

На правах рукописи

Мыльникова Алёна Николаевна

**РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ МОДЕЛИ КРОВЕНОСНОГО СОСУДА
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ
КЛЕТОК**

Специальность: 1.5.6 – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
доцент
Московцев Алексей
Александрович

Москва 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
1.1. Современные тенденции развития биотехнологических исследований. Микрофлюидные технологии.....	11
1.2. Принципы создания микрофлюидной модели кровеносного сосуда.....	15
1.2.1. Выбор оптимальной геометрии устройства. Закон Мюррея.....	17
1.2.2. Выбор гидродинамического режима. Понятие о сдвиговой деформации и восприятие ее клетками.....	24
1.2.3. Анализ физиологических особенностей клеточного микроокружения при создании модели.....	29
1.2.4. Выбор материалов для изготовления микрофлюидных устройств. Проблема адгезии клеток к подложкам.....	32
1.2.5. Способы и этапы изготовления микрофлюидных устройств.....	46
1.2.6. Основные элементы стендовой микрофлюидной системы.....	49
1.3. Влияние гидродинамического режима на физиологию эндотелиальных сосудистых клеток.....	53
1.3.1. Фенотип и морфология эндотелиальных клеток.....	53
1.3.2. Миграция, пролиферация и дифференцировка эндотелиальных клеток.....	54
1.3.3. Адгезия клеток и проницаемость клеточных мембран.....	55
1.3.4. Продукция оксида азота.....	57
1.3.5. Сосудистый гемостаз.....	58
1.4. Перспективы использования микрофлюидных технологий в сосудистой биологии.....	60
ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	66
2.1. Создание микрофлюидной модели микрососудистого русла.....	67
2.1.1. 3-хмерное моделирование микрофлюидного устройства с помощью системы для автоматизированного проектирования.....	67

2.1.2. Расчет гидродинамических параметров микрофлюидного устройства с помощью методов вычислительной гидродинамики.....	71
2.1.3. Выбор материалов для изготовления устройства.....	77
2.1.4. Изготовления микрофлюидного устройства.....	87
2.1.5. Сборка микрофлюидной системы.....	89
2.2. Изучение адаптации эндотелиальных клеток к сдвиговой деформации, создаваемой потоком в микрофлюидной системе.....	96
2.2.1. Отработка методики культивирования эндотелиоцитов в микрофлюидной системе.....	96
2.2.2. Анализ мембранного транспорта пропидий иодида и флуоресцеинизотиоцианата через поверхность клеточных мембран.....	99
2.2.3. Анализ влияния сдвиговой деформации на экспрессию белка-шаперона GRP78 и фактора Виллибранда.....	102
2.2.4. Анализ влияния сдвиговой деформации, создаваемой в микрореакторе, на продукцию клетками монооксида азота (NO).....	107
ГЛАВА 3. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА	111
3.1. Приборы.....	111
3.2. Реактивы.....	116
3.2.1. Флуоресцентные зонды.....	117
3.3. Клеточная линия.....	118
3.4. Методы исследования.....	119
3.4.1. Создание микрофлюидной модели.....	119
3.4.2. Изучение адаптации эндотелиальных клеток к динамическому воздействию, создаваемому потоком в микрофлюидной системе.....	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИФА – иммуноферментный анализ

FACS – (fluorescence-activated cell sorting) флуоресцентная активированная сортировка клеток

МТЭ – микробные топливные элементы

PECAM-1 – молекула адгезии тромбоцитов к эндотелиальным клеткам 1

VEGFR-2 – рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов

ECM – внеклеточный матрикс

PDMS – полидиметилсилоксан

PMMA – полиметилметакрилат

BSA – бычий сывороточный альбумин

CA – краевой угол смачивания

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

SAGE – серийный анализ экспрессии генов

KLF2, KLF4 – транскрипционные факторы Круппеля

eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота

НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза

CD39/ATPDase – мембранные эндонуклеотидазы

PGI₂ – простаглицлин

tPA – тканевой активатор плазминогена

ФВ – фактор Виллебранда

ADAMTS-13 – протеаза, расщепляющая фактор Виллебранда

TFPI – ингибитор тканевого фактора

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов

FITC – флуоресцеинизотиоцианат

ЧПУ – числовое программное управление

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

PI – пропидий иодид

FITC – флуоресцеинизотиоцианат

GRP78 – регулируемый глюкозой протеин 78

СД – сдвиговая деформация

PMA – форболовый эфир Phorbol-12-myristate-13-acetate

DAF-2 – 2,4,5-диаминофлуоресцеин

ПИД-регулирование – пропорционально-интегрально-дифференциальное регулирование

DMEM – питательная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS – телячья эмбриональная сыворотка

PBS – фосфатно-солевой буфер

NEAA – раствор заменимых аминокислот

ДМСО – диметилсульфоксид

НАТ – жидкая смесь гипоксантина натрия, аминоптерина и тимидина

ЭДТУ – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

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 модели 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 влияние 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 1 патенте и 11 печатных работах: 9 статьях 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».

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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Большинство традиционных биохимических методов культивирования не позволяют проводить мониторинг поведения живых клеток в реальном времени и дают лишь моментальный снимок клеточного процесса. Из-за динамической природы биологических процессов при таких исследованиях теряется значительная доля информации, так как для понимания сути происходящего необходимо знать не только конечный результат, но и то, что происходит на промежуточных этапах. Кроме того, в стандартных биотехнологических экспериментах традиционно исследуют реакцию клеток путем анализа всей популяции, тем самым фактически рассматривая «усредненный клеточный ответ», не учитывающий фенотипическую и генотипическую гетерогенность клеток, присутствующую при культивировании как в колбах, так и в биореакторах. Гетерогенность клеточной популяции может приводить к дестабилизации системы и снижению общей производительности технологического оборудования, в то время как выяснение особенностей биотехнологических процессов на молекулярном уровне должно помочь избежать данных проблем. Существующие традиционные методы, такие как проточная цитометрия, дают представление о гетерогенности популяции, но при этом не предоставляют сведений о динамическом поведении одиночных клеток [3-5].

Одним из вариантов решения вышеназванных проблем является применение в биотехнологических исследованиях микрофлюидных технологий, предоставляющих возможность направлять и переключать потоки веществ в небольших каналах и камерах, что позволяет экономить реагенты и точно контролировать химическую среду. Микрофлюидные биоаналитические системы позволяют реализовать важнейшие транспортные методы современной аналитической химии, дают возможность использовать преимущества устанавливающихся в таких каналах ламинарных потоков, оптимизировать соотношение объема к поверхности и, по сути, используют все особенности, присущие поведению жидкостей и газов в микромасштабе – в таких системах превалирует влияние таких физических явлений, как осмотическое давление, электрофоретическая подвижность и поверхностные взаимодействия, а так же наблюдается очень высокое отношение поверхности контакта к объему, что обеспечивает быстрый массо- и теплоперенос,

критичный для некоторых процессов, например, биотрансформации или реакций с использованием иммобилизованных ферментов [6-7].

Остановимся подробнее на том, что из себя представляют микрофлюидные устройства и какие перспективы открывает микрофлюидика в современной биотехнологии.

1.1. Современные тенденции развития биотехнологических исследований.

Микрофлюидные технологии.

Современная микрофлюидика представляет собой междисциплинарную область, описывающую поведение малых (порядка микро и нанолитра) объемов и потоков жидкостей и находящуюся на стыке физики, гидравлики, динамики, химии, биологии и инженерных знаний. В общем виде микрофлюидные устройства представляют собой системы, состоящие из клапанов, насосов и полимерной пластины с многоуровневой сетью каналов, заполненных жидкостью, в качестве которой выступают питательные среды или буферные растворы. Геометрические параметры таких каналов позволяют захватывать и фиксировать одиночные клетки и небольшие субпопуляции для прецизионного изучения их поведения в режиме реального времени под контролем параметров микросреды. При этом концентрация и градиенты субстратов могут быть скорректированы с помощью ламинарного потока [3-4, 6-11].

Как технология микрофлюидика прошла долгий путь, который начинался с появлением в 1970-х годах миниатюрного газового хроматографа и первой попытки культивирования клеток в микроканале. Первые же крупные успехи в этой области были сделаны после появления метода мягкой литографии, которая приобрела популярность в конце 1990-х годов. Прогресс в молекулярной биологии также значительно стимулировал развитие микрофлюидного капиллярного электрофореза. В настоящее время на микрофлюидных устройствах развиты электрофоретические и электрохроматографические методы разделения веществ в пробах, которые применяются для экспресс-анализа ДНК и РНК, сиквенирования ДНК, анализа белков, неорганических и органических веществ, иммуноферментного анализа [12-15].

В биотехнологии в последнее время большой интерес к использованию микрофлюидных систем наблюдается в области «красной» (медицинской) и «белой» (промышленной) биотехнологии. Первоначально исследования и разработка подобных

устройств были сосредоточены в областях, где ожидался наибольший потенциал для коммерциализации. Например, фармацевтические компании начали проводить скрининговые тесты в устройствах типа «лаборатория на чипе», «орган на чипе», поскольку они давали меньше ложноположительных результатов. Расширяется использование микрореакторов, позволяющих изучать и оптимизировать ферментативные реакции, что также может стимулировать развитие биотехнологической отрасли. Помимо лабораторных исследований, микрофлюидные системы применяются для культивирования микробных клеток в биотехнологических целях в промышленных установках [4, 16–19].

Кроме того, капельная микрофлюидика, где коллоидные системы типа «вода в масле» или «масло в воде» генерируются с контролируемым объемом и скоростью, является хорошо зарекомендовавшим себя и уже представленным на рынке методом, альтернативным FACS (от англ. Fluorescence-activated cell sorting – флуоресцентная активированная сортировка клеток). Помимо этого внедрение капельной микрофлюидики способствовало возникновению новой области анализа одиночных клеток, а в последние годы наблюдается замена скрининга лекарств с помощью планшетов с лунками, обычно используемого в фармацевтической промышленности, на капельную микрофлюидику. Многообразие областей биотехнологии, где нашла применение капельная микрофлюидика, представлено на рисунке 1. [3, 18, 20-23].

Микрофлюидика активно используется и при создании микробных топливных элементов (МТЭ), представляющих собой семейство электрохимических устройств, которые могут преобразовывать биодоступные органические вещества в электричество в процессе микробного катализа. По сравнению с другими системами топливных элементов, в МТЭ используются живые микроорганизмы, катализирующие разложение в мягких условиях большого спектра органических субстратов, большинство из которых широко распространены, нетоксичны и относительно недороги. С 2006 года активно тестируются многофункциональные микрофлюидные устройства, которые используют возникающий биоэлектрический потенциал для запуска таких реакций, таких как получение водорода в микробной электролизной ячейке и очистка воды в микробной опреснительной камере [10].

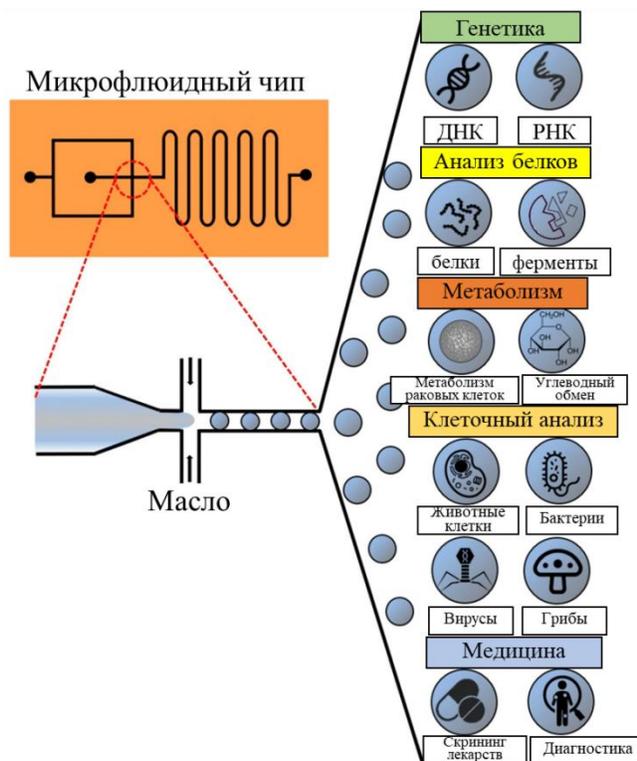


Рисунок 1 – Области применения капельной микрофлюидики в биотехнологии [25].

Еще одну область практического применения микрофлюидика нашла в мониторинге поведения микроорганизмов с использованием диэлектрофоретических устройств для обнаружения переносимых через воду патогенов, микроводорослей, в безлинзовых системах визуализации микроорганизмов, в микробной биоэнергетике и микробной экологии [24].

В области создания биологических моделей появление микрофлюидных устройств само по себе явилось своеобразным прорывом по отношению к традиционным методам культивирования клеток, так как микрофлюидика позволяет воспроизводить часть намного более сложных процессов в реальных тканях. Так, например, в колбах для культивирования жидкость обычно статична, или происходит ее турбулентное течение, в то время как в реальных живых тканях обычно поддерживается ламинарный поток. Кроме того, клетки в искусственной культуре растут в присутствии своих собственных метаболических «отходов», что приводит к изменениям pH питательной среды, тогда как в естественных условиях образовавшиеся «отходы» удаляются из тканей с помощью массопереноса и дальнейшей утилизации/эксекреции/инактивации в специализированных органах, что

позволяет в том числе контролировать pH на необходимом уровне. Выращивание клеток на на поверхностях позволяет создавать трехмерные культуры клеток, которые лучше имитируют микроструктуру, механические свойства и биохимический состав микросреды, окружающей клетки в условиях *in vivo*. Прогресс в области методов обработки материалов и иных прецизионных производственных процессов способствует эффективной имитации структурных элементов органов и тканей человека и процессов в организме, что делает микрофлюидные технологии востребованными в тканевой инженерии и биоинженерии в целом [5, 8-9, 13].

Таким образом, микрофлюидные технологии нашли свое применение как в фундаментальных лабораторных исследованиях, включающих создание моделей органов и тканей на чипе, так и в прикладных и даже промышленных установках.

Быстрый прогресс в развитии микрофлюидных технологий и их востребованность в биологии и медицине связана с рядом их преимуществ по сравнению с классическими методами. Первоначально считалось, что наиболее существенным достоинством этих устройств будет их небольшой размер. В дальнейшем, помимо малых затрат реагентов, были отмечены и другие преимущества использования микрофлюидных устройств, например, удобство их автоматизации и небольшие затраты на производство, последнее из которых оказалось наиболее важным [2, 8, 26].

Широкие перспективы применения микрофлюидных систем в различных областях современной биотехнологии подтверждаются экспоненциальным ростом числа тематических публикаций в рецензируемых журналах (рисунок 2). В данном случае поиск специализированной литературы проводился с использованием системы аналитических отчетов базы данных PubMed [3, 16, 27].

Таким образом, на сегодняшний день несмотря на то, что микрофлюидика пока еще оказывает небольшое влияние на биотехнологический рынок, ряд микрофлюидных устройств уже имеется в продаже, этот список расширяется и имеет большой коммерческий и научный потенциал [19].

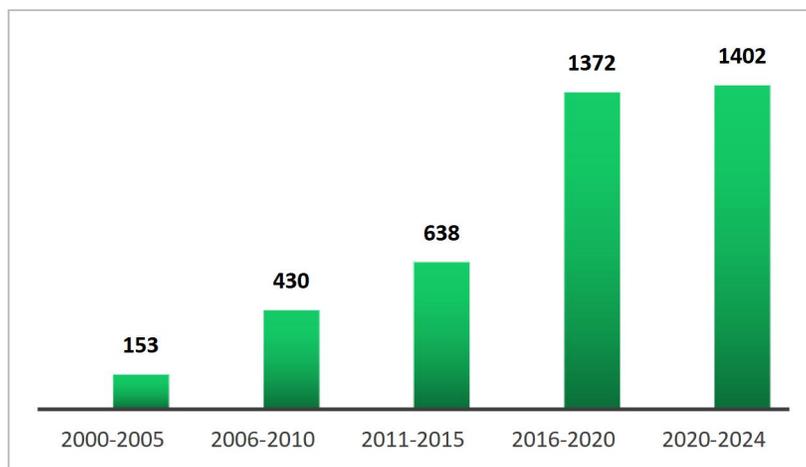


Рисунок 2 – Рост числа публикаций на тему использования микрофлюидных систем в биотехнологии по данным PubMed за последние 20 лет.

Поскольку ключевым элементом микрофлюидного устройства является поток жидкости, а наиболее чувствительными к условиям потока системам человеческого организма, безусловно, можно отнести сердечно-сосудистую и кровеносную, в области биомоделирования одним из перспективных направлений развития микрофлюидных технологий можно назвать создание моделей кровеносных сосудов.

Для лучшего проведения эксперимента с использованием микрофлюидных моделей и дальнейшей интерпретации полученных результатов, необходимо более детальное понимание сути происходящих процессов, поэтому на некоторых самых важных аспектах устройства и функционирования микрофлюидных устройств для создания моделей элементов кровеносной системы надо заострить особое внимание.

1.2. Принципы создания микрофлюидной модели кровеносного сосуда.

Создание биологической модели в микрофлюидном формате является довольно трудоёмкой задачей, требующей понимания основных принципов биологии, биохимии, физики и инженерных знаний.

Во-первых, необходимо иметь знания о ключевых элементах клеточного микроокружения, чтобы более четко имитировать естественные условия. Во-вторых, крайне важно знать критерии, по которым от макроуровня можно перейти к микроуровню. В-третьих, важно иметь хорошую подготовку в знании принципов микрофлюидики с инженерно-технологической точки зрения [14].

Схематично основные элементы клеточного микроокружения, которые учитываются на начальном этапе проектирования устройства представлены на рисунке 3 [29].



Рисунок 3 – Важнейшие факторы клеточного микроокружения [30].

Хотя в зависимости от конкретного типа исследований в конструкциях микрофлюидных устройств и методах работы с ними существуют свои тонкости, существует также сходство в общей методологии подобных исследований. Так процедура изготовления и использования микрофлюидных устройств в клеточных исследованиях состоит из следующих этапов:

- 1) проектирование устройства на основе вышеобозначенных биомиметических принципов;
- 2) создание матрицы и полимерной основы с использованием различных методов микротехнологий;
- 3) изготовление устройства и сборка стендовой микрофлюидной системы;
- 5) оптимизация протокола культивирования клеток;

б) биологические испытания разработанной модели [28].

При этом при проектировании микрофлюидного устройства, предназначенного для использования в качестве биологической модели, на первом этапе необходимо учесть целый ряд параметров, представленных ниже:

- 1) оптимальная геометрия каналов и основные гидродинамические параметры модели;
- 2) физиологические особенности жизнедеятельности (микросреды) исследуемого объекта;
- 3) материалы для изготовления устройства;
- 4) методы создания и управления потоком жидкости и детекции клеточного ответа [14].

Далее остановимся подробнее на каждом из перечисленных выше параметров.

1.2.1. Выбор оптимальной геометрии устройства. Закон Мюррея.

При выборе оптимальной геометрии модели в первую очередь необходимо опираться на нормальные анатомические характеристики, свойственные выбранному для моделирования типу кровеносного сосуда.

Анатомически сосудистую систему человека условно можно разделить на микрососудистую и макрососудистую. Микрососуды обычно представляют собой биологические структуры, имеющие диаметр просвета <150 мкм и регулирующие общее периферическое сопротивление в сосудистом дереве. К ним относятся артериолы, капилляры и венулы. Артериолы имеют в среднем диаметр от 5 до 100 мкм, берут начало от артерий и разветвляются на капилляры, которые сливаются в венулы, впадающие в вены. Они содержат монослой эндотелиальных клеток, окруженный одним-двумя слоями гладкой мускулатуры, окруженными тонким адвентициальным слоем. Капилляры отходят от артериол, имеют диаметр от 5 до 10 мкм и образуют взаимосвязанную сеть трубок со средней длиной от 0,5 до 1 мм. Капилляры имеют только слой эндотелиальных клеток и связанную с ними базальную мембрану, а в некоторых случаях они меньше, чем эритроциты. Венулы соединяют капилляры с венами и имеют диаметр около 20 мкм – они похожи на артериолы, но лишены гладкой мускулатуры. [31, 32]

Сосудистое русло организовано таким образом, чтобы ткани сплошных органов для их снабжения кислородом и питательными веществами и удаления из них отходов имели

разветвленную сеть кровеносных сосудов. При этом очевидно, что сосудистая сеть должна разветвляться так, чтобы каждая небольшая группа клеток в пределах ткани снабжалась, по меньшей мере, одним капилляром. Расстояние, на котором в ткани происходит эффективная диффузия кислорода и питательных веществ составляет порядка сотен микрон и зависит от многих факторов, в том числе скорости обмена веществ в конкретной ткани. Поскольку типичная длина капилляров составляет от 0,3 до 0,7 мм, а главной артерии – от 1 до 5 см, то становится ясно, что сосудистая сеть должна содержать достаточно большое количество уровней иерархии [33, 34].

И действительно, биологические системы кровеносных сосудов, как правило, представляют собой иерархическую структуру, отличительной чертой которой является ее многоступенчатое разделение или бифуркация. В каждом разветвлении характерный размер сосудистых сегментов, как правило, становится меньше, и по длине и диаметру, как схематически показано на рисунке 4. Подобная ситуация наблюдается так же в дыхательной системе, где кислород достигает мелких капилляров, проходя через иерархическую систему бронхов [26, 35].

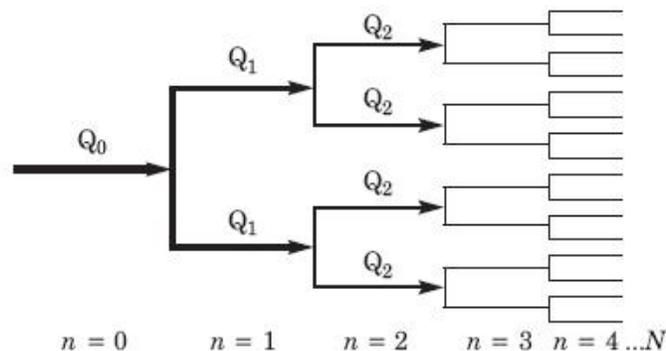


Рисунок 4 – Принципиальная схема бифуркации в сосудистой сети [36].

Нулевой уровень такой иерархической системы начинается с узла артерии или принимающей вены, от которой отходят $n+1$ дочерних сосудов, и на последнем N подуровне она заканчивается капиллярами. Таким образом, единичный объем дочерних подуровней (V_n) примерно равен:

$$V_n \sim l_n^3 \quad (1),$$

где l_n – длина n -ного сосуда.

При этом общее количество сосудов на n -ом уровне M_n составляет примерно:

$$M_n \sim V_0 / l_n^3 \quad (2),$$

где V_0 – общий объем микроуруса.

Чем выше уровень, тем точнее становится это приближение и уменьшается погрешность вычислений, связанная с конкретными особенностями сосуда. Необходимо также отметить, что приведенные выше рассуждения справедливы как для сосудов внутренних органов, так и для сосудов регионального кровообращения [37].

Для того, чтобы определить структуру микроциркуляторного русла, помимо всего прочего необходимо также классифицировать сосуды в соответствии с симметрией их разветвления. Так артерии с преимущественно асимметричными бифуркациями выделяют сравнительно малую долю потока в свои боковые ветви и, следовательно, в состоянии переносить большую часть потока на расстоянии. И наоборот, артерии с более симметричными бифуркациями распадаются на многочисленные мелкие ветви, тем самым обеспечивая кровью окружающие ткани. Такие артерии условно можно назвать артериями «доставки» и «передачи». Схематичное изображение таких артерий представлено на рисунке 5.

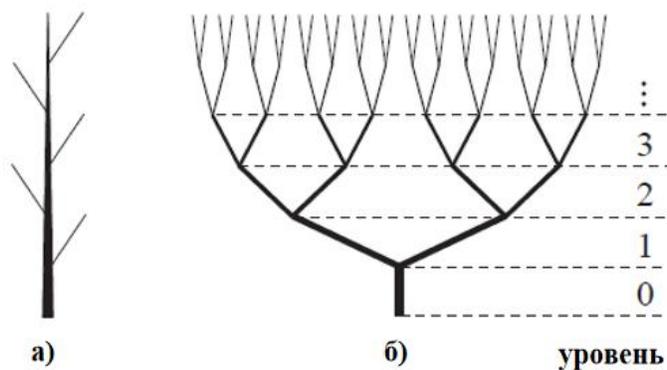


Рисунок 5 – Схематическое изображение различных видов ветвления артерий. (а) – артерии передачи, (б) – доставки [37].

Безусловно, реальные артериальные деревья должны содержать большое разнообразие промежуточных стадий между этими двумя типами сосудов и при переходе от крупных

системных артерий к мелким артериям регионального кровообращения бифуркации в сосудах должны становиться все более и более симметричным. Поэтому микроциркуляционные русла можно рассматривать как сеть сосудов с примерно симметричными бифуркациями [37].

В 1926 году физиолог Сесил Д. Мюррей математически вывел отношение между диаметрами материнского и дочернего ветвления сетей в организме, что справедливо не только для кровеносных сосудов, как было сказано выше, но и для дыхательных путей. Идея модели Мюррея заключается в предположении, что в процессе эволюции и естественного отбора физиологическая сеть сосудов приобрела оптимальную геометрию, соответствующую наименьшей возможной биологической работе, необходимой для поддержания кровотока через нее на требуемом уровне. Эта биологическая работа состоит из двух слагаемых:

- 1) работы по преодолению вязкого сопротивления при движении крови по сосудам, подчиняющаяся закону Пуазейля,
- 2) энергии, затрачиваемой на поддержание необходимого объема крови в тканях и сосудах.

Сети, которые соответствуют этому закону, имеют равномерное распределение давления по всей своей протяженности. В настоящее время этот закон привлекает к себе много внимания исследователей, особенно в биологическом мире, в том числе при проектировании геометрической конструкции микроканалов [33, 34].

С математической точки зрения закон Мюррея представлен в виде следующей зависимости:

$$d_0^3 = d_1^3 + d_2^3 \quad (3),$$

где d_0 – диаметр материнского сосуда, а d_1 и d_2 – диаметры дочерних сосудов.

Это соотношение справедливо для симметричных и асимметричных бифуркаций, а также прямоугольных каналов, чаще всего встречаемых в искусственных биологических моделях. Каналы в таких моделях должны иметь диаметры, соответствующие этому соотношению [33].

Для симметричных бифуркаций, где $d_1 = d_2$, очевидно, что

$$d_0^3 = 2d_1^3 \quad (4).$$

Используя это соотношение можно получить так же соотношения между диаметрами различных сосудов, средними скоростями, сопротивлениями потоку и давлениями для каждого последующего ветвления. Кроме того, было показано, что закон Мюррея можно обобщить, если изменение диаметра каждого последующего ветвления может быть представлено в виде параметра ветвления, X :

$$X = \frac{d_0^3}{2d_1^3} \quad (5)$$

Если $X = 1$, ветвящиеся сосуды подчиняются оригинальному закону Мюррея. Тем ни менее, X не всегда может быть равен единице, хотя в этом случае система больше не будет соблюдать принцип минимальной работы. Такое соотношение диаметров каналов, когда $X \neq 1$ может быть использовано для проектирования микроканалов со специфическими значениями распределений скорости потока и времени его пребывания в сосуде. Например, низкие значения скорости потока среды позволяют свести к минимуму повреждение чувствительных к нему клеток, и увеличивают вероятность связывания клеток с поверхностью, в то время как увеличение времени пребывания жидкости в некоторых ответвлениях сосудистой сети будет способствовать распространению питательных веществ и удалению отходов [38].

Если же значение параметра X сохраняется постоянным на протяжении всей разветвленной сосудистой сети, диаметр сегмента n -ого поколения будет равным:

$$d_n = \frac{d_0}{(2X)^{n/3}} \quad (6)$$

Для симметричной системы, объемные доли расхода на каждой бифуркации равны соответственно:

$$Q_n = 2^{-n}Q_0, \quad (7),$$

откуда средняя скорость потока V_n в каждом поколении ветвления может быть найдена следующим образом:

$$V_n = \frac{Q_n}{A_n} = V_0 \left(\frac{X^2}{2} \right)^{n/3} \quad (8),$$

где A_n – площадь поперечного сечения n-ого ветвления.

Угол бифуркации сосудов в организме также диктуется принципами оптимальности работы. То есть в отношениях между радиусами материнских и дочерних артерий, и, соответственно углов θ_1 , θ_2 , $\theta_{1,2} = \theta_1 + \theta_2$, на которые расходятся сосуды относительно друг друга, существуют фундаментальные физиологические закономерности (рисунок 6) [33].

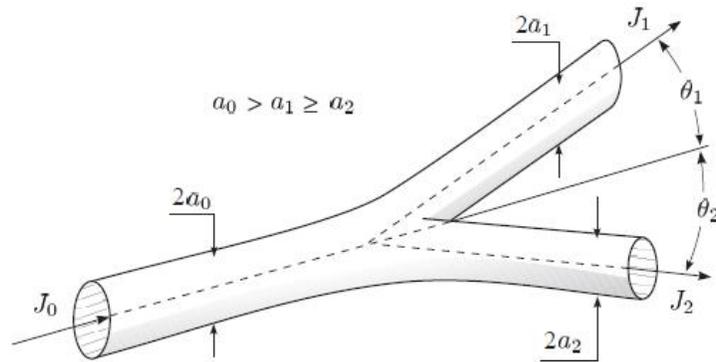


Рисунок 6 – Характеристики ветвления сосудов [33].

Однако следует заметить, что несмотря на то, что все принципы оптимальности дают численно близкие отношения между углами сосудов и радиусами бифуркации, оказалось, что экспериментально определенные углы ветвления обычно имеют значительный разброс относительно теоретического оптимума.

Эта особенность показана на рисунке 7, демонстрирующем изменения в углах ветвления сосудов с учетом 10% погрешности. Изменяя координаты ветвления узла, мы получаем, что минимум функции $P'_0 + P'_1 + P'_2$ достигается, когда

$$\begin{aligned} d_1 \cos \theta_1 + d_2 \cos \theta_2 &= (1 + \varepsilon) d_0 \\ d_1 \sin \theta_1 + d_2 \sin \theta_2 &= \varepsilon' d_0 \end{aligned} \quad (9)$$

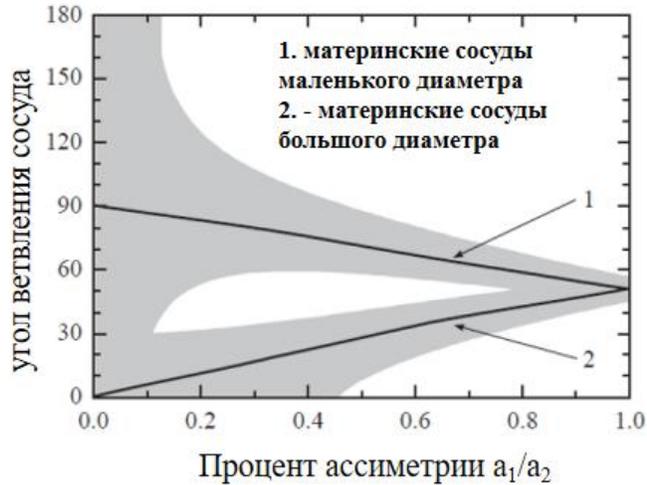


Рисунок 7 – Углы между материнской и дочерними артериями с учетом погрешности в 10% (затемненная область) [33].

Бифуркационный показатель X при этом, наоборот, хорошо описывается законом Мюррея.

Отношение диаметра к длине сосуда в литературе описано только эмпирически, в то время как математически это отношение на данный момент четко не определено. В общем виде сосуды меньшего диаметра имеют меньшую длину. Определенные соотношения диаметра к длине могут минимизировать колебания потока на протяжении всего объема, тем самым минимизируя активацию тромбоцитов и образование тромбов.

Так же надо отметить, что принятое допущение, что общий объем сосудистой сети сохраняется от уровня к уровню, позволяет вывести следующее соотношение между характерными длинами сосудов:

$$l_n^3 \approx g l_{n+1}^3 \quad (10),$$

(где $g = 2$ – порядок ветвления в узле). Отсюда следует, что

$$l_n \sim l_0 g^{-n/3} \quad (11),$$

где l_0 – длина принимающей артерии [34].

При проектировании участка кровеносного сосуда на первом этапе необходимо учесть все вышеназванные математические закономерности и выбрать соответствующий

физиологическим значениям диаметр сосуда и характер бифуркации. На втором этапе необходимо подобрать соответствующий гидродинамический режим.

1.2.2. Выбор гидродинамического режима. Понятие о сдвиговой деформации и восприятие ее клетками.

Кровоток в системе кровообращения можно рассматривать как происходящий в рамках двух различных режимов. В первом, что в целом соответствует микроциркуляции, инерционные силы пренебрежимо малы по сравнению с вязкими силами. Во втором, что в целом соответствует макроциркуляции, инерционные силы преобладают над вязкими силами.

Баланс между инерционными и вязкими силами, действующими на элемент жидкости, описывается безразмерным числом — числом Рейнольдса (Re), которое можно выразить следующим соотношением:

$$Re = \frac{Ud\rho}{\mu} \quad (12)$$

где d – диаметр сосуда, U – скорость жидкости, ρ – плотность, μ — вязкость.

Обычно в микроциркуляторном русле $1 < Re < 10$, течение ламинарное и кровь имеет неньютоновские свойства, т. е. вязкость меняется в зависимости от скорости кровотока. При макроциркуляции $10 < Re < 2000$, течение ламинарное и кровь проявляет свойства ньютоновской жидкости, т. е. вязкость не зависит от скорости кровотока. При этом важно отметить, что поток в крупнейших артериях может стать турбулентным во время фазы замедления сердечного цикла. Также представляется вероятным, что поток в артериальных канюлях, используемых в хирургии искусственного кровообращения, так же является турбулентным [39].

Очевидно, что кровеносные сосуды не являются прямыми трубками, а изгибаются и разветвляются сложным образом. Изменение направления элемента жидкости подразумевает ускорение в направлении кривизны из чего следует, что сила или, с точки зрения механики жидкости, градиент давления, должен действовать на жидкость в направлении ускорения. Влияние кривизны и ветвления на поток зависят от инерции, и, следовательно, эти явления представляют интерес для макроциркуляции [39].

Изучение распределения скорости кровотока в кровеносных сосудах может оказаться очень важным для биомедицинской инженерии и иметь существенное клиническое значение. Кроме того, моделирование кровотока необходимо при определении стратегии лечения и при разработке хирургических инструментов и имплантируемых медицинских устройств [40].

Совокупность всех действующих на сосудистые клетки механических и гемодинамических сил, вызываемых кровотоком, можно разделить на 3 основных вида:

- 1) радиальные силы, вызванные внутрисосудистым давлением,
- 2) тангенциальные силы, на которые влияют в том числе клеточные контакты и вазомоция сосуда,
- 3) осевые силы, вызванные внутрисосудистым давлением и трением текущей крови о стенку сосуда (рис. 8).

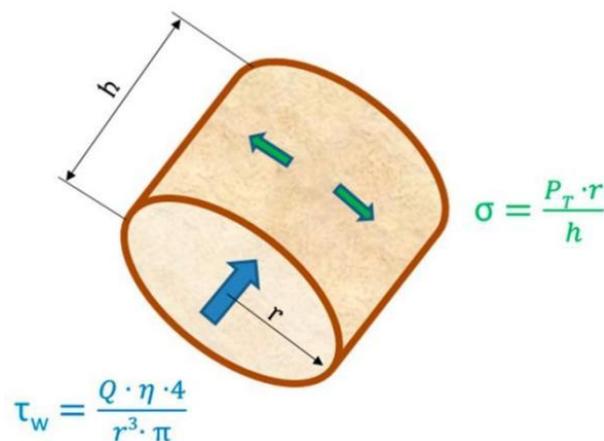


Рисунок 8 – Гемодинамические силы, действующие на сосудистую клетку (τ_w – напряжение сдвига, σ – окружное напряжение стенки, Q – объемный поток крови, η – вязкость крови, r – радиус сосуда, P_T – разница трансмурального давления) [41]

Для эндотелиальных сосудистых клеток одним из наиболее важных механических стимулов является так называемое напряжение сдвига или сдвиговая деформация, которая представляет собой силу трения, создаваемую кровотоком, приложенную по касательной к эндотелию, выраженную в силе на единицу площади. Эта тангенциальная сила трения вызывает деформацию эндотелиальных клеток во время систолической и диастолической

фаз сердечного цикла. Величину этой силы можно оценить по закону Пуазейля: напряжение сдвига пропорционально скорости потока и вязкости крови и обратно пропорционально третьей степени внутреннего радиуса [42, 43].

Артериальные эндотелиальные клетки испытывают в основном два типа напряжения сдвига, а именно, пульсирующее или ламинарное, связанное с кровотоком с четким направлением в прямых частях артерий, и колебательное или нарушенное без четкого направления в точках ответвления и изгибов [44].

Для ламинарного течения ньютоновской жидкости напряжение сдвига можно выразить следующим математическим уравнением:

$$\tau = \frac{32\eta Q}{\pi d^3} \quad (13)$$

где η — вязкость, Q — скорость потока, а d — диаметр сосуда.

