



На правах рукописи

Мыльникова Алёна Николаевна

**Разработка микрофлюидной модели кровеносного сосуда для изучения  
функциональных свойств эндотелиальных клеток**

Специальность: 1.5.6 – Биотехнология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Москва – 2024

---

Работа выполнена на кафедре Химии и технологии биомедицинских препаратов РХТУ им. Д.И. Менделеева и в лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии наук

Научный руководитель:

**Московцев Алексей Александрович,**

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного стресса, руководитель ЦКП ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии наук

Официальные оппоненты:

**Смирнов Иван Витальевич,**

член-корреспондент РАН, доктор химических наук заместитель директора по науке, главный научный сотрудник Лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Акатов Владимир Семёнович,**

доктор физико-математических наук, профессор, заведующий Лабораторией тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства

Защита диссертации состоится «24» декабря 2024 года в 16<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета 99.0.027.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», по адресу: 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9, в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» и на сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
99.0.027.03, к.т.н.



И. В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** За последние три десятилетия фундаментальные и прикладные исследования в области биохимии и биотехнологии претерпели значительную техническую модернизацию, выражающуюся в уменьшении размеров ряда лабораторных и диагностических устройств и улучшении их технологических показателей. Так, в настоящее время перспективным вектором развития современных биомедицинских исследований является создание компактных и многофункциональных устройств, выступающих в роли биологических моделей тканей и органов, применимых для изучения нормальных и патологических процессов. Одной из важнейших задач при разработке подобных моделей становится поддержание в них гидродинамических условий, приближенных к физиологическим, так как гидродинамический режим оказывает значительное влияние на фенотип и ряд аспектов жизнедеятельности клеток, таких как адгезия, проницаемость клеточных мембран и ряд других параметров. В физиологических условиях, в микрососудистом русле, как правило, устанавливается ламинарный режим течения жидкости, в то время как традиционные методы культивирования клеток предполагают проведение процессов в статических условиях или в условиях турбулентного потока, не соответствующих нормальным условиям. Решением данной проблемы может быть использование при создании биологических моделей микрофлюидной технологии [1, 2].

Иными словами, с точки зрения молекулярной биологии, медицины и диагностики микрофлюидика – это возможность сделать шаг в сторону приближения исследований *in vitro* к реальным процессам, протекающим в организме, а, значит, получать более точные результаты при уменьшении затрат на их получение. Создание микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе позволяет решать не только фундаментальные задачи в понимании физиологических процессов на уровне единичной клетки и ткани в целом, но и прикладные медицинские вопросы: например, с помощью таких устройств будет возможно осуществлять проверку действия лекарственных препаратов, новых способов доставки биологически активных веществ в клетку, биосовместимости имплантов в сердечно-сосудистой хирургии и решать ряд других вопросов.

Поскольку наиболее чувствительными к условиям потока системам человеческого организма, безусловно, можно отнести кровеносную, одним из перспективных направлений развития микрофлюидных технологий в этой области можно назвать создание биологических моделей кровеносных сосудов. На сегодняшний день с использованием микрофлюидных методов разработан ряд моделей сосудов, однако далеко еще не все

фундаментальные процессы, связанные с адаптацией клеток к потоку, хорошо изучены, поэтому дальнейшие работы в этой области имеют большой научный и практический потенциал.

**Цель работы:** создание клеточно-тканевой модели кровеносного сосуда с применением микрофлюидной технологии.

**Задачи работы:**

1. Проектирование микрофлюидного устройства для имитации участка кровеносного сосуда, расчет его основных гидродинамических параметров и компьютерное моделирование с использованием методов вычислительной гидродинамики;
2. Выбор материалов, изготовление, сборка стендовой микрофлюидной системы и оптимизация протокола культивирования эндотелиальных клеток в системе;
3. Изучение влияния сдвиговой деформации, создаваемой потоком, на адаптацию к ней эндотелиальных клеток.

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые получена микрофлюидная модель кровеносного сосуда с применением клеточной линии EA.hy926. Данная клеточная линия является эндотелиоцитоподобной с адгезивным типом роста и представляет собой стандартную клеточную модель, подходящую для имитации сосудистого эндотелия.

Разработанный объект не имеет запатентованных аналогов и имеет широкий потенциал для научного и практического применения, в том числе в клинических испытаниях доставки лекарственных веществ в клетку и биосовместимости сосудистых имплантов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Проведенные исследования по оптимизации геометрии устройства, критический выбор подложек и полимерной основы, метода модификации поверхности микрофлюидного устройства и оптимизированный протокол культивирования клеток в микроканале могут быть учтены и использованы при проектировании других микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе.

