Sensing System for Continuous Monitoring of Multiple Electrolytes in Skin Interstitial Fluids. *ACS Sens.* **6**, 2181–2190 (2021).
146. Song, S. *et al.* A CMOS VEGF Sensor for Cancer Diagnosis Using a Peptide Aptamer-Based Functionalized Microneedle. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* **13**, 1288–1299 (2019).
147. Jiang, X. & Lillehoj, P. B. Microneedle-based skin patch for blood-free rapid diagnostic testing. *Microsyst Nanoeng* **6**, 1–11 (2020).
148. Gałęska, E., Wrzecińska, M., Kowalczyk, A. & Araujo, J. P. Reproductive Consequences of Electrolyte Disturbances in Domestic Animals. *Biology* **11**, 1006 (2022).
149. Hyypä, S. & Pösö, A. R. Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Responses to Exercise in Racehorses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **14**, 121–136 (1998).
150. Dixon, R. V. *et al.* Microneedle-based devices for point-of-care infectious disease diagnostics. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **11**, 2344–2361 (2021).
151. Alberts, B. *et al.* From DNA to RNA. in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (Garland Science, 2002).
152. Ngoc, L. T. N. & Lee, Y.-C. Current Trends in RNA Virus Detection via Nucleic Acid Isothermal Amplification-Based Platforms. *Biosensors* **14**, 97 (2024).
153. Kang, T., Lu, J., Yu, T., Long, Y. & Liu, G. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID-19 point-of-care diagnostics as an example. *Biosensors and Bioelectronics* **206**, 114109 (2022).
154. Zu, Y., Chang, H. & Cui, Z. Molecular point-of-care testing technologies: Current status and challenges. *Nexus* **2**, 100059 (2025).
155. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**, E63 (2000).

156. Yang, S. & Rothman, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* **4**, 337–348 (2004).
157. Haq, F. *et al.* Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)-based diagnosis: A potential alternative to quantitative real-time PCR based detection of the novel SARS-COV-2 virus. *Saudi Journal of Biological Sciences* **28**, 942–947 (2021).
158. Augustine, R. *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology* **9**, 182 (2020).
159. Soroka, M., Wasowicz, B. & Rymaszewska, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells* **10**, 1931 (2021).
160. Fukuta, S. *et al.* Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch Virol* **148**, 1713–1720 (2003).
161. Tao, Z.-Y. *et al.* Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of Plasmodium vivax infection. *Parasit Vectors* **4**, 115 (2011).
162. Paris, D. *et al.* Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of the Diagnosis of Falciparum Malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **77**, 972–6 (2007).
163. Mauk, M. G., Song, J., Liu, C. & Bau, H. H. Simple Approaches to Minimally-Instrumented, Microfluidic-Based Point-of-Care Nucleic Acid Amplification Tests. *Biosensors (Basel)* **8**, 17 (2018).
164. Kellner, M. J. *et al.* A Rapid, Highly Sensitive and Open-Access SARS-CoV-2 Detection Assay for Laboratory and Home Testing. *Front Mol Biosci* **9**, 801309 (2022).
165. Rodriguez-Manzano, J. *et al.* Reading Out Single-Molecule Digital RNA and DNA Isothermal Amplification in Nanoliter Volumes with Unmodified Camera Phones. *ACS Nano* **10**, 3102–3113 (2016).
166. Garg, N., Ahmad, F. J. & Kar, S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr Res Microb Sci* **3**, 100120 (2022).
167. Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T. & Ismagilov, R. F. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Res* **48**, e42 (2020).
168. Rajko-Nenow, P. *et al.* A rapid RT-LAMP assay for the detection of all four lineages of Peste des Petits Ruminants Virus. *Journal of Virological Methods* **274**, 113730 (2019).
169. Chen, H., Zhang, J., Liu, Y. & Liu, X. Detection of foot-and-mouth disease virus rna by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virol J* **8**, 510 (2011).
170. El-Kholy, A. A., Abdelrahman, K. & Soliman, H. Rapid detection of BoHV-1 genomic DNA by loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods* **204**, 81–85 (2014).
171. Chen, L. *et al.* A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus. *Virol Sin* **25**, 59–64 (2010).
172. James, H. E. *et al.* Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* **164**, 68–74 (2010).
173. Storms, S. M., Shisler, J., Nguyen, T. H., Zuckermann, F. A. & Lowe, J. F. Lateral flow paired with RT-LAMP: A speedy solution for Influenza A virus detection in swine. *Veterinary Microbiology* **296**, 110174 (2024).