Для крупных артерий вдали от ветвей физиологические значения напряжения сдвига, зависят от состояния вазоконстрикции, расположения в артериальной сети, индивидуальных особенностей и патологических состояний и составляет в среднем 2-4 Па и в норме редко превышает 8 Па. Для капилляров сложно дать общую оценку касательного напряжения из-за высоких временных и пространственных вариаций капиллярной перфузии, сложности гидромеханики при прохождении эритроцитов и неопределенностей в диаметре и свойствах стенок. Вены испытывают значения напряжения сдвига около 0,1-0,6 Па. Значения сдвиговой деформации в артериолах варьируется в довольно широком диапазоне. Так напряжение сдвига для артериол конъюнктивы колеблется от 1,7 до 21,1 Па, при том, что напряжение сдвига в капиллярах и венулах конъюнктивы является постоянным и достигает максимума 9,5 Па в самых маленьких капиллярах и минимум 0,3 Па в посткапиллярных венулах наибольшего диаметра. В клубочковых капиллярах крысы были обнаружены уровни напряжения сдвига порядка 3 Па [31, 42].

Как видно из приведенных выше данных не смотря на зависимость от диаметра, напряжение сдвига на всем протяжении сосудистой системы, охватывающей 1000-кратный диапазон диаметров различных сосудов, остается в пределах одного порядка величины. Считается, что это является следствием ремоделирования сосудистого русла, вызванного напряжением сдвига, что приводит к конструкции, в которой диаметр каждого сегмента

соответствует переносимому потоку; слишком высокое напряжение сдвига вызывает внешнее ремоделирование кровеносных сосудов, в то время как сосуды так же демонстрируют внутреннее ремоделирование при снижении напряжения сдвига. Таким образом, во всей конструкции сосудистого русла преобладает примерно кубическое соотношение между диаметрами материнских и дочерних сосудов в ветвях, что является предпосылкой для относительного постоянства напряжения сдвига. Это соотношение известно также как закон Мюррея, описанный выше [42].

Понимание механизмов, с помощью которых стенка сосуда воспринимает и преобразует механическое растяжение, характерное для различных гемодинамических нарушений, остается центральной темой механобиологии. На данный момент четко не идентифицированы первоначальный механизм восприятия или рецепторы, с помощью которых клетка распознает сдвиговую деформацию, но при этом многочисленные исследования показали, что в передачу сигнала при этом вовлечено несколько сигнальных путей. Так, на данный момент считается, что сдвиговая деформация детектируется эндотелиальными клетками с помощью таких клеточных структур и органелл, как, реснички эндотелия, гетеротримерные G-белки, интегрины, гликокаликс и кавеолы [41, 45-48].

Существует множество подходов к описанию механизмов клеточного ответа на воздействие потока, но в целом большинство из них подчиняется одному из трех принципов:

- 1) через межклеточные и клеточно-субстратные адгезионные комплексы;
- 2) через прямое смещение выступающих в просвет структур на апикальной мембране;
- 3) через деформацию липидного бислоя мембраны и/или цитоскелета.

При этом цитоскелет является связующим звеном между всеми элементами системы. Схематично эти механизмы изображены на рисунке 9 [43].

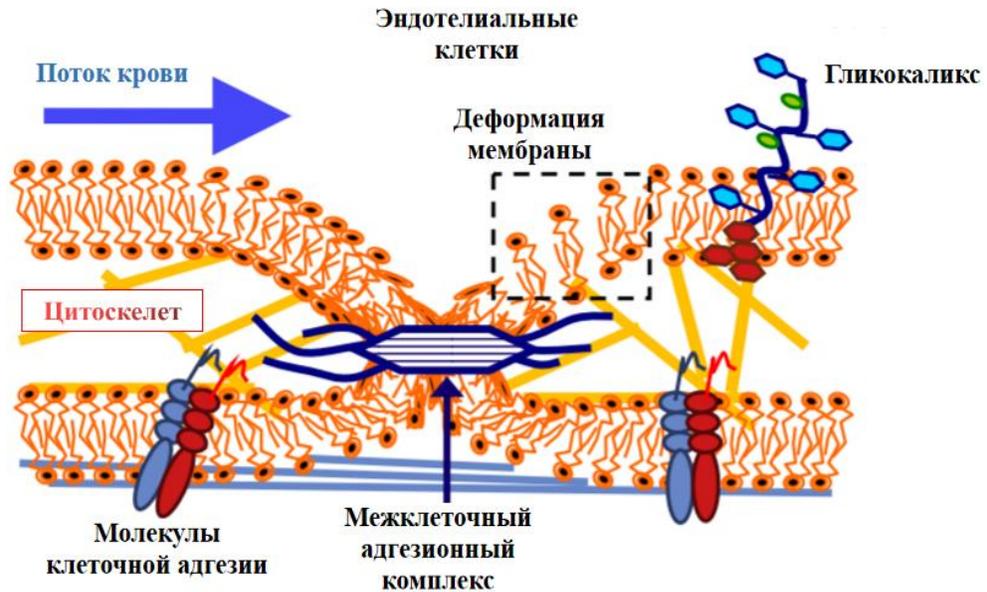


Рисунок 9 – Механизмы восприятия потока сосудистыми клетками [43].

Из всех перечисленных путей одним из наиболее важных вероятнее всего является механо-сенсорный комплекс, который локализуется в межклеточных соединениях. Этот многокомпонентный комплекс состоит из молекулы адгезии тромбоцитов к эндотелиальным клеткам 1 (PECAM-1), эндотелиального кадгерина сосудов и рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2), которые закрепляются между двумя клетками и как было экспериментально показано, ответственны за активацию путей реакции на сдвиговую деформацию, от выравнивания клеток в направлении потока и до возникновения дисфункции эндотелия [41, 43, 47].

Другим общим принципом первичной механотрансдукции является смещение структур, выступающих в просвет сосуда на апикальных мембранах эндотелиальных клеток. Так было идентифицировано две основные апикальные структуры, которые способствуют эндотелиальному ответу, индуцированному потоком: гликокаликс и первичные реснички – органеллы на основе микротрубочек, которые выступают с поверхности большинства клеток млекопитающих. Известно, что многие типы клеток воспринимают поток первичными ресничками, которые наклоняются по мере роста скорости потока, однако, на данный момент остается неясным, как деформация ресничек преобразуется клеткой в сигнал о направлении потока, позволяющем клетке выровнять

относительно него свою поляризацию. Более вероятно, клетки используют механизм определения направления кровотока, который не зависит от первичных ресничек. Взаимосвязь и относительный вклад этих механизмов в различные метаболические пути, вызванные потоком, на данный момент так же мало изучены [43, 49].

Кроме того было высказано предположение, что механический сигнал, генерируемый потоком, приводит к увеличению натяжения мембраны и возможному изменению ее кривизны, что приводит к активации механочувствительных ионных каналов или других мембранных белков, чувствительных к растяжению мембраны или связанных с различными структурами цитоскелета, но в настоящее время так же существует мало прямых доказательств, подтверждающих эти гипотезы [43].

Таким образом, изучение механизмов механотрансдукции в системах *in vitro*, где сила и характер потока могут быть спроектированы и хорошо контролироваться, остается актуальной задачей, поскольку, как было выше отмечено, многие составляющие этого процесса до конца не изучены. Подобные исследования помогают понять, как именно выбранный гидродинамический режим и связанная с ним сдвиговая деформация влияет на основные аспекты нормальной и патологической физиологии сосудистых эндотелиальных клеток, которые так же необходимо учесть при проектировании [46].

1.2.3. Анализ физиологических особенностей клеточного микроокружения при создании модели.

Центральную роль в поддержании целостности сосудов и гомеостаза в ответ на гемодинамические силы и химические сигналы играет артериальный эндотелий, который в первую очередь и подвергается воздействию кровотока [45].

Артериолы, как и все кровеносные сосуды гистологически разделяют на три анатомические оболочки: интиму, медию и адвентицию, каждая из которых имеет специфические морфологические и функциональные различия. Сосудистый эндотелий представляет собой самую внутреннюю структуру (интиму), покрывающую стенки артерий, капилляров и вен. Эндотелиальные клетки в свою очередь прикрепляются к базальной пластинке толщиной 80 нм, при этом образуя гемосовместимую поверхность. Базальная пластинка является ключевой структурой внеклеточного матрикса и содержит гликопротеины, молекулы клеточной адгезии, ламинин, фибронектины, энтактин,

тромбоспондин, протеогликаны, гепаринсульфат, коллаген IV и V типов. Перициты взаимодействуют с эндотелием, регулируют диаметр капилляров, плотные и адгезивные соединения и секрецию белка внеклеточного матрикса, а также дифференцируются в другие типы клеток, включая гладкомышечные, которые играют ключевую роль в регуляции кровотока и сосудистого тонуса и передаче сигналов и, наряду с перицитами, участвуют в определении фенотипов эндотелиальных клеток [31, 32, 41 50].

Таким образом, в непосредственном контакте с компонентами и клетками крови и действием потока находится аблюминальная сторона эндотелиальных клеток, расположенных в интиме и составляющая внутреннюю клеточную выстилку сосудов, тогда как медиа и адвентиция обеспечивают механическую поддержку, противостоящую кровяному давлению [41, 45].

Эндотелиальные сосудистые клетки очень неоднородны по морфологии и функциям в зависимости от их анатомического расположения. Кроме того, их фенотип и поведение модулируется растворимыми медиаторами, механическими силами, межклеточными взаимодействиями с перицитами и гладкомышечными клетками, взаимодействиями между клетками и матриксом, рН, содержанием кислорода, осмоляльностью и рядом других факторов, которые могут варьироваться в микроциркуляторном русле [32, 51].

Биохимически микросреда, окружающая клетки, состоит из цитокинов, факторов роста, гормонов и других биомолекул, которые в совокупности образуют сложные сигнальные пути и содержание которых важно учитывать при создании биологической модели. Очевидно, что микрофлюидные технологии в этом случае также являются хорошим инструментом для воссоздания различных градиентов концентраций, которые могут подчиняться линейным, логарифмическим законам или их комбинациями. В простейшем случае потоки от двух отдельных источников могут быть объединены вместе, и под действием ламинарного состояния эти потоки диффузионно смешиваются. Несмотря на простоту и удобство такого подхода, очевидно, что создание 3D-градиентов концентраций более предпочтительно, так как больше соответствует процессам, протекающим в тканях в естественных условиях [14, 29, 52].

Наряду с биохимическим составом, парциальное давление кислорода в физиологических условиях так же является существенным фактором для осуществления

клеточного роста, выживания и миграции и имеет большое значение для процессов регенерации тканей. При культивировании клеток с использованием традиционных методов поддерживается высокий уровень окружающего кислорода (21%), в то время как в микроциркуляторном русле уровень кислорода редко превышает 10%. Стоит отметить, что клетки, растущие при высоких уровнях кислорода, имеют более короткую продолжительность жизни, которая является результатом клеточного старения и окислительного повреждения ДНК. Таким образом, при создании модели кровеносного сосуда следует стремиться к приближению уровня кислорода к естественным условиям, в чем также способствует применение микрофлюидной технологии [53].

В последние годы широко распространена интеграция нескольких концентрационных градиентов в микрофлюидные системы. Основным недостатком таких систем, замедляющим их практическое использование в биологических исследованиях, можно назвать сложную конструкцию таких устройств. Одним из вариантов упрощения данной задачи является генерация градиентов кислорода в микрофлюидном устройстве при непосредственным добавлении поглотителя кислорода в среду для культивирования [54].

Помимо химического состава важно и физическое воздействие со стороны внеклеточной среды, постоянно передающееся клеткам, которые, в свою очередь, вырабатывают ответ на это воздействие. Вместе с механическим влиянием среды клетки в свою очередь испытывают и механическое воздействие от соседних клеток, находящихся в непосредственном контакте. Можно сказать, что они чувствуют и отвечают на механические изменения, исходящие от внеклеточного матрикса через интегрины, молекулы адгезии и цитоскелет. Таким образом, каждая отдельная клетка и вся ткань в целом постоянно испытывает динамическое устойчивое экзогенное механическое воздействие, влияющее на состояние её жизнедеятельности [14, 29, 55].

Таким образом, все силы, действующие на клетку, в том числе механические воздействия и внешние раздражители, а также сочетание всех биохимических, физических и физико-химических факторов создают динамичную трехмерную среду, параметры которой должны учитываться при создании биологической модели. При конструировании моделей микроциркуляторного русла *in vitro* критически важно учитывать происхождение

и тип эндотелиальных клеток, а для поддержания фенотипа необходимо обеспечить среду, эквивалентную по всем ключевым параметрам условиям в нормальной ткани [14, 29].

Помимо ответа на динамическое состояние микроокружения, клетки также могут идентифицировать и реагировать на физические, химические свойства, включая жёсткость биологического материала, на котором они прикреплены и выращены, что может привести к изменению в их пролиферации, миграции, дифференцировки, профиля экспрессии белка и т.д. Взаимодействие клетка-субстрат зависит от механических свойств поверхности, которые являются ключевым фактором при разработке биомедицинских устройств. Поэтому правильный выбор материала для изготовления микрофлюидного устройства для проведения исследований клеточного ответа играет одну из немаловажных ролей в биомиметическом проектировании [9, 55].

1.2.4. Выбор материалов для изготовления микрофлюидных устройств.

Проблема адгезии клеток к подложкам.

Основные требования к выбору материалов для изготовления микрофлюидных устройств, предназначенных для культивирования клеток, включают в себя оптическую прозрачность, необходимую для четкой визуализации клеток, достаточную степень механической жесткости и гибкости и химическую и реакционную способности поверхности, обеспечивающие необходимое взаимодействие функциональных групп выбранного материала с поверхностью клеток для адгезии и модуляции клеточного взаимодействия. Механические характеристики подложки и химическая реакционная способность поверхности помимо всего прочего влияют на химический состав среды и, как следствие, биологической функции этой микросреды, влияние которой было ранее рассмотрено. Также необходимо учесть технические и экономические факторы, влияющие стоимость материала, его способность к обработке, возможность многократного использования, и конечное назначение устройства в качестве лабораторного инструмента или медицинского импланта [9].

На данный момент наиболее удобным и распространенным материалом для изготовления микрофлюидных устройств в биомедицинских исследованиях является термоотверждающийся кремнийорганический полимер – полидиметилсилоксан (PDMS),

структурную единицу которого можно записать в виде формулы $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}-]$ (рисунок 10) [30, 9, 56].

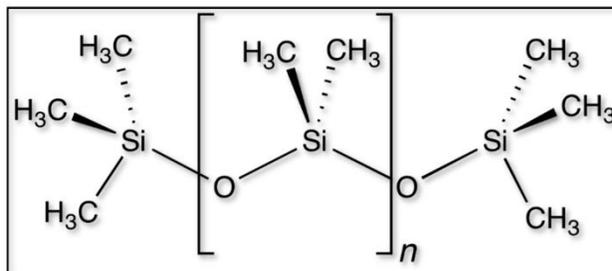


Рисунок 10 – Структура мономера PDMS [30].

В качестве подложки, на которую помещаются клетки, помимо PDMS также часто выступает и покровное стекло. Преимуществом использования стеклянных подложек является изоляционные и реакционно устойчивые свойства стекла и возможность проведения анализа клеток с помощью микроскопии, в том числе конфокальной.

С точки зрения физических и химических свойств PDMS обладает многими качествами, позволяющими использовать его для работы с клеточными культурами – отсутствие цитотоксичности, возможность автоклавирования, газопроницаемость. Так тонкие мембраны, изготовленные из PDMS, могут быть использованы в качестве поверхности газообмена в микрофлюидных устройствах и тем самым поддерживать в растущей культуре необходимый уровень кислорода и углекислого газа. С точки зрения изготовления гибкий характер PDMS позволяет создавать с его помощью интегрированные механические клапаны и насосы, он имеет более низкую аутофлуоресценцию по сравнению со многими пластмассами, используемыми в микротехнологии, что делает его пригодным для визуализации содержимого каналов с помощью флуоресценции. Важно отметить, что такие современные технологии, как, например, мягкая литография, речь о которой пойдет далее, позволяют изготавливать из PDMS структуры порядка микрона. Другие материалы могут иметь преимущества перед PDMS с точки зрения отдельных параметров, но в совокупности он обладает самым полным набором свойств, отвечающих всем требованиям для изготовления микрофлюидных устройств.

В то же время необходимо отметить, что, несмотря на преимущества в использовании PDMS, этот материал также имеет и ряд недостатков. Так, например, водяной пар и органические растворители могут легко проникать через PDMS, что может привести к нежелательным испарениям и изменениям в осмоляльности, которые губительны для культуры клеток. Для предотвращения возникновения этих проблем в качестве альтернативы PDMS могут использоваться прозрачные термопласты, такие как, например, полиметилметакрилаты (PMMA), которые, как правило, имеют более низкую проницаемость, чем PDMS. Так же одной из проблем использования PDMS является его склонность к неспецифической адсорбции белка с последующей адгезией микробов и образованием биопленок, из-за чего его использование в медицинских устройствах (например, катетерах, сосудистых трансплантатах и голосовых протезах) ограничено. В качестве альтернативы PDMS в таких случаях может выступать полистирол, как наиболее распространенный пластик, традиционно используемый для культивирования клеток, а также циклические олефиновые сополимеры. Однако, лучшей стратегией по сравнению с заменой PDMS другим материалом может быть его обработка покрытием или легирование, особенно когда цель заключается в снижении абсорбции малых молекул. В качестве перспективных методов обработки, появившихся в последнее время, можно отметить обработку поверхности диоксидом кремния в виде наночастиц, легированных по методу золь-гель технологии [9, 56-58].

Таким образом, очевидно, что в обозримом будущем PDMS будет по-прежнему выступать в роли быстрого и доступного материала для большинства научно-исследовательских лабораторий, и будет работать во взаимодействии, а не в конкуренции с другими часто используемыми материалами [14].

Наиболее широко используемая форма PDMS для мягкой литографии состоит из двухкомпонентного полимера (коммерческий набор Sylgard 184 DowCorning). Первым компонентом является основание, которое состоит из диметилсилоксановых олигомеров с концевыми винильными группами, платинового катализатора и наполнителя из диоксида кремния (диметилвинилированный и триметилированный диоксид кремния). Второй компонент – отвердитель, который содержит сшивающий агент

(диметилметилгидроксисилоксан) и ингибитор (тетраметилтетравинилциклотетрасилоксан) [53].

Структуры вышеперечисленных соединений представлены на рисунке 11.

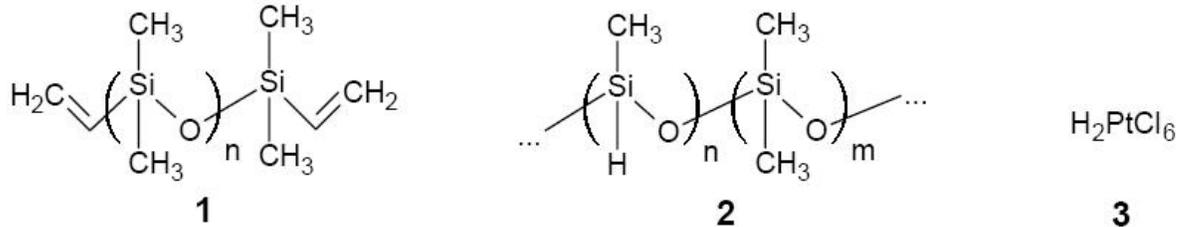


Рисунок 11 – Основные компоненты основания коммерческого набора Dow Corning Sylgard 184 Silicone Elastomer. 1 – диметилсилоксановые олигомеры с концевыми винильными группами, 2 – наполнитель из диоксида кремния, 3 – платиновый катализатор [59].

В присутствии платинового катализатора протекает реакция гидроксирования гидроксиметилированных силоксановых звеньев с последующей «сшивкой» с концевыми виниловыми группами полимерной основы с образованием связи Si–C. Предполагаемая схема протекающих при этом превращений представлена на рисунке 12 [53, 60].

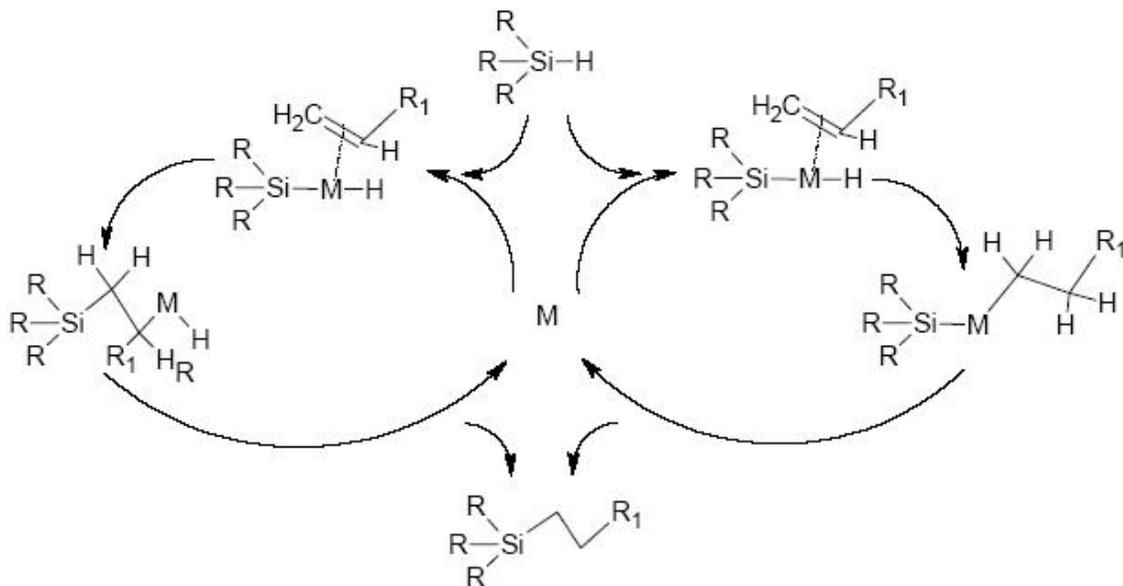


Рисунок 12 – Предположительный механизм реакции гидроксирования, катализируемой переходными металлами (M) [60].

Доля «сшитых» и «несшитых» групп, образующихся при отверждении полимера, зависит от условий обработки (например, температуры и времени отверждения) и соотношения компонентов. Поскольку эти условия могут различаться при разных протоколах использования данного материала, количество не сшитых, низкомолекулярных олигомеров из основания или отвердителя также может различаться для каждого готового полимера. Иными словами, эластичность готового образца PDMS может быть модифицирована и тонко настроена путем изменения соотношения основания и отвердителя [53, 55].

В литературе описано, что соотношение основы и отвердителя 10:1 является наиболее часто используемым для получения оптимальных физических свойств PDMS. При таком соотношении избыток основы приводит к возникновению вторичных реакций, которые приводят к образованию дополнительных Si–OH-групп на поверхности PDMS. В свою очередь изменение отношения основания к отвердителю до 20:1 уменьшает сшивку и жесткость полученного готового полимера, что в свою очередь влияет на его физико-химические свойства [61].

Помимо этого, немаловажную роль играют не только свойства самого полимера, но и физико-химические свойства его поверхности. В первозданном состоянии PDMS обладает низкой поверхностной энергией, около 20 дин/см², что ограничивает адгезию некоторых типов клеток на субстрате. Нарушение адгезии и, как следствие, открепление клетки – сложный процесс, который может происходить через различные механизмы, многие из которых недостаточно хорошо понимаются на молекулярном уровне. Например, отслоение может происходить путем диссоциации рецептор-лигандных связей, изменения в конформации белков внеклеточного матрикса ЕСМ для связывания рецепторов клеток или передачи сигналов, ингибирующих рост клетки. В противовес этому, описанное ранее появление дополнительных полярных групп на поверхности PDMS повышает его гидрофильность и, как следствие, улучшает клеточную адгезию [53].

Очевидно, что это связано с тем, что гидрофильные и гидрофобные поверхности связывают белки по-разному: белки могут адсорбироваться интактными или могут разворачиваться – терять нативную конформацию для минимизации свободной энергии

системы. Водорастворимые белки в физиологической среде обычно имеют глобулярную форму с гидрофобным ядром и гидрофильными и заряженными боковыми цепями аминокислот, экспонированными в раствор. Таким образом, на гидрофильных поверхностях адсорбция белка происходит через полярные и ионные взаимодействия. Конформационные изменения белков, как правило, при этом не индуцируются, и белки связываются в их нативной конформации с интактными водными оболочками. Это приводит к довольно слабой, в основном обратимой, адсорбции белка.

На гидрофобных поверхностях белки связываются необратимо из-за дегидратации границы раздела и отсутствия промежуточных гидратных оболочек. Дегидратация как субстрата, так и поверхности белка обеспечивает адсорбцию на гидрофобных поверхностях. Это неизбежно приводит к значительным перестройкам конформаций белков с частичным или полным их разворачиванием. Гидрофобные аминокислоты белкового ядра формируют гидрофобные взаимодействия с поверхностью подложки, при этом большинство полярных и заряженных аминокислотных остатков ориентированы в сторону водного раствора. Степень конформационных изменений поверхностных белков отражает баланс между силой взаимодействия белок-поверхность и конформационной стабильностью белка. Адсорбированный слой белка образуется в течение первых нескольких секунд контакта между поверхностью и раствором и определяет релевантность поверхности последующему прикреплению и распластыванию клеток [37, 42, 62-64].

После адсорбции белков инициируются прикреплению и распластывание клеток благодаря неспецифическим взаимодействиям между клетками и поверхностью, декорированной белком. Они включают электростатическое, электродинамическое, стерическое и энтропийное взаимодействия. Первые два основаны на наличии фиксированных зарядов и диполей как на поверхности клетки, так и на поверхности субстрата. С другой стороны, тесная адгезия между клеткой и поверхностью требует сжатия гликокаликса и поверхностного слоя белка на клеточной мембране, который вызывает стерическое и энтропийное отталкивание. Как только баланс неспецифических взаимодействий обеспечивает достаточную близость клетки к поверхности, происходят специфические взаимодействия между рецепторами клеточной поверхности и

иммобилизованными на поверхности белками, что обеспечивает механическое закрепление клеток к подложке [37, 65].

Стабильная фиксация клеток к подложке зависит от экспрессии интегринов, и их сродства к внеклеточным белкам, предварительно адсорбированным на поверхности, а также состава белкового слоя на поверхности и конформации адсорбированных белков. Эти условия в конечном итоге определяют судьбу клеток, седиментирующих на поверхности *in vitro*: клетки могут плотно прикрепляться и распластываться, увеличивая площадь контакта с поверхностью или могут сохранять «ошаренную» морфологию, оставаясь плохо прикрепленными и неспособными к распластыванию. В последнем случае специфические взаимодействия не могут быть сформированы, и клетки, зависящие от субстрата, будут погибать [62, 66].

Многочисленные экспериментальные данные показывают, что в связи с вышеописанными причинами, клетки, как правило, проявляют слабую адгезию к необработанной поверхности PDMS и часто создают агрегаты, из-за чего остро встаёт вопрос в модификации поверхности данного полимера. Кроме того, важно учитывать, что каждый тип клеток имеет специфическую адгезию к поверхности, вследствие чего необходимо оптимизировать параметры модификации поверхности PDMS в зависимости от типа клеток и источника их происхождения. Различные методы модификации поверхности, приводящие к ее гидрофилизации, повышают поверхностную энергию поверхности PDMS, улучшая прикрепление клеток, поскольку поверхность PDMS с концевыми ОН-группами демонстрирует более высокую доступность домена связывания для фибронектина, белка ЕСМ и витронектина [55, 61].

Одним из наиболее распространенных методов модификации поверхности является кислородно-плазменная обработка и последующее осаждение на поверхности гидрофильных белков (рисунок 13) [55].

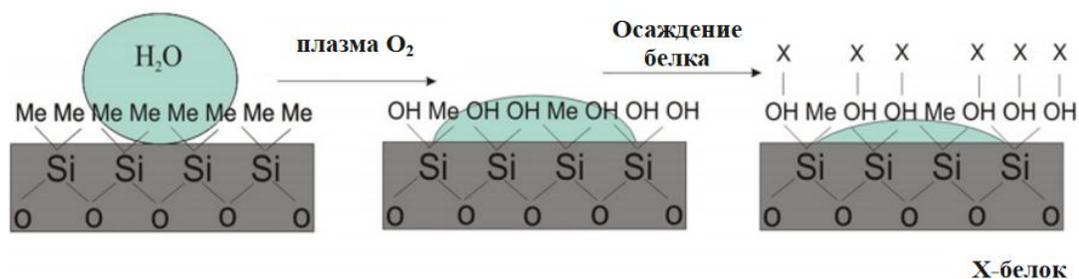


Рисунок 13 – Схема модификации поверхности PDMS кислородом плазмы с последующей адсорбцией белка ECM [61].

Во время плазменной обработки с материалом происходит три основные реакции – травление, образование свободных радикалов и ионная бомбардировка. В результате вышеперечисленных реакции происходит сильное окисление органических групп на поверхности материала за счёт того, что O_2 плазма содержит высоко энергонасыщенные электроны, ионы и радикалы, вступающие с ними во взаимодействие. В результате этого кратковременная обработка O_2 плазмой может изначально гидрофобную поверхность PDMS преобразовать в сильно гидрофильную путем окисления метильных групп на поверхности, которые могут затем сформировать силанолы (рисунок 14). При этом поверхность становится сходной по свойствам с диоксидом кремния [65, 67-69].

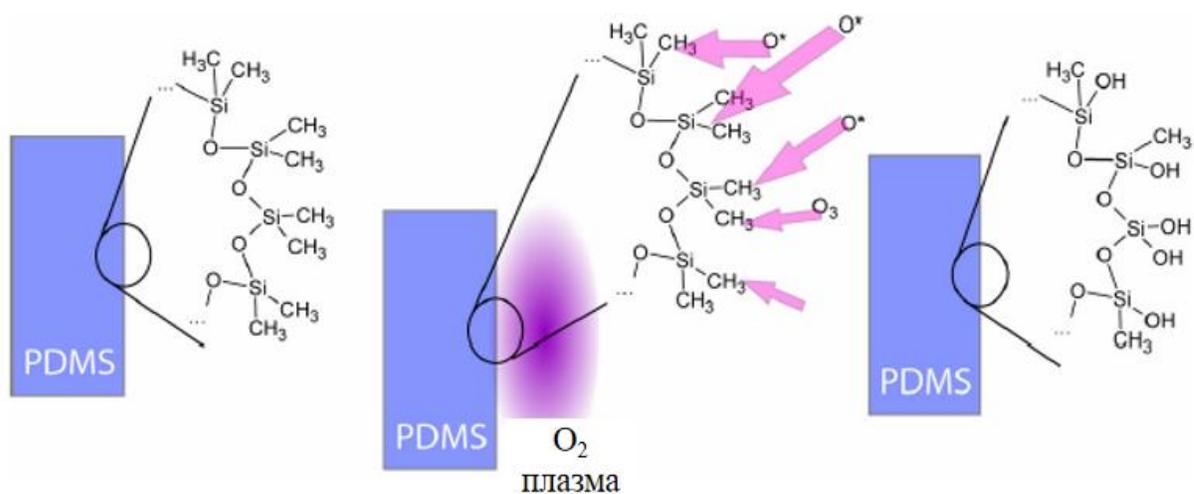


Рисунок 14 – Гидрофилизация поверхности PDMS с использованием O_2 плазменной обработки [70].

Наличие групп схожих по свойствам с диоксидом кремния на поверхности микроканалов делает их гидрофильным, и, таким образом, облегчает прохождение жидкостей по каналам. Кроме этого, плазменная обработка PDMS, создавая слой SiO_2 на поверхности, значительно затрудняет избыточную диффузию кислорода через PDMS [68].

Важно так же отметить, что в зависимости от газа, используемого при плазменной обработке, плазма сама может способствовать выходу групп на поверхности подложки или может использоваться для активации поверхности для последующего связывания водорастворимых полимерных цепей и снижения гидрофильности поверхности, что может быть полезно для предотвращения избыточной микробной контаминации в микрофлюидном устройстве [71].

Однако следует отметить, что этот эффект от плазменной обработки не является постоянным и будет затухать в течение нескольких часов, так как цепи силоксана с низким молекулярным весом в объемах PDMS могут мигрировать к его поверхности. Решением этой проблемы является сохранение образцов полимера в водной среде, что приводит к сохранению гидрофильности образца в течение недели, замедляя процесс восстановления и переориентации [55, 69, 71].

Обработка поверхности кислородной плазмой используется не только для гидрофилизации, но и может быть применено для склеивания готового устройства. При этом достигается сильная прочность сцепления и поддерживается стойкая герметизация при использовании низкой нагрузки. Сцепление происходит за счет реакции конденсации между силанольными группами, которые после обработки плазмой «прижимаются» друг к другу (рисунок 15). Как для PDMS, так и для стекла, чаще всего используемого в качестве подложки, эта реакция приводит к образованию связи Si-O-Si после потери молекулы воды [67, 68, 72, 73].

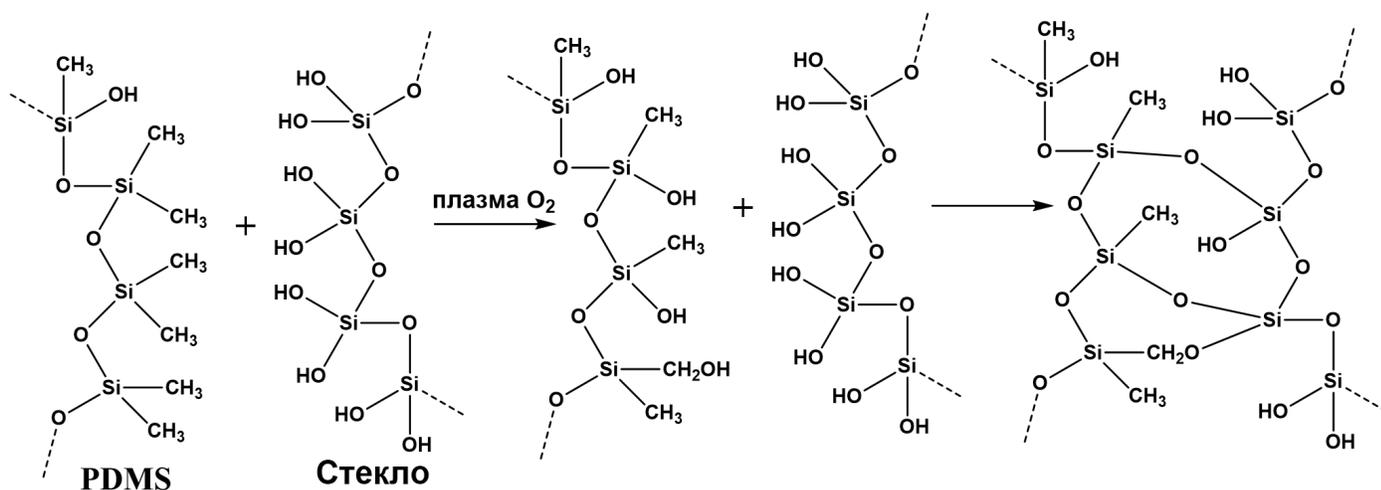


Рисунок 15 – Возникновение ковалентной связи между стеклом и PDMS в результате плазменной обработки [70].

Последовательный процесс активации плазмой отличается от других подходов тем, что в этом случае герметичность и высокая прочность соединения достигаются при низкой температуре. Низкотемпературная герметизация особенно важна в микрофлюидике, так как при генерации потоков с высокими скоростями давление в таких устройствах может достигать высоких значений, при которых может возникнуть разрыв канала, а высокие температуры могут повреждать стекло или полимерный материал, которые могут так же использоваться при изготовлении готового устройства [72].

Альтернативным и недорогим методом гидрофилизации поверхности так же можно считать химическую обработку материала так называемым раствором «пиранья», содержащем смесь 30% очищенной H_2O_2 и 98% H_2SO_4 в соотношении 2:3 в течение 15 мин с последующим погружением в раствор KOH. Гидрофилизация поверхности в данном случае также происходит за счет окисления метильных групп. Среди других методов химической обработки поверхности PDMS можно выделить погружение в 0,5 М кипящую HCl на 10 минут, а также погружение образцов в ацетон в ультразвуковую ванну на 5 минут с последующей промывкой деионизированной водой и погружением в 30% H_2O_2 на час. Однако немаловажно отметить, что химическая обработка хоть и заметно повышает гидрофильность поверхности, мало чем помогает в последующем улучшении адгезии, роста и пролиферации клеток на PDMS из-за возможного присутствия на поверхности

продуктов окисления, которые не совместимы с обеспечением нормальной жизнедеятельности клеток, в связи с чем ее можно применять лишь в ограниченных случаях [55, 73].

Все вышеназванные выводы об изменении физико-химических свойств PDMS и его поверхности при разных способах его получения и последующей обработки продемонстрированы и подтверждены в литературе путем измерения краевого угла смачивания (СА), модуля упругости и рядом других методов.

В таблице 1 приведены данные для образцов PDMS с разным соотношением основания к отвердителю при обработке и в условиях ее отсутствия [55, 65].

Таблица 1. Значения СА и шероховатости для PDMS с различными соотношениями основания к отвердителю без обработки, после обработки плазмой и химической обработке.