Созданная микрофлюидная модель эндотелиальной выстилки кровеносного сосуда может быть использована для изучения влияния гидродинамического режима, создаваемого током крови по сосудам, на основные параметры жизнедеятельности эндотелиальных клеток, таких, как выживаемость, степень адгезии, проницаемость клеточных мембран, продукция монооксида азота (NO) и изменение уровня экспрессии белковых факторов, вовлеченных в ответ на стрессовое воздействие на клетку, что позволяет использовать эту модель для изучения регуляции клеточного гомеостаза в условиях потока.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Представленные в работе результаты получены с использованием современных компьютерных программ и физико-химических методик: микроскопии в проходящем свете, оптической конфокальной микроскопии, зондовой ион-проводящей микроскопии, электронной сканирующей и флуоресцентной микроскопии, спектрофлуориметрии. Оценку содержания и распределения исследуемых белковых маркеров в клетках проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**Положения научно-квалификационной работы, выносимые на защиту:**

1) Подход к проектированию микрофлюидной модели для имитации участка кровеносного сосуда требует анализа литературных данных по физиологическим параметрам моделируемого участка сосуда, математического расчета характеристик будущего устройства и компьютерного моделирования гидродинамических параметров с использованием методов вычислительной гидродинамики.

2) Материал для изготовления микрофлюидного устройства должен обеспечивать высокую адгезию клеточной линии к поверхности материала, кроме того, в ряде случаев необходима оптимизация протокола предварительной модификации поверхности подложки.

3) В качестве критериев работоспособности разрабатываемого микрофлюидного устройства может выступать стойкое поддержание жизнеспособности клеточной культуры в течение длительного времени в условиях стендовой системы, что требует оптимизации протокола культивирования клеток в данном формате по сравнению с традиционными методами.

4) Сдвиговая деформация, создаваемая потоком в микрофлюидном устройстве, оказывает влияние на мембранный транспорт, экспрессию белка стрессового ответа GRP78, факторов свёртываемости крови (на примере фактора Виллебранда) и продукцию эндотелиальными клетками монооксида азота (NO).

**Степень достоверности полученных результатов.** Все эксперименты были выполнены на современном оборудовании с корректным использованием методологии научного исследования и в нескольких повторностях. Результаты исследования интерпретировали на основании статистической обработки полученных результатов, а также согласованностью теоретических результатов и экспериментальных данных, что обеспечивает достоверность количественных оценок и исключает субъективность заключений.

### **Апробация работы.**

Работа была представлена на пяти международных конференциях: The European Molecular Biology Laboratory CONFERENCE «Microfluidics», EMBL Heidelberg, Germany, 2016; Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 2017; Актуальная биотехнология, 2022 и на V Всероссийской конференции «Фундаментальные основы мэмс- и нанотехнологий», 2015 г.

**Публикации.** Основные результаты диссертации изложены в 11 печатных работах: 4 статья в научных журналах, включенных в перечень ВАК, 1 из которых индексируется в системе SCOPUS, и 4 тезисах докладов.

**Личный вклад автора** состоит в анализе литературных данных, формулировке и обсуждении задач, решаемых в квалификационной работе, подготовке и проведении экспериментов, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов на конференциях.

Автор выражает особую благодарность н.с. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», директору ООО «Микрофлюидные технологии» Колесову Д.В., к.ф.-м.н., н. с. НИТУ МИСиС Ерофееву А.С. Изготовление матрицы было проведено при поддержке лабораторий МГУ им. М.В. Ломоносова, анализ адгезии клеток к подложкам методом ион-проводящей зондовой микроскопии – при поддержке НИТУ «МИСиС». Отдельные части работы были выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (проект FSSM-2022-0003).

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список цитируемой литературы из 120 ссылок. Работа содержит 3 таблицы, 59 рисунков, 13 формул.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **Введении** дано обоснование актуальности выбранной темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, её научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** – обзор литературы по теме диссертационного исследования содержит 120 литературных ссылок. В обзоре рассмотрены конструкционные особенности и подходы к выбору материалов для микрожидкостных устройств, применяемых в молекулярной биологии, преимущества и недостатки данных технологии, рассмотрены этапы изготовления гистотипических микрофлюидных моделей в сосудистых и других медицинских исследованиях.

**Вторая глава** посвящена обсуждению результатов. В первом разделе отмечены все этапы проектирования устройства, расчет гидродинамических параметров и выбор материала для изготовления модели, изготовление устройства и сборка микрофлюидной стендовой системы.

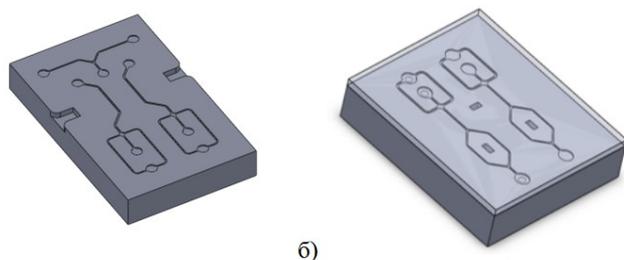
Второй раздел посвящен проверке жизнеспособности спроектированной модели и демонстрации ее практического применения на примере определения влияния гидродинамических параметров на адаптацию эндотелиальных клеток к условиям потока, включая их адгезию, мембранный транспорт флуоресцентных зондов, продукцию монооксида азота (NO), экспрессию GRP78 и фактора Виллибрандта и сопоставление полученных данных с аналогичными, полученными в статических условиях.