174. Chen, H. *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of infectious bronchitis virus in infected chicken tissues. *Mol Cell Probes* **24**, 104–106 (2010).
175. Kursa, O., Woźniakowski, G., Tomczyk, G., Sawicka, A. & Minta, Z. Rapid detection of Mycoplasma synoviae by loop-mediated isothermal amplification. *Arch Microbiol* **197**, 319–325 (2015).
176. Kim, J.-M. *et al.* Simple and Rapid Colorimetric Detection of Canine Parainfluenza Virus 5 (Orthorubulavirus mammalis) Using a Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Pathogens* **12**, 921 (2023).

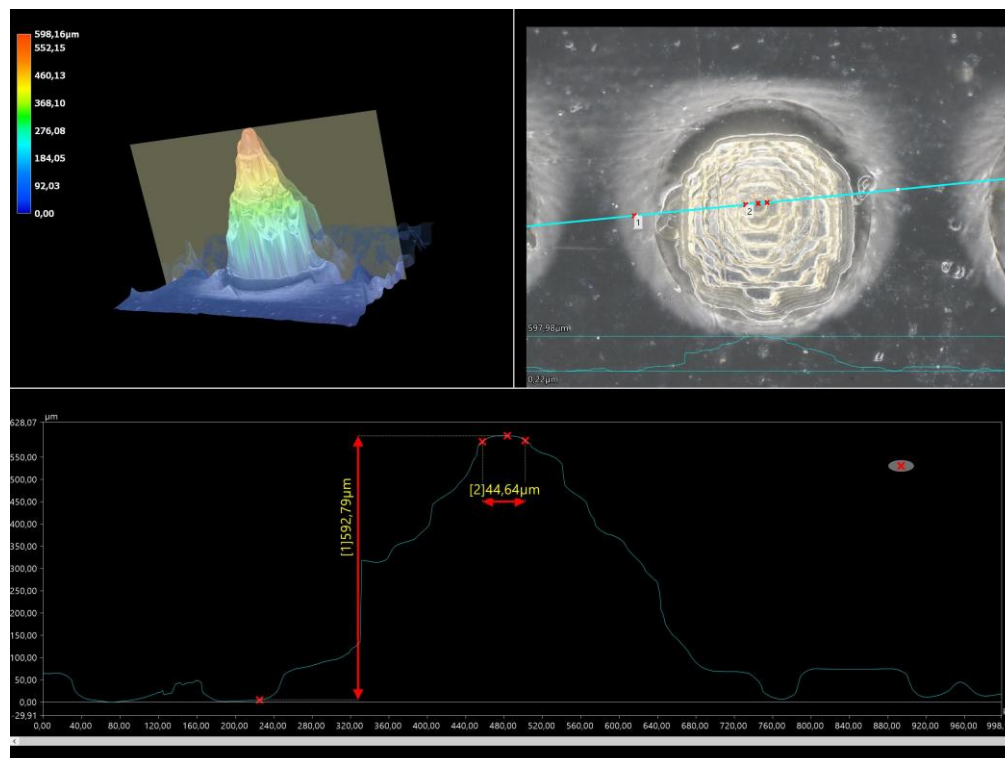
177. Liu, D.-F. *et al.* Establishment of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection and differentiation of canine distemper virus infected and vaccinated animals. *Infect Genet Evol* **32**, 102–106 (2015).
178. Shen, H. *et al.* Comparison of dye-based and probe-based RT-LAMP in detection of canine astrovirus. *Arch Virol* **169**, 21 (2024).
179. Khamsingnok, P. *et al.* Comparison of PCR, Nested PCR, and RT-LAMP for Rapid Detection of Feline Calicivirus Infection in Clinical Samples. *Animals* **14**, 2432 (2024).
180. Waheed, S. *et al.* 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab Chip* **16**, 1993–2013 (2016).
181. Hull, C. W. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. (1986).
182. Schubert, C., Langeveld, M. C. van & Donoso, L. A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *British Journal of Ophthalmology* **98**, 159–161 (2014).
183. Pervaiz, S., Qureshi, T. A., Kashwani, G. & Kannan, S. 3D Printing of Fiber-Reinforced Plastic Composites Using Fused Deposition Modeling: A Status Review. *Materials* **14**, 4520 (2021).