Основание/ Отвердитель	«Чистый» PDMS		Обработка плазмой O ₂		Химическая обработка	
	СА	Шероховатость (нм)	СА	Шероховатость (нм)	СА	Шероховатость(нм)
5:1	101,77±1,5	0,656±0,027	11,29±2	0,348±0,075	21,65±2,5	9,36±0,209
10:1	100,25±2	0,602±0,004	9,87±1,5	0,337±0,008	20,62±3	12,6±0,7
15:1	94,91±2	0,571±0,011	11,38±2,5	0,250±0,016	19,63±2	14,4±0,723
20:1	95,2±2,5	0,422±0,016	10,61±1,5	0,208±0,011	15,35±2	20,4±0,75

Из таблицы видно, что в отсутствии обработки («чистый» PDMS) образцы с избыточным основанием менее гидрофобны по сравнению с образцами с избыточным отвердителем. После химической или плазменной обработки наблюдается значительное снижение СА для всех составов PDMS, что подтверждает гидрофилизацию обработанных образцов, наиболее предполагаемая причина которой была описана ранее. При этом между различными составами полимера ни в одном из обработанных образцов не наблюдается никаких существенных изменений в СА и, следовательно, степени гидрофилизации поверхности.

Измерения СА так же проводились для образцов PDMS, обработанных плазмой и раствором пирани, не только сразу после обработки, но и после их выдерживания в

культуральной среде внутри инкубатора в течение 5 дней. Было обнаружено, что с течением времени свойства поверхности практически не меняются, что, в свою очередь, указывает на то, что гидрофильность образцов может сохраняться длительное время в моделируемой физиологической среде.

Кроме того, следует отметить изменение значений СА при адсорбции белков. На рисунке 16-А показана экспериментально полученная зависимость СА и соотношения основания к отвердителю после физической адсорбции поли-L-лизина, фибронектина, желатина, ламинина и коллагена. Как видно из представленных данных, обработка поли-L-лизином и фибронектином незначительно меняет свойства поверхности PDMS, обработка желатином позволяет снизить СА до $35,8 \pm 4,7$ (для соотношения 20:1), ламинином до $47,6 \pm 10,3$ (для соотношения 10:1), а коллагеном до $31,0 \pm 3,9$ (для соотношения 10:1). При этом как правило, самая высокая гидрофильность наблюдается при соотношении 20:1, что подтверждает ранее выдвинутое предположение, что избыточное содержание отвердителя может улучшить физическую адсорбцию белков на поверхностях PDMS [61].

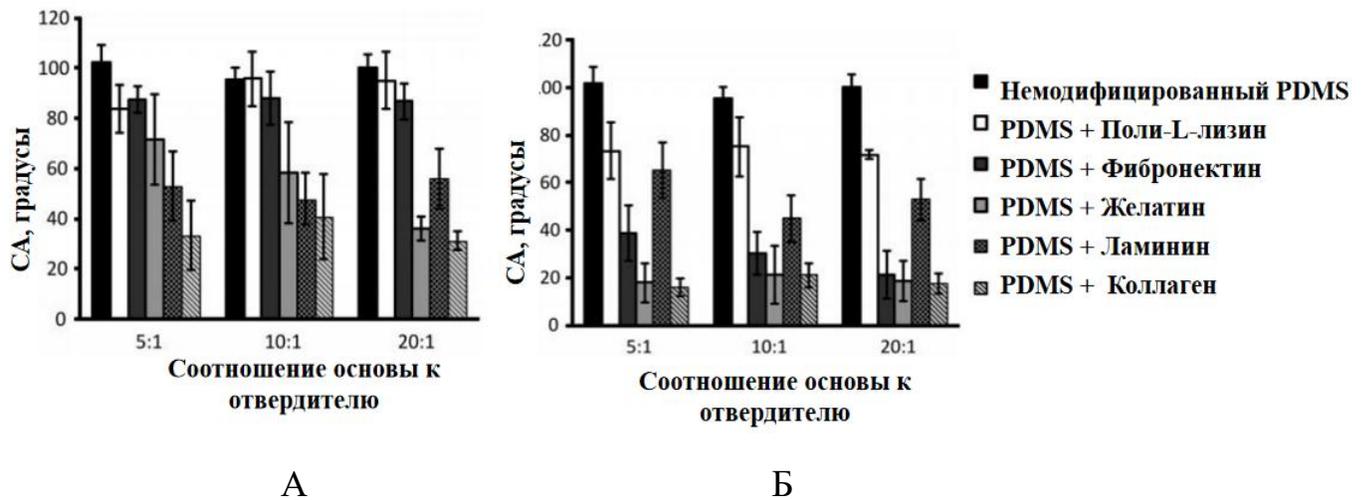


Рисунок 16 – Зависимость СА и отношения основания к отвердителю после модификации образцов PDMS различными белками. (А) без предварительной активации PDMS, (Б) с предварительной активацией кислородной плазмой [55].

Обработка плазмой позволяет получить наименьшее значение СА для каждого тестируемого образца (рис. 16-Б). При этом покрытие активированных образцов PDMS

желатином и коллагеном вызывает наибольшее снижение гидрофобности PDMS. Например, СА для соотношения 10:1 составляют $21,3 \pm 12,3$ (желатин) и $20,9 \pm 5,1$ (коллаген). Обработка фибронектином так же значительно снижает гидрофобность поверхности PDMS.

Таким образом, было доказано, что адсорбция белков оказывает существенное влияние на смачиваемость и гидрофильность поверхности PDMS. При этом поверхность PDMS должна быть активирована для получения более сильного связывания белков [61].

Как видно из Таблицы 1, для различных соотношении основы к отвердителю не наблюдается существенного изменения значения шероховатости как в обработанных, так и не в обработанных образцах. Так, согласно представленным данным, среднеквадратичная шероховатость в «чистом» PDMS варьируется от 0,422 до 0,656 нм с максимумом для образца, имеющего самые высокие составы отвердителя. После воздействия плазмы кислорода поверхности PDMS становятся более гладкими (0,208-0,384 нм) из-за образования связей SiOx, приводящей к сглаживанию верхней поверхности полимера. Однако после химической обработки среднеквадратичная шероховатость поверхностей PDMS увеличивается более чем на один порядок, что может быть связано с выделением локального тепла при экзотермической реакции окисления поверхности раствором пираньи, что приводит к увеличению значения напряжения в обрабатываемой области. Так же следует отметить, что вероятно максимальная шероховатость наблюдается в результате неадекватной полимеризации длинноцепочечных молекул за счет уменьшения соотношения основания и отвердителя [55].

Таким образом, можно сказать, что поверхностные свойства исследуемого полимера в большей степени зависят от способа и параметров его обработки (плазменной или химической), чем от его состава (соотношения основы к отвердителю) и условий отверждения (время и температура).

Помимо обеспечения стабильной адгезии к субстрату выбранный материал по физико-химическим свойствам должен обеспечивать и дальнейшую нормальную жизнедеятельность клеток, культивируемых в микрофлюидном устройстве. Так следует учесть, что большая часть клеток в организме человека является адгерентными, т.е. функционирующими в прикрепленном к внеклеточному веществу и другим клеткам виде. В случае, если адгерентные клетки не могут найти подходящие сайты для адгезии, они

подвергаются апоптозу. Таким образом, поверхность имеет решающее значение не только для первоначальной адгезии, но и для дальнейшего поддержания жизнеспособности клеток [55, 64, 74].

Сравнительный анализ экспериментальных данных на различных клеточных линиях показал, что поверхностные свойства PDMS доминируют в первоначальной адгезии и распластывании клеток независимо от их типа, тогда как на дальнейшую их пролиферацию в большей степени влияют физические свойства материала, такие как модуль упругости, причём эти свойства влияют на клетки по-разному в зависимости от их фенотипа. Так, из литературных данных известно, что рост некоторых клеток (например, эндотелиальных клеток и фибробластов) был более быстрым на жесткой поверхности (1-3 МПа) по сравнению с мягкой (0,1-10 кПа). В противовес этому кератиноциты демонстрировали большую пролиферацию и скорость роста в условиях более низкого модуля Юнга [55, 75-77].

В случае культивирования стволовых клеток на PDMS наблюдалась картина, отличная от описанной выше. Так, было показано, что более жесткие, гладкие или менее гидрофобные поверхности могут способствовать размножению стволовых клеток разных типов, причём состав PDMS так же влияет на длительную пролиферацию, но не влияет на начальную клеточную адгезию [74].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что сразу несколько поверхностных и физико-химических свойств PDMS оказывают комбинаторное влияние на поведение клеток, которое отличается от эффектов, вызванных изменениями любого отдельного фактора, что делает необходимым комплексный анализ всех свойств при оптимизации условий биомоделирования для каждого конкретного типа исследований.

Кроме того, совокупность всех условий приготовления (время и температура отверждения, отношение основания к отвердителю) и методов модификации поверхности PDMS могут приводить к изменениям его физико-химических свойств, таких как химия поверхности и жёсткость подложки, что может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на поведение различных типов клеток, что делает актуальной задачу оптимизации подбора условий работы с данным материалом в приложении к конкретному типу клеток, выступающих в качестве объекта исследований [53, 55].

1.2.5. Способы и этапы изготовления микрофлюидных устройств.

После подбора соответствующих материалов и оптимизации способов их предварительной обработки, следующей задачей становится сборка микрофлюидной модели. В литературе зарекомендовали себя такие методы изготовления микрофлюидных устройств, как LIGA-технологии (рентгеновская литография на синхротронном излучении (LI), гальванопластика (G) и формовка (A)) лазерная абляция, обработка алмазными порошками, штамповка, горячее тиснение, литье под давлением и др. Классификация современных методов изготовления микрофлюидных устройств представлена на рисунке 17 [6, 78].



Рисунок 17 – Классификация технологий, применяемых для изготовления микрофлюидных устройств [79].

Из всех вышперечисленных методов наиболее часто используемым является мягкая литография. Суть метода заключается в заполнении полимерным материалом (чаще всего – PDMS) кремниевой формы (матрицы) с инвертированными геометрическими формами, ее затвердевании при температуре и извлечении из формы. Две части полимера (или полимер и стеклянную подложку) затем соединяют, чтобы сформировать закрытую систему камер и микроканалов [9].

Необходимые для мягкой литографии матрицы, как правило, изготавливаются с использованием фотолитографии, глубокого реактивного ионного травления дифторидом ксенона, гальванических и ряда других методов. В основе метода фотолитографии лежит использование фоторезиста – фоточувствительного материала, свойства которого меняются под воздействием ультрафиолетового света, и фотошаблона для создания необходимой геометрии каналов, нанесенной на подложку. Фоторезист экспонируется при УФ-излучении через фотошаблон и проявляется. Травление стекла выполняется плавиковой кислотой (рисунок 18) [9, 79, 80, 81].

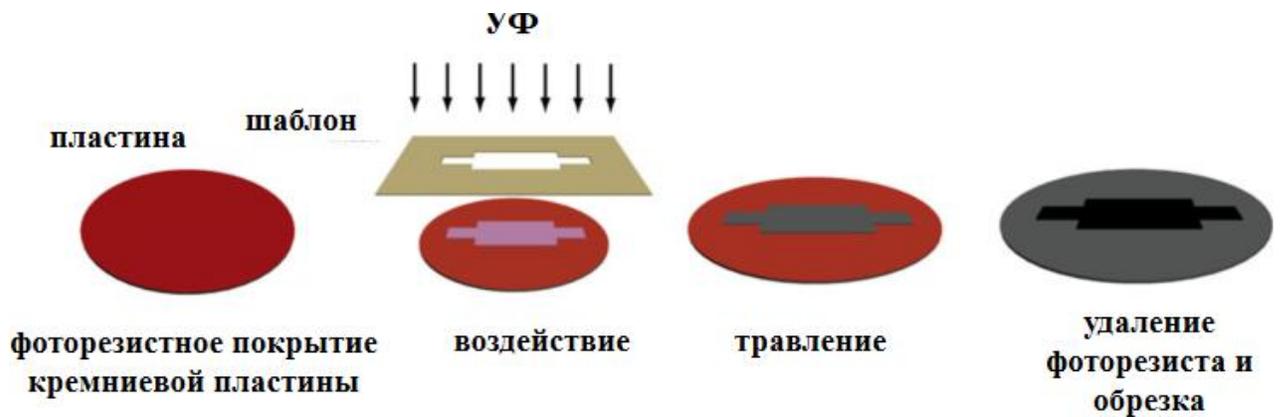


Рисунок 18 – Изготовление матрицы с помощью фотолитографии [80].

В отличие от мягкой литографии, где главным преимуществом является быстрота производства, литье под давлением и горячее тиснение позволяют осуществлять более масштабное изготовление одноразовых микрофлюидных устройств. Процесс тиснения основан на различии в термомеханических свойствах между матрицей и подложкой. Основным принцип данной технологии заключается в том, что термопластичный материал подложки сначала нагревают выше его температуры стеклования, затем форма или матрица прижимается к подложке, что позволяет полимеру заполнить матрицу. При охлаждении шаблон матрицы передается на подложку. Обычно в таких случаях используются жесткие основы, изготовленные из кремния или никеля, полученные с помощью дорогостоящих методов, таких как, например, гальванопластика, в связи с чем становится понятно, что

мягкие формы, изготовленные из полимеров, таких как PDMS или эпоксидные смолы, являются более практичным и экономически выгодными [78].

Таким образом, именно широкое использование, доступность и относительная простота литографических методов отчасти сделали микрофлюидную технологию мощным и доступным инструментом для тканевой инженерии и создания биологических моделей [81].

Для создания готовой биологической модели и поддержания ее стабильной работы после изготовления устройства следующим шагом становится монтаж стендовой микрофлюидной системы – подключение устройства к системам дозирования и управления потоками жидкостей, поддержания температуры, создание асептических условий и детекции клеточного ответа.

Остановимся далее на основных элементах данной системы.

1.2.6. Основные элементы стендовой микрофлюидной системы.

Точками взаимодействия между областью культивирования и внешней средой служат входные и выходные порты микрофлюидного устройства, с помощью которых оно посредством игл и трубок подключается к системам дозирования и управления потоками жидкостей. Так как жидкость должна попадать в систему и прокачиваться через нее, создавая ламинарный режим течения, устройство должно быть оснащено системой специальных клапанов и насосов, которые могут быть либо подключены к внешнему устройству, либо непосредственно встроены в систему. Для поддержания необходимого гидродинамического режима применяется большое разнообразие насосов (рисунок 19) с различным устройством движущих механизмов, каждый из которых имеет свои характеристики и преимущества [5, 9, 35, 56, 82].

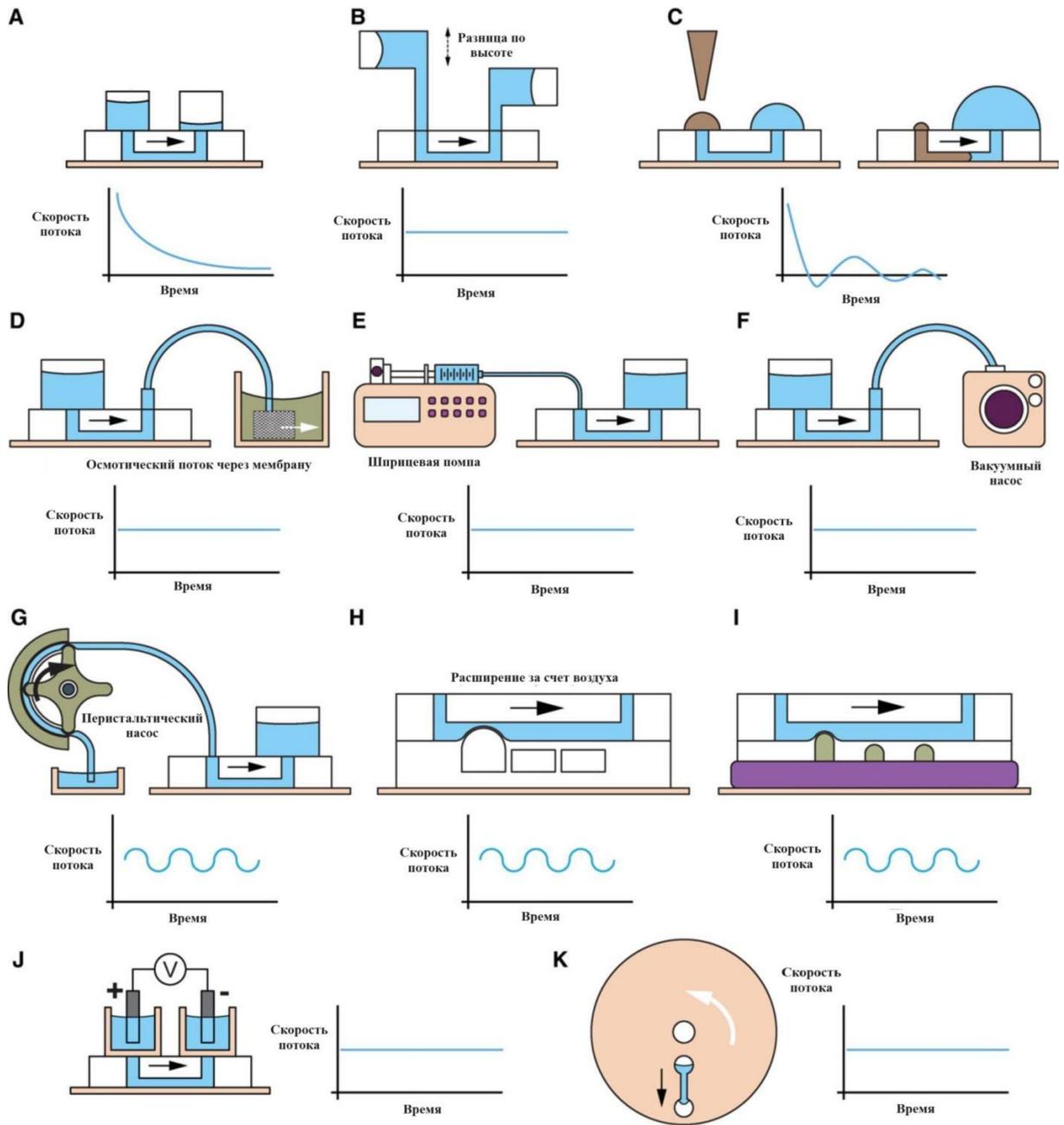


Рисунок 19 – Основные типы насосов, используемых в микрофлюидных устройствах. (А) Насос действующий за счет силы тяжести с вертикально ориентированными резервуарами, (В) Насос действующий за счет силы тяжести с горизонтально ориентированными резервуарами, (С) Насос, действующий на основе сил поверхностного натяжения капель (D) осмотический насос, (Е) шприцевой насос с положительным давлением (F) вакуумный насос с отрицательным давлением, (G) перистальтический насос, (H) перистальтический насос с пневматическим давлением, (I) перистальтический насос Брайля (J) электрокинетический насос, (K) центробежный насос [82].

В большинстве микрофлюидных систем используются внешние насосы, которые могут быть подключены к портам доступа через трубки. При этом наиболее широкое применение находят шприцевые и вакуумные насосы. Шприцевые насосы используют поршень для создания избыточного давления, чтобы вытолкнуть жидкость из жидкостного канала (рис. 19 E), в то время как вакуумный насос, наоборот, вытягивает жидкость, создавая отрицательное давление (рис. 19 F). Обычно такой метод применяется к системам, для которых необходим постоянный поток жидкости для своевременного пополнения питательных веществ и удаления отходов [14].

Недостатком шприцевых насосов является то, что они оперируют ограниченным объемом жидкости, заключенной внутри одного шприца, и, следовательно, рассматриваются как закрытые системы, в отличие от насосов, работающих за счет силы тяжести, что может стать серьезной проблемой для проведения экспериментов, где необходимы большие объемы перфузии в течение длительного периода времени. Решением подобной проблемы может стать использование вакуумных насосов, которые, в том случае если резервуар на входе постоянно заполнен, представляют собой открытую систему. При этом необходимо отметить, что и в шприцевых, и в вакуумных насосах есть движущиеся элементы, что делает их установку и эксплуатацию более дорогостоящей по сравнению с насосами с пассивными методами закачки жидкости [82].

Так насосы, использующие пассивный поток жидкости (рис 19, A-D), просты в использовании и являются выгодным с точки зрения высокой пропускной способности для выполнения большого числа анализов. Однако, они не подходят для создания биологических моделей кровеносных сосудов, где поддерживается прецизионный гидродинамический режим.

Перистальтические насосы основаны на принципе принудительного вытеснения, при котором гибкий трубопровод сжимается для вытеснения жидкости внутри трубопровода (рис. 19 G-I). Поток в таком случае является пульсирующим и колебательным, а не постоянным, что подходит не для всех типов биологических моделей. Основное же преимущество таких устройств заключается в способности создавать двунаправленный поток.

Электрокинетические или электроосмотические насосы для создания активного потока используют электричество, но основаны на совершенно ином принципе, чем механические насосы (рис. 19-И). Их конструкция очень проста из-за отсутствия движущихся частей. Такие устройства считаются «открытыми» системами, позволяющими добавлять жидкость во входное отверстие, но не создающие параболический профиль скоростей внутри канала, что не соответствует ламинарному режиму течения. При использовании таких устройств требуются материалы, ионизируемые на поверхности, и существует риск электролиза, что ограничивает использование таких насосов для долгосрочного культивирования.

Центробежные микрофлюидные насосы являются уникальными устройствами, в которых поток создается путем вращения микрофлюидного устройства на двигателе для создания центробежных сил (рис. 19-К). При этом центробежные силы способны генерировать широкий диапазон скоростей потока: от менее десятков нл/мин до более сотен л/мин за счет контроля размеров каналов и изменения скорости вращения. Однако поток, генерируемый таким методом, обычно однонаправленный (от центра к внешнему краю), что исключает возможность рециркуляции потока.

С учетом всего вышесказанного, очевидно, что будущее остается за устройствами, объединяющими в себя несколько видов насосов, усиливающих преимущества и минимизирующих недостатки каждого отдельного из них. Кроме того, выбор типа насоса будет зависеть от выбранного гидродинамического режима будущей модели [82].

Помимо гидродинамических характеристик, температура также является важным параметром окружающей среды, регулирующим большинство физических, химических и биологических процессов, в связи с чем важной задачей становится ее поддержание в стендовой микрофлюидной системе в физиологическом диапазоне. Неконтролируемый температурный профиль может приводить к денатурации белков и нуклеиновых кислот, лизису клеток и образованию пузырьков, которые создают значительные градиенты давления и при прохождении через микроканал приводят к откреплению клеток от поверхности. Изменение температуры также может влиять на такие свойства клеточной суспензии как, вязкость, теплопроводность и электропроводность, что так же искажает результаты эксперимента [83].

Для контроля температуры в микрофлюидных устройствах чаще всего используются методы охлаждения и нагрева, основанные на эффекте Пельтье, заключающимся в прохождении электрического тока через соединение двух проводников с разными значениями электрического потенциала, что приводит к переносу тепла от одного проводника к другому. Модули Пельтье, размещенные вне микрофлюидного канала, функционируют как внешние системы охлаждения. При этом важно отметить, что, если температура должна быть равномерной в пространстве канала, между элементом Пельтье и образцом нужно использовать теплораспределительную пластину, изготовленную из материала с высокой теплопроводностью, например, алюминия. При этом необходимо учитывать тепловые свойства материалов, отделяющих датчик от микрофлюидного канала или камеры, поскольку для точного отображения измеренной внешней температуры с фактической внутренней температурой необходимо учитывать рассеивание тепла. Использование же микронагревателей внутри микрофлюидного канала при условии, что его изготовление совместимо с процессом изготовления микрофлюидного устройства, может изменить характер потока, вызвать нежелательные химические реакции и даже повредить само устройство [79, 83].

Таким образом, стендовая микрофлюидная система представляет собой сложную замкнутую сеть, внутри которой поддерживаются физиологические значения температуры, гидродинамический режим и стерильные условия, достигающиеся путем использования в процессе эксперимента различных детергентов и проведения процессов в ламинарном шкафу. Собранный система позволяет использовать микрофлюидное устройство в качестве биологической модели, основное назначение которой, в случае модели имитации участка кровеносного сосуда заключается в исследовании влияния гидродинамического режима на физиологию эндотелиальных сосудистых клеток.

Ранее были отмечены предполагаемые механизмы, с помощью которых клетка воспринимает поток, а далее отметим то, к чему приводит действие потока и какие элементы этого взаимодействия на данный момент нуждаются в дальнейшем исследовании с помощью микрофлюидных моделей.

1.3. Влияние гидродинамического режима на физиологию эндотелиальных сосудистых клеток.

1.3.1. Фенотип и морфология эндотелиальных клеток.

С точки зрения физиологии нормальным считается ламинарный поток, который связан с физиологическим фенотипом эндотелиальных клеток. Области с устойчивым однонаправленным ламинарным потоком являются атерозащитными, поддерживающими нормальное функционирование эндотелиальных клеток. В артериальных участках с нарушенным кровотоком клетки подвергаются стрессу и подвергаются более высокому риску потери функции и образования атеросклеротических бляшек. Таким образом, гемодинамический режим может индуцировать различные адаптивные фенотипы в эндотелиальных клетках [46, 84, 85].

В нормальных артериях есть зоны разделения потока, которые различаются характером сдвиговой деформации и локальными реакциями эндотелия на механические воздействия. При нарушенной сдвиговой деформации эндотелиальные клетки хронически подвергаются аритмическим изменениям гемодинамических сил и, следовательно, переключают фенотип в сторону повышенной проницаемости для макромолекул плазмы, усиленного обмена и повышенных адгезионных свойств моноцитов [46].

Создаваемая потоком сдвиговая деформация также способствует дифференцировке эндотелиальных клеток в фенотип гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), состоящего из церебральных микрососудистых эндотелиальных клеток, характеризующихся отсутствием фенестраций, небольшим количеством пиноцитозных везикул и наличием хорошо развитых плотных соединений, которые образуют диффузионный барьер, избирательно исключающий попадание большинства переносимых кровью веществ в мозг [86].

К элементам морфологии сосудистых клеток, регулируемым потоком, можно отнести форму, размер и внешний вид. На микроскопическом уровне можно пронаблюдать, как сами эндотелиальные клетки адаптируются по форме к полю напряжения сдвига – клетки, культивируемые в отсутствие напряжения сдвига, имеют вид булыжника, в то время как наличие фонового напряжения сдвига приводит к веретенообразной морфологии в направлении потока. Выравнивание эндотелиальных клеток по направлению потока было неоднократно показано в исследованиях *in vivo* [42, 55].

Немаловажен также тот факт, что в прямых сегментах артерий эндотелиальные клетки поляризованы, вытягиваются параллельно направлению движения жидкости, что снижает сопротивление потоку и способствует их выживанию. В областях с нарушенным течением и низким напряжением сдвига клетки располагаются не параллельно оси сосудов и имеют менее поляризованную форму. Такая топология приводит к воздействию на клетки более высоких градиентов напряжения сдвига и делает их более чувствительными к атеросклерозу [46].

Таким образом, исследования *in vivo* предполагают, что нарушенные паттерны кровотока нарушают эндотелиальную функцию и инициируют фенотипические изменения, ведущие к эндотелиальной дисфункции и способствующие индукции атеросклероза [46].

1.3.2. Миграция, пролиферация и дифференцировка эндотелиальных клеток.

Как известно, клеточная пролиферация представляет собой увеличение общего количества клеток и является результатом баланса между новыми делениями клеток и гибелью клеток или их дифференциации. В условиях *in vivo* было обнаружено, что когда кровотоки в сонных артериях собак был усилен путем хирургического создания артериовенозного шунта, плотность эндотелиальных клеток заметно увеличилась в ответ на усиление кровотока, а исследования *in vitro* с использованием эндотелиальных клеток в микрофлюидных устройствах показали, что устойчивый ламинарный поток снижает пролиферацию эндотелиальных клеток, тогда как турбулентный поток, наоборот, повышает. Это может быть связано с тем, что ламинарный поток останавливает эндотелиальные клетки в фазе $G_0=G_1$ клеточного цикла за счет повышения концентрации ингибитора циклинзависимой киназы p21. Кроме того под действием потока сосудистый эндотелий обладает способностью восстанавливать участки эндотелиальных клеток, оголенные в результате токсического повреждения или механического слущивания, а соседние клетки мигрируют и пролиферируют, регенерируя поврежденный эндотелий. Таким образом, сдвиговая деформация обеспечивает выживаемость сосудистых клеток [48, 55].

Еще одним примером вышесказанного можно назвать тот факт, что отделение плаценты после рождения ребенка приводит к заметному снижению кровотока, что вызывает постнатальное ремоделирование артерий новорожденного и во время этого

процесса возникают высокие показатели апоптоза эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Когда в лабораторных условиях культивировались пупочные вены человека, удаленные сразу после рождения, во время статического культивирования происходил массивный апоптоз, но при перфузии вен культуральной средой апоптотические клетки не обнаруживались. Эффект подавления апоптоза сдвиговым напряжением также был продемонстрирован *in vitro* [48].

Недавние исследования показали, что сдвиговая деформация влияет на дифференцировку незрелых клеток, включая эндотелиальные клетки-предшественники и эмбриональные стволовые клетки. Клетки предшественники из костного мозга, циркулирующие в периферической крови, мигрируют к ткани-мишени, где они дифференцируются и способствуют образованию новых сосудов. Во время этого процесса они подвергаются сдвиговой деформации, создаваемой потоком интерстициальной жидкости и кровотоком, при этом в случае воспроизведения подобных состояний *in vitro* в микрофлюидных устройствах их дифференцировка в зрелые эндотелиальные клетки также значительно ускоряется [48, 87].

1.3.3. Адгезия клеток и проницаемость клеточных мембран.

На проницаемость мембран эндотелиальных клеток могут влиять как биохимические факторы, такие как цитокины и медиаторы воспаления, так и сдвиговая деформация. В свою очередь изменения проницаемости влияют на транспорт молекул и развитие ряда патологических процессов [31].

Ранее было отмечено, что площадь поверхности ионных каналов слишком мала, чтобы непосредственно приводить к ответу на сдвиговую деформацию, и в него вовлечены сама клеточная мембрана, внутриклеточный цитоскелет, ядро, эндотелиальный поверхностный слой – гликокаликс, который покрывает люминальную сторону эндотелиальных клеток, или их комбинации [42, 49].

Ядро является самой крупной и наиболее устойчивой к сжатию органеллой в клетке, и ранее предполагалось, что оно обладает способностью действовать как амортизатор. Под действием сдвиговой деформации ядра эндотелиальных клеток могут смещаться вниз по течению под прямым действием гидродинамического сопротивления. Смещение ядра в свою очередь способствует установлению планарной клеточной полярности в эндотелии и

может также запускать клеточные сигнальные каскады, в конечном итоге приводящие к перемещению цитоскелета [49].

В настоящее время активно изучается роль эндотелиального гликокаликса в механотрансдукции. Гликокаликс образует отрицательно заряженный гелеобразный слой, состоящий из мембранных гликопротеинов, протеогликанов, гликозаминогликанов и связанных белков плазмы. Отрицательный заряд на поверхности отталкивает отрицательно заряженные молекулы, а также белые и красные кровяные клетки и тромбоциты. Почти все механические силы, действующие на эндотелиальные клетки, передаются слою гликокаликса, тем самым уменьшая градиенты сдвиговой деформации, которые испытывает клеточная поверхность [41, 42, 46, 88, 89].

Помимо этого, было обнаружено, что кровоток отклоняет длинные цепочки молекул протеогликанов, которые, в свою очередь, деформируют апикальную плазматическую мембрану, тем самым способствуя передаче механического сигнала. Обработка эндотелиальных клеток ферментами гепариназами, разрушающими гликокаликс, приводила к потере выравнивания эндотелиальных клеток вдоль направления потока и, как следствие, реакции на сдвиговую деформацию, что указывает на потенциальную роль протеогликанов в механотрансдукции [42, 46].

Как ранее уже было отмечено, гидродинамический режим влияет на адгезивные взаимодействия, происходящие между эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Было показано, что напряжение сдвига модулирует адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам путем изменения экспрессии молекул адгезии [48].

При достаточно высоких значениях сдвиговой деформации эндотелиальные клетки в конечном итоге отсоединяются или теряют целостность мембраны. Пороговые значения для запуска данных процессов для эндотелиальных клеток на данный момент не были определены, но в литературе можно встретить информацию для других типов клеток. Так экстраполяция ранее полученных данных о лизисе эритроцитов при локальном действии сдвиговой деформации на эндотелиальные клетки позволяет прогнозировать их лизис при давлении около 800 Па. Клетки могут претерпевать обратимую потерю целостности мембраны и при более низких значениях напряжения сдвига, что может стать основой для доставки лекарств в просвет эндотелия с помощью ультразвука [42].

1.3.4. Продукция оксида азота.

Экспериментально было доказано, что из 20 000 генов в геноме человека экспрессия примерно 600 регулируется сдвиговой деформацией. Сравнение библиотек SAGE (серийный анализ экспрессии генов) для эндотелиальных клеток, культивируемых в статических условиях и подвергнутых сдвиговой деформации, показало заметную дифференциальную экспрессию таких генов, как, например, транскрипционные факторы Крупшеля (KLF2, KLF4), считающихся одними из основных факторов адаптации эндотелиальных клеток к сдвиговой деформации, но наиболее значительным из этих изменений является связанное с потоком увеличение высвобождения оксида азота NO [41, 42, 48, 90].

NO вырабатывается из L-аргинина специфическим ферментом, называемым эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) и расположенным в мембранных кавеолах или на аппарате Гольджи. Биодоступность NO имеет основополагающее значение для регуляции окислительного баланса, возможно, за счет связывания супероксида и индукции синтеза глутатиона. Другим фундаментальным компонентом окислительного баланса является никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза (НАДФН-оксидаза) – основной сосудистый источник супероксида. Исследования на изолированных сосудах показали, что стабильный поток в первую очередь индуцирует NO, тогда как колебания потока, связанные с частотой сердечных сокращений, приводят к продукции O_2^- . O_2^- реагирует с NO с образованием аниона пероксинитрита $ONOO^-$, чрезвычайно реактивного радикала, вызывающего нитрозилирование [42, 45, 48, 86].

Вызванная стимуляцией eNOS продукция NO приводит к его активному взаимодействию с чувствительными цистеиновыми остатками, что также приводит к S-нитрозилированию белков, являющемуся важной посттрансляционной модификацией, участвующей в модуляции сердечно-сосудистой функции посредством регуляции митохондриального метаболизма, увеличению внутриклеточного Ca^{2+} , клеточной защиты от апоптоза и окислительного стресса [86].

Открытие калиевых каналов под действием сдвиговой деформации может привести к гиперполяризации, открытию эндотелиальных кальциевых каналов и притоку кальция в

эндотелиальные клетки. Этот кальций так же активирует NO-синтазу, что приводит к образованию NO (рисунок 20) [42].

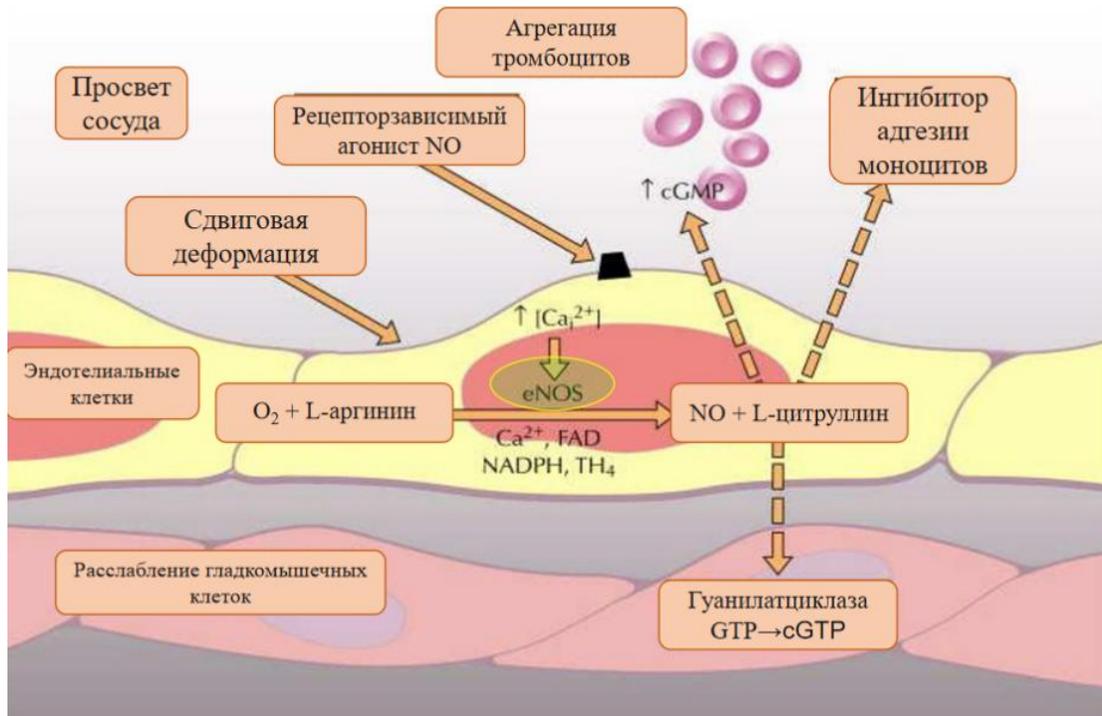


Рисунок 20 – Регуляция тонуса сосуда посредством высвобождения клетками NO.

Активность eNOS в эндотелиальных клетках способствует поддержанию сосудистого гомеостаза. Исследования показали, что высокое напряжение сдвига (10-30 дин/см² для вен и 15-100 дин/см² для артерий), обычно присутствующее в прямых сегментах кровеносных сосудов, защищает от атерогенных раздражителей. Напротив, более низкие значения сдвиговой деформации вызывают провоспалительное и протромботическое состояния, характеризующиеся прогрессирующей эндотелиальной дисфункцией. Согласно ранее полученным экспериментальным данным снижение экспрессии и активности eNOS на данный момент считается основным фактором при развитии эндотелиальной дисфункции [47, 91-97].