**В третьей главе** дано описание используемых материалов и методов проведения экспериментов.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Создание микрофлюидной модели.

В первую очередь воздействию кровотока подвергается артериальный эндотелий, который играет центральную роль в поддержании гомеостаза в ответ на гемодинамические силы и химические сигналы, поэтому для проектирования модели в качестве основных геометрических параметров были взяты параметры, характерные для артериол: диаметр сосуда 100-500 мкм, линейная скорость потока 1-20 см/с (в пересчете на объемную скорость - 5-2000 мкл/мин). Был предложен следующий вариант конструкции, содержащий 2 входных порта для отдельной загрузки среды и клеточной суспензии, 1 выходной порт для сбора прокачиваемой среды и прямой участок канала с сечением 250x200 мкм (рисунок 1 а). Второй вариант геометрии устройства включал помимо прямого участка канала также область с симметричной бифуркацией на два канала с размерами 200x200 мкм (Рисунок 1 б).



а) б)  
Рисунок 1 – Трехмерные модели микрофлюидных устройств: а – содержащая участок прямого сосуда, б – содержащая участок прямого сосуда и области бифуркации.

Представленные модели из-за наличия двух независимых параллельных каналов позволяли проводить одновременно два анализа, что снижало вариабельность по температурному режиму или плотности клеток по сравнению с последовательным измерением.

Для расчёта гидродинамических параметров использовались методы вычислительной гидродинамики.

С учётом быстрого обеднения среды питательными веществами в микроканале за базовые (статические) условия была принята объёмная скорость подачи ростовой среды 1 мкл/мин, а для имитации динамических условий - 400 мкл/мин, что укладывается в физиологический диапазон. На рисунке 2 представлены полученные с помощью программного обеспечения SolidWorks расчетные значения профилей сдвиговых деформаций, создаваемых потоком в условиях низких (1 мкл/мин) и высоких (400 мкл/мин) значений скоростей потока.

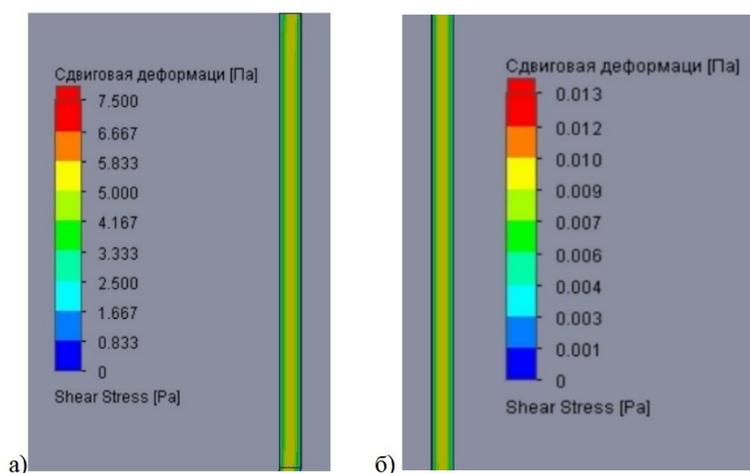


Рисунок 2 – Гидродинамический расчет распределения величин пристеночной сдвиговой деформации в опытном и контрольном каналах при скорости подачи ростовой среды: а – 400 мкл/мин, б – 1 мкл/мин.

оказались сопоставимы с физиологическими, в статических – сопоставимы с условиями отсутствия потока.

Следующим шагом при проектировании был выбор материалов для изготовления устройства – полимерной основы и подложки, на которую будут засеиваться клетки. Поскольку проектируемая модель является моделью участка кровеносного сосуда, в качестве клеточной линии была выбрана стандартная в таких случаях линия EA.Hy926, являющаяся эндотелиоцитоподобной с адгезионным типом роста.

В качестве материалов для основы и подложки был предложен ряд материалов, согласно литературным данным чаще всего применяемых при производстве микрофлюидных систем, и проведен анализ их биосовместимости с выбранной клеточной линией. Всего было подготовлено 14 образцов, представленных в таблице 1. Исследование степени адгезии клеток к подложкам проводилось методом оптической конфокальной микроскопии. В результате эксперимента было установлено, что клетки адгезировали ко всем видам исследуемых подложек. О степени адгезии клеток к субстрату судили по площади, занимаемой клетками в адгезированном состоянии. Статистически обработанные данные приведены на рисунке 3.