184. Bishop, G. W. *et al.* 3D-Printed Fluidic Devices for Nanoparticle Preparation and Flow-Injection Amperometry Using Integrated Prussian Blue Nanoparticle-Modified Electrodes. *Anal. Chem.* **87**, 5437–5443 (2015).
185. Kadimisetty, K. *et al.* 3D-printed supercapacitor-powered electrochemiluminescent protein immunoarray. *Biosensors and Bioelectronics* **77**, 188–193 (2016).
186. Chen, C., Wang, Y., Lockwood, S. Y. & Spence, D. M. 3D-printed fluidic devices enable quantitative evaluation of blood components in modified storage solutions for use in transfusion medicine. *Analyst* **139**, 3219–3226 (2014).
187. Kadimisetty, K., Malla, S. & Rusling, J. F. Automated 3-D Printed Arrays to Evaluate Genotoxic Chemistry: E-Cigarettes and Water Samples. *ACS Sens.* **2**, 670–678 (2017).
188. 3D printed microfluidic devices with integrated versatile and reusable electrodes - Lab on a Chip (RSC Publishing). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/lc/c4lc00171k>.
189. Anderson, K. B., Lockwood, S. Y., Martin, R. S. & Spence, D. M. A 3D Printed Fluidic Device that Enables Integrated Features. *Anal. Chem.* **85**, 5622–5626 (2013).
190. Xu, J., Harasek, M. & Gföhler, M. From Soft Lithography to 3D Printing: Current Status and Future of Microfluidic Device Fabrication. *Polymers* **17**, 455 (2025).
191. Achinas, S., Heins, J.-I., Krooneman, J. & Euverink, G. J. W. Miniaturization and 3D Printing of Bioreactors: A Technological Mini Review. *Micromachines* **11**, 853 (2020).
192. Razzaghi, M., Alexander Ninan, J. & Akbari, M. Advancements in Materials for 3D-Printed Microneedle Arrays: Enhancing Performance and Biocompatibility. *Micromachines* **15**, 1433 (2024).
193. Mamo, H. B., Adamiak, M. & Kunwar, A. 3D printed biomedical devices and their applications: A review on state-of-the-art technologies, existing challenges, and future perspectives. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **143**, 105930 (2023).
194. Carrasco-Correa, E. J., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M. & Miró, M. The emerging role of 3D printing in the fabrication of detection systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **136**, 116177 (2021).
195. Xiao, Y. *et al.* Fully integrated and automated centrifugal microfluidic chip for point-of-care multiplexed molecular diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* **255**, 116240 (2024).
196. Jawad, M. *et al.* A disposable, passive microfluidic cartridge for point-of-care detection of antibodies in total capillary blood based on hemagglutination and machine-learning assisted interpretation. *RSC Adv.* **15**, 43322–43333 (2025).
197. Papamatthaiou, S., Menelaou, P., El Achab Oussallam, B. & Moschou, D. Recent advances in bio-microsystem integration and Lab-on-PCB technology. *Microsyst Nanoeng* **11**, 78 (2025).
198. Cutuli, E., Sanalitra, D., Stella, G., Saitta, L. & Bucolo, M. A 3D-Printed Micro-Optofluidic Chamber for Fluid Characterization and Microparticle Velocity Detection. *Micromachines* **14**, 2115 (2023).

199. Kariman, B. S. *et al.* High dioptric power micro-lenses fabricated by two-photon polymerization. *Opt Express* **32**, 48114–48131 (2024).
200. Selemanni, M. A., Cenhrang, K., Azibere, S., Singhateh, M. & Martin, R. S. 3D printed microfluidic devices with electrodes for electrochemical analysis. *Anal. Methods* **16**, 6941–6953 (2024).
201. Wang, A. *et al.* A 3D-Printed Microfluidic Device for qPCR Detection of Macrolide-Resistant Mutations of *Mycoplasma pneumoniae*. *Biosensors (Basel)* **11**, 427 (2021).
202. Hinnen, H., Viglione, M., Munro, T. R., Woolley, A. T. & Nordin, G. P. 3D-Printed Microfluidic One-Way Valves and Pumps. *Micromachines* **14**, 1286 (2023).