1.3.5. Сосудистый гемостаз.

В физиологических условиях эндотелиальные клетки регулируют гемостаз и предотвращают активацию и агрегацию тромбоцитов посредством работы мембранных эндонуклеотидаз (CD39/ATPDase), которые гидролизуют молекулы аденозиндифосфата, высвобождаемые активированными тромбоцитами, а также посредством секреции

простациклина (PGI₂) и NO, обладающих мощной ингибирующей активностью в отношении агрегации тромбоцитов. Помимо этого эндотелиальные клетки экспрессируют антитромботический мембранный гликопротеин тромбомодулин, который инактивирует прокоагулянтный фактор тромбин и активирует антикоагулянтный белок С. Было обнаружено, что сдвиговая деформация участвует в этом процессе, способствуя увеличению продукции протеогликанов, гепарансульфата, тканевого активатора плазминогена (tPA) и гликопротеинового фактора фон Виллебранда (ФВ), являющегося одним из наиболее важных факторов свертываемости крови [48,51, 88, 98].

Фактор Виллебранда представляет собой крупный мультимерный гликопротеин, присутствующий в плазме крови, эндотелиальных клетках, мегакариocyтах и тромбоцитах и опосредующий адгезию тромбоцитов к местам повреждения сосудов, а также связывающий и защищающий от деградации фактор свертывания VIII. Среди адгезивных белков ФВ уникален тем, что высокие уровни напряжения сдвига усиливают, а не уменьшают его взаимодействие с тромбоцитами [98, 99].

ФВ в основном вырабатывается в эндотелиальных клетках и хранится в тельцах Вейбеля-Паладе – гранулах, состоящих из плотно упакованных мультимеров ФВ и Р-селектина с характерной палочкообразной формой, не типичной для большинства внутриклеточных включений. Небольшое количество общего ФВ вырабатывается в мегакариocyтах и сохраняется в α -гранулах тромбоцитов. При секреции большие мультимеры ФВ расщепляются металлопротеиназой ADAMTS-13, активность которой и регулируется сдвиговой деформацией [88, 98, 99].

Было обнаружено, что в условиях низкой сдвиговой деформации ФВ остается в глобулярной форме, которая скрывает сайты связывания и не взаимодействует с циркулирующими тромбоцитами. В случае повреждения сосуда и при высоких значениях сдвиговой деформации ФВ разворачивается и открывает места связывания, в частности, для рецепторов гликопротеина Ib тромбоцитов. Таким образом, взаимодействие между ADAMTS-13 и ФВ регулируется посредством конформационных изменений, вызванных сдвиговой деформацией [98, 99].

Пороговое значение кровотока, критическое для разворачивания и активации ФВ оценивается в 5000 c^{-1} , в связи с чем в местах сужения сосудов и стенозов и может

наблюдается образование тромба. Разворачиваемые при высоких скоростях сдвига нити ФВ могут самоассоциироваться и образовывать паутинные структуры, дополнительно стимулируя адгезию тромбоцитов. Способность развернутого ФВ к самоассоциации при высоких скоростях сдвига изучалась *in vitro* в помощи биологических моделей в микрофлюидном формате. На примере подобных моделей, содержащих повороты и области бифуркации, было обнаружено, что увеличение скорости потока и сдвиговой деформации способствовало утолщению и удлинению нитей ФВ [99].

Недавние исследования показали, что ФВ также участвует в развитии воспаления, связывая тем самым тромбоз и воспаление. Так мультимеры ФВ и тромбоциты, прикрепленные к поврежденному и активированному эндотелию, могут служить местами связывания лейкоцитов, что предрасполагает к распространению воспалительного процесса [88, 99].

Сдвиговая деформация также оказывает влияние и на природу тромбов. Так венозные сосуды часто содержат клапаны, особенно в нижних конечностях. Из-за нарушенного потока, локальной гипоксии или других причин в таких участках часто инициируется образование тромбов. Присутствие больших концентраций t-РА может способствовать тому, что эти тромбы расширяясь и увеличиваясь в размерах образуют большие эмболы в кровотоке [41].

Так как функция микроциркуляторного русла имеет ключевое значение в области тканевой инженерии и регенеративной медицины, становится очевидно, что гидродинамические условия, в норме присутствующие в кровеносных сосудах, играют важную роль в физиологических и патологических ответах сосудистого эндотелия, в связи с чем его дальнейшее изучение не отделимо от создания моделей, где эти гидродинамические условия могут быть воспроизведены. К появлению таких моделей привели в том числе интеграция биоматериалов и понимание важнейших аспектов биологии сосудов [88, 100].

1.4. Перспективы использования микрофлюидных технологий в сосудистой биологии.

Технологические достижения в области микрофлюидики в сочетании с улучшенными биосовместимыми материалами сделали возможным имитацию кровеносных сосудов

человека. Сочетание функциональной сосудистой сети, которая отображает процессы развития для поддержки сложных тканевых конструкций, имеет решающее значение, и многие процессы развития, наблюдаемые в нативных кровеносных сосудах человека, были воспроизведены с использованием данной технологии [101].

В последнее время появился ряд коммерчески доступных систем с проточными камерами, что повышает эффективность, стандартизацию и миниатюризацию исследований параметров потока. Ограничения остаются для устройств с параллельными каналами – многие из этих платформ изготовлены из стекла или кремния и, следовательно, являются газонепроницаемыми, жесткими и непригодными для клеточных исследований [88].

На данный момент развитие микрофлюидных технологий позволяет создавать сосудоподобные структуры того же размера, что и микроциркуляторная сеть (<100 мкм) со сложной иерархической организацией. При размере сосуда менее 100 мкм кровь больше не ведет себя как простая непрерывная жидкость, так как размер клеток крови приближается к диаметру самих сосудов и постоянно возникают сложные взаимодействия между клетками крови, молекулами плазмы и эндотелием. Микрофлюидные модели сосудов являются идеальным инструментом для исследования подобных явлений. Помимо этого, активно создаются микрофлюидные системы различной геометрии, имитирующие анатомию микроциркуляторного русла, поврежденных сосудов и сосудов со стенозами [101-104].

Для изучения роли барьерной функции и проходимости сосудов используются проточные камеры с параллельными каналами. Эти исследования показали, что гидродинамический режим влияет экспрессию генов и белков антикоагулянтных и ингибирующих тромбоциты факторов, включая ингибитор тканевого фактора (TFPI) и eNOS. Было дополнительно показано, что биофизические свойства кровотока играют роль в поддержании целостности слоя эндотелиальных клеток. Например, по сравнению со стазом или турбулентным потоком, ламинарный поток способствует усиленной миграции эндотелиальных клеток к обнаженным областям монослоя [88].

Возможность проведения экспериментов в условиях непрерывного потока позволило исследователям определить роль рецепторов и белков тромбоцитов в патогенезе заболеваний, связанных с дисфункцией тромбоцитов, таких как, например, синдром

Бернара-Сулье и тромбастения Гланцмана. Кроме того, в подобных устройствах возможно изучать и другие связанные с потоком процессы тромбоза и сосудистого гемостаза, а также генетические нарушения свертываемости крови, такие как, например, гемофилия и болезнь Виллебранда. Болезнь Виллебранда является идеальной патологией для изучения влияния гидродинамических условий потока на сосудистые клетки, поскольку структура, размер и функция ФВ, а также адгезия тромбоцитов являются зависимыми от этой силы явлениями, которые трудно зафиксировать в рутинных анализах крови. Современные модели конструкции проточной камеры так же позволяют проводить механистические исследования адгезии тромбоцитов к стенке сосуда в местах повреждения или воспаления [51, 88, 104, 105].

Кроме того, в микрофлюидных устройствах так же могут быть воссозданы некоторые процессы механизма заживления ран. Так путем добавления сериновой протеазы трипсина в один из каналов на эндотелиальном монослое были получены искусственные «царапины». Когда одна сторона канала очищалась от клеток путем обработки трипсином, наблюдалась миграция оставшихся клеток в область «царапины» в течение достаточного времени, чтобы количественно оценить эту направленную миграцию [105].

Недавно были изготовлены 3D перфузионные цилиндрические микрососуды для изучения кинетики изменения эндотелиального барьера, которое проявляется как при раке, так и при инфекции, с прямыми наблюдениями роли тромбоцитов в процессах, связанных с иммунитетом в сосудистой сети. Включение белков субэндотелиального матрикса в эти устройства расширило способность микрофлюидных устройств моделировать интравазацию и экстравазацию метастатических раковых клеток и лимфоцитов соответственно и позволили контролировать физические параметры, такие как трансмуральное давление и интерстициальный поток для изучения динамики взаимодействия тромбоцитов и эндотелия [88, 106, 107].

Так же микрожидкостные системы клеточных культур нашли широкое применение в качестве платформ для моделирования целиакии, болезни Альцгеймера и ряда онкологических заболеваний. Способность микрофлюидных устройств включать в свои конструкции сосудистую систему позволяют *in vitro* моделировать процесс ангиогенеза опухоли. Последние эксперименты в области изучения ангиогенеза в микрофлюидных

устройствах показали, что сдвиговая деформация ослабляет ангиогенез в присутствии VEGF (эндотелиальный ростовой фактор сосудов) и что интерстициальный поток регулирует морфологию сосудистых клеток в зависимости от направления градиента VEGF [28, 80].

Таким образом, примеры, приведенные выше, наглядно иллюстрируют тот факт, что использование микрожидкостных технологии имеет большие перспективы в сосудистой биологии и, что более важно, открывает новые направления исследований, которые невозможны с использованием традиционных методов. Хотя мало кто сомневается, что микрофлюидные системы для ведения клеточных культур будут продолжать развиваться, в том числе в области изучения ангиогенеза, а также экспериментальной биологии в целом, необходимо признать необходимость продолжения научных исследований и разработок в области базовых методов микрофлюидики. Многие аспекты микросистем, описанные выше, могут быть улучшены для еще большего приближения к естественным физиологическим условиям, также как может быть повышена доступность таких устройств и усовершенствован вывод данных. При этом автоматизация, стандартизация и увеличение масштабов исследований в данной области будут стимулировать систематический характер биологических исследований будущем [28, 105].

Но несмотря на ряд преимуществ, у исследователей сохраняется здоровый скептицизм в отношении физиологической значимости и трансляционного потенциала результатов, полученных с помощью эндотелиализованных микрофлюидных систем. Исследователи, использующие технологии микрофлюидных устройств, должны учитывать физиологические факторы, такие как наличие пульсирующего потока, геометрия микрососудистой сети и образование тромбина, которые значительно влияют на границу раздела тромбоцитов и эндотелия *in vivo*. Первоначальные исследования с использованием микрофлюидных технологий для изучения границы раздела тромбоцит-эндотелий проводились либо в очищенных системах, либо с использованием цельной крови с антикоагулянтами. Ограничение этих первоначальных исследований связано с тем фактом, что прямые углы микрофлюидных устройств не отражают физическую биологию сосудистой сети. Было предпринято относительно мало попыток включить пульсирующий

поток в микрофлюидные исследования, несмотря на физиологическую значимость пульсирующего потока при изучении границы раздела тромбоцит-эндотелий [88].

Еще одним из ограничений в использовании современных микрофлюидных технологий является сложность использования этих платформ для изучения режимов течения, характеризующихся высокими числами Рейнольдса, без необходимости использования сверхфизиологических скоростей сдвига, что затрудняет имитацию вторичных потоков, которые потенциально могут возникать при стенозах, в областях сосудистых клапанов или бифуркациях в более крупных венах и артериях [88].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном литературном обзоре рассмотрены основные этапы создания микрофлюидных моделей кровеносных сосудов: представлены основные математические закономерности, необходимые для проектирования геометрии устройства и выбора гидродинамического режима его работы, биологические и технологические аспекты, касающиеся выбора материала для изготовления устройства и основных параметров микросреды. Отдельно отмечены современные методики изготовления микрофлюидных устройств, основные элементы стендовой микрофлюидной системы и принципы монтажа данной системы. Помимо этого, затронуты физиологические аспекты адаптации эндотелиальных клеток к потоку, большинство из которых на данный момент до конца не изучены, и перспективы дальнейших исследований в данной области.

Из представленного анализа литературы можно сделать вывод, что микрофлюидные технологии являются перспективным направлением научных исследований в области биотехнологии в целом и особенно в области создания биологических моделей в сосудистой биологии, где влияние потока и создаваемой им сдвиговой деформации оказывает существенное влияние на физиологическую адаптацию клеток и развитие патологических процессов.

Отдельно стоит отметить, что все вышеперечисленные этапы создания модели необходимо оптимизировать для каждого конкретного исследования, в том числе для каждой отдельной культуры клеток. Оптимизация должна касаться как геометрии устройства, так и критического выбора материалов для подложки, полимерной основы и состава культуральной среды. На полученные при таком исследовании данные

впоследствии можно будет опираться при создании других микрофлюидных моделей органов и тканей на чипе.

Кроме уточнения технических характеристик исследования в этой области открывают новые перспективы в изучении физиологии клеток в условиях потока, что может быть особенно важно в создании биологических моделей, приближенных к условиям *in vivo*.

ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основная функция кровеносной системы состоит в адекватном распределении кровотока по всем частям тела для удовлетворения изменяющиеся потребности тканей в кислороде и других питательных веществах, а также для удаления из тканей продуктов жизнедеятельности. При этом геометрия сосудистой сети в целом и каждого отдельного сосуда, составляющего сеть, должна быть построена по принципу минимальности работы, обеспечивающаюм стабильное функционирование системы.

В организме человека сосудистые клетки находятся в потоке крови, оказывающаюм на них механическое воздействие. При этом в ответ на механическое или химическое воздействие возникает биологическая реакция для поддержания гомеостатических условий – возникает динамический баланс. Как результат, может иметь место либо физиологическая адаптация, либо развитие патологии сосудистой стенки, в связи с чем центральной темой механобиологии и моделирования кровеносных сосудов в микроформате по-прежнему является понимание механизмов, с помощью которых стенка сосуда воспринимает и преобразует механическое воздействие, оказываемоюм кровотоком. Было высказано предположение, что в связи с тем, что *in vivo* механическое воздействие потока и, следовательно, гидродинамический режим, регулирует процессы жизнедеятельности сосудистого эндотелия, *in vitro* также должно наблюдаться различие в поведении клеток в присутствии или отсутствии потока [45, 46].

Таким образом, целью данной работы являлась разработка клеточно-тканевой модели участка кровеносного сосуда с применением микрофлюидной технологии и биологические испытания разработанной модели, заключающиеся в изучении влияния потока на адаптацию к нему эндотелиальных сосудистых клеток.

Работа состояла из двух основных частей. Первая часть заключалась в создании микрокапиллярной модели и включала в себя проектирование оптимальной геометрии с помощью программы для автоматизированного проектирования, расчет гидродинамических параметров с помощью компьютерной программы SolidWorks, подбор материалов с учетом специфики выбранной клеточной линии, изготовление устройства методом мягкой литографии и сборку стендовой микрофлюидной системы.

Во второй части работы проводилась проверка работы данной модели. Разрабатываемая клеточная модель должна была обеспечивать жизнеспособность клеток на протяжении всего эксперимента, как в условиях динамического воздействия потока среды, так и в его отсутствие, в том числе с проведением мониторинга всех необходимых параметров в режиме реального времени, а так же давать воспроизводимые результаты. Было необходимо оптимизировать уже известные методики культивирования с учетом особенностей микрофлюидного формата. После формирования в каналах клеточного монослоя была поставлена задача в изучении процессов адаптации эндотелиоцитов к условиям сдвиговой деформации, создаваемой в естественных условиях током крови по сосудам. Основные аспекты адаптации, которые были выбраны для исследования, включали морфологию и адгезию клеток, проницаемость клеточных мембран, регуляцию системы гомеостаза и экспрессию вовлеченных в этот процесс белков-шаперонов, а также продукцию клетками оксида азота NO. Исследования проводились в сравнении со статическими условиями, так же воспроизводимыми в микрофлюидной системе.

2.1. Создание микрофлюидной модели микрососудистого русла.

2.1.1. 3-хмерное моделирование микрофлюидного устройства с помощью системы для автоматизированного проектирования.

При проектировании микрофлюидной модели были учтены как биологические особенности культивируемых клеток (их размеры, диаметр, способ роста, потребность в питательных веществах), так и анализ литературных данных, затрагивающих геометрию сосудов и основные положения закона Мюррея. В таблице 2 представлены литературные данные по геометрическим параметрам основных типов кровеносных сосудов и характерным для них гидродинамическим параметрам потока. Это были первоначальные данные, на основе которых предполагалось разрабатывать будущую модель. В связи с тем, что в первую очередь воздействию кровотока подвергается артериальный эндотелий, который и играет центральную роль в поддержании целостности сосудов и гомеостаза в ответ на гемодинамические силы и химические сигналы, для воссоздания в модели условий, приближенных к физиологическим, в качестве основных геометрических параметров, на которые необходимо было опираться при проектировании, были взяты параметры, характерные для артериол.

параллельных канала длиной 1 см и сечением 100x100 мкм. В дальнейшем в исходную структуру вносился ряд изменений для различных режимов загрузки клеток в систему с учетом особенностей адгерентных культур в потоке жидкости, обнаруженных экспериментально. Так, на концах каналов были добавлены сужения различного диаметра, сопоставимого или меньшего размера, чем размер одной клетки для увеличения количества клеток, адгезирующих в канале. Еще одной доработкой исходной геометрии было добавление отдельных камер непосредственно в каналах, сопоставимых с размером единичной клетки. Идея такой доработки заключалась в реализации возможности одновременного проведения исследований ответа клеток на внешнее воздействие при их культивировании в монослое (в больших камерах и каналах) и в отсутствие межклеточного взаимодействия (в дополнительных камерах).

Высокая вариабельность является спецификой работы с живыми объектами. В дальнейшем при проектировании также была поставлена задача оптимизации проведения эксперимента и снижения вариабельности ряда параметров. Устройства должны были быть сконструированы таким образом, чтобы была область, в которой каналы двух независимых устройств, размещенных на одной подложке, были бы расположены достаточно близко друг к другу, так, чтобы при 4х кратном увеличении они одновременно попадали в поле зрения микроскопа, что облегчало бы совместное наблюдение. Как правило, один канал используется как контрольный, в котором поддерживаются, например, статические условия, а другой – как измерительный, в котором создавался поток. Это облегчает проведение сравнительного анализа поведения клеток в двух независимых каналах в рамках одного эксперимента – наличие внутреннего контроля и возможность относительного оценивания способствуют снижению вариабельности. При этом управление потоком среды и, следовательно, поддержания необходимого уровня напряжения сдвига в двух устройствах было бы организовано независимо друг от друга.

Таким образом, был предложен следующий вариант конструкции, содержащий 2 входных порта для раздельной загрузки среды и клеточной суспензии, 1 выходной порт для сбора прокачиваемой среды и прямой участок канала с сечением 250x200 мкм (рисунок 22 а). Третий вариант геометрии устройства включал помимо прямого участка канала также

область с симметричной бифуркацией на два канала с размерами 200x200 мкм (рисунок 22 б).

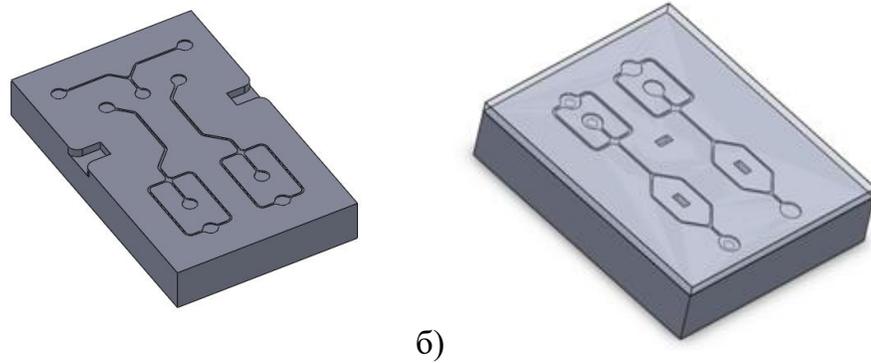


Рисунок 22 – Трехмерные модели микрофлюидных устройств: а – содержащий участок прямого сосуда, б – содержащий участок прямого сосуда и области бифуркации.

Представленные на данном этапе разработки модели из-за наличия двух независимых параллельных каналов (прямых или с областями бифуркаций), позволяли проводить одновременно два анализа, что снижало вариабельность по сравнению с последовательным измерением.

Дополнительно были спроектированы чипы с асимметричной бифуркацией для создания разных значений сдвиговой деформации в пределах одного устройства. Асимметричная бифуркация характерна для начальных звеньев сосудистого русла – сосудов «доставки», симметричная же – для конечного звена. Помимо этого, чипы с асимметричной бифуркацией могли быть использованы для моделирования патологических процессов, таких как стеноз.

Для дальнейшего использования были выбраны два последних представленных на рисунке 22 варианта геометрии устройства. Для первоначального подбора и расчета гидродинамических параметров потока использовались методы вычислительной гидродинамики.

2.1.2. Расчет гидродинамических параметров микрофлюидного устройства с помощью методов вычислительной гидродинамики.

Полученные результаты были опубликованы в статье: 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.

Основным расчётным параметром потока в микрофлюидном устройстве является профили скоростей прокачиваемых жидкостей и создаваемое этим потоком касательное напряжение, которое приводит к деформации и является механическим стимулом, инициирующим каскад адаптивных процессов в эндотелиальных клетках.

Поскольку создаваемая модель являлась клеточно-тканевой моделью кровеносного сосуда, в процессе проектирования при подборе оптимальных гидродинамических параметров кроме ранее отмеченных литературных данных о характерных для данного типа сосуда скоростях потока, необходимо было учесть и ряд других важных биологических аспектов.

Во-первых, по сравнению с этапами прикрепления клеток к субстрату и начального лаг-периода в росте культуры, традиционно более предпочтителен для анализа период экспоненциального роста, дающий при сравнительном анализе более воспроизводимые результаты. Таким образом, на начальном этапе до того, как в системе будет создан поток среды, была поставлена задача в оптимизации условий продолжительного культивирования клеток до достижения им фазы экспоненциального роста в чрезвычайно малом объеме микроканала. Основная проблема при решении данной задачи заключалась в том, что при культивировании клеток в микроканале по сравнению с аналогичными традиционными методами (в культуральных планшетах, чашках Петри) наблюдается значительно меньшее соотношение объема питательной среды к объему клеток и с учетом этого соотношения и высокой плотности клеток существует риск быстрого обеднения ростовой среды, изменения ее физико-химических свойств, например, закисления, при отсутствии притока свежей среды, что может само по себе выступать в роли стрессового воздействия на культуру и тем самым исказить полученные результаты.

Во-вторых, для изучения влияния динамического режима на адаптацию клеток в качестве сравнения было необходимо смоделировать статические условия, при этом также

учитывая вышеназванные проблемы. Кроме этого, при моделировании статических условий необходимо отметить, что в условиях *in vivo* клетки в тканях даже в отсутствии потока крови находятся в слабом токе интерстициальной жидкости.

С учетом всего вышеперечисленного, был сделан вывод, что культивирование клеток в микрофлюидном формате в условиях полного отсутствия потока (в лаг-фазе клеточного цикла и в качестве стационарного контроля) не является целесообразным. В связи с этим за статические стационарные для эндотелиоцитов условия была принята низкая объемная скорость подачи ростовой среды 1 мкл/мин, которая, с одной стороны, достаточна для обновления свежей среды в канале, с другой стороны – ниже скорости потока, физиологически устанавливающихся в артериолах аналогичного диаметра. Таким образом при культивировании клеток в высокой плотности в микрофлюидном устройстве постоянная подача ростовой среды является обязательным условием и обозначает принципиально другую парадигму культивирования клеток, отличную от традиционного статического способа.

Исходя из данных по линейным скоростям потока, характерным для артериол (таблица 2) и с учетом сечения канала 200x250 мкм и 200x200 мкм расчётный физиологический диапазон объемных скоростей потока составил от 25 до 500 мкл/мин. Таким образом, для дальнейшего моделирования предварительно за физиологическую объемную скорость потока при первоначальном расчете было выбрано значение 400 мкл/мин.

Дальнейший анализ расчетных профилей скоростей потока и сдвиговых деформаций в проектируемом микрофлюидном устройстве был выполнен с использованием методов вычислительной гидродинамики с помощью SolidWorks – программного комплекса САПР для автоматизации работ промышленного предприятия на этапах конструкторской и технологической подготовки производства. Данная программа обеспечивает разработку изделий любой степени сложности и назначения, в том числе позволяет моделировать 3D структуру микрофлюидного устройства и производить расчет его основных гидродинамических параметров. Для упрощения расчетов в качестве параметров модельной жидкости при проектировании были выбраны параметры воды.

Как известно, поведение любой механической системы может быть описано путем применения второго закона Ньютона, но на практике в связи со сложным составом крови такой подход для моделирования ее течения в сосудах не осуществим. Биологические жидкости не обязательно ведут себя как ньютоновские жидкости. В частности, при низких значениях сдвиговой деформации кровь проявляет неньютоновские эффекты, а при значениях выше 100 с^{-1} нормальная вязкость крови человека приближается к почти постоянному значению. Поэтому во многих ситуациях, например, при анализе кровотока в артериях и артериолах, целесообразно рассматривать кровь как ньютоновскую жидкость.

В нашем же случае выбранную в качестве модельной жидкости воду, как, по сути, и плазму крови можно также считать ньютоновскими жидкостями, и, как ранее было отмечено в литературном обзоре для ламинарного течения ньютоновской жидкости напряжение сдвига или сдвиговую деформацию можно выразить следующим математическим уравнением (13):

$$\tau = \frac{32\eta Q}{\pi d^3} \quad (13)$$

где η — вязкость, Q — скорость потока, а d — диаметр сосуда.

Как видно из уравнения выше, сдвиговая деформация находится в прямой пропорциональной зависимости от скорости потока, поэтому ее профили сопоставимы по своему виду к аналогичным профилям скоростей потока.

Ниже представлены полученные с помощью SolidWorks расчетные значения для прямого участка канала профили распределения сдвиговой деформаций, создаваемой потоком со скоростью 1 мкл/мин (рисунок 23 а) и со скоростью 400 мкл/мин (рисунок 23 б).

Из представленных рисунков видно, что в канале наблюдается параболический профиль распределения сдвиговой деформации, что соответствует ламинарному режиму течения жидкости. При объемной скорости потока 1 мкл/мин максимальный диапазон значений сдвиговой деформации составляет от 0 Па у стенок сосуда до 0,015 Па в центре канала, а при скорости 400 мкл/мин – от 0 до 6 Па.

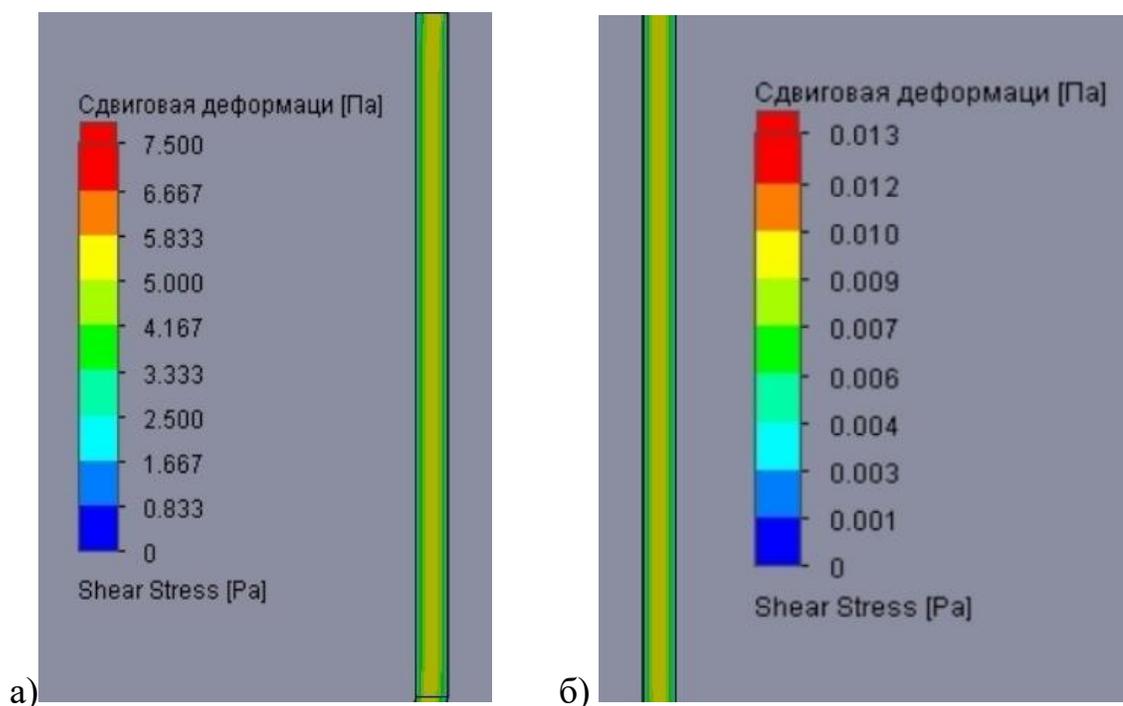


Рисунок 23 – Гидродинамический расчет распределения величин пристеночной сдвиговой деформации в опытном и контрольном каналах при скорости подачи ростовой среды: а – 400 мкл/мин, б – 1 мкл/мин.

Из литературных данных, полученных на экспериментальных моделях *in vivo* известно, что физиологические значения сдвиговой деформации, обнаруживаемые в артериолах варьируется в довольно широком диапазоне, но в среднем составляют 2-4 Па и в норме редко превышают 8 Па. Эти значения могут варьироваться в зависимости от вазоконстрикции, расположения сосуда в артериальной сети, индивидуальных особенностей организма и развития патологических состояний. Таким образом, рассчитанные теоретические значения сдвиговой деформации в проектируемой модели в динамических условиях оказались сопоставимы с физиологическими, в статических – с условиями отсутствия потока.

Представленные выше гидродинамические расчеты также показывают, что средняя величина сдвиговой деформации постоянна в линейных участках микроканалов, в местах изгибов наблюдается ее увеличение. Ввиду наличия изгибов и относительно короткого прямого участка между ними («колено»), в последнем наблюдается повышенная сдвиговая деформация (до 7,5 Па при скорости потока 400 мкл/мин) по сравнению с более длинным

вертикальным участком (рисунок 24). При этом рассчитанные значения по-прежнему укладываются в физиологический диапазон.

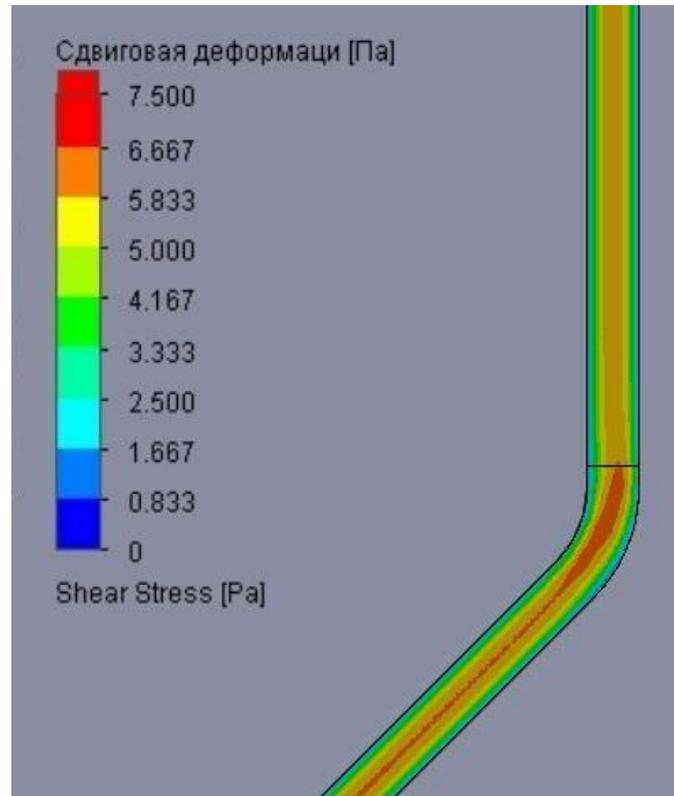


Рисунок 24 – Тепловая карта распределения величины сдвиговой деформации в участке изгиба микроканала при объемной скорости подачи ростовой среды 400 мкл/мин.

Сдвиговая деформация в области бифуркации, также отличается от прямых участков и имеет свои особенности (рисунок 25). Как видно из рисунка в области бифуркации величина сдвиговой деформации существенно снижается (в 2–4 раза) и может достигать значений, близких к 0 Па. В области изгибов сдвиговая деформация, наоборот, слегка повышается (до 20%), при этом оставаясь ниже, чем в центре главного канала.

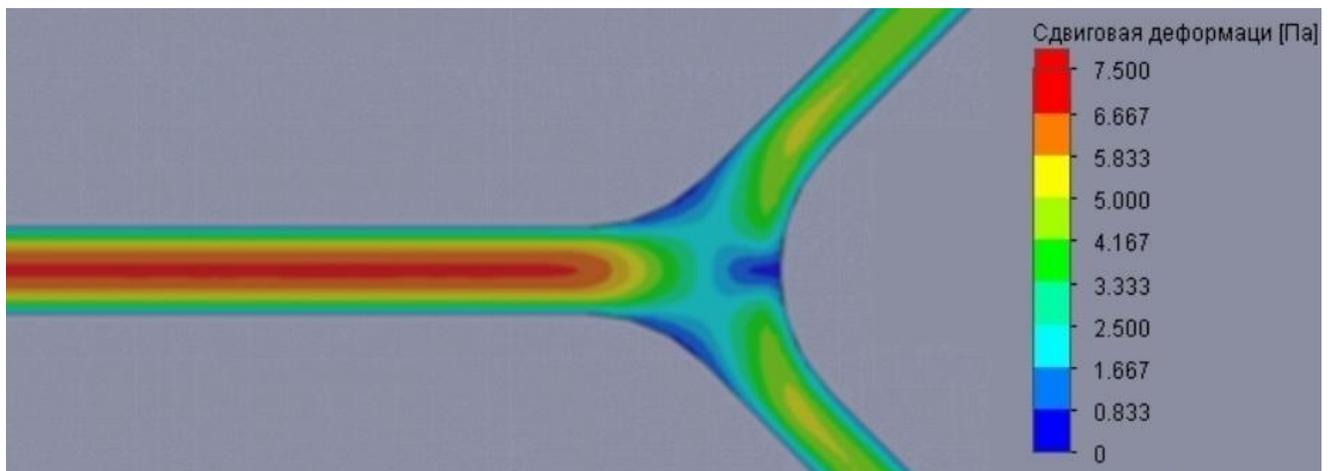


Рисунок 25 – Тепловая карта распределения величины сдвиговой деформации в области бифуркации при объемной скорости подачи ростовой среды 400 мкл/мин

Программное обеспечение SolidWorks также позволило предсказывать поведение частиц в потоке в микроканале – так был смоделирован процесс загрузки клеток в микрофлюидное устройство (рисунок 26). В качестве модели клетки для расчёта выступали сферические частицы диаметром 30 мкм. При этом эмпирически была определена оптимальная скорость загрузки 100 мкл/мин, при котором наблюдалось наиболее полное заполнение всего пространства каналов. Подобного рода моделирование может быть необходимо и в дальнейших исследованиях при анализе поведения клеток крови в потоке в кровеносных сосудах.

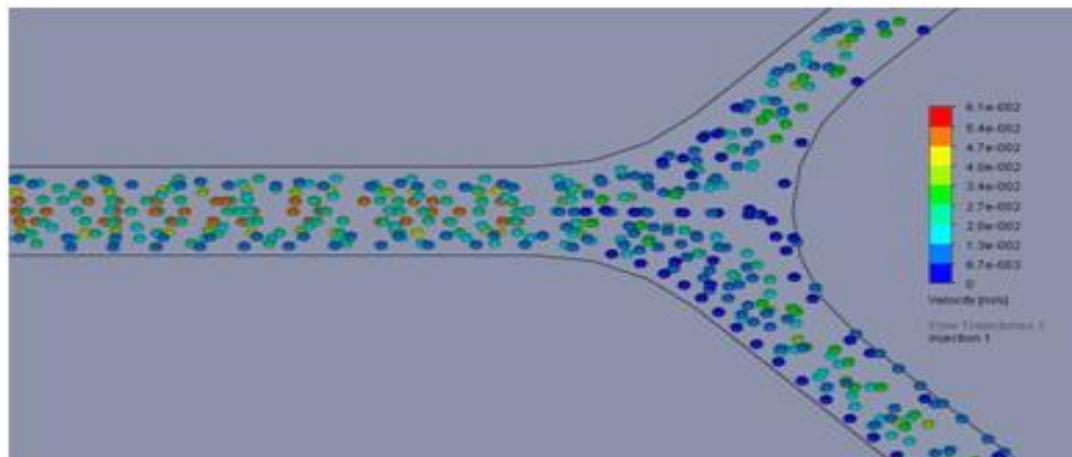


Рисунок 26 – Моделирование поведения сферических частиц диаметром 30 мкм в канале чипа в потоке с объемной скоростью 100 мкл/мин

При этом, как видно из рисунка 26, при загрузке клеток в микрофлюидное устройство наблюдалось неравномерное распределение клеток в объеме канала, сопоставимое по профилю с профилями скоростей и сдвиговой деформации, из чего можно предположить, что при формировании равномерного монослоя в статических условиях будет наблюдаться миграция клеток в каналах, а в динамических – изменение их морфологии согласно рассчитанным линиям потока.