Таблица 1. Образцы для анализа адгезии клеток к подложкам

Образец	Материал	Тип модификации поверхности
1	PDMS	-
2	PDMS	плазма кислорода
3	PDMS	коллаген
4	PDMS	плазма кислорода + коллаген
5	Покровное стекло	-
6	Покровное стекло	плазма кислорода
7	Покровное стекло	коллаген
8	Покровное стекло	плазма кислорода + коллаген
9	MS-1002	-
10	MS-1002	плазма кислорода
11	MS-1002	коллаген
12	MS-1002	плазма кислорода + коллаген
13	Полистирол	-
14	Полистирол	коллаген

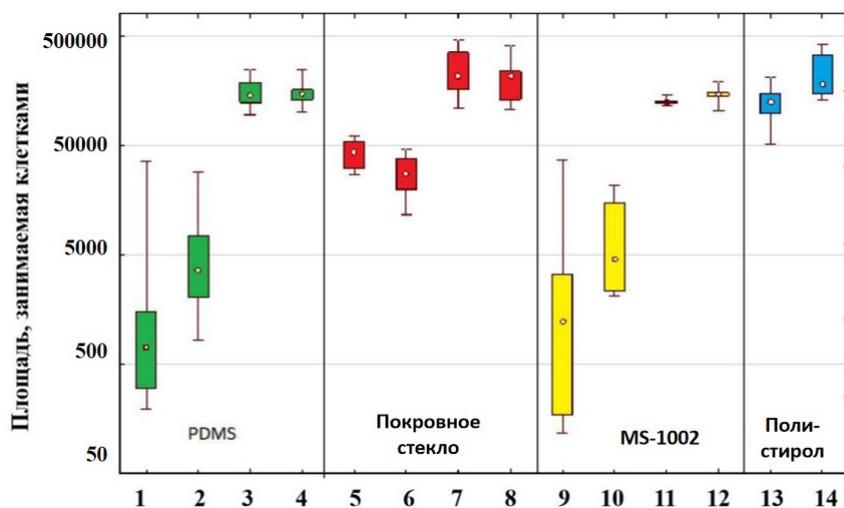


Рисунок 3 – Площадь, занимаемая клетками, адгезировавшими к поверхности различных материалов. Данные представлены как медиана и 25-75 процентиля.

Испытанный впервые полимер MS-1002 продемонстрировал схожие с PDMS свойства в качестве подложки для клеточной адгезии.

Для исследования топологии отдельных клеток был применён метод сканирующей зондовой ион-проводящей микроскопии. Были сняты изображения клеток на трёх наиболее предпочтительных для клеток подложках - образцы 3, 5 и 7 (рисунок 4).

Согласно полученным данным в необработанном состоянии наиболее благоприятными для адгезии материалами оказались полистирол и стекло. Было установлено, что обработка плазмой достоверно не улучшала адгезию, в то время как дополнительное осаждение на поверхности материала коллагена увеличивало адгезивную площадь во всех вариантах подложек.

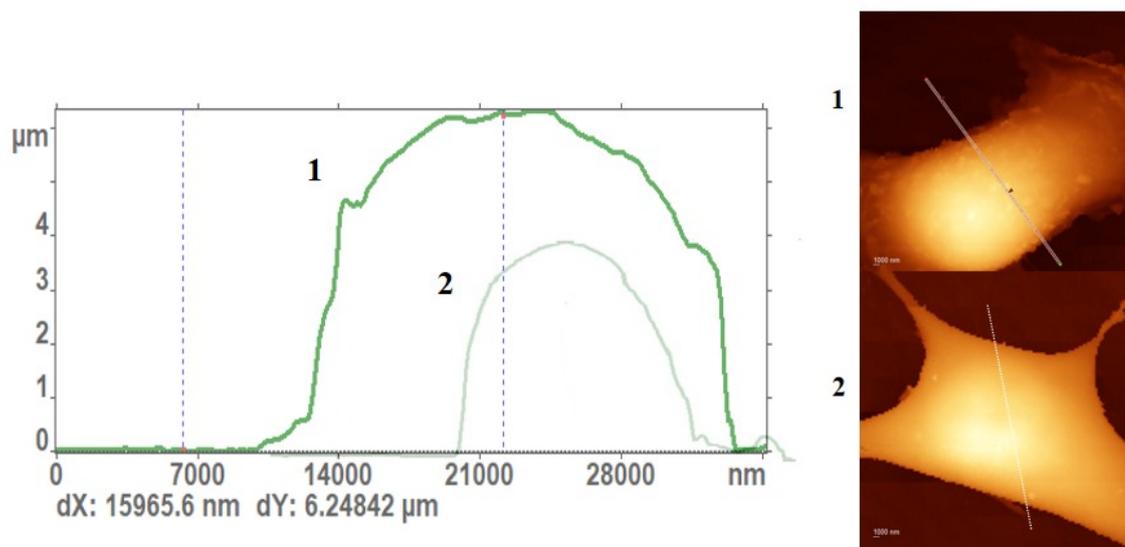


Рисунок 4 – Топография и трехмерная реконструкция клеток EA.Hy926 на поверхности необработанного (1) и обработанного коллагеном (2) стекла

Было обнаружено, что на необработанном стекле (образец 5) максимальная высота клеток составляла 6,0 - 6,5 мкм, они имели округлую форму, что характерно для движения клетки в шарообразном состоянии в поисках благоприятного места для распластывания. На образцах, обработанных коллагеном клетки имели распластную форму, часто вытянутую в нескольких направлениях. Высота клетки в самой высокой части составила 4-4,6 мкм (для PDMS) и 3,7-4,5 мкм (для стекла). Характерным признаком благоприятных условий для адгезии клеток являлось наличие ярко выраженных филоподий.

