

Экспериментальное изучение миграции моноцитов с помощью разработанного микрожидкостного устройства

© А.А. Рахимов^{1,2}, А.А. Валиев^{1,2}, К.В. Данилко², А.Т. Ахметов¹

¹ Институт механики им. Р.Р. Мавлютова Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

E-mail: ragar83@mail.ru

Поступило в Редакцию 12 мая 2023 г.

В окончательной редакции 19 июня 2023 г.

Принято к публикации 30 октября 2023 г.

Представлены эксперименты, проведенные в микрожидкостном устройстве миграции моноцитов при взаимодействии с хемоаттрактантом — кондиционированной средой жизнедеятельности клеток рака предстательной железы андрогеннезависимой линии PC-3 или андрогензависимой линии LNCaP. Средняя скорость миграции к среде от LNCaP ($\sim 37 \mu\text{m/h}$) оказалась выше, чем к PC-3 ($\sim 12 \mu\text{m/h}$). Количество мигрировавших к кондиционированной среде от LNCaP моноцитов здорового человека выше, чем у пациентов с раком предстательной железы, однако средние скорости миграции моноцитов здоровых и пациентов практически не различались. Разработка миграционных устройств является важным шагом на пути улучшения диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: микрожидкостное устройство, хемоаттрактант, миграция, моноцит, рак предстательной железы.

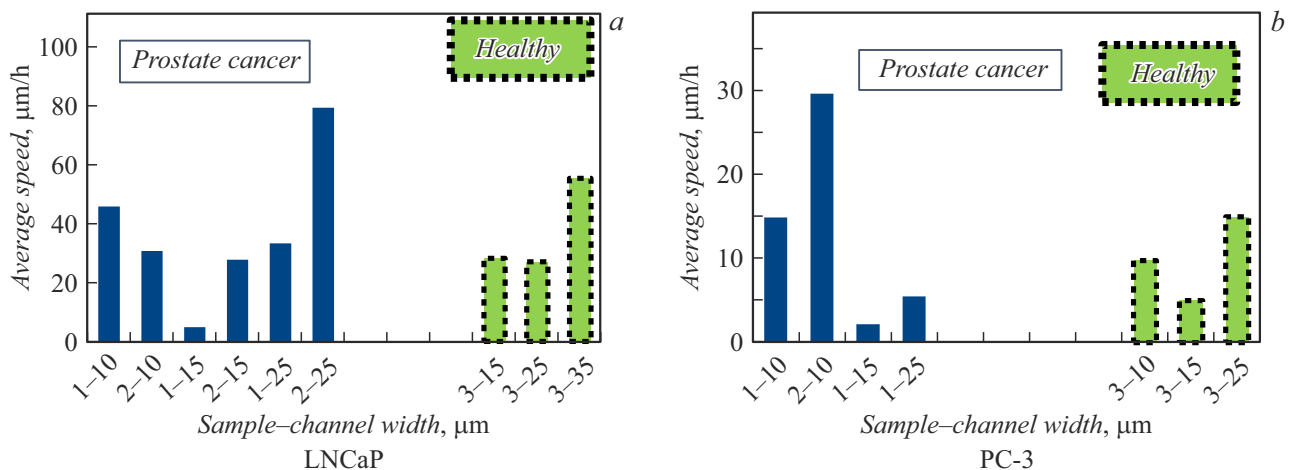
DOI: 10.61011/PJTF.2023.23.56842.73A

Миграция является ключевым свойством живых клеток. Она обеспечивает нормальное развитие организма и иммунный ответ, но и воспалительные процессы, а также метастазирование опухолей. Моноциты — белые кровяные клетки, разновидность лейкоцитов, они поедают проникающие в организм микробы и бактерии и таким образом избавляются от них. Актуальность проблемы оценки миграционного потенциала моноцитов при раке предстательной железы (РПЖ) различной агрессивности в 3D-условиях, моделирующих микроокружение опухоли, связана с распространенностью РПЖ и онкозаболеваний в целом, недостаточной разработанностью малоинвазивных высокоинформативных недорогих и быстрых методов диагностики и прогнозирования онкозаболеваний. Различные микрожидкостные 3D-устройства в настоящее время рассматриваются в качестве удобного, экономичного и эффективного инструмента для создания микромоделей целого органа, изучения механизмов межклеточного взаимодействия на уровне микроокружения опухоли и свойств единичных клеток [1–4].