203. Silva, T. E. A.-R., Kohler, S., Bartsch, N., Beuschlein, F. & Guentner, A. T. 3D printing by two-photon polymerization of hollow microneedles for interstitial fluid extractionm(2024).
204. Papadakis, G. *et al.* Portable real-time colorimetric LAMP-device for rapid quantitative detection of nucleic acids in crude samples. *Sci Rep* **12**, 3775 (2022).
205. Pearce, J. M. Distributed Manufacturing of Open Source Medical Hardware for Pandemics. *Journal of Manufacturing and Materials Processing* **4**, 49 (2020).
206. Alawsi, T. & Al-Bawi, Z. A review of smartphone point-of-care adapter design. *Engineering Reports* **1**, e12039 (2019).
207. Kadimisetty, K. *et al.* Fully 3D Printed Integrated Reactor Array for Point-of-Care Molecular Diagnostics. *Biosens Bioelectron* **109**, 156–163 (2018).
208. El-Tholoth, M., Bai, H., Mauk, M. G., Saif, L. & Bau, H. H. A portable, 3D printed, microfluidic device for multiplexed, real time, molecular detection of the porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine deltacoronavirus at the point of need. *Lab Chip* **21**, 1118–1130 (2021).
209. Alparslan, C. & Bayraktar, Ş. Advances in Digital Light Processing (DLP) Bioprinting: A Review of Biomaterials and Its Applications, Innovations, Challenges, and Future Perspectives. *Polymers* **17**, 1287 (2025).
210. Luo, Z. *et al.* Digital light processing 3D printing for microfluidic chips with enhanced resolution via dosing- and zoning-controlled vat photopolymerization. *Microsyst Nanoeng* **9**, 103 (2023).
211. Hu, Y., Luo, Z. & Bao, Y. Trends in Photopolymerization 3D Printing for Advanced Drug Delivery Applications. *Biomacromolecules* **26**, 85–117 (2025).
212. Chaudhary, R. *et al.* Additive manufacturing by digital light processing: a review. *Prog Addit Manuf* **8**, 331–351 (2023).
213. Lee, S. W. & Lee, S. S. Shrinkage ratio of PDMS and its alignment method for the wafer level process. *Microsyst Technol* **14**, 205–208 (2008).
214. Lee, J. W., Park, J.-H. & Prausnitz, M. R. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials* **29**, 2113–2124 (2008).
215. Davis, S. P., Landis, B. J., Adams, Z. H., Allen, M. G. & Prausnitz, M. R. Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *Journal of Biomechanics* **37**, 1155–1163 (2004).
216. Albadr, A. A. *et al.* Rapidly dissolving microneedle patch of amphotericin B for intracorneal fungal infections. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **12**, 931–943 (2022).
217. Affolter, V. K. & Moore, P. F. Histologic features of normal canine and feline skin. *Clinics in Dermatology* **12**, 491–497 (1994).
218. Di Stasio, D. *et al.* Measurement of Oral Epithelial Thickness by Optical Coherence Tomography. *Diagnostics (Basel)* **9**, 90 (2019).
219. Park, J.-W. Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests. *Biosensors* **12**, 857 (2022).
220. Khamsingnok, P. *et al.* Comparison of PCR, Nested PCR, and RT-LAMP for Rapid Detection of Feline Calicivirus Infection in Clinical Samples. *Animals* **14**, 2432 (2024).
221. Écija-Arenas, Á., Román Pizarro, V. & Juan Manuel, F.-R. Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device. *Microchimica Acta* **187**, (2020).