Таким образом, в качестве наиболее приемлемого материала для подложки было выбрано стекло, обработанное коллагеном, в качестве полимерной основы – PDMS.

Изготовление микрофлюидного устройства проводилось методом мягкой литографии. Матрица для создания полимерной основы была изготовлена методом фрезерования из полиметилметакрилата матрица. После формирования основы из PDMS матрица удалялась, поверхность основы и покровного стекла обрабатывалась кислородной плазмой, после чего их совмещали и прижимали для образования герметичной конструкции. Каналы устройства оснащали трубками из поливинилхлорида Tygon S-54-HL, а в боковой паз устанавливали термодатчик. Места контакта дополнительно герметизировали полидиметилсилоксаном.

Для последовательного монтажа всех элементов системы была разработана схема (рисунок 5). Микрофлюидное устройство посредством клапанного устройства, оснащенного тремя входами (первый порт загрузки) было присоединено к дозирующему шприцевому модулю, объемом 10 мл (NemeSys, Швейцария). Программное обеспечение NemeSys позволяло регулировать изолированную прокачку жидкости по одной траектории. Сборка системы проводилась в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Для поддержания в системе постоянной температуры монтированный в устройство

термодатчик был присоединен к термоэлектрическому модулю с контроллером и элементом Пельтье (RMT Ltd, Россия). Устройство было помещено на специальный держатель и установлено в поле зрения оптического микроскопа, дополнительно оснащенного камерой для непрерывной записи полученных изображений, так же была установлена камера для внешнего наблюдения за работой системы. Загрузка клеточной суспензии производилась вручную через второй порт загрузки. Система после сборки оставалась замкнутой, что предотвращало возможную микробную контаминацию и образование пузырей.

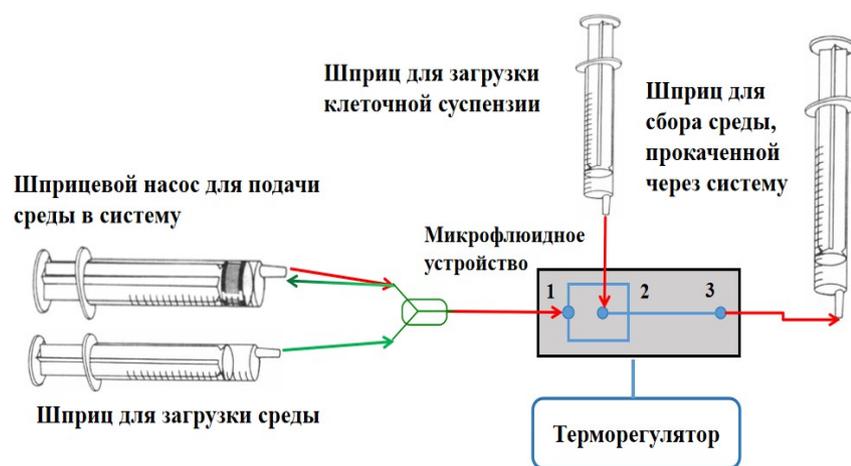


Рисунок 5 – Схема микрофлюидной системы.

Первоначально разработанная схема была применима при небольших расходах жидкости, прокачиваемой через устройство. Для более продолжительных экспериментов была разработана схема с возможностью рециркуляции потока (рисунок 6).

При такой реализации работы системы накапливаемая после прохождения по каналам среда через определенные промежутки времени подавалась на вход системы. С учетом значительной временной протяженности экспериментов с клетками, был апробирован и активно использовался удаленный мониторинг и управление параметрами системы через сеть Интернет.

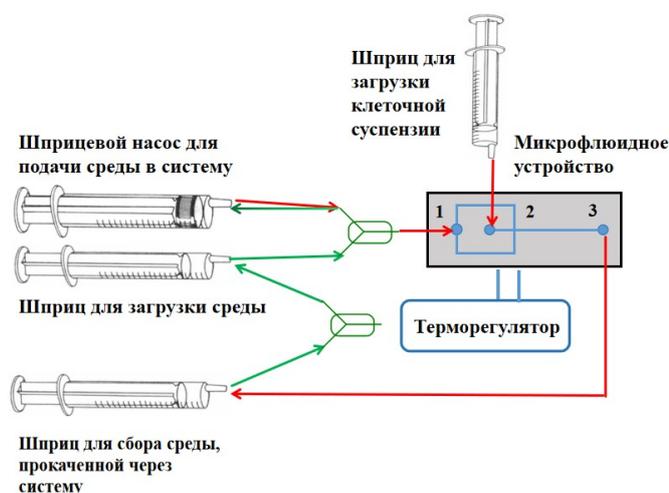


Рисунок 6 – Схема установки с рециркуляцией потока.

С учетом малого объема среды в каналах и быстрого изменения ее pH в процессе жизнедеятельности при культивировании клеток EA.hy926 в системе в среду дополнительно был добавлен буфер HEPES. Результатом оптимизации всех параметров служило стойкое поддержание жизнедеятельности культуры до 4 суток. Следующим этапом работы было исследование влияния потока и создаваемого им напряжения

сдвига (или сдвиговой деформации) на параметры жизнедеятельности эндотелиальных клеток.