Микрожидкостные устройства изготовлены с использованием метода мягкой фотолитографии. Прототипом микрожидкостной миграционной камеры (ММК) для изучения миграции клеток являлась микрофлюидная ячейка, описанная в работе [5]. Методика изготовления представленного в работе устройства аналогична описанной в работе [6], а схема миграционной ячейки аналогична приведенной в работе [7]. Она состоит из подводящих жидкость каналов, двух камер („градиентной“ и „накопительной“) высотой $50 \mu\text{m}$, сообщающихся через „миграционные“ каналы высотой $10 \mu\text{m}$ и шириной $10, 15, 25, 35 \mu\text{m}$, и цилиндрических отверстий в

полидиметилсилоксане глубиной 5mm , диаметром 3mm для всех отверстий, кроме выходного, диаметр которого равен 6mm . К градиентной камере ячейки гидростатическим насосом подавались раствор хемоаттрактанта и питательная среда. Особенностью модели (по сравнению с ранее изготовленным устройством [6]) является уменьшение количества подводящих хемоаттрактант и питательную среду каналов до двух шириной $50 \mu\text{m}$ (вместо трех шириной $33 \mu\text{m}$) для уменьшения погрешностей изготовления каналов, влияния пузырьков и вероятности возникновения эффекта динамического запирания. Были добавлены плавные переходы-расширения отверстий, все отверстия-лунки имеют плавное расширение, а место соединения двух подводящих каналов закруглено. В накопительной камере было сделано расширение-емкость, за счет которого скорость падает и клетки там задерживаются.

Проведены эксперименты в ММК с моноцитами здорового человека и пациентов с РПЖ (см. таблицу). В качестве хемоаттрактанта использовали кондиционированную бессывороточную среду X-VIVO с продуктами жизнедеятельности раковых клеток андрогензависимой линии LNCaP или андрогеннезависимой линии PC-3. Для эксперимента были использованы новые ММК, изготовленные не ранее чем за десять суток. Перед началом эксперимента канал обрабатывали УФ-светом в течение 15min . Всю систему помещали на стол инвертированного микроскопа AxioObserver D1 (Carl Zeiss), нагретый до 37°C . Использовали объектив A-Plan $\times 10$, применялся метод фазового контраста. Микрофотосъемка осуществлялась с помощью цифровой камеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением ZEN (Zeiss, Германия). Для регистрации движения клеток проводилась



Средние скорости движения образцов моноцитов в миграционных каналах с кондиционированной средой от клеток LNCaP (a) и PC-3 (b). По оси абсцисс цифрам отмечены образцы моноцитов (см. таблицу) и ширина миграционных каналов (в μm).

покадровая съемка (Time Laps) клеток в течение 20 h с интервалом 5 min. Серия полученных изображений применялась для наблюдения за перемещением клеток в микроканалах.

До начала эксперимента клетки были расположены у входа в миграционные каналы. Неживые клетки полностью распластаются, адгезируют к поверхности стекла. Ядро живой клетки в отличие от мертвых полностью не распластывается. Как известно, шарообразные предметы отражают свет практически во все стороны, поэтому живые моноциты выглядят светящимися на фотоснимках. По наличию свечения живые клетки можно легко отличить от мертвых. В экспериментах среднее содержание живых клеток составляет около 50%. Наибольшее количество мигрировавших клеток (14 клеток) отмечалось в эксперименте с моноцитами здорового донора (образец № 3) и кондиционированной средой клеток линии LNCaP (см. таблицу). Для образцов № 1 и 2 пациентов с РПЖ количество мигрировавших моноцитов оказалось сходным в экспериментах с кондиционированной средой от клеток обеих линий: LNCaP и PC-3 (см. таблицу).

При проведении экспериментов камера раз в 5 min снимала миграционные каналы шириной 10, 15, 25 и 35 μm , и при обработке полученных фотоснимков рассчитывали среднюю скорость только для тех микроканалов, в которых была замечена активная миграция

моноцитов (см. рисунок). При этом среднее значение брали по всем участкам микроканалов одинаковой ширины для всех прошедших через них клеток. Для миграционных каналов сопоставимой ширины 10–35 μm (см. рисунок) не обнаружено влияния ширины микроканала на скорость миграции: клетка моноцита может двигаться как быстрее, чем аналогичная клетка в более широком канале, так и медленнее. В различных участках микроканала моноциты двигались с разной скоростью, зачастую ускоряясь ближе к выходу — месту с наибольшей концентрацией хемоаттрактанта.