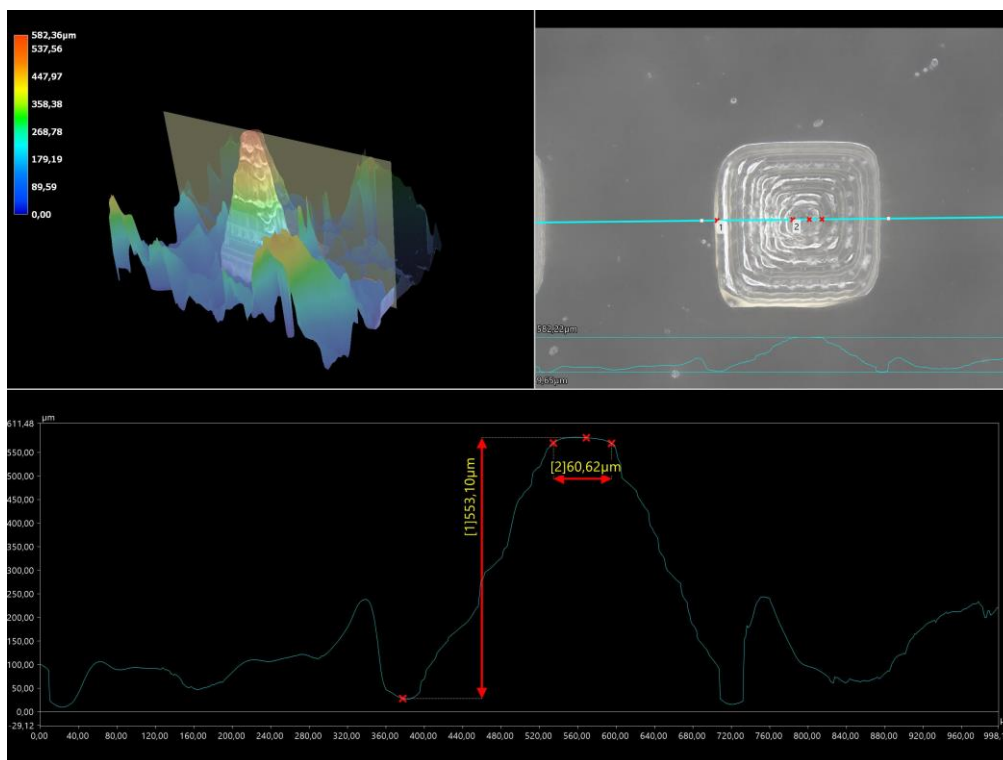
222. Bucciarelli, A. *et al.* VAT photopolymerization 3D printing optimization of high aspect ratio structures for additive manufacturing of chips towards biomedical applications. *Additive Manufacturing* **60**, 103200 (2022).
223. Beckwith, A. L., Borenstein, J. T. & Velásquez-García, L. F. Monolithic, 3D-Printed Microfluidic Platform for Recapitulation of Dynamic Tumor Microenvironments. *Journal of Microelectromechanical Systems* **27**, 1009–1022 (2018).
224. Walczak, R. *et al.* Portable Laboratories in Suitcases Utilizing Microfluidic Chips for Identification of Bacteria and Virus Pathogens as a New tool of EU Countries Biological Threats Defense Strategy. *Procedia Engineering* **168**, 163–167 (2016).
225. Beckwith, A. L., Borenstein, J. T. & Velásquez-García, L. F. Monolithic, 3D-Printed Microfluidic Platform for Recapitulation of Dynamic Tumor Microenvironments. *Journal of Microelectromechanical Systems* **27**, 1009–1022 (2018).
226. Su, R., Wang, F. & McAlpine, M. C. 3D printed microfluidics: advances in strategies, integration, and applications. *Lab Chip* **23**, 1279–1299 (2023).
227. Pumford, E. A. *et al.* Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* **170**, 112674 (2020).
228. Pierson-Perry, J. F. *et al.* Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition.
229. Dao Thi, V. L. *et al.* A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med* **12**, eabc7075 (2020).
230. Strohmaier-Nguyen, D., Horn, C. & Baeumner, A. J. Innovations in one-step point-of-care testing within microfluidics and lateral flow assays for shaping the future of healthcare. *Biosensors and Bioelectronics* **267**, 116795 (2025).
231. Sarbaland, F. bin N. *et al.* Temperature Control in Microfluidic Devices: Approaches, Challenges, and Future Directions. *Applied Sciences* **15**, 9902 (2025).
232. Kodzius, R. *et al.* Inhibitory effect of common microfluidic materials on PCR outcome. *Sensors and Actuators B: Chemical* **161**, 349–358 (2012).