## 2. Биологические испытания разработанной модели.

Было выдвинуто предположение, что сдвиговая деформация может влиять на проницаемость клеточных мембран. Для проверки данной теории были выбраны два флуоресцентный зонда, не способных пройти через неповрежденную клеточную мембрану – пропидий йодид и флуоресцеинизотиоцианат. Окрашивание клеток флуоресцентными зондами проводилось в динамических условиях при скорости потока 400 мкл/мин, в статических – в отсутствие потока (в чашках Петри). Полученные методом конфокальной микроскопии данные представлены на рисунке 7 (пропидий йодид) и рисунке 8 (флуоресцеинизотиоцианат).

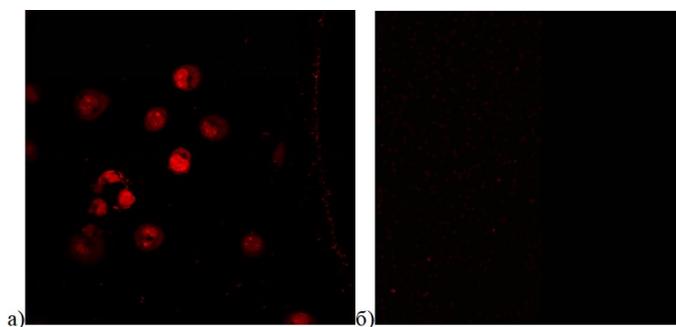


Рисунок 7 – Окрашивание клеток пропидий йодидом в потоке жидкости (А) и в статических условиях (Б).

Полученные данные демонстрируют, что действие потока приводит к деформации клеточной мембраны а, значит, существует вероятность, что в подобных условиях может быть реализована доставка внутрь клетки веществ, в стандартных условиях не имеющих специальных транспортных систем.

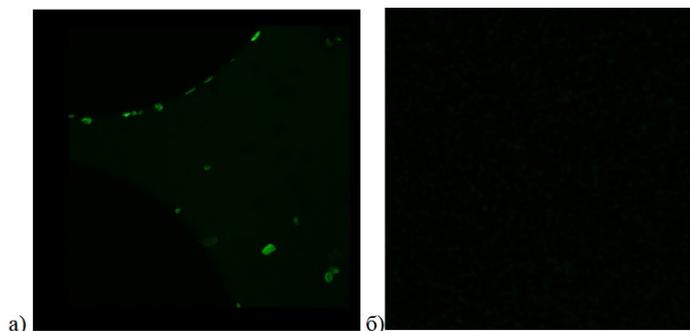


Рисунок 8 – Окрашивание клеток флуоресцеинизотиоцианатом в потоке жидкости (А) и в статических условиях (Б).

Еще одним из проявлений реакции эндотелиальных сосудистых клеток на патологические значения сдвиговой деформации является высвобождение из них белкового фактора Виллебранда (ФВ), который синтезируется сосудистым эндотелием, депонируется в клетках и хранится в них в плотно свёрнутом состоянии однако высвобождаясь, под

действием сильного потока жидкости, образует протяжённые нити, сплетающиеся в сеть, способную улавливать тромбоциты из потока крови. Механизм обратной связи, регулирующий клеточный ответ на изменение значения сдвиговой деформации потоком крови недостаточно изучен. Было выдвинуто предположение, что в механизме клеточного ответа может принимать участие белок-шаперон GRP78, участвующий в плотной упаковке ФВ внутри клетки.

Проведенный методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии анализ показал, что экспрессия ФВ и GRP78 при действии сдвиговой деформации низкой интенсивности находилась на сравнительно невысоком уровне (рисунок 9), наблюдался заметный уровень колокализации GRP78 и ФВ, локализация последнего была преимущественно внутриклеточной.

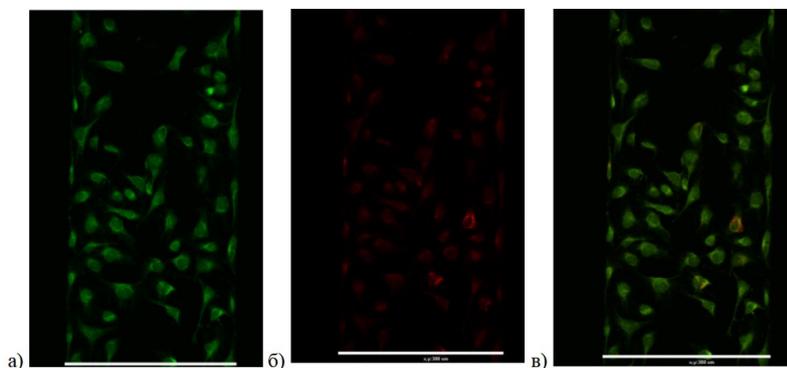


Рисунок 9 – Микрофотографии клеток EA.hy926 при культивировании в потоке 1 мкл/мин и окрашенных первичными антителами к белку GRP78 (А), затем вторичными FITC-мечеными антителами, и параллельно первичными антителами к ФВ, затем родамин-мечеными вторичными антителами (Б): В – слитое двухканальное изображение.