Эксперименты в ММК с использованием в качестве хемоаттрактанта среды X-VIVO, кондиционированной клетками линии LNCaP андрогензависимой опухоли, для образцов моноцитов № 1–3 показали (см. рисунок), что средняя скорость движения через каналы различной ширины составила 36.9 $\mu\text{m}/\text{h}$. Скорость движения по направлению к градиентной камере ММК с кондиционированной средой от линии клеток андрогеннезависимой опухоли PC-3 оказалась значительно ниже — 11.7 $\mu\text{m}/\text{h}$. Средние скорости движения клеток пациентов с РПЖ и здоровых лиц по направлению к хемоаттрактантам линии клеток LNCaP практически не различались (36.91 и 36.86 $\mu\text{m}/\text{h}$ соответственно).

При использовании в качестве хемоаттрактанта кондиционированной среды от клеток линии PC-3 оказалось (см. рисунок), что мигрировавшие моноциты пациентов с РПЖ двигались несколько быстрее к градиентной камере (13.1 $\mu\text{m}/\text{h}$), чем моноциты здорового человека (9.9 $\mu\text{m}/\text{h}$).

Полученные результаты показывают, что моноциты двигаются к кондиционированной среде андрогензависимой раковой линии быстрее, чем для андрогеннезависимой линии. У здорового человека моноцитов, реагирующих на угрозу, больше, чем у пациентов с РПЖ, хотя скорости мигрировавших клеток для одной и той же линии практически одинаковы. Наблюдаемые различия могут лечь в основу формирования алгоритма оценки

Количество мигрировавших клеток образцов моноцитов

Номер образца моноцитов (группа)	Кондиционированная среда линии клеток	
	LNCaP	PC-3
1 (РПЖ)	6	6
2 (РПЖ)	6	4
3 (здоровый)	14	7

миграции моноцитов в микроканалах у здоровых лиц и пациентов с РПЖ в зависимости от их клинической характеристики.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00531 (<https://rscf.ru/project/22-25-00531/>).

Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Клетки пациентов с РПЖ и здоровых людей брались с информированного добровольного согласия на проведение клинических и научных исследований. Полученные результаты приведены конфиденциально, без указания личных данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] M.F. Coughlin, R.D. Kamm, *Adv. Healthc. Mater.*, **9** (8), 1901410 (2020). DOI: 10.1002/adhm.201901410
- [2] J. Yu, E. Berthier, A. Craig, T.E. de Groot, S. Sparks, P.N. Ingram, D.F. Jarrard, W. Huang, D.J. Beebe, A.B. Theberge, *Nat. Biomed. Eng.*, **3**, 830 (2019). DOI: 10.1038/s41551-019-0421-4
- [3] M. Urbanska, H.E. Muñoz, J.S. Bagnall, O. Otto, S.R. Manalis, D. Di Carlo, J. Guck, *Nat. Meth.*, **17**, 587 (2020). DOI: 10.1038/s41592-020-0818-8
- [4] И.В. Кухтевич, К.И. Белоусов, А.С. Букатин, В.И. Чубинский-Надеждин, В.Ю. Васильева, Ю.А. Негуляев, А.А. Евстратов, *Письма в ЖТФ*, **42** (9), 71 (2016). [I.V. Kukhtevich, K.I. Belousov, A.S. Bukatin, V.I. Chubinskiy-Nadezhdin, V.Yu. Vasileva, Yu.A. Negulyaev, A.A. Evstrapov, *Tech. Phys. Lett.*, **42** (5), 478 (2016). DOI: 10.1134/S1063785016050102].
- [5] Z. Tong, E.M. Balzer, M.R. Dallas, W. Hung, K.J. Stebe, K. Konstantopoulos, *PLoS ONE*, **7** (1), e29211 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0029211
- [6] А.А. Рахимов, А.Т. Ахметов, А.А. Валиев, К.В. Данилко, С.П. Саметов, Д.Б. Хисматуллин, *Многофазные системы*, **14** (1), 17 (2019). DOI: 10.21662/mfs2019.1.003
- [7] А.А. Рахимов, А.А. Валиев, К.В. Данилко, А.Т. Ахметов, *Медицинский вестник Башкортостана*, **17** (6), 49 (2022). <https://medvestb.elpub.ru/jour/article/view/847/834>