Załącznik nr 1

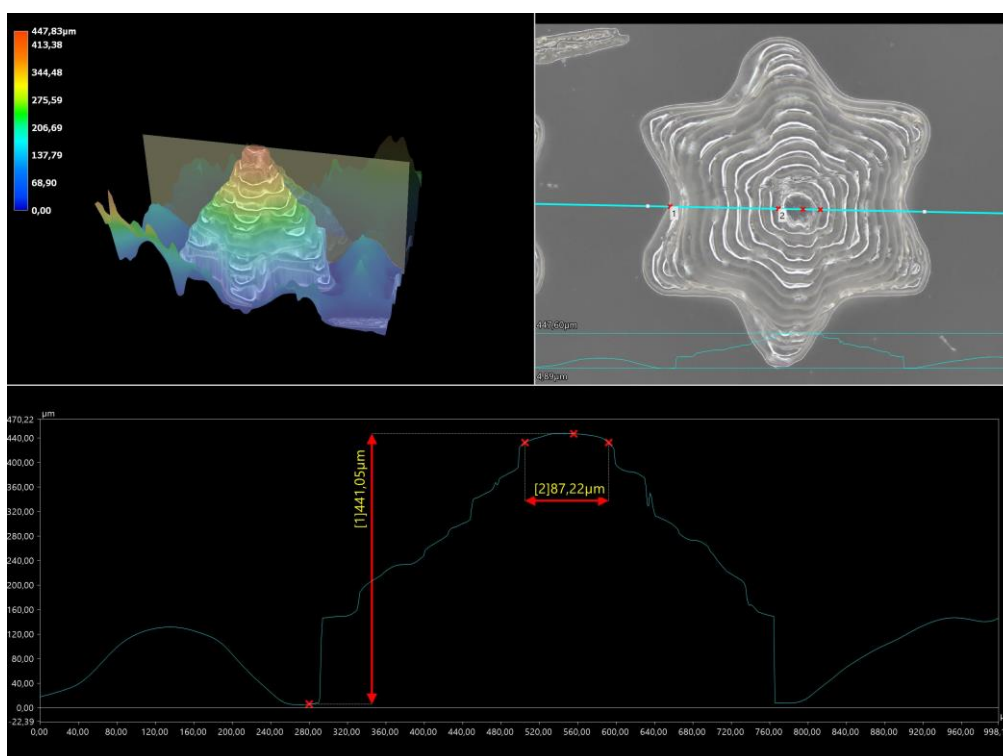
Do podrozdziału 6.1 Wytwarzanie mikroigłowych matryc.



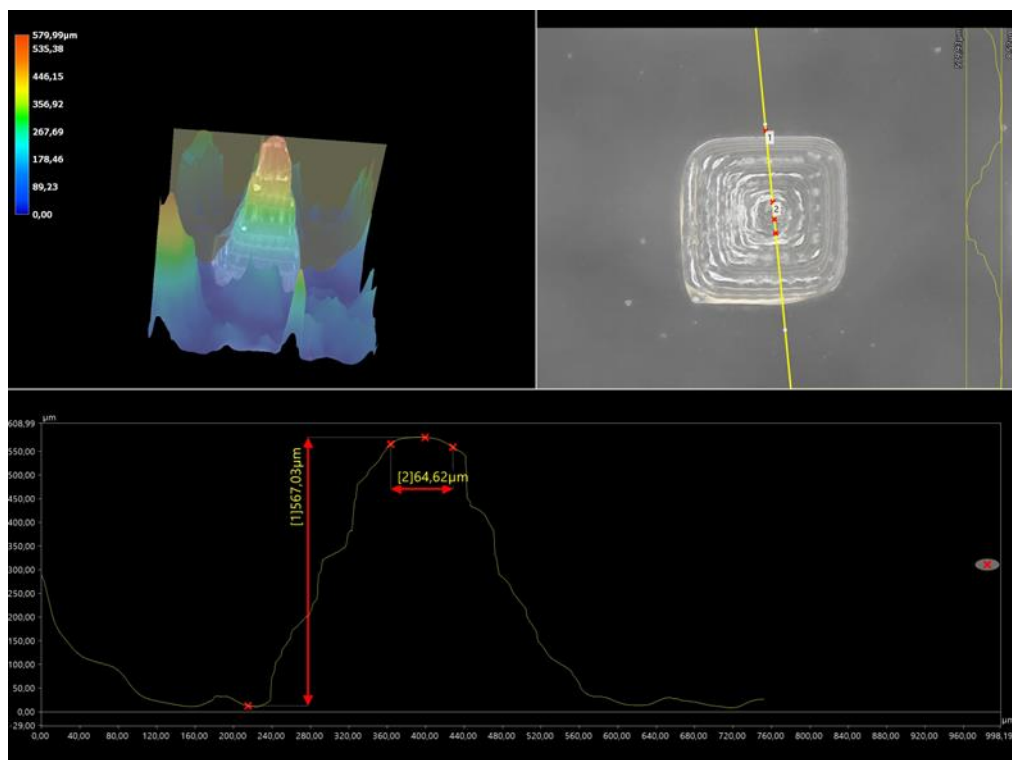
Rysunek 1 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **geometrii stożkowej** -trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.