При объемной скорости потока 400 мкл/мин был отмечен рост интенсивности флуоресценции клеток по красному каналу, соответствующему ФВ, во внеклеточном пространстве, как в виде включений, так и в виде нитей (рисунок 10).

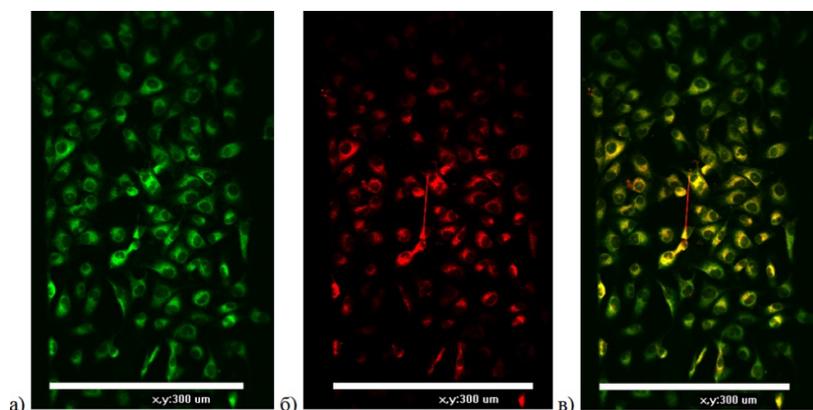


Рисунок 10 – Микрофотографии клеток EA.hy926 при культивировании в потоке 400 мкл/мин и окрашенных первичными антителами к белку GRP78 (А), затем вторичными FITC-мечеными антителами, и параллельно первичными антителами к ФВ, затем родамин-мечеными вторичными антителами (Б): В – слитое двухканальное изображение.

Еще одним важным аспектом изучения адаптации эндотелиальных клеток к гидродинамическим условиям является оценка продукции ими оксида азота (II) NO, поскольку он участвует в нейротрансмиссии, иммунной защите и поддержании гомеостаза сосудов и сосудистого тонуса. Так как количественное определение NO затруднено из-за низкого выхода впервые был применен метод непрямого определения с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина DAF-2. Способность

клеток линии EA.Hy926 продуцировать оксид азота была проанализирована в статических условиях с использованием активатора eNOS – кальциевого ионофора A23187 и субстрата L-аргинина. Для предполагаемого увеличения продукции NO был применен транскрипционный индуктор eNOS – форболовый эфир Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA.

Для анализа сдвиговой деформации на продукцию NO были использованы объемные скорости 2 мкл/мин и 100 мкл/мин с расчетной максимальной сдвиговой деформацией ~0.01 Па и ~5.50 Па соответственно (рисунок 11). Было установлено, что действие потока приводит к увеличению интенсивности флуоресценции зонда, указывающее на рост концентрации продуктов окисления оксида азота. Однако, при соответствующем физиологическому уровню сдвиговой деформации ~5.50 Па при объемном расходе 100 мкл/мин прирост концентрации продуктов окисления NO в микрофлюидной системе оказывается сравнительно небольшим (в ~1.15 раза) по сравнению со статическими условиями. Это может быть обусловлено значительным разбавлением продукта ввиду незамкнутой конфигурации микрофлюидной системы.

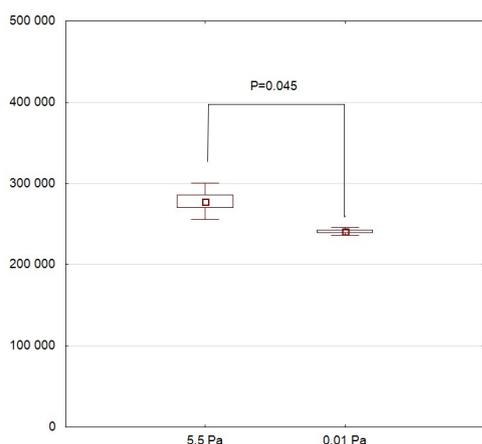


Рисунок 11 – Интенсивность флуоресценции при 515 нм сред FluoroBrite, прокачанных с постоянной скоростью 100 мкл/мин и 2 мкл/мин в течение 4 ч в независимых каналах микрофлюидного устройства с инкубируемыми в них клетками EA.Hy926 в присутствии 100 мкМ L-аргинина.

Таким образом, в данной работе для изолированного монослоя эндотелиоцитоподобных клеток EAhy.926 в микрофлюидной системе впервые получены данные об увеличении продукции оксида азота при росте сдвигового напряжения. Все полученные нами данные позволяют предположить, что созданная нами модель участка кровеносного сосуда подходит для изучения влияния сдвиговой деформации, создаваемой потоком на физиологию эндотелиальных клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Спроектирована и изготовлена стендовая микрофлюидная система, позволяющая проводить длительную инкубацию клеток в контролируемом потоке с возможностью прижизненного мониторинга параметров жизнедеятельности живых клеток с помощью микроскопии. Оптимизированы состав среды и методики культивирования клеток EA.Hy926 в микрофлюидном устройстве, а также подобраны

материалы для полимерной основы системы - полидиметилсилоксан, покрытый коллагеном.