Таким образом, можно сделать вывод, что согласно выбранной геометрии каналов и подобранных скоростей потока в 1 мкл/мин (что соответствует статическому стационарному режиму) и 400 мкл/мин (что соответствует динамическому режиму) в устройстве в обоих случаях наблюдался соответствующий ламинарному режиму параболический профиль скоростей потока и сдвиговой деформации по сечению канала, достигающий минимальных значений у стенок и камеры перед бифуркацией (0 Па) и максимальных – в центре канала (до 7,5 Па в случае изгиба), при этом все рассчитанные значения не выходили за физиологический диапазон. Рассчитанный выше профиль скоростей и сдвиговой деформации также будет далее необходим для сопоставления значения сдвиговой деформации с характеристикой поведения клеток в условиях адаптации к потоку.

После подбора оптимальных скоростей потока и анализа расчетных данных профилей скоростей и сдвиговой деформации следующим шагом был выбор материалов для изготовления устройства – полимерной основы и подложки, на которую будут помещаться клетки.

2.1.3. Выбор материалов для изготовления устройства.

Полученные результаты были опубликованы в статье: 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.

При выборе материалов для изготовления микрофлюидного устройства в первую очередь необходимо было опираться на такие технико-экономические параметры как

оптическая прозрачность, достаточная степень механической жесткости, химическая и реакционная способность поверхности, газопроницаемость, возможность автоклавирования, цена, а также на особенности клеточной линии, выбранной в качестве объекта исследований.

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.

При окончательном выборе материала важно было учесть как химические свойства полимерной основы и подложки, так как они влияют на химический состав среды и, как следствие, ее биологическую функцию, так и отдельно параметры поверхности, так как они влияют на адгезию, морфологию, выживаемость и пролиферацию клеточной культуры.

Основными параметрами, характеризующими поверхность субстрата и являющимися критичными для культивирования на них клеток, являются угол смачивания (демонстрирует степень гидрофобности поверхности), модуль упругости (механическая жесткость поверхности) и шероховатость. Для большинства современных материалов все значения вышеперечисленных параметров имеются в литературе, но на данный момент не было обнаружено прямой и универсальной корреляции между свойствами поверхности и адаптации к ним различных клеточных культур, в связи с чем на данном этапе стояла задача выбрать предполагаемые материалы для изготовления будущего устройства и отдельно проверить их совместимость с клеточной линией EA.hy926.

С учетом всего вышеперечисленного, первым выбранным для анализа материалом стал PDMS, как в наибольшей степени отвечающий всем перечисленным критериям. Поскольку жесткость полимера играет роль в выживаемости и пролиферации клеток, для дальнейшего исследования помимо «стандартного» PDMS (коммерческий набор Sylgard 184) было решено рассмотреть отличающийся от него по механическим параметрам вариант полидиметилсилоксана – полимер, обладающий большими значениями модуля упругости MS-1002 (Dow Corning).

В качестве третьего материала для исследования было выбрано покровное стекло, в связи с тем, что оно так же легко поддается обработке, не обладает цитотоксичностью и, в

отличие от более прочного предметного стекла, пригодно для визуализации образцов на сканирующем конфокальном микроскопе.

Четвертым субстратом был выбран полистирол как наиболее частый синтетический материал, используемый для изготовления культуральных сосудов и планшетов. В данном случае полистирол был выбран в качестве сравнительного материала, так как он биосовместим с большинством клеточных культур, но не в качестве предполагаемого субстрата для изготовления микрофлюидного устройства.

Предыдущие исследования показали, что несмотря на все положительные свойства полидиметилсилоксана в силу его химической природы и, как следствие, гидрофобных свойств, клетки проявляют слабую адгезию к его необработанной поверхности и часто создают агрегаты, в связи с чем остро встаёт вопрос в предварительной модификации поверхности данного материала [61].

Одними из наиболее распространённых методов модификации и, следовательно, гидрофилизации поверхности являются кислородно-плазменная обработка и предварительная адсорбция на поверхности гидрофильных белков. Из всех доступных для этих целей белков согласно литературным данным наиболее широкое применение нашли коллаген и желатин, построенные из гидрофильных аминокислот, таких как глицин, пролин или гидроксипролин. При этом для получения более прочного связывания белков поверхность субстрата должна быть предварительно активирована, например, той же плазменно-кислородной обработкой. Известные в литературы химические методы модификации поверхности в работе использованы не были из-за ранее отмеченных неудовлетворительных показателей по шероховатости поверхности после обработки, препятствующей стабильной адгезии клеток к субстрату [55, 61].

Таким образом, для выбора оптимальных материалов для изготовления основы и подложки будущего микрофлюидного устройства для дальнейшего исследования были приготовлены 14 образцов (таблица 3).

Таблица 3. Предполагаемые материалы для изготовления основы и подложки микрофлюидного чипа

Номер образца	Материал	Тип модификации
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

Исследование степени адгезии клеток к подложкам проводилось методом оптической конфокальной микроскопии. Для оценки площадей, занимаемых клетками на субстратах, было применено тотальное мечение белков флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). На полученных на конфокальном микроскопе изображениях окрашенных клеток выделяли объекты методом пороговой фильтрации. Затем были посчитаны площади объектов, соответствующих адгезировавшим клеткам.

В результате эксперимента было установлено, что клетки адгезировали ко всем видам исследуемых подложек. Для примера на рисунке 27 представлено изображение адгезированных клеток EA.hy926, меченных FITC на подложке из MS-1002, обработанного коллагеном (образец 11).

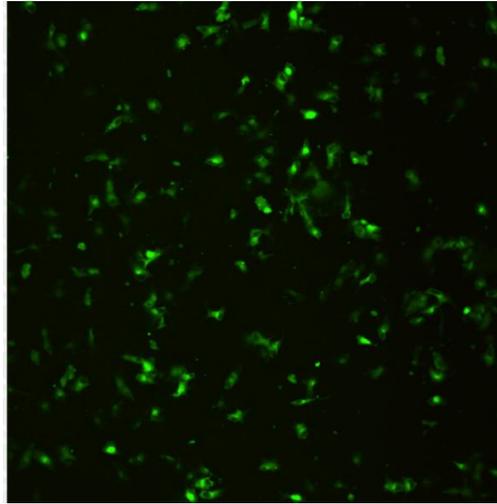


Рисунок 27 – Конфокальное изображение клеток EA.hy926, меченных FITC на подложке из MS-1002, модифицированной коллагеном.

Однако, степень адгезии на разных материалах существенно различалась. О степени адгезии клеток к тому или иному субстрату судили по площади, занимаемой клетками в адгезированном состоянии – чем больше была площадь, тем лучше была адгезия. Статистически обработанные данные приведены на рисунке 28.

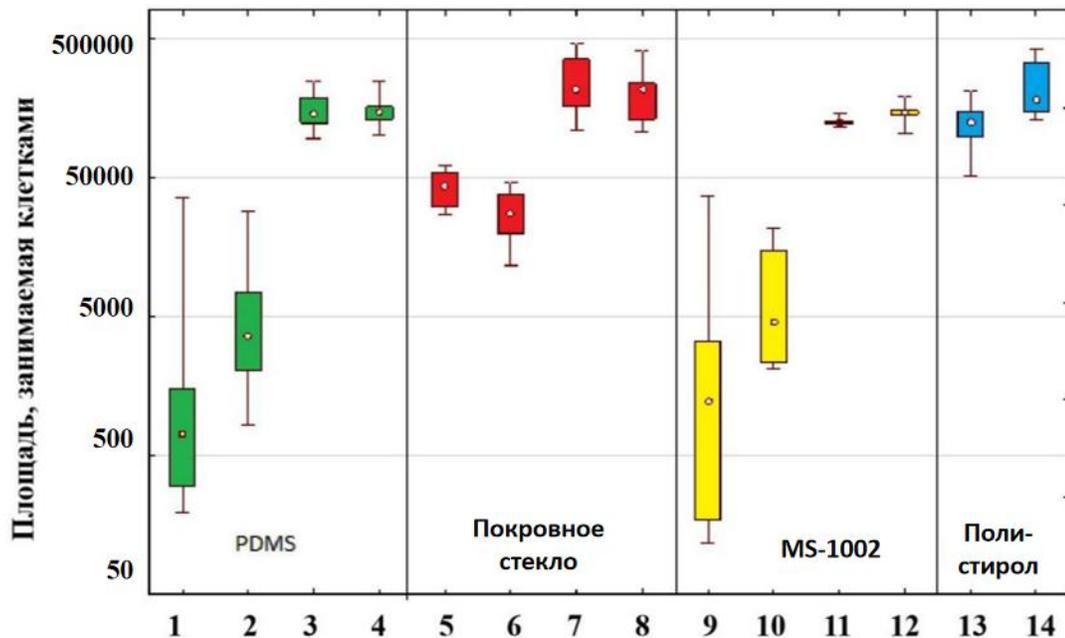


Рисунок 28 – Площадь, занимаемая клетками адгезировавшими к поверхности различных материалов. Данные представлены как медиана и 25-75 процентиля.

Согласно полученным данным в необработанном состоянии (рис 28, образцы **1, 5, 9** и **13**) наиболее благоприятными для адгезии материалами оказались полистирол и покровное стекло, при этом адгезия клеток как к PDMS, так и к другому типу силоксана MS-1002 была невелика и существенно уступала вышеназванным субстратам.

Сравнение поверхностей на основе PDMS так же показало, что обработка плазмой достоверно не меняет площадь, занимаемую адгезированными клетками в отличие от обработки коллагеном, существенно увеличивающей клеточную адгезию (рис.28, образцы **2, 3, 7, 10** и **11**). А в случае стекла плазма даже снижала степень адгезии клеток к поверхности (образец **6**).

Из таблицы видно, что дополнительное осаждение на поверхности материала коллагена увеличивало адгезивную площадь во всех вариантах подложек, включая полистирол (образцы **3, 4, 7, 8, 11, 12** и **14**).

Испытанный впервые полимер MS-1002 продемонстрировал схожие с PDMS свойства в качестве подложки для клеточной адгезии: обработка плазмой не меняла эффективность адгезии, и лишь обработка коллагеном значительно ее повышала.

Как следует из полученных данных, стекло по сравнению с силоксанами является наиболее оптимальным субстратом для адгезии клеток EA.hy926. В связи с тем, что обработка плазмой приводила к небольшому снижению площади, занимаемой адгезированными клетками, хоть это снижение вероятно нельзя назвать существенным, помимо модификации поверхности плазмой при использовании в качестве подложки покровного стекла необходимо дополнительное осаждение коллагена (образец **9**).

Следует отметить, что метод оптической микроскопии даёт представление об общем распределении клеток на подложке и степени их распластанности, в то время как для исследования характеристик и топологии отдельных клеток на различных подложках необходимы дополнительные методы анализа. В связи с этим помимо конфокальной микроскопии для оценки биосовместимости материалов был применён метод сканирующей зондовой микроскопии, а именно сканирующей ион-проводящей микроскопии.

Были отсняты изображения клеток на трёх наиболее предпочтительных для клеток подложках – образцы **3, 5** и **7**. Изображения были обработаны путём выравнивания по

строкам (квадратам), т.к. сканирование происходит по квадратам и базовый уровень новой строки квадратов может не совпадать с предыдущем из-за программных особенностей, а также путём вычитания общего наклона (при наличии), возникающего из-за неравномерности толщины подложки или закрепления образца. Другой обработки, влияющей на размеры объектов, не проводилось. Далее были проведены измерения высот клеток по различным построенным сечениям. Также оценивалась общая форма клеток на поверхности.

В ходе эксперимента было обнаружено, что на необработанном стекле (образец 5) максимальная высота клеток составляет 6,0 – 6,5 мкм (рис. 29).

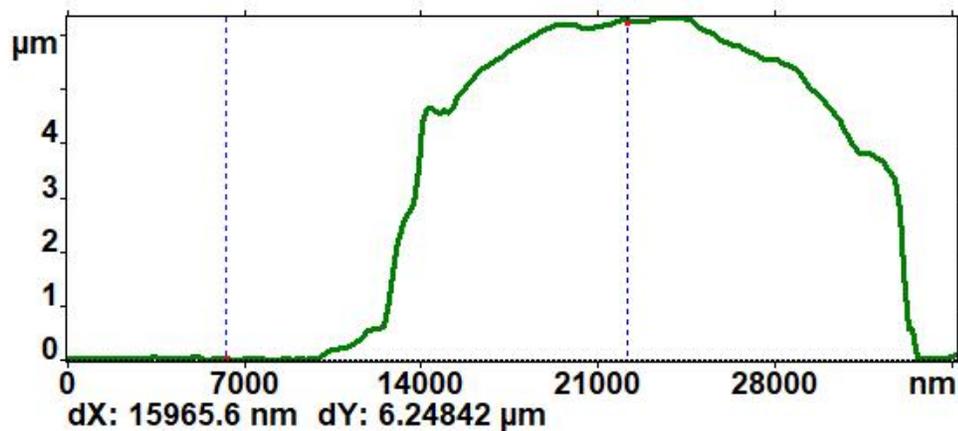


Рисунок 29 – Профиль сечения клеток EA.hy 926 на поверхности стекла.

При трехмерной реконструкции полученных изображений было обнаружено, что клетки на данной поверхности имеют округлую форму и ярко выраженное направление, при этом «спереди» и «сзади» наблюдается плавный подъем, а с боков клетка имеет резкую границу (рисунок 30). Такая форма может быть характерна для движения клетки в шарообразном состоянии в поисках благоприятного места для распластывания.

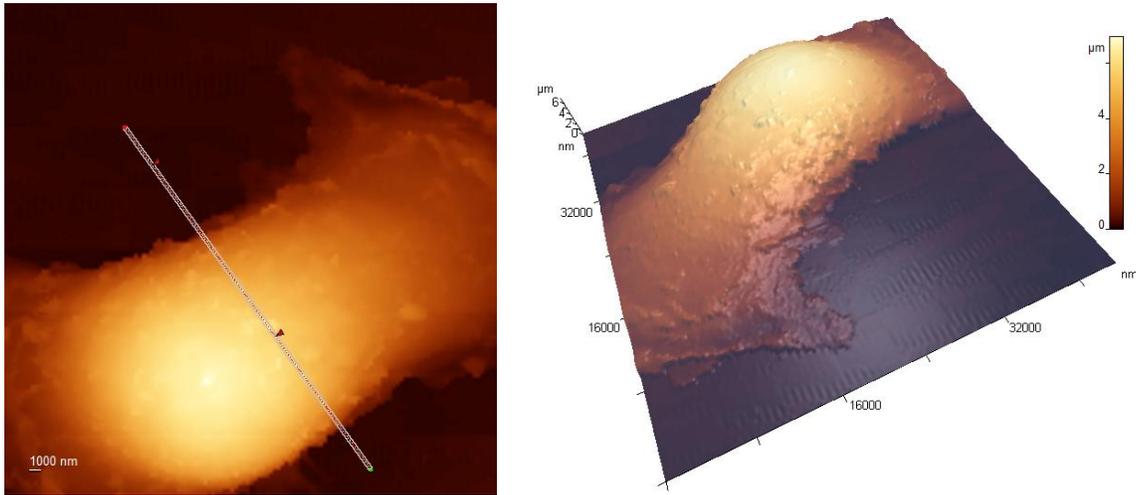


Рисунок 30 – Топография и трёхмерная реконструкция клеток EA.hy 926 на поверхности необработанного стекла.

Иная картина наблюдалась для образцов, обработанных коллагеном. Так на PDMS, обработанном коллагеном (образец **3**), высота клетки в ядерной, самой высокой части, составила 4-4,6 мкм (рисунок 31).

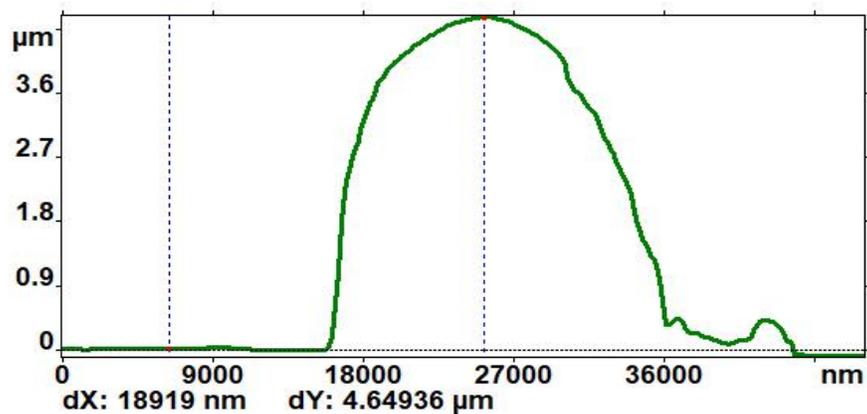


Рисунок 31 – Профиль сечения клеток EA.hy 926 на поверхности PDMS, обработанного коллагеном.

При этом анализ клеточной топографии показал, что в отличие от той картины, которая наблюдалась в случае необработанного стекла, на поверхности данной подложки клетки имели распластанную форму, часто вытянутую в нескольких направлениях (рисунок 32).

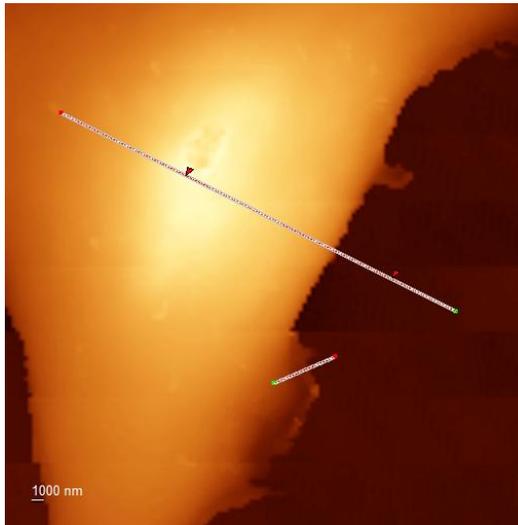


Рисунок 32 – Топография клеток EA.hy 926 на поверхности PDMS, обработанного коллагеном

Характерным признаком благоприятных условий для адгезии клеток на данном типе субстрата также является наличие ярко выраженных выпячиваний внешней клеточной мембраны размерами до 0,14 мкм (так называемых филоподий), наличие которых свидетельствует о способности клеток к миграции по подложке (рисунки 33 и 34).



Рисунок 33 – Формирование филоподий на поверхности PDMS, обработанной коллагеном.

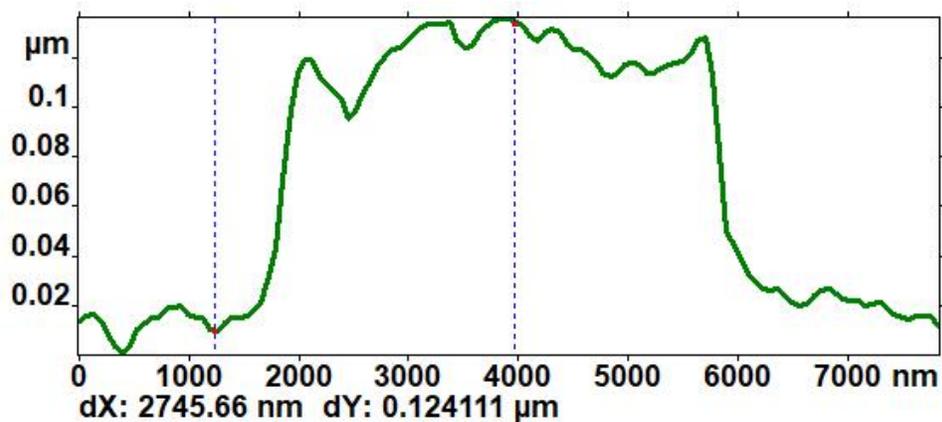


Рисунок 34 – Профиль сечения филоподий.

На покровном стекле, обработанном коллагеном (образец 7), клетки также имели распластанную форму с выростами в разных направлениях. Высота клеток также составила 3,7-4,5 мкм. Для обеих подложек, обработанных коллагеном, характерным является наличие «юбки» в некоторых областях вокруг клетки высотой 100–400 нм (рисунок 35).

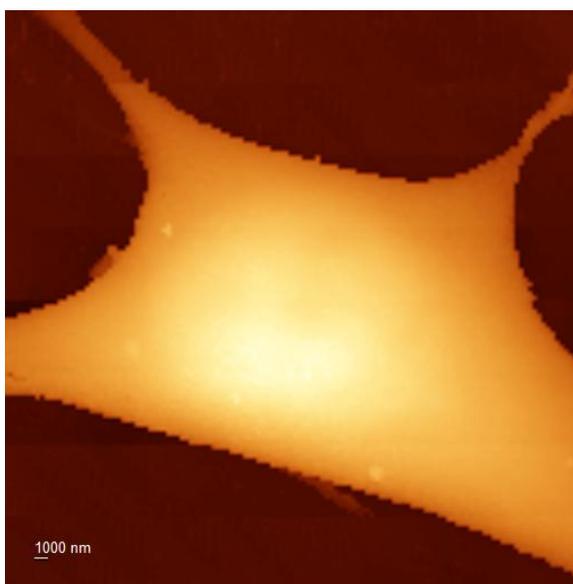


Рисунок 35 – Топография клеток EA.hy 926 на поверхности покровного стекла, обработанного коллагеном

Из анализа представленных изображений очевидно, что необработанная поверхность стекла является менее благоприятным материалом для адгезии клеток, чем поверхность,

предварительно обработанная коллагеном, и процесс полной адгезии занимает больше времени, что обуславливается необходимостью наработки белков внеклеточного матрикса.

Таким образом, на основании полученных данных, в качестве наиболее приемлемого материала для подложки по своим физико-химическим свойствам и биосовместимости было выбрано покровное стекло, обработанное коллагеном, в то время как в качестве полимерной основы предпочтение по-прежнему было отдано PDMS, согласно совокупности его физико-химических свойств, ранее рассмотренных на основании литературных данных (отсутствие цитотоксичности, газопроницаемость, низкая фоновая аутофлуоресценция и т.д.). Кислородно-плазменная обработка так же была включена в протокол модификации поверхности, но уже в связи с необходимой дальнейшей сборкой микрофлюидного устройства – соединении основы и подложки и герметизации устройства.

2.1.4. Изготовление микрофлюидного устройства.

Изготовление микрофлюидного устройства проводилось методом мягкой литографии. Для создания полимерной основы была необходима матрица, которая была изготовлена методом фрезерования из полиметилметакрилата (PMMA). Изготовление матрицы проводилось на вертикальном обрабатывающем фрезерном центре с числовым программным управлением (ЧПУ) HURCO VMX 1 (Германия) на базе ЦКП МИСиС. В изготовленную матрицу заливалась коммерчески доступная композиция Dow Corning Sylgard 184 Silicone Elastomer, состоящая из двух частей – основы и отвердителя, тщательно смешиваемых в отношении 10:1. После формирования основы матрица удалялась, а поверхность, содержащая каналы, обрабатывалась кислородной плазмой для активации поверхности. Аналогичной обработке подвергалась поверхность покровного стекла, выбранного в качестве подложки. Обработанные поверхности совмещали и прижимали для образования герметичной конструкции.

Схема создания гибридного микрофлюидного устройства представлена на рисунке 36:

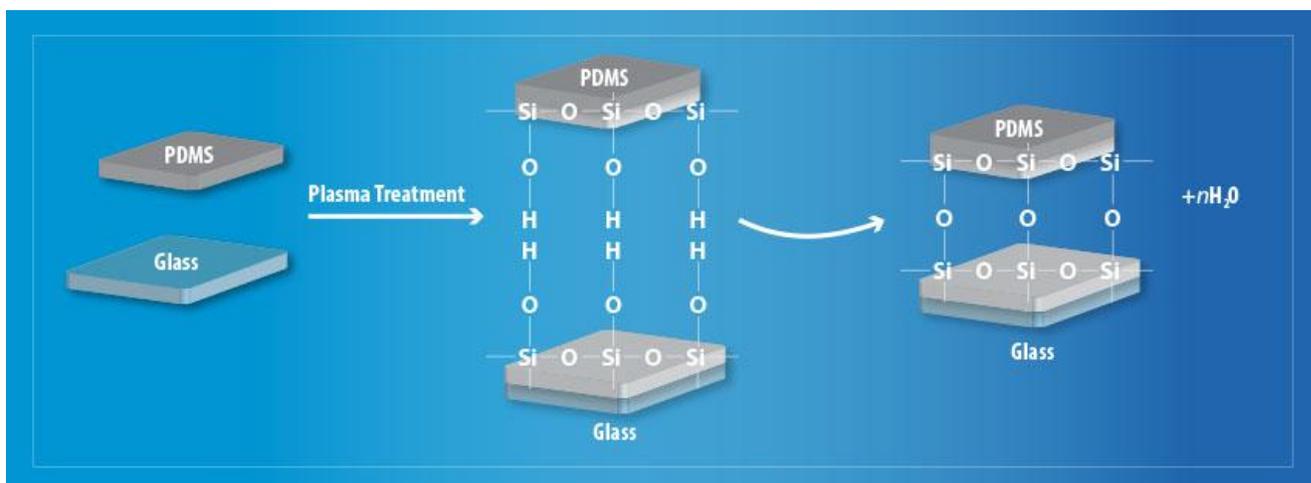


Рисунок 36 – Схема сборки микрофлюидного устройства [108].

Далее устройство оснащали медицинскими трубками из поливинилхлорида Tygon S-54-NL, внутренний диаметр которых соответствовал диаметру порта загрузки, а в боковой паз устанавливали термодатчик. Места контакта дополнительно герметизировали полидиметилсилоксаном. Герметичность полученной конструкции тестировали путем прокачки через нее деионизированной воды (рисунок 37).

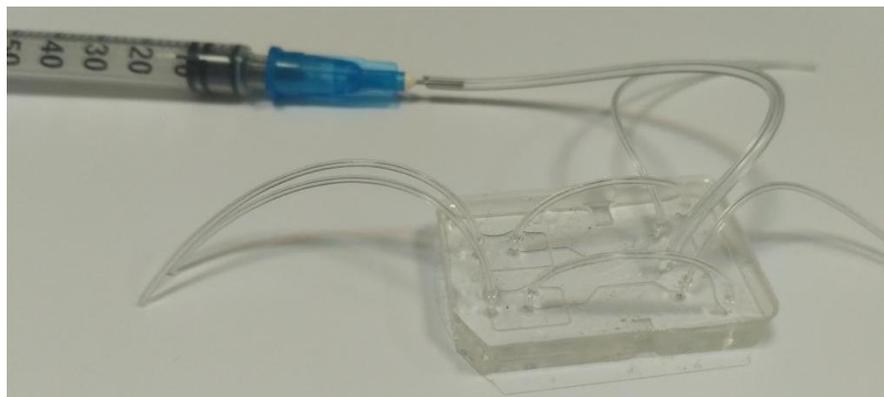


Рисунок 37 – Тестирование на герметичность готового устройства.

После изготовления и проверки герметичности устройства следующим этапом являлось соединение устройства с модулями для управления потоками жидкости и монтаж стендовой микрофлюидной системы.

2.1.5. Сборка стендовой микрофлюидной системы.

Для создания гистотипической модели эндотелиальной выстилки сосуда было необходимо оптимизировать все параметры, необходимые для поддержания жизнедеятельности клеток в микрофлюидной системе – температурный режим, давление, химический состав питательной среды, предотвращение микробной контаминации, возможность прижизненной визуализации клеток и др. Иными словами, проведение долгосрочных экспериментов с клетками предъявляет к системе ряд требований, выполнение которых необходимо для обеспечения их адгезии, роста и пролиферации.

Для решения всех поставленных задач стендовая система помимо самого микрофлюидного устройства должна была включать в себя модули для дозирования жидкости и управления потоками, устройства для контроля и поддержания постоянной температуры и визуального контроля с возможностью удаленного мониторинга за состоянием клеток в устройстве. Для последовательного монтажа всех элементов системы была предварительно разработана следующая схема (рисунок 38):

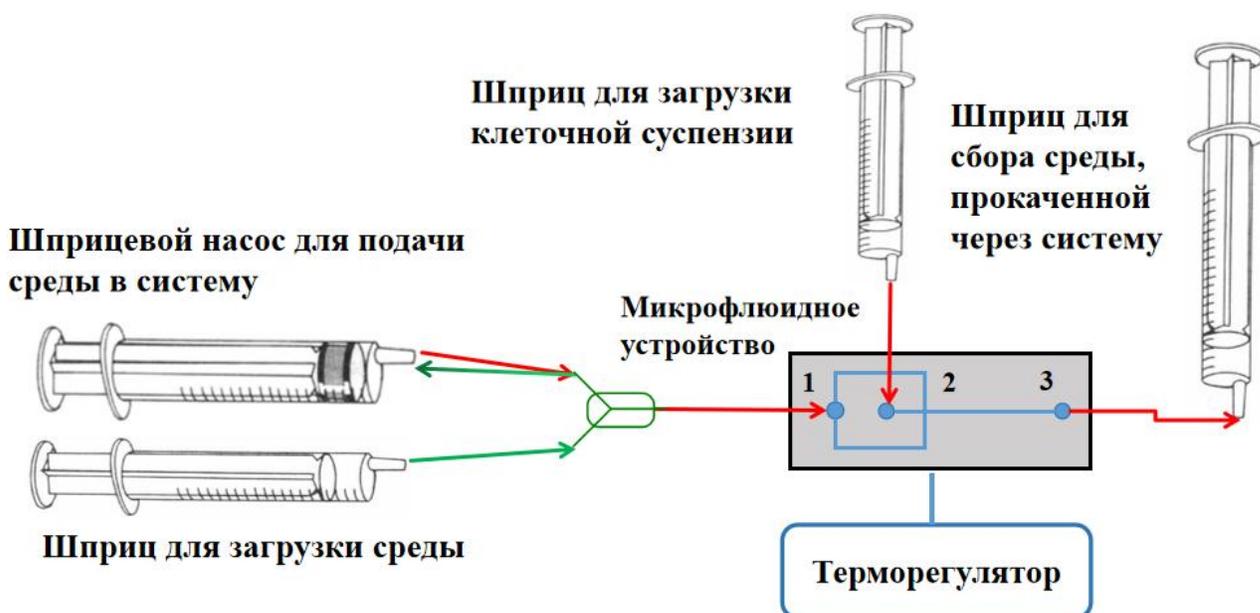


Рисунок 38 – Схема микрофлюидной системы. Зелеными линиями показано направление движения потока при загрузке шприца средой, красными – при прокачке жидкости через систему.

Согласно данной схеме микрофлюидное устройство было присоединено к дозирующему шприцевому модулю, максимальным объемом 10 мл (NemeSys, Швейцария). Для наполнения шприцевого модуля использовался стерильный медицинский шприц аналогичного объема. Соединение шприцевого модуля и микрофлюидного устройства через трубку проводилось посредством клапанного устройства, оснащенного тремя входами, два из которых монтировались со шприцевыми устройствами, а один – с микрофлюидным устройством (на схеме – порт загрузки **1**). Программное обеспечение NemeSys позволяло регулировать открытие и закрытие клапана, и изолированную прокачку жидкости по одной траектории (обозначено зелеными и красными стрелками соответственно).

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 (рисунок 39), оснащенного камерой для непрерывной записи полученных изображений.

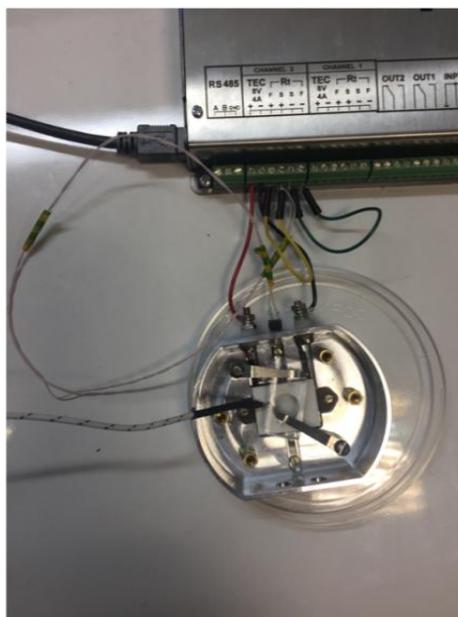


Рисунок 39 – Держатель для микрофлюидного устройства с интегрированным элементом Пельтье

Кроме того на микроскоп дополнительно была установлена камера для внешнего наблюдения за работой системы и своевременного удаленного мониторинга возможных нарушений ее работы. Загрузка клеточной суспензии производилась вручную с использованием инсулинового шприца объемом 1 мл через трубку, соединенную с микрофлюидным устройством (рисунок 38 – порт загрузки **2**). Прокачиваемая через систему питательная среда так же собиралась в шприц, соединенный с устройством посредством трубки (рисунок 38 – порт **3**). Таким образом система после сборки оставалась замкнутой, что предотвращало возможную микробную контаминацию и образование пузырей.

Критическим для использования данной системы в качестве биологической модели было обеспечение асептических условий на весь период эксперимента. Был разработан протокол проверки герметичности и стерилизации системы, позволяющий существенно снизить вероятность контаминации в течение долгосрочных экспериментов, включающий в себя несколько этапов стерилизации и последовательной промывки (стерильной деионизированной водой, детергирующими растворами и фосфатно-солевым буфером). Для поддержания стерильных условий установку собирали в ламинарном шкафу. Внешний вид собранной системы представлен на рисунке 40.



Рисунок 40 – Общий вид стендовой микрофлюидной системы в ламинарном шкафу

Первоначально разработанная схема была применима при постановке экспериментов, для которых расход жидкости, прокачиваемой через систему, составлял не более 10 мл (максимальный объем дозирующего шприцевого модуля). Это означало, что при подобранной на этапе моделирования скорости потока 400 мкл/мин, питательной среды хватало бы на 25 минут, после чего требовалось бы повторное наполнение шприцевого модуля через внешний шприц. Такой режим работы при продолжительных экспериментах (например, 24 или 48 часов) приводил бы к значительному расходу среды и потенциально мог бы привести к нарушению асептических условий и появлению в системе пузырей. Для решения этой проблемы был разработан новый алгоритм использования дозирующих и накопительных емкостей, схема которого представлена на рисунке 41.

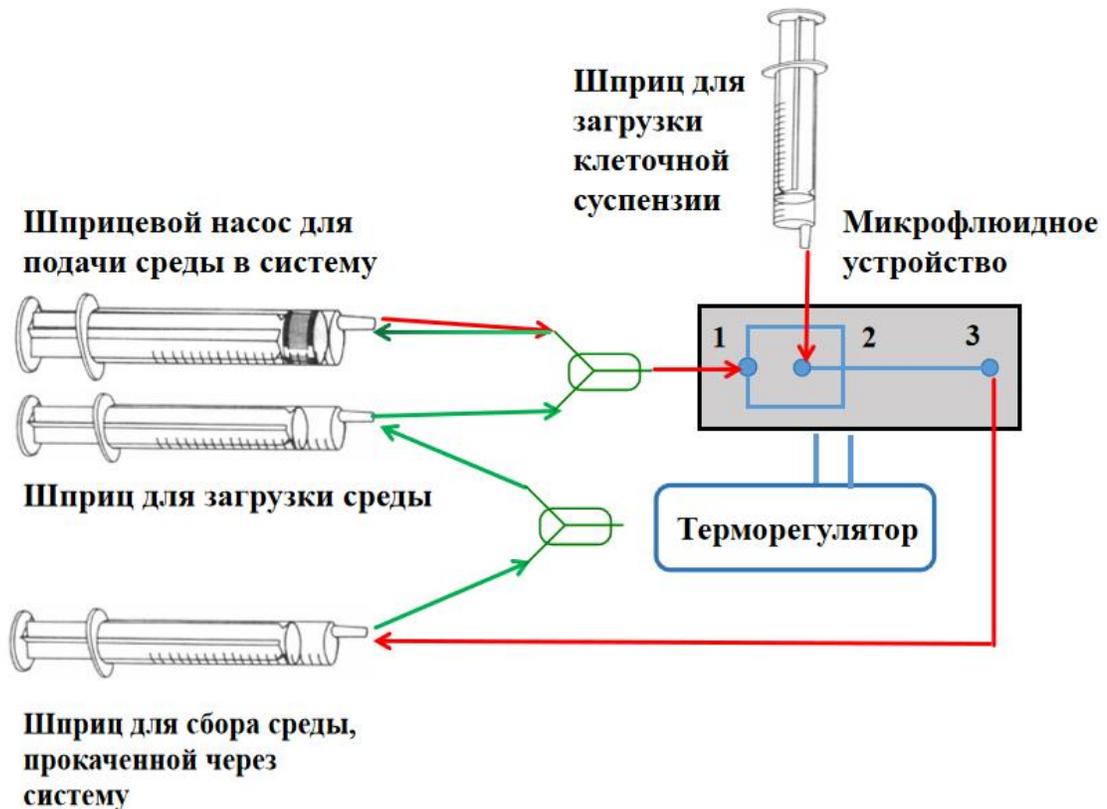


Рисунок 41 – Схема установки с рециркуляцией потока. Красными стрелками показано направление потока при прокачивании среды через систему, зелеными – возвращение прокаченной среды через клапаны на вход (рециркуляция потока).