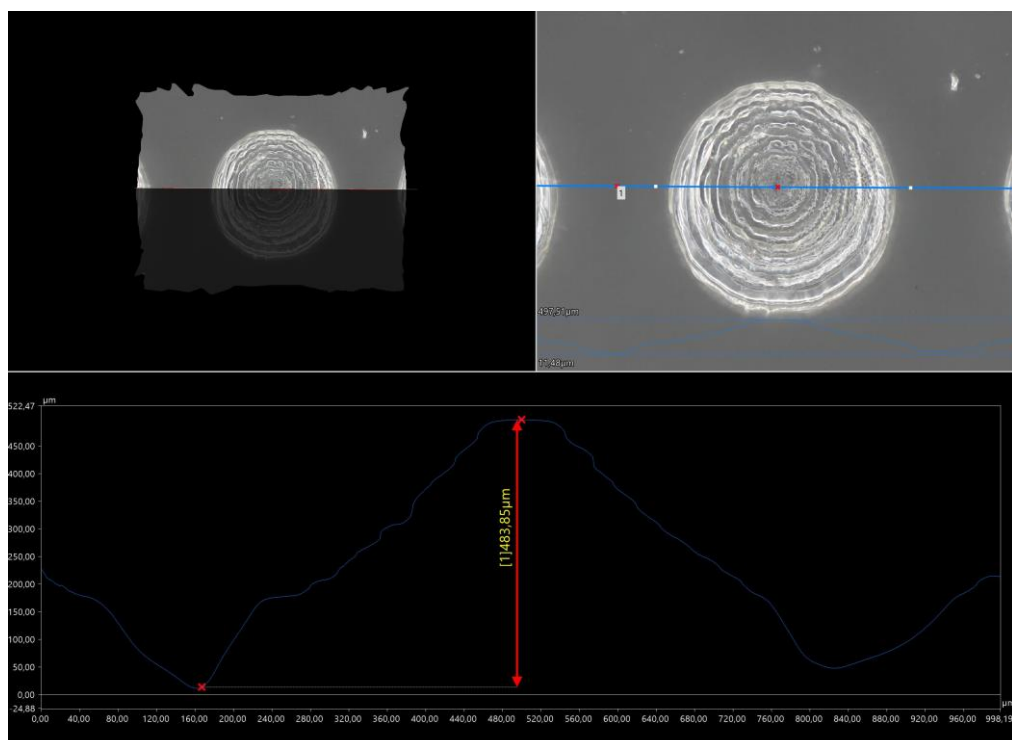
Rysunek 2 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **geometrii piramidalnej** -trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.



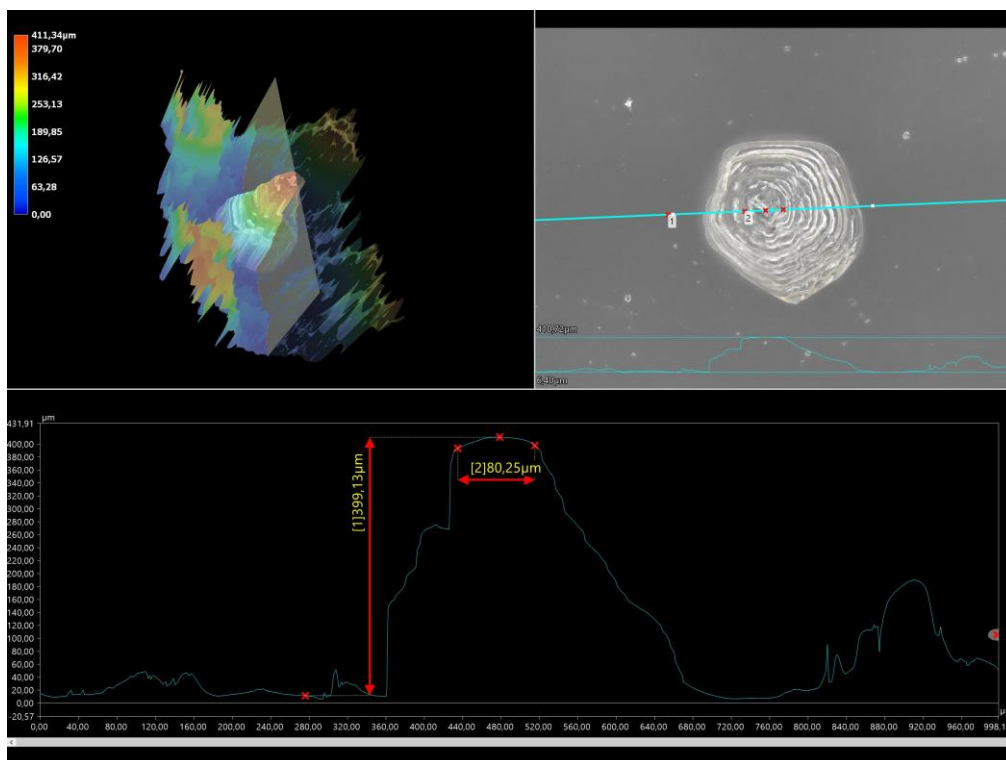
Rysunek 3 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **geometrii gwiaździstej** -trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.