2. Показано, что эффективность мембранного транспорта пропидий йодида и флуоресцеинизотиоцианата в цитоплазму и ядро клеток в условиях проточного режима функционирования была существенно выше по сравнению со статичным режимом, что может свидетельствовать о повышенной проницаемости клеток в условиях потока.

3. Впервые с использованием микрофлюидной модели установлены достоверные отличия в экспрессии клетками EA.hy926 белка GRP78 и фактора Виллебранда (ФВ) в областях с различной величиной сдвиговой деформации. Можно предположить, что GRP78, участвующий в ответе на стресс эндоплазматического ретикулума, вовлечен в адаптацию клетки к сдвиговой деформации.

4. Проведенный анализ показал отсутствие ФВ во внеклеточной среде и высокий уровень колокализации фактора Виллебранда и GRP78 в статических условиях, что связано с участием GRP78 в фолдинге ФВ. При действии высокоинтенсивной сдвиговой деформации была отмечена секреция и рост концентрации ФВ во внеклеточном пространстве, как в виде включений, так и в виде нитей.

5. Впервые получены данные об увеличении продукции клетками оксида азота при росте сдвигового напряжения в микрофлюидной системе. Это открывает новые возможности использования разработанной микрофлюидной модельной системы для изучения функционального состояния эндотелия при действии вазоактивных фармакологических препаратов и при моделируемой дисфункции эндотелия.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

1. Мыльникова А.Н., Ощепков М.С., Соловьева И.Н., Московцев А.А., Колесов Д.В. Применение микрофлюидных технологий в современной биотехнологии // Химическая промышленность сегодня. 2023. № 6. С. 2-8 (CAS)

2. Коваленко Л.В., Ощепков М.С., Мыльникова А.Н., Меньков А.О., Удовенко В.А., Семчукова М.И., Соловьева И.Н. Конструкционные особенности микрофлюидных устройств и области их применения // Бутлеровские сообщения. 2018. № 9(55). С. 91-105 (Перечень ВАК)

3. Московцев А.А., Колесов Д.В., Мыльникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017. Т. 61, № 4. С. 112-125 (CAS)

4. D. Zaychenko, M. Mesitov, R. Soldatov, A. Mylnikova, D. Kolesov, A. Sokolovskaya, A. Kubatiev, A. Mironov, A. Moskovtsev. Post-Transcriptional Regulation of Cellular Response to

Unfolded Proteins: tiRNA Involvement // FEBS Journal. 2016. Vol. 283, S. 1. P. 207-208. DOI: 10.1111/febs.13808 (Scopus)

- публикации в иных научных журналах и изданиях:

5. Мыльникова А.Н., Московцев А.А., Колесов Д.В., Ощепков М.С. Оценка влияния гидродинамических условий, создаваемых потоком жидкости в микрофлюидном устройстве, на адаптацию эндотелиальных клеток к стрессовому воздействию // Успехи в химии и химической технологии. 2023. № 37(17). С. 29-31.

6. Московцев А.А., Мыльникова А.Н., Колесов Д.В., Микрюкова А.А., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Оценка продукции оксида азота эндотелиальными клетками EA.hy926 при механическом стрессе, создаваемом потоком в микрофлюидной системе // Патогенез. 2020. № 18(4). С. 71-77.

7. Московцев А.А., Кубатиев А.А., Колесов Д.В., Мыльникова А.Н. Исследование миграции мезенхимных клеток FRSN в условиях низкоинтенсивной деформации сдвига, вызываемой постоянным потоком // Патогенез. 2018. № 16(4). С. 144-147.

8. Колесов Д.В., Ерофеев А.С., Московцев А.А., Власенкова Н.К., Горелкин П.В., Мыльникова А.Н., Кубатиев А.А. Исследование адгезии эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 к различным подложкам, используемых в методе мягкой литографии для создания микрофлюидных чипов // Патогенез. 2018. № 16(4). С. 81-89.

9. Мыльникова А.Н., Колесов Д.В., Московцев А.А., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Клеточные микрофлюидные технологии для биомоделирования патологических процессов // Патогенез. 2017. Т. 15(4). С. 4-12.

10. Колесов Д.В., Московцев А.А., Мыльникова А.Н., Савина Г.Д., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Биомоделирование микрососуда в микрофлюидном чипе // Патогенез. 2016. № 14(4). С. 4-8.

11. Мыльникова А.Н., Московцев А.А., Колесов Д.В., Ощепков М.С. Подавление активности рибонуклеазы IRE1 – новый подход в терапии некоторых видов онкологических заболеваний // Успехи в химии и химической технологии. 2014. № 38(9). С. 76-79

12. Полезная модель №199234. Проточный чип для моделирования участка сосудистого русла для испытания имплантатов и оборудования для сердечно-сосудистой хирургии / Колесов Д.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А., Мыльникова А.Н. Заявл. 29.06.2018. Оpubл. 09.09.2019.