Согласно данной схеме ростовая среда на выходе из устройства собиралась в стерильную емкость (рисунок 41 – порт 3). Емкость через систему клапанов была подключена к подводющему дозирующему модулю. Был разработан программный скрипт управления каналами и клапанами системы, с помощью которых накапливаемая после прохождения по системе ростовая среда через определенные промежутки времени обратно подавалась на вход системы (рисунок 41 – порт загрузки 1), обеспечивая таким образом возможность рециркуляции среды и многократного ее использования. При этом следует отметить, что подобная схема работы не исключала возможности периодического введения в описанную замкнутую систему свежей ростовой среды.

Таким образом, разработанная система может рассматриваться как модель замкнутой кровеносной системы с физиологически адекватными скоростями потоков.

Полное компьютерное управление как скоростью, так и клапанами подачи позволяло проводить эксперименты в автоматизированном режиме. Так, все элементы собранной системы, включая термостатирование, подачу жидкостей, наблюдение за клетками, имеют компьютерное управление. С учетом значительной временной протяженности экспериментов с клетками, был апробирован и в настоящее время активно используется удаленный мониторинг и управление параметрами системы через сеть Интернет (рисунок 42).

Таким образом, при создании и монтаже стендовой микрофлюидной системы были решены следующие проблемы, позволившие полностью адаптировать систему для работы с клеточными культурами:

- 1) обеспечение асептических условий работы для длительных экспериментов;
- 2) возможность рециркуляции ростовой среды в системе;
- 3) термостатирование микрофлюидного устройства для обеспечения поддержания физиологических температурных условий;
- 4) герметичность жидкостной системы;
- 5) возможность прижизненного микроскопического наблюдения за клетками (микроскопия в проходящем свете, фазово-контрастная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия);

б) возможность постоянного мониторинга и управления параметрами системы, в том числе и удаленно через сеть Интернет.

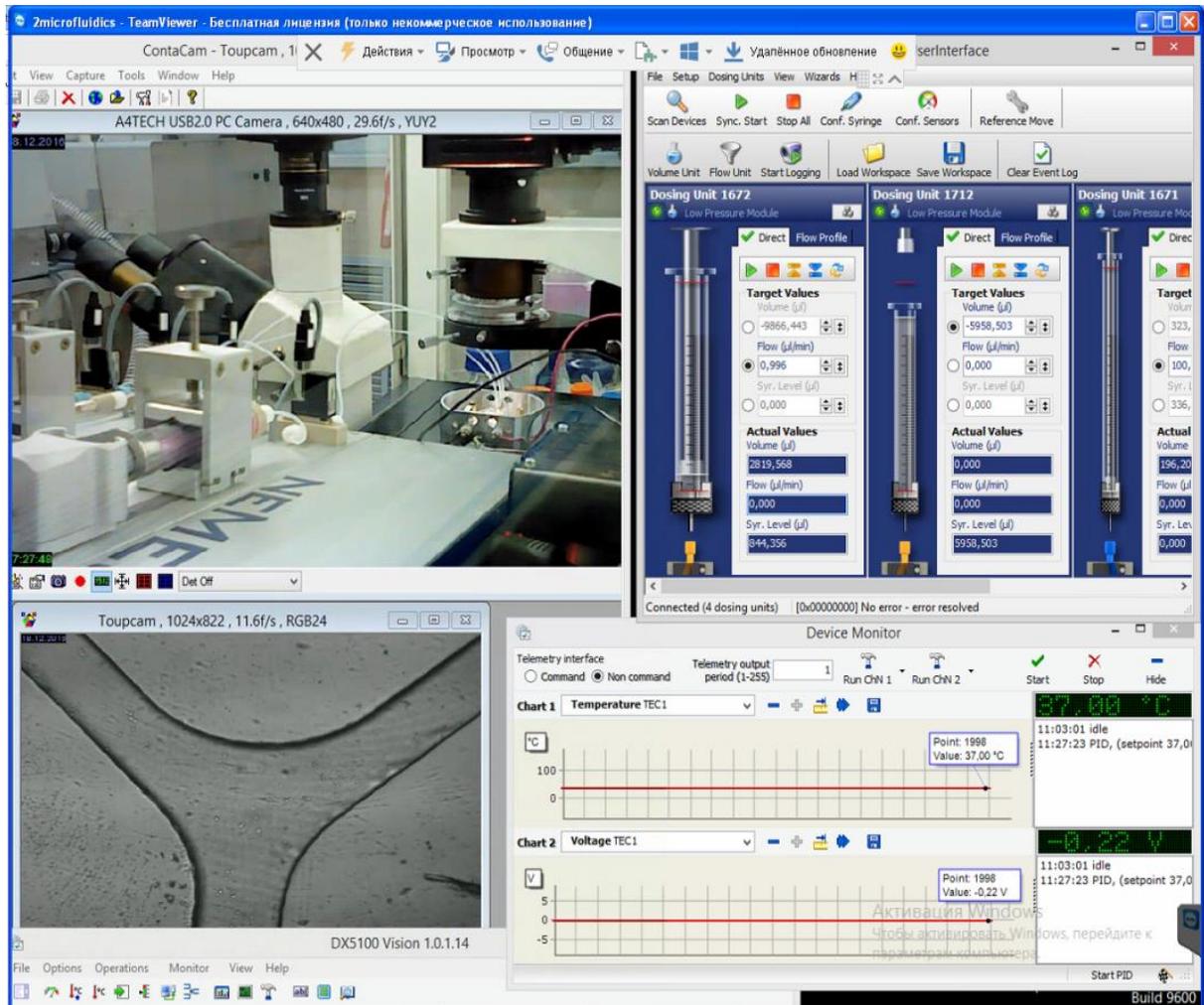


Рисунок 42 – Скриншот процесса удаленной работы с системой через сеть Интернет

Данные, полученные в результате проектирования микрофлюидной модели участка кровеносного сосуда, легли в основу полезной модели №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., Мильникова А.Н. Заявл. 29.06.2018. Оpubл. 09.09.2019).

Разработанная полезная модель может быть использована для тестирования взаимодействия оборудования, например коронарных стентов, с клеточной стенкой сосуда в условиях потока, в том числе, процесса эндотелизации. Данный результат достигается за

счет того, что проточный чип содержит цилиндрический колодец, к которому подведены каналы для подачи и отвода жидкости, а на стенках колодца сформирован слой эндотелиальных клеток. В качестве недостатка ранее разработанных в этой области технических решений выступало отсутствие клеточного монослоя, имитирующего эндотелиальную выстилку сосуда. Задача, на решение которой было направлено заявленное техническое решение заключалось в решении задачи тестирования взаимодействия оборудования с клеточной стенкой сосуда в условиях потока.

Разработанное устройство работало следующим образом. Чип заполнялся ростовой средой. Затем через входной канал или непосредственно в колодец через один из входов в твердых пластинах вводилась суспензия эндотелиальных клеток. После чего вход плотно закрывался пробкой. Для улучшения адгезии клеток эндотелия к стенкам колодца стенки могли быть предварительно обработаны коллагеном, образующими двумерный гель на внутренней поверхности колодца. После адгезии клеток к стенкам колодца, через чип включался поток ростовой среды со скоростью, соответствующей физиологическим значениям скорости течения крови в сосудах. Мембраны на входе и выходе из колодца служили для создания равномерного потока по всему сечению колодца. После образования монослоя эндотелиальных клеток на внутренних стенках колодца, открыв одну или обе пробки в колодец могло быть введено тестируемое оборудование, например, участок или целый коронарный стент. Поток при этом останавливался, а ростовая среда могла как удаляться из чипа, так и оставаться в нем. После введения оборудования, пробки плотно закрывались и поток возобновлялся. Наблюдение взаимодействия тестируемого оборудования и клеточного слоя могло осуществляться как визуально, с помощью оптической или конфокальной микроскопии при использовании прозрачных материалов, так и непрямыми методами, например, путем анализа биомаркеров на выходе из устройства. Также анализ мог проводиться после извлечения тестируемого оборудования из устройства, по конечной точке.

В данном же случае разработанная модель была необходима для изучения адаптации эндотелиальных клеток, которая была изучена во второй части работы.

2.2. Изучение адаптации эндотелиальных клеток к сдвиговой деформации, создаваемой потоком в микрофлюидной системе.

2.2.1. Отработка методики культивирования эндотелиоцитов в микрофлюидной системе.

Одним из важнейших этапов работы с системой для культивирования в ней клеток, был этап предварительной подготовки, заключающийся в последовательной обработке шприцов, трубок и каналов растворами детергентов для предотвращения микробной контаминации, инкубация системы в растворе коллагена I типа с содержанием 0,01 M уксусной кислоты для создание пленки коллагена на поверхности стеклянной подложки и инкубация в течение 2 часов в полной питательной среде для дополнительного осаждения беков на поверхности каналов. Только после всех этапов обработки система была готова для культивирования в ней эукариотических клеток.

За основу для методики культивирования клеток EA.hy 926 в микрофлюидном формате была взята стандартная методика для данной клеточной линии, описанная в международной базе данных ATCC. С учетом малого объема среды в каналах и быстрого изменения ее pH в процессе жизнедеятельность в среду дополнительно был добавлен буфер HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота). Данный буфер представляет собой цвиттер-ионный органический агент, способный поддерживать физиологический уровень pH, несмотря на изменения концентрации диоксида углерода, вырабатывающегося при клеточном дыхании.

Помимо вышеперечисленного на начальном этапе оптимизации протоколов работы системы был обозначен ряд методических недостатков, как в работе самой системы, так и в последующих процедурах пробоподготовки. Среди наиболее существенных проблем были отмечены следующие:

- 1) неэффективный контроль посадочной плотности клеток, в связи с чем периодически наблюдалась неравномерная или низкая посадочная плотность;
- 2) возникновение воздушных пузырей в системе.

Для устранения этих проблем был осуществлен ряд действий. В частности, для повышения посадочной плотности была применена прямая загрузка суспензии клеток в микрофлюидное устройство, что существенно снизило потери клеток (рисунок 43). Для

снижения вероятности появления воздушных пузырей был оптимизирован порядок подключения портов для подачи среды и клеток.

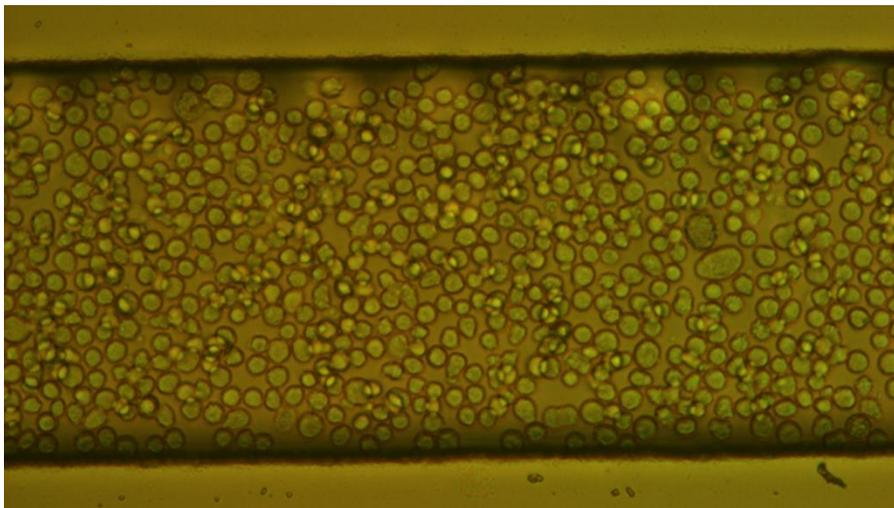


Рисунок 43 – Высокая плотность клеток при ручной загрузке клеточной суспензии в канал.

Применяемые для монтажа системы трубки из поливинилхлорида обеспечивали лучшую герметичность, а также повышали удобство работы с устройством благодаря их гибкости. Также удалось уйти от металлических игл, с помощью которых ранее трубки подсоединяли к устройству. Эти иглы приводили к изменению смачиваемости и частым протеканиям жидкости при работе системы.

Результатом оптимизации всех параметров служило стойкое поддержание жизнедеятельности культуры клеток EA.hy926 до 4 суток в условиях разработанной стендовой микрофлюидной системы. После загрузки суспензии в систему клетки сравнительно быстро, в пределах 20-40 мин, адгезировали к поверхностям устройства. На рисунке 44 видна адгезия клеток в каналах устройства. При этом, предпочтительным местом адгезии являлась поверхность обработанного коллагеном покровного стекла, из которого была изготовлена подложка, в то время как адгезия на поверхности PDMS была незначительна, что согласуется с полученными ранее выводами.

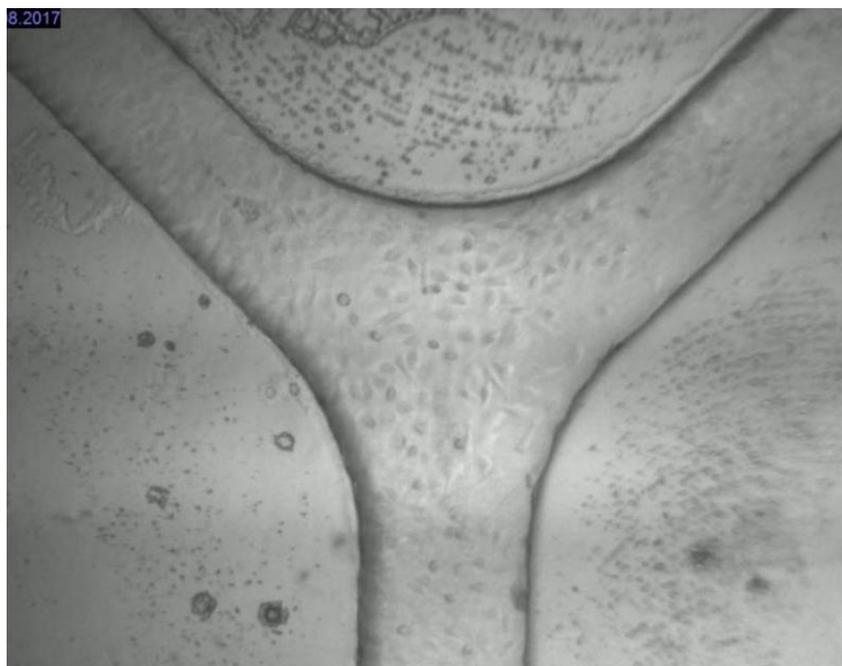


Рисунок 44 – Адгезия клеток в микрофлюидном устройстве.

Адгезировавшие клетки далее находились в потоке жидкости на скорости 1 мкл/мин, что соответствовало величине сдвиговой деформации в канале в 0.01 Па, при этом они не демонстрировали ухудшение выживаемости на длительных (более 72 часов) временных интервалах. Как одно из подтверждений факта оптимизации всех вышеперечисленных параметров в системе так же наблюдался процесс деления клеток со стадиями их ошаривания и разделения на две дочерние клетки, при этом весь процесс занимал 1,5 часа. Прикладываемая величина сдвиговой деформации в этом случае составляла 0.01 Па и существенно не изменяла морфологию клеток, которая соответствовала таковой при статическом культивировании (рисунок 45).

Как видно на представленном изображении в части эффективности посадки и роста, а также морфологии клеток EA.hy926, не наблюдалось существенной разницы между стандартными методиками культивирования и культивированием в микрофлюидной системе. Также не было зарегистрировано снижения жизнеспособности клеток в устройстве из-за возможного ухудшения газообмена в замкнутой системе, что можно объясняться достаточной газопроницаемостью PDMS и рационально подобранной буферной системой, добавленной в среду для культивирования.

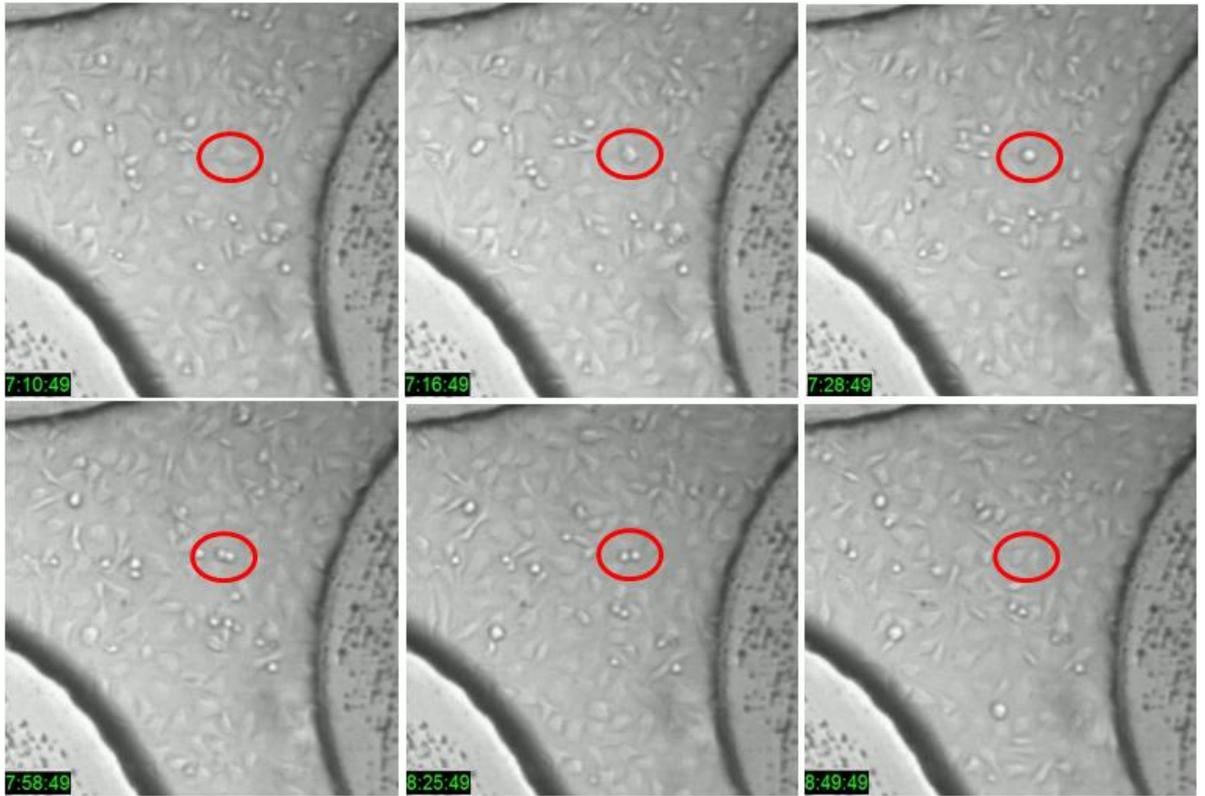


Рисунок 45 – Процесс деления клеток в микрофлюидной системе.

После оптимизации протокола загрузки и культивирования клеток в системе следующим этапом работы было исследование влияния потока и создаваемой им сдвиговой деформации на основные параметры жизнедеятельности эндотелиальных клеток.

2.2.2. Анализ мембранного транспорта пропидий иодида и флуоресцеинизотиоцианата через поверхность клеточных мембран.

Было выдвинуто предположение, что сдвиговая деформация, создаваемая потоком, может влиять на проницаемость клеточных мембран. Для проверки данной теории были выбраны два широко используемых в молекулярной биологии флуоресцентных зонда – пропидий иодид и флуоресцеинизотиоцианат.

Отличительной особенностью данных флуоресцентных меток является то, что они проходят только через поврежденную клеточную мембрану, поэтому в классических исследованиях используются, как правило, для различения живых и мертвых клеток. В то же время у выбранных красителей наблюдается различный механизм возникновения флуоресценции, что позволяло провести сравнительный анализ мембранного транспорта

зондов через клеточную мембрану. Так, пропидий йодид является интеркалятором в ДНК, в то время как свечение флуоресцеинизотиоцианата обусловлено его связыванием с нуклеофильными группами биомолекул.

В данной работе по наличию или отсутствию флуоресцентного окрашивания клеток можно было сделать вывод об изменении проницаемости клеточной мембраны под воздействием сдвиговой деформации.

Окрашивание клеток пропидий йодидом проводилось в динамических условиях при скорости потока 200 мкл/мин, в статических – в отсутствие потока (в чашках Петри).

Данные, полученные методом конфокальной микроскопии представлены на рисунке 46.

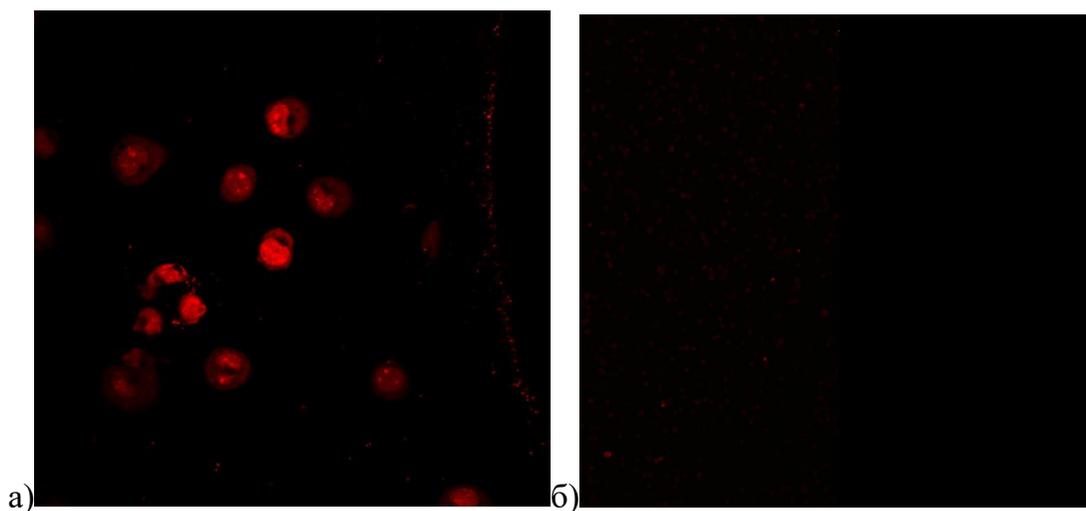


Рисунок 46 – Окрашивание клеток пропидий йодидом: а – в динамических условиях, б – в статических условиях.

По представленным изображениям можно отметить, что эффективность мембранного транспорта пропидий йодида в цитоплазму и ядро клеток в микрофлюидном устройстве в условиях проточного режима функционирования была существенно выше по сравнению со статическим режимом.

Окрашивание клеток флуоресцеинизотиоцианатом также проводилось в динамических условиях при скорости потока 200 мкл/мин, в статических – в отсутствие потока (в чашках Петри).

Полученные методом конфокальной микроскопии изображения представлены на рисунке 47.

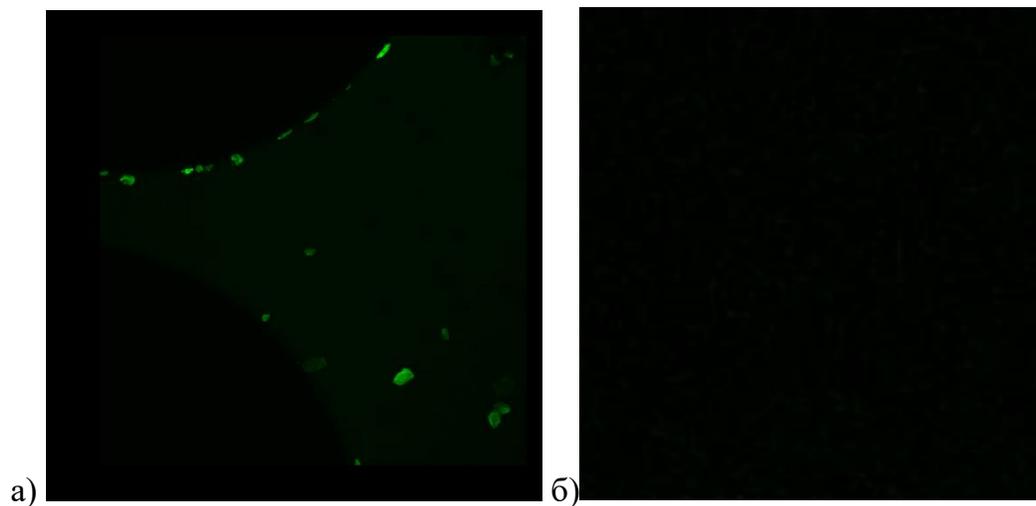


Рисунок 47 – Окрашивание клеток флуоресцеинизотиоцианатом: а – в динамических условиях, б – в статических условиях.

Полученные данные демонстрируют, что мембранный транспорт флуоресцеинизотиоцианата также был более эффективен в проточных условиях. В то же время необходимо отметить, что полученный результат в данном случае не может интерпретироваться однозначно, так как нет уверенности в жизнеспособности окрашенных клеток.

Таким образом, можно предположить, что воздействие сдвиговой деформации привело к изменению проницаемости клеточной мембраны и тем самым вероятно открыло возможность к проникновению флуоресцеинизотиоцианата в цитоплазму, а пропидий йодида в цитоплазму и ядро, а, значит, существует вероятность, что в подобных условиях может быть реализована доставка внутрь клетки веществ, в стандартных условиях не имеющих специальных транспортных систем для прохождения через мембрану. Однако, данное предположение нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

2.2.3. Анализ влияния сдвиговой деформации на экспрессию белка-шаперона GRP78 и фактора Виллибранда.

Полученные результаты были опубликованы в статье: Мильникова 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. 729-31.

Как ранее уже было отмечено, одним из проявлений реакции эндотелиальных сосудистых клеток на патологические значения сдвиговой деформации является высвобождение из них хранящегося в них белка – фактора Виллебранда. Этот белок хранится в сосудистых клетках в плотно свёрнутом состоянии, однако высвобождаясь, под действием сдвиговой деформации, образует протяжённые нити, сплетающиеся в сеть, способную улавливать тромбоциты из потока крови и устранять повреждения стенки сосуда. Однако, чрезмерная экспрессия и нарушение нативной конформации ФВ может приводить к возникновению сосудистых патологий и тромботических осложнений. При этом механизм обратной связи, регулирующий в этом случае клеточный ответ на изменение значения сдвиговой деформации потоком крови на данный момент до конца не был изучен.

Было выдвинуто предположение, что в механизме клеточного ответа может принимать участие глюкозозависимый белок 78 (GRP78), предположительно участвующий в плотной упаковке ФВ внутри клетки.

GRP78 представляет собой основной белок-шаперон (белок теплового шока), который в эндоплазматическом ретикулуме нормальных клеток участвует в каскаде клеточного ответа на накопление белков с ненативной конформацией. Основная роль GRP78 в этом процессе заключается в рефолдинге или деградации неправильно упакованных белков [109-112].

В связи с особенностью разворачивания ФВ под действием потока было необходимо исследовать его внеклеточную фракцию. Для этого проводилось последовательное окрашивание клеток первичными антителами к белку GRP78, затем вторичными FITC-мечеными антителами, и параллельно первичными антителами к ФВ, затем родамин-

мечеными вторичными антителами. В ходе экспериментов в микрофлюидной системе было обнаружено, что экспрессия клетками EA.hy926 GRP78 и ФВ в контрольном канале при действии сдвиговой деформации низкой интенсивности (скорость потока 1 мкл/мин) находилась на сравнительно не высоком уровне (рисунок 48), включения ФВ отчетливо детектировались лишь в единичных клетках. Так как известно, что клетки EA.hy926 начинают активно синтезировать ФВ при додифференцировке при высокой степени конфлюэнтности, наблюдаемая картина была ожидаема по причине этой особенности данных клеток.

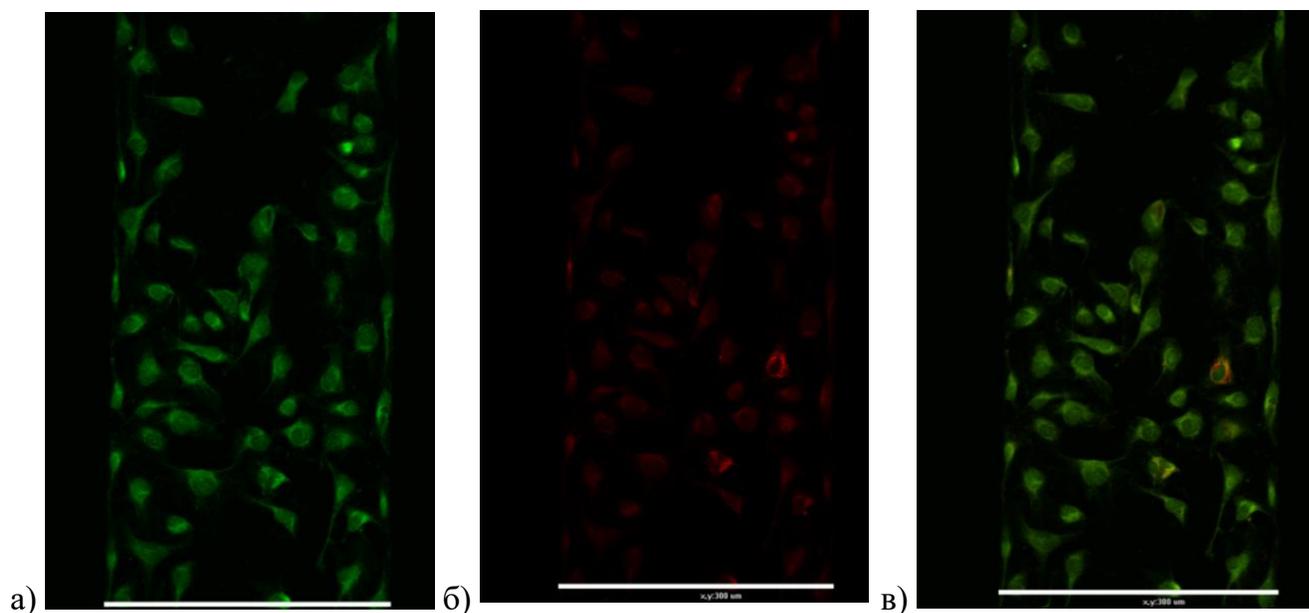


Рисунок 48 – Примеры микрофотографий эндотелиоцитов, культивируемых в потоке в микроканале при скорости 1 мкл/мин (20X увеличение): а – зеленый FITC-канал, соответствующий GRP78, б – красный родамин-канал, соответствующий ФВ; в – слитое двухканальное изображение.

Проведенный анализ колокализации ФВ и GRP78 при действии сдвиговой деформации низкой интенсивности по совокупности контрольных клеток методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показал заметный уровень колокализации. В контрольных каналах при действии низкоинтенсивной сдвиговой деформации почти не определялся внеклеточный ФВ, его локализация была

преимущественно внутриклеточной. Полученный уровень колокализации, возможно, связан с участием GRP78 в фолдинге ФВ.

В случае высокой сдвиговой деформации при объемной скорости потока 400 мкл/мин был отмечен рост интенсивности флуоресценции клеток по красному каналу, который соответствует родамин-меченым антителам, соответствующим ФВ. Предположительно это может быть связано с увеличением синтеза клетками ФВ. Во всех случаях при действии повышенной сдвиговой деформации регистрировалось флуоресценция преимущественно по красному каналу во внеклеточном пространстве, как в виде включений, так и в виде нитей (рисунок 49).

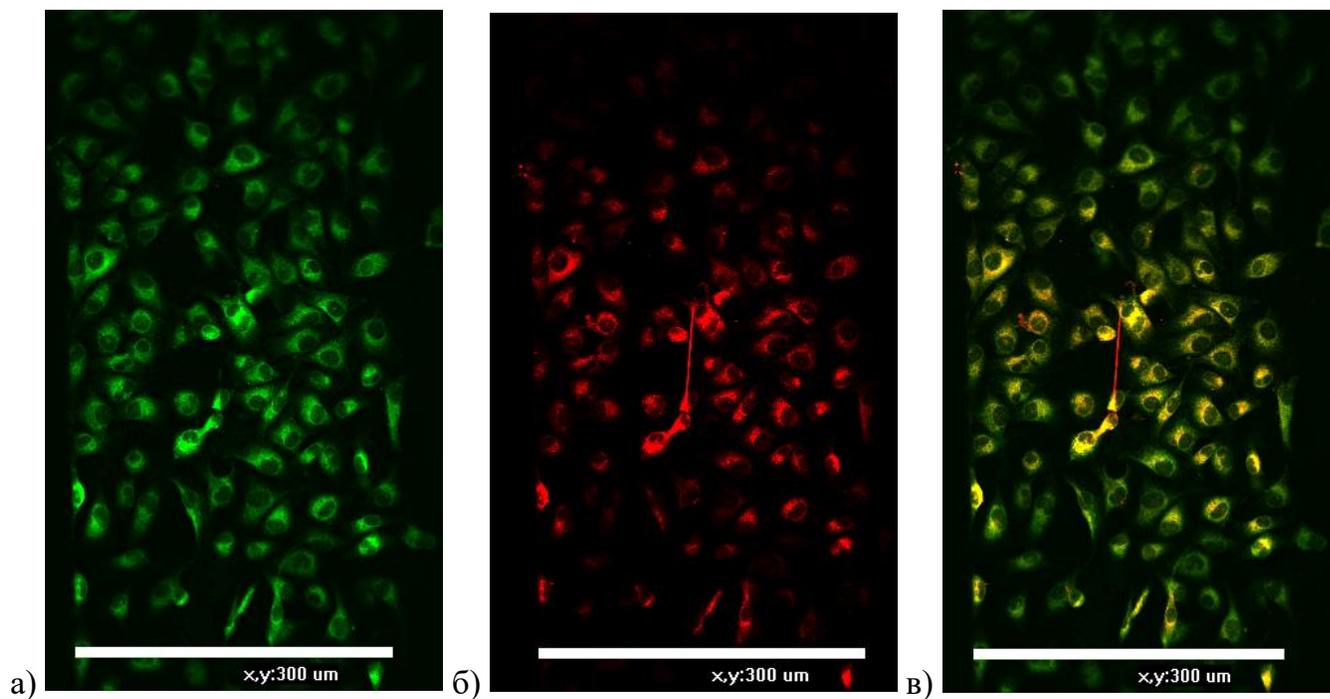


Рисунок 49 – Примеры микрофотографий эндотелиоцитов, культивируемых в потоке в микроканале при скорости 400 мкл/мин (20X увеличение): а – зеленый FITC-канал, соответствующий GRP78, б – красный родамин-канал, соответствующий ФВ; в – слитое двухканальное изображение.

Можно предположить, что в связи с тем, что прочность связывания клеток с поверхностью стекла отличается от физиологических условий связывания эндотелиальных клеток с базальной пластиной, в результате действия сдвиговой

деформации высокой интенсивности может передаваться значительное усилие на цитоскелет, что может дополнительно способствовать разворачиванию ФВ и его частичной полимеризации в клетке.

Для определения специфичности мечения была так же произведена окраска клеток, подверженных действию интенсивной сдвиговой деформации, только антителами к ФВ. В ходе эксперимента были визуализированы похожие тонкие нитевидные образования (рисунок 50).

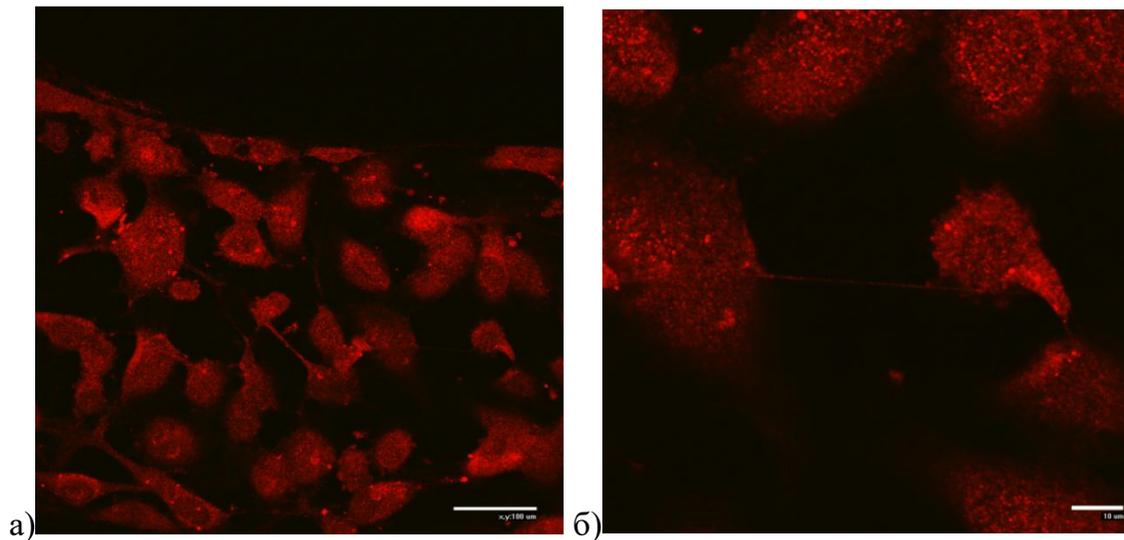


Рисунок 50 – Примеры микрофотографий эндотелиоцитов, культивируемых в потоке в микроканале при скорости 400 мкл/мин в течение 12 ч, инкубированных с первичными антителами только к ФВ и затем с вторичными родамин-мечеными антителами: а – 20X увеличение, б – 40X увеличение.

При этом окраска клеток только вторыми FITC- и родаминмечеными антителами показала сравнительно низкий уровень неспецифической окраски в обоих случаях, что так же подтверждает специфичность окрашивания (рисунок 51).