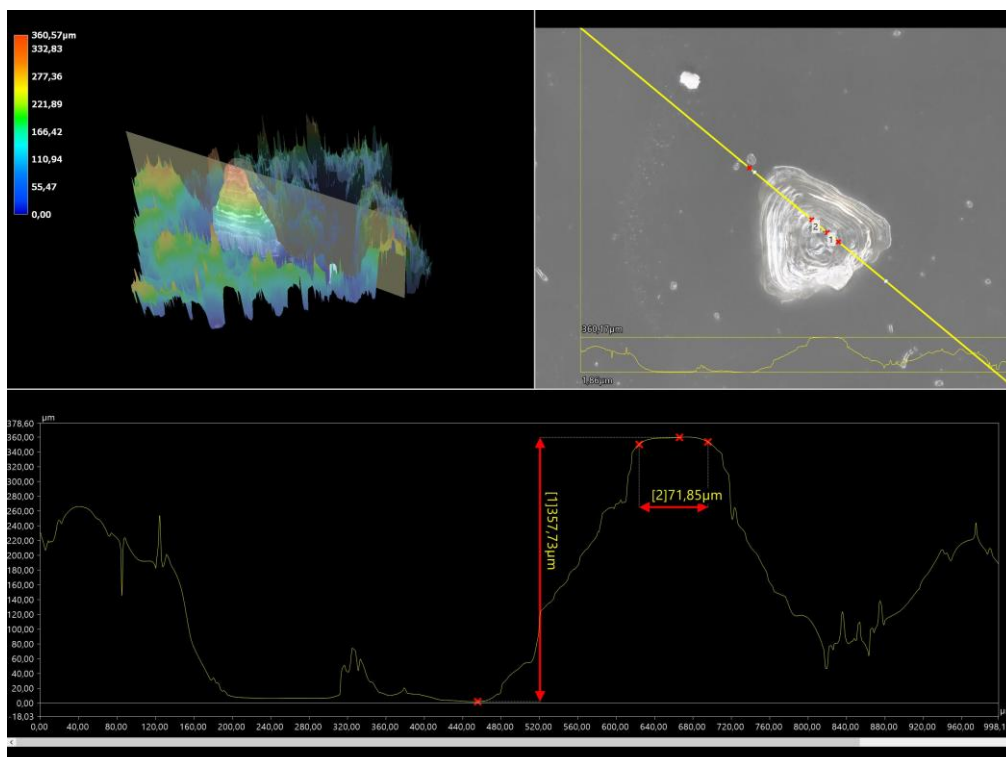
Rysunek 4 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **kształcie grotu z kwadratową podstawą** - trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.



Rysunek 5 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **kształcie grotu z okrągłą podstawą** - trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.



Rysunek 6 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **kształcie pięciokąta** - trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.



Rysunek 7 Charakterystyka morfologiczna mikroigieł wykonanych z PVP/PVA o **kształcie trójkąta** - trójwymiarowa rekonstrukcja topografii pojedynczej mikroigły, wraz z odpowiadającym obrazem w płaszczyźnie XY oraz profilem wysokości wzdłuż zaznaczonej linii pomiarowej.