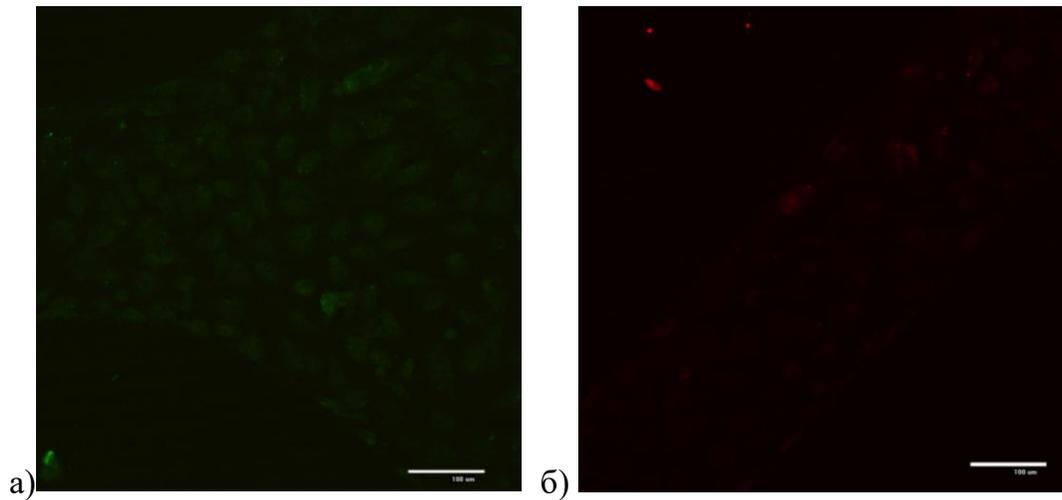


Рисунок 51 – Примеры микрофотографий эндотелиоцитов, культивируемых в потоке в микроканале при скорости 400 мкл/мин в течение 12 ч (20X увеличение): а – инкубированных только со вторичными FITC-мечеными антителами; б – инкубированных только со вторичными родамин-мечеными антителами.

Отдельно стоит отметить тот факт, что при действии интенсивной сдвиговой деформации наблюдались высокая интенсивность флуоресценции у краевых клеток по контурам микроканалов, это было отмечено как в микроканалах с бифуркацией, так и микроканалах без ветвления (рисунок 52).

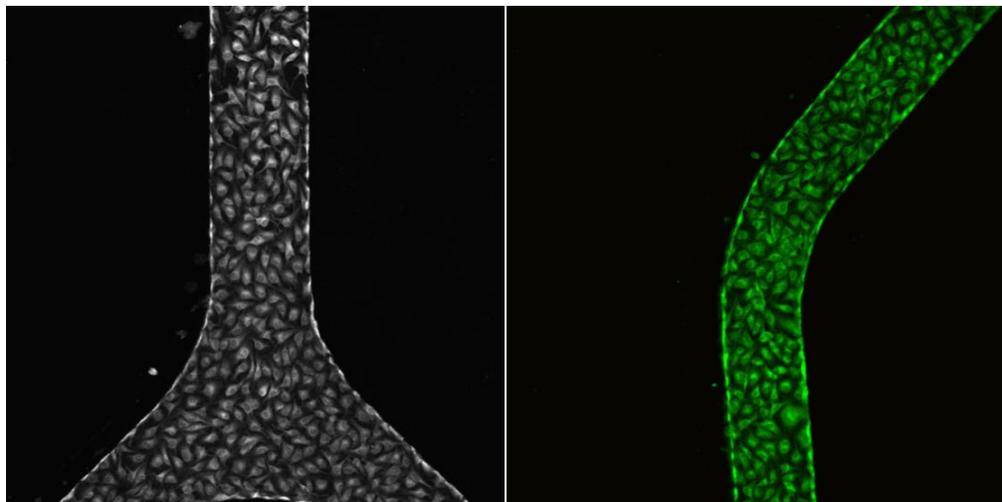


Рисунок 52 – Примеры микрофотографий эндотелиоцитов, культивируемых в потоке в микроканале при скорости 400 мкл/мин в течение 12 ч (20X увеличение), инкубируемых с первичными антителами к GRP78, а затем вторичными FITC-мечеными антителами.

Наблюдаемое явление, по-видимому, может быть связано с особенностью морфологии данных клеток – меньшим распластыванием по субстрату из-за меньшей доступности гидрофильной поверхности и предпочитаемой клетками поверхности стекла по сравнению с поверхностью PDMS, что ранее было уже отмечено на этапе подбора материалов для изготовления устройства.

2.2.4. Анализ влияния сдвиговой деформации на продукцию клетками монооксида азота (NO).

Полученные результаты были опубликованы в статье: Московцев А.А., Мильникова 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.

Анализ продукции оксида азота (II) (NO) является важным аспектом изучения адаптации эндотелиальных клеток к гидродинамическим условиям, поскольку он участвует в таких физиологических процессах, как нейротрансмиссия, иммунная защита и поддержание гомеостаза сосудов. Однако количественное определение NO, продуцируемого конститутивными изоформами eNOS, затруднено из-за его низкой свободной концентрации, в связи с чем для оценки функционального состояния клеток EA.Hy926 при действии потока в каналах микрофлюидной системы впервые был применен метод непрямого определения продукции NO с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина DAF-2 [112-114].

Способность клеток линии EA.Hy926 продуцировать оксид азота была проанализирована в статических условиях в присутствии 1 мкМ кальциевого ионофора A23187 (активатора eNOS) и 100 мкМ L-аргинина в качестве субстрата. Для предполагаемого увеличения продукции NO был применен транскрипционный индуктор eNOS – форболовый эфир Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Как видно из рисунка 53, увеличение интенсивности флуоресценции в ~1.2 раза по сравнению с базовыми условиями наблюдалась при предварительной инкубации с PMA в концентрации 5 нМ, что

свидетельствует о росте продукции NO в результате предполагаемой транскрипционной активации. Инкубация проводилась в течении 18 часов.

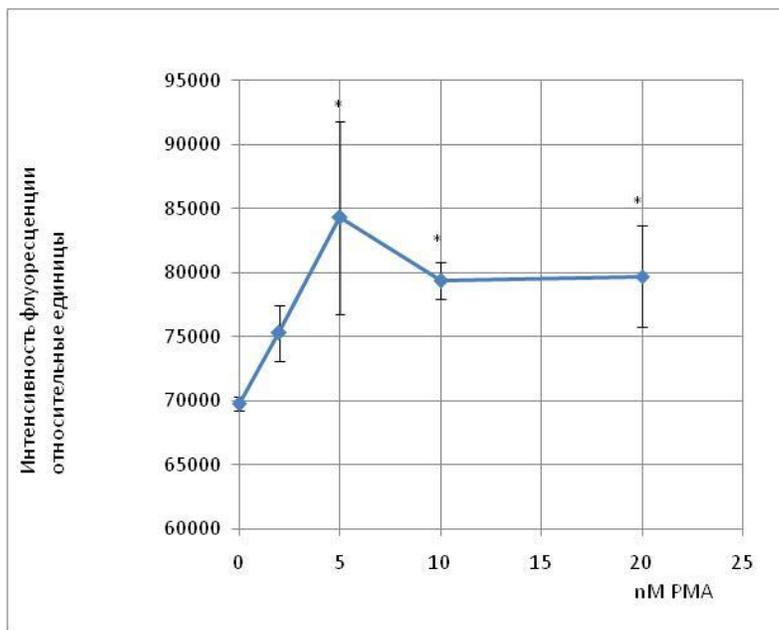


Рисунок 53 – Зависимость интенсивности флуоресценции при 515 нм (возбуждение 495 нм), скорректированная на фоновую флуоресценцию при 538 нм (возбуждение 485 нм) при добавлении зонда DAF-2 к клеткам EA.Нy92, предварительно активированным PMA

Для сравнительного анализа продукции NO в условиях потока были использованы объемные скорости 2 мкл/мин и 100 мкл/мин с расчетной максимальной сдвиговой деформацией ~ 0.01 Па и ~ 5.50 Па соответственно. В ходе проведенных исследований было установлено, что действие сдвиговой деформации приводит к увеличению интенсивности флуоресценции зонда, указывающее на рост концентрации продуктов окисления оксида азота. Однако, при соответствующем физиологическом уровне сдвиговой деформации ~ 5.50 Па в микрофлюидном устройстве при объемном расходе 100 мкл/мин прирост концентрации продуктов окисления NO оказывается сравнительно небольшим (в ~ 1.15 раза) по сравнению со статическими условиями (2 мкл/мин). Это может быть обусловлено значительным разбавлением продукта ввиду незамкнутой конфигурации микрофлюидной системы (рисунок 54).

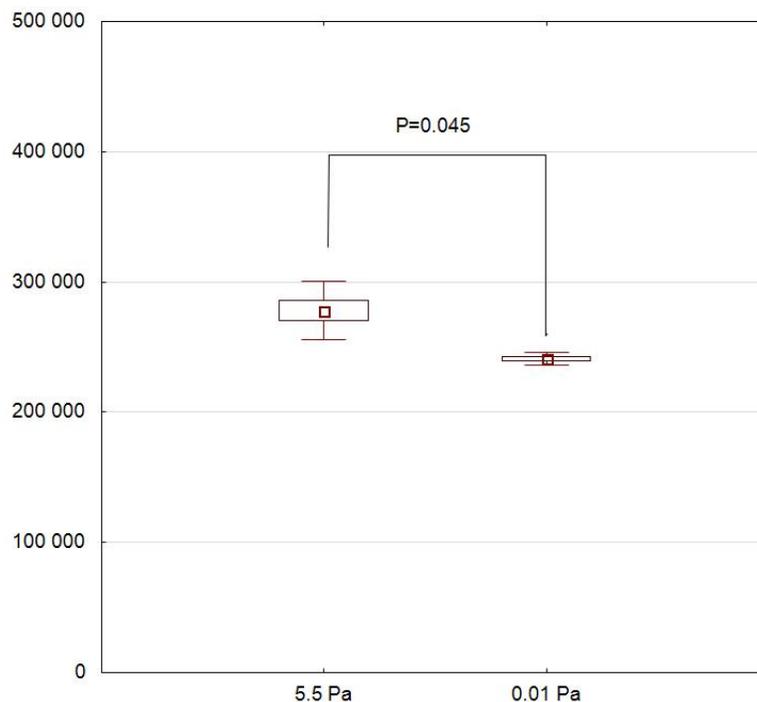


Рисунок 54 – Интенсивность флуоресценции при 515 нм (возбуждение 495 нм), скорректированная на фоновую флуоресценцию при 538 нм (возбуждение 485 нм) среды FluoroBrite, прокачанной с постоянной скоростью 100 мкл/мин и 2 мкл/мин в течение 4 ч в микрофлюидной системе

Резюмируя все вышесказанное, стоит отметить, что для изолированного монослоя эндотелиоцитоподобных клеток EAhy.926 в микрофлюидной системе, имитирующей микрососудистое русло, впервые получены данные об увеличении продукции оксида азота при росте сдвиговой деформации. Полученные данные могут служить основой для использования разработанной микрофлюидной модельной системы как для изучения функционального состояния эндотелия при действии вазоактивных фармакологических препаратов и других методов воздействия на эндотелий, так и при моделируемой дисфункции эндотелия.

Таким образом, все полученные данные позволяют предположить, что созданная в рамках диссертационной работы 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, продукцию монооксида азота (NO) и уровня экспрессии белковых факторов, вовлеченных в ответ на стрессовое воздействие на клетку, что позволяет использовать ее для изучения регуляции клеточного гомеостаза (биологии эндотелиальных клеток) в условиях потока.

ГЛАВА 3. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

3.1. Приборы.

Культуральный инкубатор Sanyo.

Для поддержания необходимого температурного и газового режима при культивировании эукариотических клеток использовался культуральный инкубатор Sanyo (Япония). Подключение инкубатора к баллону со сжиженным углекислым газом позволяло поддерживать уровень CO₂ во внутренней атмосфере в пределах 5%. Стенки инкубатора были изготовлены из нержавеющей стали с добавлением меди, что, вместе с системой стерилизации воздуха ультрафиолетом, предотвращало развитие нежелательных микроорганизмов.

Автоматический счётчик клеток Countess.

Для подсчета количества клеток в суспензии использовался автоматический счетчик клеток Countess (Нидерланды), оснащенный автоматизированной системой фокусировки и освещения, а также программным обеспечением для анализа изображений первичных и иммортализованных культур клеток. Счетчик позволял получать изображения в светлом поле, что позволяло подсчитывать клетки и измерять жизнеспособность. Диапазон измерения счетчика составлял от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл. Оптимальный диапазон – от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Минимальный объем образца – 10 мкл.

Конфокальный сканирующий микроскоп Nikon Eclipse TE 2000-и.

Визуализация внутриклеточных структур, покрашенных флуоресцентными зондами, проводилась с помощью конфокального сканирующего микроскопа Nikon Eclipse TE 2000-и (Япония). Конфокальная сканирующая микроскопия – это один из методов оптической микроскопии, принцип которой основывается на использовании диафрагмы, отсекающей поток фонового рассеянного света, благодаря чему в микроскопе в каждый момент времени происходит регистрация изображения одной точки объекта, после чего формируется полноценное изображение. Получение нескольких двумерных изображений на разной глубине в образце позволяло реконструировать трехмерные структуры (оптическое сечение) внутри клетки. Описанный метод исследования позволял идентифицировать отдельные

молекулы и структуры клетки, способность различных веществ накапливаться в ядре, цитоплазме или в других клеточных структурах [115].

Ион-проводящий микроскоп ICAPPIC.

Для изучения топографии клеточного монослоя применялся сканирующий ион-проводящий микроскоп ICAPPIC (Великобритания), размещённый на оптическом микроскопе Eclipse Ti (Nikon, Япония) на базе ЦКП МИСиС. Метод ион-проводящей микроскопии основан на сканировании топологии поверхности образца с помощью измерения ионного тока через сверхтонкий капилляр [116].

Режим сканирования был организован как приближение капилляра к поверхности в последовательности точек над образцом. В качестве зонда в установке использовался нанометровый стеклянный капилляр из боросиликатного стекла, в который был помещен электрод. Второй электрод находился в растворе, налитым в чашку Петри с образцом. Для проведения картирования поверхности и получения топографии образца использовалась система обратной связи, основанная на регистрации ионного тока, протекающего через нанокапилляр и координат пьезоактюаторов. При сближении капилляра с объектами на поверхности образца просвет капилляра «затыкался» и ионный ток снижался. Сравнение положений нанокапилляра во время всего сканирования давало детальную топографию образца.

Сканирующий ион-проводящий микроскоп позволял осуществлять исследования биологических объектов, таких как белки и клетки, в их нативной жидкой среде. Прямого контакта между зондом и объектом во время сканирования не происходило, т.к. регистрировалось чрезвычайно малое снижение тока (0,04%), которое достигалось на достаточном удалении от поверхности, что предотвращало дополнительное механическое воздействие на клетку, сохраняло ее функциональность, и позволяло проводить многократные сканирования в динамических условиях.

Вертикальный обрабатывающий фрезерный центр с числовым программным управлением HURCO VMX 1.

Для изготовления полимерных матриц, необходимых для производства микрофлюидных устройств, использовался вертикальный обрабатывающий фрезерный центр с числовым программным управлением (ЧПУ) HURCO VMX 1 (Германия) на базе ЦКП МИСиС. Установка была предназначена для обработки пластин, дисков, валов и других деталей и для изготовления пресс-форм. Станок был оснащен автоматизированной системой управления, позволяющей осуществлять на нем линейную и круговую интерполяцию. Размер рабочего стола станка составлял 760x360 мм. Стандартная скорость шпинделя – 10000 об/мин. Линейными направляющими качения оснащались оси X, Y, Z и скорость перемещения по осям от 3.0 до 11400 мм/мин. Точность позиционирования составляла 0,005, разрешение до 1 мкм. Установка позволяла легко совмещать на одной матрице микроэлементы чипа и макроскопические элементы, такие как места под температурные датчики, клапаны и т.д. Преимуществом данного подхода перед фотолитографией являются стоимость и скорость изготовления матриц, что дает возможность легко и быстро оптимизировать конструкцию чипа.

Плазменный очиститель поверхности Diener electronic GmbH + Co.

Для гидрофилизации поверхности PDMS, сборки и герметизации микрофлюидного устройства применялась лабораторная плазменная установка Diener electronic GmbH + Co (Германия).

Установка Diener electronic GmbH + Co представляла собой цилиндрическую вакуумируемую камеру объемом 1,7 литра из сверхчистого кварцевого стекла диаметром 105 мм и длиной 200 мм. Источник плазмы: до 50 Вт, 13,56 МГц, электропитание: 230 В, 6А, 50/60 Гц.

С помощью генератора плазмы происходило преобразование электрической энергии в энергию заряженных и нейтральных частиц – электронов, ионов, атомов и молекул. Бомбардировка подложки всеми составляющими плазмы очищала и химически активировала поверхность образца, помещенного в рабочую камеру устройства. В точках контакта разрядных нитей поверхность локально нагревалась до высоких температур,

меня топографию поверхности. Кроме гидрофилизации поверхность физически очищалась от загрязнений за счет бомбардировки ионами и химических реакций при подаче кислорода. Загрязнения переводились в газовую фазу и удалялись из камеры откачной системой.

Установка для прецизионного дозирования жидкости NemeSys.

Для дозирования и управления потоками жидкости в микрофлюидной системе использовалась установка для прецизионного дозирования жидкости NemeSys (Cetoni, Швейцария). Установка включала в себя шприцевые модули объемами 1 мл, 5 мл, 10 мл и 25 мл, фитинг для соединения с трубками и клапанами, защитный капюшон, клапанные устройства и электрический привод. Смачиваемые части шприцев были изготовлены из нержавеющей стали с дополнительными уплотнительными кольцами.

Система привода шприцевого насоса с пропорционально-интегрально-дифференциальным регулированием (ПИД-регулированием) обеспечивала плавное движение поршня, предотвращая эффект налипания и гарантируя высокую точность и отсутствие пульсаций в создаваемых потоках жидкости в диапазоне от миллилитров и до нанолитров в секунду. Набор фитингов и клапанных устройств позволял варьировать скорость потока в широком диапазоне, загружать новые растворы в шприцевые модули без потери стерильности, осуществлять мгновенную остановку потока, а также варьировать направление потоков, в том числе создавая замкнутый контур с рециркуляцией, и моделировать различные режимы работы микрофлюидной системы.

Термоэлектрический модуль с контроллером и элементом Пельтье RMT Ltd.

Для поддержания в микрофлюидной системе постоянной физиологической температуры 37°C использовался термоэлектрический модуль с контроллером и элементом Пельтье (RMT Ltd, Россия). В основе работы элемента Пельтье находится физический принцип прохождения тока через две соприкасающиеся пластины, изготовленные из материалов с полупроводниками разных типов. В месте их соединения наблюдался нагрев при подаче тока в одну сторону, и понижение температуры при движении его в обратную.

Поддержание заданной температуры в устройстве происходило по принципу обратной связи по температуре.

Инвертированный оптический микроскоп Olympus.

Для визуализации клеток в микрофлюидной системе использовался инвертированный оптический микроскоп Olympus (Япония). Диапазон увеличения для данного микроскопа составлял от 12,5х до 1500х, устройство было дополнительно оснащено видеоокуляром TourCam (TourTek, КНР) с функцией фото- и видеозаписи и веб-камерой A4Tech (КНР) для фиксации изображений клеток в микрофлюидном чипе в режиме реального времени. Запись и обработка изображений осуществлялась с помощью программного обеспечения ContaCam.

Инвертируемый оптический микроскоп Olympus позволял проводить исследования в режимах светлого поля, темного поля, дифференциально-интерференционного контраста Номарского и простом поляризованном свете. Переключение между светлым/темным полем производилось путем переключения слайдера.

Спектрофлуориметр Horiba Fluoromax-4.

Для регистрации флуоресценции использовался спектрофлуориметр Horiba Fluoromax-4 (Япония). Прибор позволял детектировать флуоресценцию образцов как с пикомолярной (1-100 пмоль) концентрацией, так и при особо малых значениях времени экспозиции, что особенно важно для определения уровня монооксида азота. Принцип действия прибора основан на методе молекулярной эмиссионной спектроскопии – изучении спектров излучения молекул в ультрафиолетовой (200-400 нм), видимой (400-760 нм) и инфракрасной (более 760 нм) областях спектра, возникающих при облучении вещества светом с определенной длиной волны или в результате химической реакции. Спектрофлуориметрия предполагала сканирование как по длине волны возбуждения, так и по длине волны флуоресценции. Использование двух двойных монохроматоров обеспечивало минимальный уровень мешающего излучения, что гарантировало высокую точность измерений. В качестве источника излучения выступала ксеноновая лампа мощностью 150 Вт.

3.2. Реактивы.

Питательная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM («GIBCO», США); питательная среда DMEM без фенолового красного (FluoroBrite, «GIBCO», США); телячья эмбриональная сыворотка, Fetal bovine serum, FBS («GIBCO», США); фосфатно-солевой буфер в таблетках, Phosphate Buffered Saline, PBS («Amresco», США); раствор заменимых аминокислот MEMNon-Essential Amino Acids (NEAA) 100X («GIBCO», США); L-глутамин («Предприятие ПанЭко», Россия); гентамицин 10мг/мл, Gentamicin 10mg/ml («GIBCO», США); добавка к питательной среде НАТ, гамма-облученный лиофилизированный порошок («GIBCO», США); 0,25% раствор трипсина в 0,53 мМоль ЭДТА и неорганических солях в очищенной воде («Предприятие ПанЭко», Россия); диметилсульфоксид (ДМСО); 0,4% раствор трипанового синего, Trypan Blue stain 0,4% («Invitrogen», США); 70% и 96% растворы этилового спирта; буферный раствор HEPES 1 ммоль, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid («Invitrogen», США); набор для приготовления подидиметилсилоксана Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, (Polydimethylsiloxane, PDMS, «Dow Corning», Бельгия); набор для приготовления подидиметилсилоксана MS-1002 («Dow Corning», Бельгия); флуоресцеинизоотиоцианат (FITC, FluoresceinIsothiocyanate, ThermoScientific, США); пропилий иодид (PI, «Invitrogen», США); 0,01% раствор коллагена I типа, collagen Type I (COL1) в 0,01 М растворе уксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США); 1% и 4% растворы парафармальдегида в фосфатно-солевом буфере; 0,5% раствор неионогенного детергента Тритон X-100 (MP Biomedicals, Германия); 4% раствор бычьего сывороточного альбумина BSA («Предприятие ПанЭко», Россия); первичные антитела к GRP78 (Abcam, Великобритания); первичные антитела к фактору Виллебранда (Abcam, Великобритания); вторичные флуоресцентно-меченые антитела (KPL, США); форболовый эфир Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, США); кальциевый ионофор A23187 (Sigma-Aldrich, США); L-аргинин (PanReac Applichem, США); флуоресцентный индикатор для прямого обнаружения оксида азота 2,4,5-диаминофлуоресцеин (DAF-2, Sigma-Aldrich, США).

3.2.1 Флуоресцентные зонды.

Пропидий иодид.

Пропидий иодид (PI) представляет собой интеркалирующий реагент и флуоресцентную молекулу, используемую в молекулярной биологии для идентификации некротических и апоптотических клеток, так как проходит только через поврежденную мембрану. Его молекулярная формула – $C_{27}H_{34}I_2N_4$, структура показана на рисунке 55.

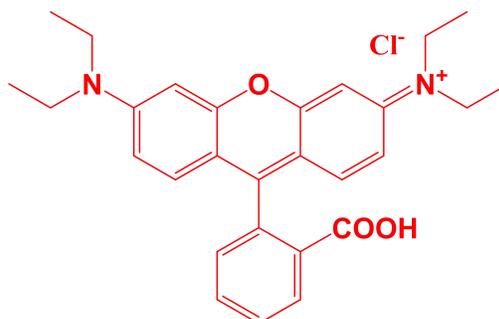


Рисунок 55 – Структурная формула пропидий иодида

При связывании с нуклеиновыми кислотами максимум возбуждения флуоресценции обнаруживается при 535 нм, а максимум эмиссии при 617 нм.

PI связывается с ДНК путем интеркаляции между основаниями, так же он связывается с РНК, что требует применения нуклеаз для выборочного окрашивания ДНК или РНК. Одна молекула PI стехиометрически связывается с четырьмя-пятью парами оснований ДНК.

После связывания с ДНК флуоресценция PI усиливается в 20-30 раз, в связи с чем PI используется в флуоресцентной микроскопии, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, проточной цитометрии и флюоиметрии [117].

Пропидий иодид был предоставлен компанией «Invitrogen», США.

Флуоресцеинизотиоцианат.

Флуоресцеинизотиоцианат (FITC) представляет собой молекулу флуоресцеина, функционализированную реакционно-способной группой изотиоцианата ($-N=C=S$) в

одном из двух атомов водорода на нижнем кольце структуры (рисунок 56). Его молекулярная формула – $C_{21}H_{11}NO_5S$.

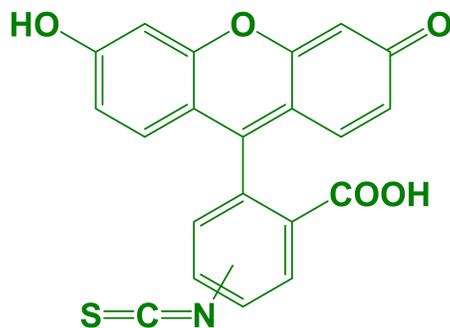


Рисунок 56 – Структурная формула флуоресцеинизотиоцианата

Данное производное флуоресцеина активно по отношению к нуклеофилам, в том числе аминам и сульфгидрильным группам белков, пептидов и других биомолекул за счет наличия в его структуре функционально активной группы изотиоцианата (рисунок 57). FITC имеет максимум спектра длин волн возбуждения и эмиссии 495 нм/519 нм [118].

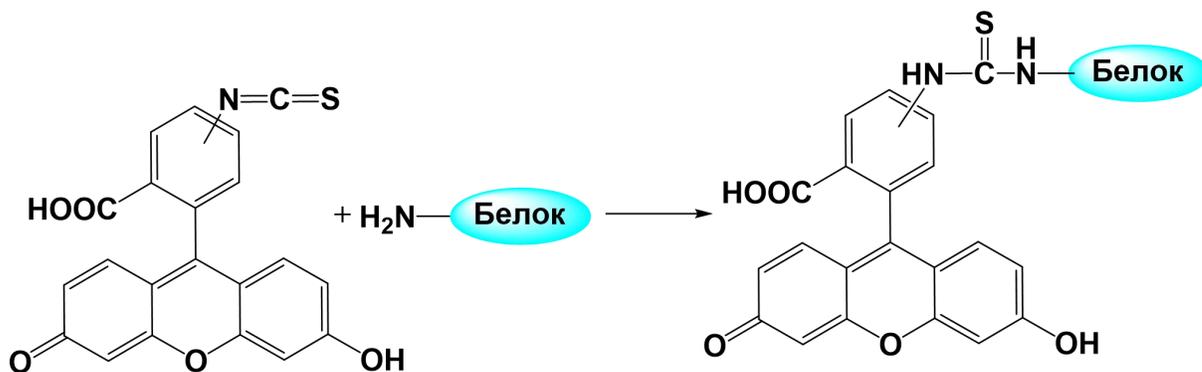


Рисунок 57 – Взаимодействие флуоресцеинизотиоцианата с молекулами белков [119].

Приобретен у компании «Thermo Fisher Scientific» (США).

3.3. Клеточная линия.

Исследования были выполнены на соматической гибридной клеточной линии человека EA.hy926. Эндотелиальная линия EA.Hy926, полученная путем гибридизации первичной эндотелиальной клеточной линии HUVEC с клеточной линией аденокарциномы

легкого А-549. Данная клеточная линия является эндотелиоцитоподобной с адгезионным типом роста (рисунок 58). Была получена из Университета Северной Каролины, США [119].

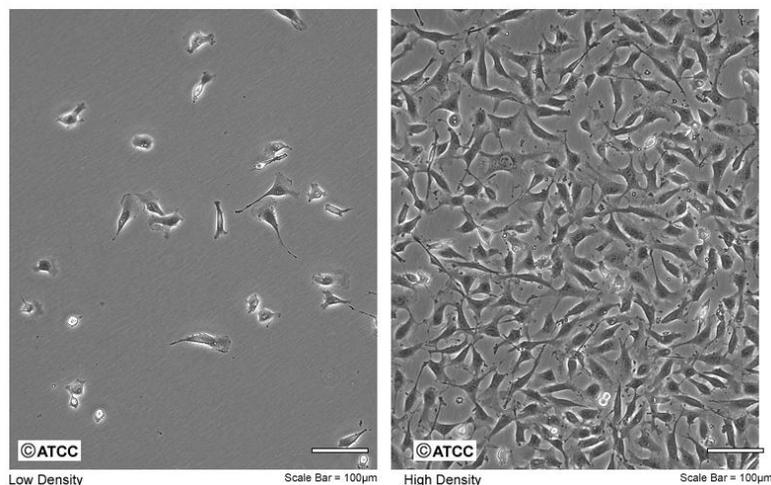


Рисунок 58 – Микрофотографии клеточной линии человека EA.hy926 при высокой (справа) и низкой (слева) плотности засева.[120]

Клеточная линия паспортизована, прошла контроль видовой специфичности (проведен кариотипический анализ), контроль контаминации (бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены).

3.4. Методы исследования.

3.4.1. Создание микрофлюидной модели.

Проектирование микрофлюидного устройства

При проектировании микрофлюидного устройства были учтены как биологические особенности культивируемых клеток (их размеры, диаметр, способ роста, потребность в питательных веществах), так и основные принципы биомиметического проектирования. Для моделирования геометрии будущего устройства использовалась программа для проектирования AutoCAD. Программа позволяла воспроизводить предполагаемую модель в двумерном и трехмерном формате.

Расчет гидродинамических параметров микрофлюидного биореактора с помощью компьютерной программы SolidWorks.

Для проведения компьютерного моделирования с помощью SolidWorks в спроектированной модели выделялась область вычислений в виде прямоугольной призмы, полностью включающей в себя полость, в которой находится жидкость. Затем в области вычислений строилась расчетная сетка. Сетка строилась путем деления области вычислений на слои, которые затем разделялись на прямоугольные ячейки. При моделировании ячейки можно было автоматически модифицировать, чтобы лучше соответствовать геометрии. Также, сетка могла быть уточнена в процессе вычислений. Далее задавались граничные и начальные условия.

Для моделирования течения ростовой среды через микрофлюидный чип было использовано условие объемного расхода для входа жидкости и условие постоянного давления окружающей среды на выходе. Дополнительно были заданы такие параметры, как температура, степень турбулентности потока, наличие теплопереноса через стенки, шероховатость стенки и т.д. Важным параметром для расчёта являлась жидкость, обладающая следующими характеристиками: плотность, динамическая вязкость, теплоемкость и теплопроводность. В целях упрощения задачи в качестве модельной жидкости была выбрана вода, а термодинамическими эффектами было решено пренебречь. Все вычисления происходили при постоянной температуре 37 °С, соответствующей физиологическим условиям, которые планировалось поддерживать в устройстве. Вычисления состояли из дискретизации зависящих от времени уравнений Навье-Стокса и решении их на расчетной сетке. Результаты расчетов сохранялись в виде значений основных параметров (скорость потока, давление и т.д.) в ячейках сетки и могли быть представлены в виде объемных диаграмм или линейных графиков, сечений или отдельных значений.

Приготовление образцов подложек с последующей модификацией поверхности.

Для оценки степени адгезии клеток к различным подложкам были приготовлены образцы из следующих материалов:

- 1) PDMS

- 2) PDMS, обработанный плазмой
- 3) PDMS, обработанный коллагеном
- 4) PDMS, обработанный плазмой и коллагеном
- 5) Покровное стекло
- 6) Покровное стекло, обработанное плазмой
- 7) Покровное стекло, обработанное коллагеном
- 8) Покровное стекло, обработанное плазмой и коллагеном
- 9) MS-1002
- 10) MS-1002, обработанный плазмой
- 11) MS-1002, обработанный коллагеном
- 12) MS-1002, обработанный плазмой и коллагеном
- 13) Полистирол
- 14) Полистирол, обработанный коллагеном

Образцы полимеров представляли собой круглые пластины диаметром 16 мм, вырезанные из предварительно изготовленной мембраны. Для изготовления полимерной мембраны были использованы коммерческие наборы Dow Corning Sylgard 184 Silicone Elastomer и MS-1002 (Dow Corning, США), каждый из которых состоял из двух частей – основы и отвердителя, тщательно смешиваемых в пропорции 10:1 и отверждаемые при температуре 80°C в течение 2 часов. Стеклянные образцы представляли собой покровные стекла размерами 24 x 24 x 0,17 мм.

Обработка образцов **2, 4, 6, 8, 10** и **12** плазмой кислорода проводилась с помощью плазменного очистителя поверхности Diener electronic GmbH + Co. KG при давлении в 3-5 мм рт. ст. в течение 5 минут, после чего обработка продолжалась еще 10 минут при давлении 2 мм. рт. ст. После этого все образцы, включая те, которые не были подвергнуты плазменной обработке, помещали в лунки 12-луночного культурального планшета и стерилизовали УФ облучением в течение 30 минут.

В лунки с образцами **3, 4, 7, 8, 11, 12** и **14** вносили 0,01% раствор коллагена I типа с содержанием 0,01 М уксусной кислоты и инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов, после чего лунки были отмыты фосфатно-солевым буфером (PBS).

После всех обработок клеточную суспензию EA.hy 926 в концентрации 100 тыс. клеток/мл разносили по лункам культурального планшета, содержащих исследуемые образцы. Планшеты помещали в инкубатор на два часа во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ при 37°C. После инкубации пробы фиксировали 1% раствором параформальдегида в PBS.

Оценка степени адгезии клеток к субстрату методом оптической конфокальной микроскопии.

Для оценки площадей, занимаемых клетками на субстратах, было применено тотальное мечение их белков FITC. Образцы с клетками после фиксации отмывали 2 раза PBS, и вносили в каждую лунку 12-луночного планшета по 1 мл буфера и 10 мкл раствора FITC до конечной концентрации 1 мкг/мл, после чего инкубировали 10 мин. После инкубации образцы отмывали 2 раза PBS и делали микрофотосъемку с использованием конфокальной микроскопии на микроскопе EclipseTE с контроллером C1 с лазером 488 нм и ФЭУ-детектором 515/30 нм (Nikon, Япония).

На полученных на конфокальном микроскопе изображениях окрашенных клеток выделяли объекты методом пороговой фильтрации. Затем были посчитаны площади объектов, соответствующих адгезировавших клеток. Для сравнения площадей, занятых адгезировавшими клетками, на поверхностях на основе разных материалов использовались такие виды статистической обработки данных как медианный тест и критерий Краскела-Уоллиса с поправками на множественное сравнение.

Оценка степени адгезии клеток к субстрату методом зондовой микроскопии.

Для исследования методом ион-проводящей микроскопии были дополнительно проанализированы образцы **3, 5 и 7**, показавшие наилучшую адгезию клеток при исследовании на оптическом микроскопе.

В качестве основы образцов для зондовой микроскопии были взяты тонкие (около 1 мм) пластины PDMS отлитые на гладкой поверхности чашки Петри. Пластины помещали в чашки Петри диаметром 60 мм гладкой стороной вверх. На пластину клали круглое покровное стекло диаметром 16 мм. Пластины и стекло выдерживали в 0,01% растворе

коллагена I типа с содержанием 0,01 М уксусной кислоты в течение 2 часов, а затем тщательно промывали PBS. Рядом с первым стеклом помещали второе, и весь образец стерилизовали под УФ облучением в течение 15 минут. Таким образом получался образец, содержащий все три типа поверхности, выбранных для исследования.

Адгезия клеток происходила из суспензии, содержащей 300 тыс. клеток EA.hy 926 в течение 2 часов в культуральном инкубаторе при 37 °C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂. Затем образцы с клетками фиксировали 1% раствором параформальдегида в PBS, тщательно промывали и заливали PBS. Исследование проводили на сканирующем ион-проводящем микроскопе (ICAPPIC, Великобритания) размещённом на оптическом микроскопе Eclipse Ti (Nikon, Япония) на базе ЦКП МИСиС.

Полученные значения анализировали с использованием медианного теста и теста Краскела-Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для статистического анализа использовался программное обеспечение STATISTICA (StatSoft Inc., США).

Изготовление матрицы с помощью фрезерования из оргстекла (PMMA).

По спроектированным в AutoCAD трехмерным моделям чипов создавали модели матриц, которые затем были переведены в управляющую программу для фрезерного станка. В качестве материала для изготовления матрицы был выбран PMMA. Матрицы были изготовлены на вертикальном обрабатывающем фрезерном центре с ЧПУ. При изготовлении матриц методом фрезерования важное значение имеет качество получаемой обработанной поверхности. Для уменьшения шероховатости поверхности и устранения мелких дефектов, изготовленную матрицу выдерживали в парах растворителя в течение ночи.

Изготовление микрофлюидного устройства методом мягкой литографии.

Полимерная основа была приготовлена с использованием коммерческого набора Dow Corning Sylgard 184 Silicone Elastomer в тех же пропорциях, из которых ранее были изготовлены образцы для анализа.

После тщательного перемешивания полученной смесью основы и сшивателя заполняли пресс-форму (матрицу). После заливки формы перед отвердеванием полимера проводилась его дегазация с использованием плазменного очистителя поверхности Diener electronic GmbH + Co. KG при пониженном давлении в 100 мм рт. ст. в течение 10-15 минут.

Дальнейшая реакция полимеризации протекала в течение 2 часов при температуре 80°C. Полученная PDMS-основа имела равномерную толщину 5 мм по всей своей поверхности, что важно для равномерного обогрева устройства при соединении его с системой для культивирования клеток.

Для соединения полимерной основы со стеклянной подложкой так же был использован плазменный очиститель поверхности Diener electronic GmbH + Co. KG. Перед обработкой поверхности плазмой кислорода проводилось обеспыливание каналов в полимерной основе под контролем микроскопии. Покровные стекла, используемые в качестве подложки, обрабатывались 96% водным раствором этилового спирта для обезжиривания и очистки поверхности от механических включений. Основа и подложка обрабатывались плазмой кислорода при давлении в 3-5 мм рт. ст. в течение 5 минут, после чего обработка продолжалась еще 10 минут при давлении 2 мм. рт. ст.

После сшивки стекла и полимерной пластины в устройство монтировались полые трубки Tygon S-54-HL из поливинилхлорида двух различных диаметров для последующего монтажа с системой шприцев и насосов. Для присоединения новых трубок в устройстве в местах вводов проделывались отверстия с помощью пробойника, представляющего собой полую металлическую иглу, закреплённую на станине для вертикального перемещения. В зависимости от размера трубок применяли иглы разного диаметра. В подготовленные отверстия устанавливали трубки соответствующего диаметра, а в боковой паз чипа устанавливали термодатчик. Места контакта дополнительно герметизировали PDMS. Герметичность полученной конструкции тестировали путем прокачки через нее деионизированной воды.

Сборка и подготовка микрофлюидной установки для культивирования клеток.

После сборки готовое микрофлюидное устройство подключали к замкнутой проточной системе на основе прецизионной дозирующей системы Nemesys (Cetoni,

Швейцария). Данная система обеспечивала практически безимпульсную подачу жидкости, благодаря использованию сервомоторов и ПИД-регулирования с обратной связью для определения положения и скорости подачи. Чип соединялся с помощью трубок с системой дозирующих инжекторных (шприцевых) модулей 5 и 10 мл и выходными шприцами для загрузки клеточной суспензии.

Подготовка собранной конструкции к культивированию клеток состояла из нескольких этапов.

1. Промывка системы деионизированной водой в течение 30 минут (очистка от механических загрязнений).

2. Промывка 70% водным раствором этанола в течение 20 минут (стерилизация внутренних поверхностей, шприцев, трубок и камер для культивирования).

3. Промывка стерильной деионизированной водой в течение 30 минут.

4. Промывка и инкубация системы в растворе коллагена I типа с содержанием 0,01 М уксусной кислоты в течение 2 часов.

5. Промывка и инкубация с полной питательной средой для дополнительного осаждения бексов на поверхности каналов.

Для предотвращения микробной контаминации вся система была помещена в стерильный ламинарный шкаф. Заполнение внешних шприцов так же производилось в стерильном ламинарном шкафу

После каждого цикла проведения эксперимента осуществлялась стерилизация внутреннего пространства в ламинарном шкафу УФ-облучением и тщательная промывка системы детергирующими растворами для дополнительной очистки от продуктов жизнедеятельности клеток, предотвращения контаминации и более тщательной подготовки системы к последующему использованию. В отсутствие использования системы для проведения экспериментов над живыми клетками, она хранилась полностью заполненной 70% водным раствором этанола.

3.4.2. Изучение адаптации эндотелиальных клеток к динамическому воздействию, создаваемому потоком в микрофлюидной системе.

Субкультивирование клеток EA.Hy926.

Для культивирования клеток EA.Hy926 использовали питательную среду Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), содержащую растворённую в очищенной воде смесь неорганических солей и фенолового красного с дополнительным добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамина, 1% раствора заменимых аминокислот NEAA и 2% добавки к среде НАТ (жидкая смесь гипоксантина натрия (5 мМ), аминоптерина (20 мкМ) и тимидина (0,8 мМ)). Культивирование проходило в культуральном инкубаторе при 37°C в 5% CO₂/95% воздушной атмосфере. Субкультивирование проводили в 75 см² пластиковых культуральных сосудах (матрасах) по достижении конfluence. После этого клеточный монослой открепляли от поверхности культурального сосуда под действием раствора трипсина (0,25%) в ЭДТА (0,53 мМоль) в течение 3 минут, осаждали центрифугированием на скорости 200g в течение 5-10 минут, ресуспендировали в малом объеме надосадочной жидкости и проводили подсчет и анализ жизнеспособности клеток на автоматическом счётчике клеток. После подсчета суспензию разводили питательной средой до плотности 5x10⁴ клеток/мл и помещали в новые матрасы объемом 75 см². Субкультивирование проводили каждые 2-3 дня.

Для обновления культуры производилась ее криоконсервация. Для этого клетки в концентрации 10⁶ клеток/мл помещали в среду для заморозки, содержащую 95% FBS в 5% диметилсульфоксиде (ДМСО). Далее ампулы с суспензией клеток охлаждали в течение 24-48 часов при -80°C, после чего переносили в жидкий азот (-195,8°C).

При культивировании клеток в микрофлюидном чипе без обогащения атмосферы углекислым газом в среду дополнительно добавляли 50 ммоль буферного раствора HEPES с конечным содержанием 20 мМ для поддержания необходимого уровня pH и препятствия закисления среды в процессе жизнедеятельности клеток.

Оценка жизнеспособности клеток методом исключения красителя (трипановый синий).

Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего, структурная формула которого изображена на рисунке 59.

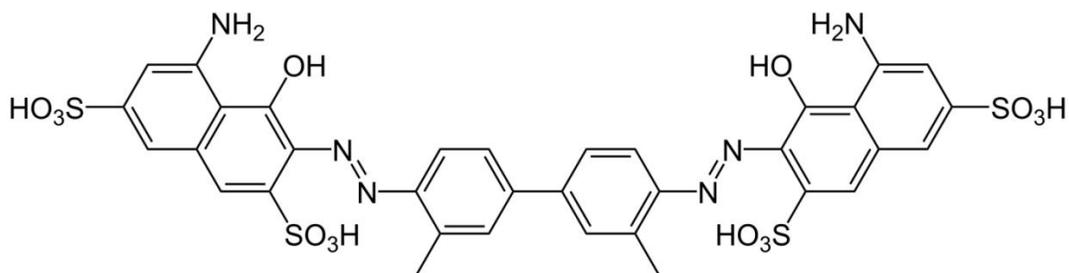


Рисунок 59 – Структурная формула трипанового синего

Аликвоту суспензии объемом 15 мкл от каждого образца смешивали с равным объемом 0,4% раствора трипанового синего и помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на автоматическом счётчике клеток Countess™ («Invitrogen», США). Каждый исследуемый образец клеток был подсчитан в повторе.

Культивирование клеток в микрофлюидной системе.

Для загрузки в микрофлюидную систему была приготовлена клеточная суспензия 2-3 млн. клеток в 1 мл питательной среды с добавлением HEPES-буфера. Изначально большая концентрация обусловлена последующим разбавлением при прокачке через проточную камеру. Полученная суспензия загружалась в систему с помощью внешнего инсулинового шприца объемом 1 мл. Ручная загрузка клеточной суспензии сокращала расход реагентов, предотвращала избыточную адгезию клеток в трубках и клапанах и позволяла более плавно и равномерно контролировать загрузку.

После заполнения внутреннего пространства камеры клеточной суспензией в течение 15 минут поддерживались статические условия, позволяющие клеткам сидиментировать и начать адгезировать к поверхности. После загрузки клеточной суспензии и адгезии клеток к поверхности в устройстве поддерживался непрерывный поток среды со скоростью 1 мкл/мин для удаления отходов и подачи питания к клеткам, и сохранялась постоянная

физиологическая температура 37°C. Постоянное поддержание необходимой температуры проводилось при помощи термоэлектрического модуля с контроллером и элементом Пельтье по принципу обратной связи по температуре. Для поддержания температуры в заданном диапазоне был использован ПИД-регулятор.

Контроль над работой установки осуществлялся с помощью компьютерных программ, а также визуально с помощью инвертированной микроскопии в проходящем свете. С учетом длительности экспериментов с клетками, был апробирован и в настоящее время активно используется удаленный мониторинг и управление параметрами системы через сеть Интернет.

Инкубация клеток происходила в течение интервала времени от нескольких часов до 4 суток в зависимости от плотности первоначального посева и времени достижения клетками конfluence.

Анализ диффузии флуоресцеинизотиоцианата и пропидий йодида через поверхность клеточных мембран.

Для исследования влияния сдвиговой деформации на проницаемость клеточных мембран осуществлялась инкубация уже прикрепленных к поверхности клеток в микрофлюидном устройстве флуоресцентными красителями при постоянной подаче среды со скоростью 200 мкл/мин. В качестве зондов были выбраны флуоресцеинизотиоцианат и пропидий йодид.

Клетки обрабатывались флуоресцентным зондом в разведении 1 мкг в 1 мл среды течение 15 минут. После инкубации со средой, содержащей зонд, для уменьшения фона флуоресценции при визуализации полученного результата с помощью конфокальной микроскопии клетки отмывались в течение 1 часа фосфатно-солевым буфером при той же скорости потока.

Контролем служили клетки, инкубируемые в той же концентрации, временном диапазоне и составе среды, но в статическом режиме в чашке Петри.

Визуализацию полученных результатов проводили при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon Eclipse TE 2000-и с использованием программного обеспечения EZ версии 2.3.

Анализ влияния сдвиговой деформации, создаваемой в микрофлюидной системе, на экспрессию GRP78 и ФВ методом непрямой иммунофлуоресценции.

Для исследования влияния сдвиговой деформации, создаваемой в естественных условиях током крови по сосудам на адгезию клеток, регуляцию системы гомеостаза и экспрессию шаперонов осуществлялась инкубация уже адгезированных к поверхности клеток в микрофлюидном устройстве при постоянной подаче среды со скоростью, близкой к физиологическим значениям скорости крови в сосудах сопоставимого диаметра и составляющую 400 мкл/мин в течение 6 или 12 часов.

Анализ уровня экспрессии GRP78 и фактора Виллебранда проводили с использованием метода непрямой иммунофлуоресценции.

В процессе эксперимента были использованы 2 режима подачи ростовой среды:

1) с низкой скоростью 1 мкл/мин в течение 24 часов с последующей фиксацией клеток (статический контроль);

2) с низкой скоростью 1 мкл/мин в течение 12 часов, затем со скоростью 400 мкл/мин в течение 6 или 12 часов с последующей фиксацией клеток.

После инкубации в микрофлюидном устройстве клетки фиксировали в течение 15 минут 4% раствором параформальдегидов, пермеабилizировали в течение 15 минут 0,5% раствором Тритон Х-100 и блокировали в течение 40 минут 4% раствором BSA (бычьим сывороточным альбумином).

При этом в системе сохранялась постоянная температура 37°C.

При анализе внеклеточной фракции только ФВ пермеабилizацию не проводили. Инкубацию с раствором первичных антител к GRP78 (Abcam, Великобритания) и/или к фактору фон Виллебранда (Abcam, Великобритания) проводили в течение ночи при температуре +4 °С. После этого устройство активно промывали буферным раствором и инкубировали с соответствующими вторичными флуоресцентно-мечеными (FITC, родамин) антителами (KPL, США) в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре.

Визуализацию конечных результатов анализа проводили после тщательной промывки системы фосфатно-солевым буферным раствором при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon Eclipse TE 2000-и.

Полученные конфокальные изображения в 16-битном TIFF-формате были обработаны в программном обеспечении Image Pro. Сегментация изображений осуществлялась путём применения пороговой фильтрации по интенсивности, а затем макроса для подсчета объектов. Объекты, представляющие собой клетки и фрагменты клеток, сортировали по площади и отбрасывали те из них, которые не превышали порогового значения. Анализ на колокализации. проводили в программном обеспечении конфокального микроскопа.

Спектрофлуориметрический анализ влияния сдвиговой деформации на продукцию клетками мочнооксида азота NO методом непрямо́й детекции.

Принцип непрямого детектирования NO основан на взаимодействии зонда 4,5-диаминофлуоресцеина DAF-2 с продуктом окисления NO – оксидом азота (III), образующегося в ходе быстро протекающей реакции между неокисленным NO и уже окисленным NO до оксида азота (IV) NO₂, при этом стехиометрическое соотношение между DAF-2 и NO составляет 1:2. Продуктом данной реакции является высокофлуоресцирующее соединение – триазол DAF-2T, квантовый выход которого превышает DAF-2 в 180 раз.

Для определения изменений в уровне продукции оксида азота NO в статических условиях, клетки EA.Hy926, предварительно за 24 ч до эксперимента заседали в 12-луночный планшет, добавляли растворенный в ДМСО форболовый эфир PMA до конечных концентраций 0-20 нМ и инкубировали 18 ч.

Для индукции высвобождения NO в среду добавляли 1 мкМ кальциевого ионофора A23187 и инкубировали в течение 30 минут. После инкубации проводили смену среды на DMEM без фенолового красного (FluoroBrite, Termo Fisher Scientific) с 10% FBS, 100 мкМ L-аргинина, 1 мкМ зонда DAF-2 и инкубировали 2ч, после чего среду собирали и анализировали на спектрофлуориметре Horiba Fluoromax-4 с использованием микрокюветы объемом 130 мкл. Отдельно учитывалось содержание 1.8 мМ ионов кальция в среде FluoroBrite.

Для регистрации флуоресценции использовали режим автоматизированного измерения с последовательным снятием спектров на длинах волн возбуждения 495 и 485 нм, что соответствует максимуму возбуждения DAF-2T – продукта взаимодействия зонда

DAF-2 с оксидом азота (III) – и собственно зонда DAF-2 соответственно. Значение интенсивности эмиссии флуоресценции DAF-2T при 515 нм корректировали, таким образом, на фоновую флуоресценцию DAF-2 при 538 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты и выводы диссертационной работы:

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barea J.S., Lee J., Kang D.K. Recent Advances in Droplet-based Microfluidic Technologies for Biochemistry and Molecular Biology. // *Micromachines*. – 2019. – Vol. 10(6). – p. 412.
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*. – 2020. – № 9 (55). – с. 91-105.
3. Leygeber M., Lindemann D., Sachs C.C., Kaganovitch E., Wiechert W., Nöh K., Kohlheyer D. Analyzing Microbial Population Heterogeneity – Expanding the Toolbox of Microfluidic Single-Cell Cultivations. // *Journal of Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 431 (23). – pp. 4569-4588.
4. Scheler O., Postek W., Garstecki P. Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 55. – pp. 60-67
5. Primiceri E., Chiriac M. S., Rinaldi R., Maruccio G. Cell chips as new tools for cell biology – results, perspectives and opportunities. // *Lab on a Chip*. – 2013. – Vol. 13 (19). – pp. 1-14.
6. Рубцов Н.Б., Попик В.М., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Микрофлюидные устройства в биологии и конструирование биосенсоров. // *Новосибирск*. – 2004. – Vol. 4 – с. 84-87
7. Riordon J., Sovilj D., Sanner S., Sinton D., Young E.W.K. Deep Learning with Microfluidics for Biotechnology. // *Trends in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 37 (3). – pp. 310-324.
8. Erickson D., Li D. Integrated microfluidic devices. // *Analytica Chimica Acta*. – 2004. – Vol.507. – pp. 11-26.
9. Niraj K. Inamdar, Jeffrey T. Borenstein. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2011. – Vol. 22 – pp. 681-689
10. Qian F., Morse D.E. Miniaturizing microbial fuel cells. // *Trends in Biotechnology*. – 2011. – Vol.29 (2). – pp. 61-69.

11. Primiceri E., Chiriaco M.S., Rinaldi R., Maruccio G. Cell chips as new tools for cell biology – results, perspectives and opportunities. // *Lab on a Chip*. – 2013. – Vol. 13 (9). – pp. 3789-3802
12. Lisowski P., Zarzycki P.K. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (IPADs) and Micro Total Analysis Systems (ITAS): Development, Applications and Future Trends. // *Chromatographia*. – 2013. – Vol. 76. – pp. 1201-1214
13. Webster A., Greenman J., Haswella S.J. Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. // *Chem Technol Biotechnol*. – 2011. – Vol. 86. – pp. 10–17
14. Young E.W, Beebe D.J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39 (3). – pp. 1036-1048
15. Кухтевич И.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Евстрапов А.А. Микрофлюидные чипы для исследования биологических объектов методами микроскопии высокого разрешения. // *Научно-технический вестник Санкт-Петербургского государственного университета информационных технологий, механики и оптики*. – 2011. – № 1 (77). – с. 111-115
16. Oliveira A., Pessoa A., Bastos R., Lucimara T. Microfluidic tools toward industrial biotechnology. // *Biotechnology Progress*. – 2016. – Vol. 32 (6). – pp. 1372-1389
17. Bjork S.M, Joensso H.N. Microfluidics for cell factory and bioprocess development. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 55. – pp. 95-102
18. Krujatz F., Lode A., Seide J., Bley T., Gelinsky M., Steingroewer J. Additive Biotech – Chances, challenges, and recent applications of additive manufacturing technologies in biotechnology. // *New Biotechnology*. – 2017. – Vol. 39. – pp. 222-231
19. Köhler J.M., Henkel T. Chip devices for miniaturized biotechnology. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 69. – pp. 113-125
20. Winkler S., Grünberger A., Bahnemann J. Microfluidics in Biotechnology: Quo Vadis. // *Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 179. – pp. 355-380
21. Hengoju S., Tovar M., Man D.K.W., Buchheim S., Rosenbaum M.A. Droplet Microfluidics for Microbial Biotechnology. // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2022. – Vol. 179. – pp. 129-157
22. Kaminski T.S., Scheler O., Garstecki P. Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. // *Lab on a Chip*. – 2016. – Vol. 16 (12). – pp. 2168-2187

23. Bourguignon N., Karp P., Attallah C., Chamorro D.A., Oggero M., Booth R., Ferrero S., Bhansali S., Pérez M.S., Helguera B.L.G. Large Area Microfluidic Bioreactor for Production of Recombinant Protein. // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12 (7). – pp. 526-544
24. Juang Y.J., Chang J.S. Applications of microfluidics in microalgae biotechnology: A review. // *Biotechnology Journal*. – 2016. – Vol. 11. – pp. 327-335
25. Zeng W., Guo L., Xu S., Chen J., Zhou J. High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. // *Trends in Biotechnology*. – 2020. – Vol. 38 (8). – pp. 888-906
26. Буляница А.Л., Посмитная Я.С., Рудницкая Г.Е., Лукашенко Т.А., Цымбалов А.И., Евстрапов А.А. Стекланно-полимерные микрофлюидные чипы для электрофоретического разделения биомолекул. // *Научное приборостроение*. – 2014. – № 4 (24). – с. 67-76.
27. Walsh D.I., Kong D.S., Murthy S.K., Carr P.A. Enabling Microfluidics: From Clean Rooms to Makerspaces. // *Trends in Biotechnology*. – 2017. – Vol. 35 (5). – pp. 383-392
28. Edmond W. K. Young. Advances in Microfluidic Cell Culture Systems for Studying Angiogenesis. // *Journal of Laboratory Automation*. – 2013. – Vol. 18 (6) – p. 427-437
29. Felix Kurth, Klaus Eyer, Alfredo Franco-Obrego, Petra S. Dittrich. A new mechanobiological era: microfluidic pathways to apply and sense forces at the cellular level. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2012. – Vol. 16 – pp. 400-408
30. Johana Kuncová-Kallio, Pasi J. Kallio. PDMS and its Suitability for Analytical Microfluidic Devices. // *Proceedings of the 28th Annual International Conference, New York City, USA*. – 2006.
31. David R. Myers, Wilbur A. Lam. Vascularized Microfluidics and Their Untapped Potential for Discovery in Diseases of the Microvasculature. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2021. – Vol. 23 – p. 407-432
32. Kyle A. Di Vito, Michael A. Daniele, Steven A. Roberts, Frances S. Ligler, André A. Adams. Microfabricated blood vessels undergo neoangiogenesis. // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 138 – pp. 142-152
33. Hoganson David M., Howard I. Pryor, Ira D. Spool, Owen H. Burns, J. Randall Gilmore, Joseph P. Vacanti. Principles of Biomimetic Vascular Network Design Applied to a Tissue-Engineered Liver Scaffold. // *Tissue Engineering: Part A*. – 2010. – Vol. 16 (5) – pp. 1479-1468

34. Lubashevsky I.A., Gafiychuk V.V. Analysis of the optimality principles responsible for vascular network architectonics. // Institute of Applied Problems of Mechanics and Mathematics National Academy of Sciences of Ukraine. – 2008
35. Larry J. Millet and Martha U. Gillette. Over a century of neuron culture: From the Hanging drop to Microfluidic devices. // Yale Journal of biology and medicine. – 2012. –Vol. 85 – pp. 501-521
36. Robert W. Barber and David R. Emerson. Biomimetic Design of Artificial Micro vasculatures for Tissue Engineering.// Supplement. – 2010. – Vol. 1 – pp. 67-79
37. Bell G.I., Dembo M., Bongrand P. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding.// Biophysical journal. – 1984. – Vol. 45 (6). – pp. 1051-1064.
38. Emerson D.R., Krzysztof C., Xiaojun G., Robert W. Barber. Biomimetic design of microfluidic manifolds based on a generalized Murray's law. // Lab on a Chip. – 2006. – Vol. 6 – pp. 446-454
39. Colin G. Caro, Kim H. Parker and Denis J. Doorly. Essentials of blood flow. // Perfusion. – 1995. – Vol. 10 – pp. 131-133
40. Anastasiou A.D., Spyrogianni A.S., Koskinas K.C., Giannoglou G.D., Paras S.V. Experimental investigation of the flow of a blood analogue fluid in a replica of a bifurcated small artery. // Medical Engineering & Physics. – 2012. – Vol. 34. – pp. 211-218
41. Krüger-Genge A., Block A., Franke R., Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20. – pp. 4411-4433
42. Van Bavel E. Effects of shear stress on endothelial cells: Possible relevance for ultrasound applications. // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2007. – Vol. 93. – pp. 374-383.
43. Fanche I.S., Levitan I. Endothelial inwardly-rectifying K⁺ channels as a key component of shear stress-induced mechanotransduction. // Current Topics in Membranes. – 2020. – Vol. 85. – pp. 59-88
44. Mano R. M., Shakti G., Julie Yi-Shuan Li, Nassim E.A., Zhen B.C., John Y., Shu C., Shankar S.. Longitudinal shear stress response in human endothelial cells to atheroprone and atheroprotective conditions. // PNAS. – 2021. – Vol. 118 (4). – pp. 1-8.

45. Deshun L., Ghassan S. K. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. // *J. R. Soc. Interface.* – 2011. – Vol. 8. – pp. 1379-1380
46. Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. // *Acta Physiol.* – 2017. – Vol. 219 (2). – pp. 382-408.
47. Bertani F., Francesco D.D., Corrado M. D., Talmon M., Fresu L.G., Boccafoschi F. Paracrine Shear-Stress-Dependent Signaling from Endothelial Cells Affects Downstream Endothelial Function and Inflammation. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – pp. 1-24.
48. Ando J., Yamamoto K. Effects of Shear Stress and Stretch on Endothelial Function. // *Antioxidants&Redox Signaling.* – 2011. – Vol. 15. – pp. 1389-1404
49. Tkachenko E., Gutierrez E., Semion K. Saikin, Per Fogelstrand, Chungo Kim, Alex Groisman, Mark H. Ginsberg. The nucleus of endothelial cell as a sensor of blood flow direction. // *Biology Open.* – 2013. – Vol. 2. – pp. 1007-1012
50. Tennant M., Geachie J. K. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. // *Aust. Surg.* – 1990. – Vol.60 (10). – pp. 747-753.
51. Coenen D.M., Mastenbroek T.G., Cosemans J. Platelet interaction with activated endothelium – mechanistic insights from microfluidics. // *Blood First Edition Paper.* – 2017. – Vol.130 (26). – pp. 819-2828.
52. Sudong Kim, Hyung Joon Kimz and Noo Li Jeon. Biological applications of microfluidic gradient devices. // *Integrative Biology.* – 2010. – Vol. 2 – pp. 584-603
53. Keith H.K.Wong, Juliana M. Chan, Roger D. Kamm and Joe Tien. Microfluidic Models of Vascular Functions.// *The Annual Review of Biomedical Engineering.* – 2012. – Vol. 14 – pp. 205-230
54. Chia-Wen Chang, Yung-Ju Cheng, Melissa Tu, Ying-Hua Chen, Chien-Chung Peng, Wei-Hao Liao and Yi-Chung Tung. A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies.// *Lab on a Chip.* – 2014. – Vol. 14 – pp. 3762-3772
55. Jyoti Wala, Debashis Maji, Soumen Das. Influence of physico-mechanical properties of elastomeric material for different cell growth. // *IOPscience.* – 2017. – pp. 1-29
56. Lily Kim, Yi-Chin Toh, Joel Voldman and Henry Yu. A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian Cells. // *Lab Chip.* – 2007. – Vol. 7 – pp. 681-694

57. Lin Wang, Bing Sun, Katherine S. Ziemer, Gilda A. Barabino, Rebecca L. Carrier. Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco-2 cells. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2009. – pp. 1260-1271
58. Ismail Emre Araci and Philip Brisk. Recent developments in microfluidic large scale integration. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – Vol. 25 – pp. 60-68
59. SYLGARD (R) 184 SILICONE ELASTOMER KIT. BASE information. Официальный сайт компании Dow Corning Corporation. URL: <http://www.dowcorning.com/DataFiles/0902770180655d5b.html> (дата обращения 14.11.2018)
60. Lautens M., Rovis.T. Hayashi, T. *Comprehensive Asymmetric Catalysis*. // Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.– 1999. – Vol. 3. – p. 173
61. Zuchowska A., Kwiatkowski P., Jastrzebska E., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z. Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly(dimethylsiloxane) surface modified by proteins.// *Electrophoresis*. – 2016. – Vol. 37. – pp. 536-544
62. 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.
63. Khalili A.A., Ahmad M.R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2015. – Vol.16 (8). – pp. 18149-18184.
64. Donghao R.Lu, Kinam P. Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1991. – Vol.144 (1). – pp. 271-281.
65. Wei-Chih Lin, Nur Adila Mohd Razali. Temporary Wettability Tuning of PCL/PDMS Micro Pattern Using the Plasma Treatments.// *Materials*. – 2019. – Vol. 12. – p. 644
66. Streuli C.H. Integrins and cell-fate determination. // *J.Cell.Sci*. – 2008. – Vol. 122 (2). – pp. 171-177.
67. Dmitry A. Markov, Elizabeth M. Lillie, Shawn P. Garbett , Lisa J. McCawley. Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions. // *Biomed Microdevices*. – 2014. – Vol.16 (1). – pp. 91-96

68. Jeong Wong and Chih-Ming Ho. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. // *Microfluid Nanofluidics*. – 2009. – Vol. 7 (3) – pp. 291-306

69. Weiqiang Chen, Raymond H. W. Lam and Jianping Fua. Photolithographic surface micromachining of polydimethylsiloxane (PDMS). // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12 (2) – pp. 391–395

70. PDMS. Научно-исследовательский портал Intelligent Materials and Systems Laboratory. URL: http://www.ims.ut.ee/~alar/microtech/Ch1_5/ (дата обращения 14.11.2018)

71. Pintoa S., Alves P., Matos C.M., Santos A.C., Rodrigues L.R., Teixeirac J.A. Poly(dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma to improve its characteristics towards biomedical applications. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – Vol (81). – pp. 20-26

72. Mukhopadhyay S., Roy S.S., Raechelle A. D., Mathur A., Holmes R.J., McLaughlin J.A. Nanoscale surface modifications to Control capillary flow characteristics in PMMA microfluidic devices. // *Nanoscale Research Letters*. – 2011. – Vol. 6 (1) – pp. 411-423

73. Lampin M., Warocquier-Clerout R., Legris C., Degrange M., Sigot-Luizard M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. // *J. Biomed. Mater. Res*. – 2007. – Vol. 36 (1). – pp. 99-108

74. Menon N.V., Chuah Y.J., Phey S., Zhang Y., Wu Y., Chan V., Kang Y. A microfluidic assay to study the combinatorial impact of substrate properties on mesenchymal stem cell migration. // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7 (31). – pp. 1-37

75. Tusan C. G., Man Yu-Hin, Zarkoob H., Johnston D.A., Andriotis O.G., Thurner P.J., Yang S., Sander E.A., Gentleman E., Sengers B.G., Evans N.D. Collective cell behaviour in mechanosensing of substrate thickness. // *Biophys J*. – 2018. – Vol. 114 (11). – pp. 2743-2755

76. Jing Xie, Demao Zhang, Chenchen Zhou, Quan Yuan, Ling Ye, Xuedong Zhou. Substrate elasticity regulates adipose-derived stromal cell differentiation towards osteogenesis and adipogenesis through β -catenin transduction. // *Acta Biomaterialia*. – 2018. Vol. 79 – pp. 83-95

77. Hassanisaber H., Jafari L., Campeau M.A., Drevelle O., Lauzon M.A., Langelier E., Fauchoux N., Rouleau L. The effect of substrate bulk stiffness on focal and fibrillar adhesion

formation in human abdominal aortic endothelial cells. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2019. – Vol. 98. – pp. 572-583

78. Maurya D.K., Wee Yang Ng, Mahabadi K.A., Liang Y.N. and Rodriguez I. Fabrication of lab-on chip platforms by hot embossing and photopatterning. // *Biotechnology Journal.* – 2007. – Vol. 2 – p. 1381-1388

79. А.Нисан. Микрофлюидные модули: области применения и технологии производства. // *Электроника.* – 2013. – № 5. – с. 182-196

80. Jong H.S., Shuler M.L. Microtechnology for Mimicking In Vivo Tissue Environment. // *Annals of Biomedical Engineering.* – 2012. – Vol. 40 (6) – pp.1289-1300

81. Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J.P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103 (8) – pp. 2480-2487

82. Chang Kyu Byun, Kameel Abi-Samra, Yoon-Kyoung Cho, Shuichi Takayama. Pumps for microfluidic cell culture. // *Electrophoresis.* – 2014. – Vol. 45 – p. 235-24748.

83. Dos-Reis-Delgado A.A., Carmona-Dominguez A, Sosa-Avalos G., Jimenez-Saaib I.H., Villegas-Cantu K.E., Gallo-Villanueva R.C., Perez-Gonzalez V.H. Recent advances and challenges in temperature monitoring and control in microfluidic devices. // *Electrophoresis.* – 2023. – Vol. 44. – pp. 268-297.

84. Rashad S., Han X., Tupin S., Ohta M., Niizuma K., Tominaga T. Epigenetic response of endothelial cells to different wall shear stress magnitudes: A report of new mechano-miRNAs. // *J. Cell. Physiol.* – 2020. – Vol. 235 (11). – pp. 7827-7839.

85. Xiong W., Zhang J. Shear Stress Variation Induced by Red Blood Cell Motion in Microvessel. // *Annals of Biomedical Engineering.* – 2010. – Vol. 38 (8). – pp. 2649-2659

86. Firasat S., Hecker M., Binder L., Asif A.R. Advances in endothelial shear stress proteomics. // *Expert. Rev. Proteomics.* – 2014. – Vol. 11 (5). – pp. 611-619

87. Seep A., Jing A., Ying L., Cheung C., Evelyn K. F. Yim, Yi-Chin Toh. Determination of critical shear stress for maturation of human pluripotent stem cell-derived endothelial cells towards an arterial subtype. // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2019. – Vol.116. – pp. 1164-1175.

88. Zilberman-Rudenko J., Sylman J.L., Garland K.S., Puy C., Wong A.D., Searson P.C., McCarty O.J.T. Utility of microfluidic devices to study the platelet-endothelium interface. // *Platelets*. – 2017. – Vol. 28 (5). – pp. 449-456
89. Maksimenko A.V., Turashev A.D. Endothelial Glycocalyx of Blood Circulation System III. Biological Functions, State under Normal and Pathological Conditions, and Bioengineering Applications. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2014. – Vol. 40 (3). – pp. 237-251
90. Zhuang X., Cross D., Heath V.L., Bicknell R. Shear stress, tip cells and regulators of endothelial migration. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – Vol. 39. – pp. 1571-1575
91. Fleming I., Fisslthaler B., Dixit M., Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118 (18). – pp. 4103-4111.
92. Farah C., Michel L. Y. M., Balligand J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2018. – Vol. 15 (5). – pp. 292-316.
93. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. // *Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol.* – 2010. – Vol. 459 (6). – pp. 793-806
94. Davies P.F., Spaan J.A., Krams R. Shear stress biology of the endothelium. // *Ann. Biomed. Eng.* – 2005. – Vol. 33 (12). – pp. 1714-1718.
95. Balligand J.L., Feron O., Dessy C. eNOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. // *Physiological Reviews*. – 2009. – Vol. 89 (2). – pp. 481-534
96. Davies P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. // *Physiological Reviews*. – 1995. – Vol. 75 (3). – pp. 519-560.
97. García-Cardena G., Comander J., Anderson K.R., Blackman B.R., Gimbrone M.A. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2001. – Vol. 98 (8). – pp. 4478-4485.
98. Han-Mou Tsai. Shear Stress and von Willebrand Factor in Health and Disease. // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2003. – Vol. 29 (5). – pp. 479-488
99. Okhota S., Melnikov I., Avtaeva Y., Kozlov S., Gabbasov Z. Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (20). – p. 7804.

100. Haase K., Kamm R.D. Advances in on-chip vascularization. // *Regen. Med.* – 2017. – Vol. 12 (3). – pp. 285-302
101. Koduru S.V., Leberfinger A.N., Pasic D., Forghani A., Lince S., Hayes D.J., Ozbolat I.T., Ravnic D.J. Cellular Based Strategies for Microvascular Engineering. // *Stem. Cell. Reviews and Reports.* – 2019. – Vol.15. – pp. 218-240
102. Schoeman R.M. , Lehmann M., Neeves K.B. Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders. // *Platelets.* – 2017. – Vol. 28 (5). – pp. 463-471
103. Jain A., Andries D. van der Meer, Papa A.L., Barrile R., Lai A., Schlechter B.L., Otieno M.A., Loudon C.S., Hamilton G.A., Michelson A.D., Frelinger A.L., Ingber D.E. Assessment of whole blood thrombosis in a microfluidic device lined by fixed human endothelium. // *Biomed. Microdevices.* – 2016. – Vol. 18. – pp. 73-81
104. Polacheck W.J., Kutys M.L., Tefft J.B., Chen C.S. Microfabricated blood vessels for modeling the vascular transport barrier. // *Nat. Protoc.* – 2019. – Vol. 14 (5). – pp. 1425-1454
105. Van der Meer A. D., Poot A.A. , Duits M.H.G., Feijen J. and Vermes I. Microfluidic Technology in Vascular Research. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2009.– pp. 1-10
106. Luuk de Haan, Suijker J., Ruthger van Roey, Berges N., Petrova E., Queiroz K., Strijker W., Olivier T., Poeschke O., Garg S., Lenie J. van den Broek. A Microfluidic 3D Endothelium-on-a-Chip Model to Study Transendothelial Migration of T Cells in Health and Disease. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – pp. 8234-8245
107. Jain A., Barrile R., van der Meer A.D., Mammoto A., Mammoto T., Ceunynck K.D., Aisiku O., Otieno M.A., Loudon C.S., Hamilton G.A., Flaumenhaft R., Ingber D.E. A primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics. // *Clin Pharmacol Ther.* – 2018. – Vol. 103 (2). – pp. 332-340
108. Plasma Treatment of PDMS for Microfluidics. Официальный сайт компании Henniker. URL: <https://plasmatreatment.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-treatments/plasma-surface-activation-to-improve-adhesion/plasma-treatment-of-pdms/> (дата обращения: 17.05.2019)

109. Ibrahim M., Doaa H. Abdelmalek, Abdo A. Elfiky. GRP78: A cell's response to stress. // *Life Sciences*. – 2019. – Vol. 226. – pp. 156-163
110. Zhang Lu-Hua and Zhang Xiang. Roles of GRP78 in Physiology and Cancer. // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2010. – Vol. 110. – pp. 1299-1305
111. Zhu G., Lee A.S. Role of the Unfolded Protein Response, GRP78 and GRP94 in Organ Homeostasis. // *J. Cell. Physiol.* – 2015. – Vol. 230 (7). – pp. 1413-1420
112. Kojima H. et al. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70 (13). – pp. 2446-2453.
113. Nakatsubo N. et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: Diaminofluoresceins. // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 427 (2). – pp. 263-266.
114. Leikert J.F., Räthel T.R., Müller C., Vollmar A.M., Dirsch V.M. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 506 (2). – pp. 131-134
115. Поули Дж. Б. Справочник по биологической конфокальной микроскопии. – 3-е изд. – Берлин: Спрингер, 2006.
116. Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J. Scanning ion conductance microscopy of living cells. // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 74 (2). – pp. 653–658
117. Propidium Iodide. Официальный сайт компании Immuno Chemistry Technologies: URL: http://www.immunochemistry.com/sites/default/files/Propidium_Iodide_Product_Datasheet.html (дата обращения: 17.11.2018)
118. FITC. База данных Fluorescent dyes database properties and applications. URL: <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252> (дата обращения: 17.11.2018)
119. Fluoro Tag FITC Conjugation Kit. // Официальный сайт компании Sigma aldrich URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/364/319/fitc1bul.pdf> (дата обращения: 01.07.2018).
120. EA.hy926. // Официальный сайт частного некоммерческого Центра биологических ресурсов ATCC. URL: <https://www.atcc.org/products/crl-2922> (дата обращения: 01.07.2018).