

14

## **Микрофлюидный чип с гидродинамическими ловушками для микроскопических исследований одиночных клеток *in vitro***

© И.В. Кухтевич<sup>1,2</sup>, К.И. Белоусов<sup>1</sup>, А.С. Букатин<sup>2,3</sup>,  
М.В. Дубина<sup>3</sup>, А.А. Евстапов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Университет ИТМО, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский Академический университет —  
научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, Санкт-Петербург  
E-mail: ba@inbox.ru (И.В. Кухтевич)

*Поступило в Редакцию 20 октября 2014 г.*

Приведены результаты работ по созданию микрофлюидного чипа для микроскопических исследований одиночных клеток в условиях *in vitro*. Численное моделирование траекторий движения микрочастиц позволило определить геометрию гидродинамических ловушек, их число, порядок расположения ловушек в реакционной камере. В соответствии с разработанной топологией методом фотолитографии были изготовлены микрофлюидные чипы из фоторезиста SU-8. Испытания микрофлюидных чипов показали их работоспособность при выделении и фиксации клеток миелоидной лейкемии человека K562 из потока пробы и последующем их изучении методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Многие современные биологические методы основаны на исследовании отдельных клеток и уникальных событий, происходящих с каждой из них под влиянием как внешних, так и внутренних факторов. Такой подход обусловлен наличием биологического шума, возникающего в сигнальных путях клеток вследствие того, что при передаче внутренних и межклеточных сигналов участвует малое количество сигнальных молекул [1]. Наиболее распространенной техникой количественного анализа отдельных клеток является проточная цитофлуорометрия, которая обладает высокой производительностью, но не позволяет проводить длительный мониторинг клеточной активности отдельных клеток в зави-

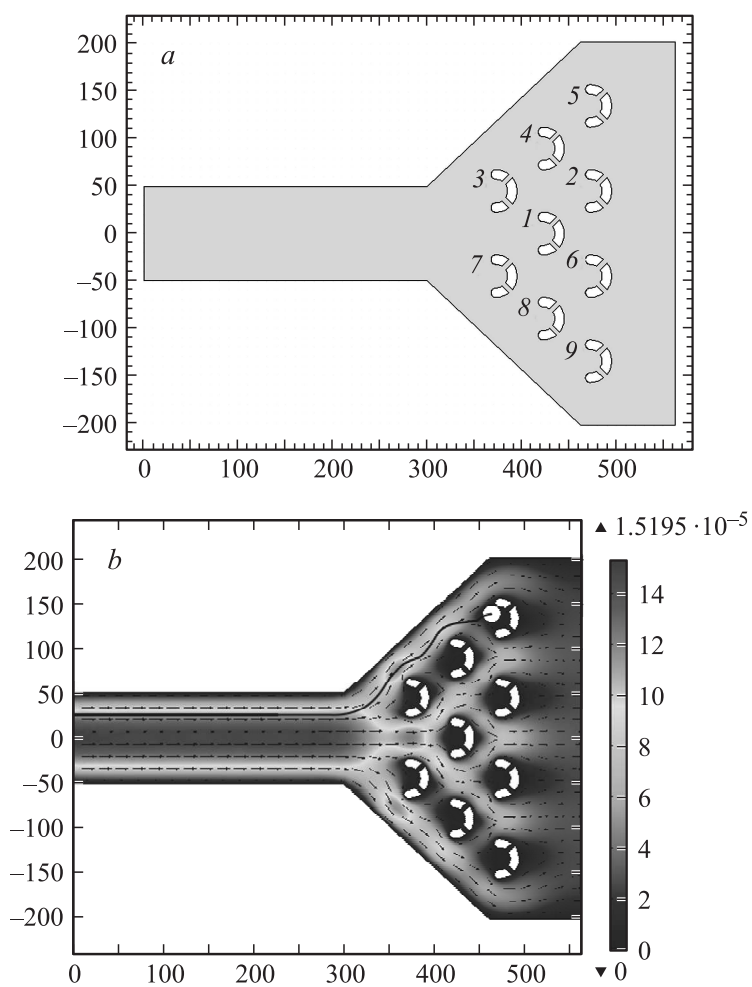
симости от параметров внешней среды. Поэтому необходимо развитие новых подходов и методов работы с одиночными клетками, а соответственно и создание новых приборов и устройств. Регистрация событий, происходящих с отдельной клеткой в нативном состоянии с высоким пространственным разрешением, также является одной из актуальных задач, так как подобные исследования дают возможность получить новую, ранее недоступную информацию и знания о живой клетке. Это, в частности, позволит создавать эффективные формы лекарственных средств для лечения различных заболеваний (в том числе онкологических). Одним из направлений развития аналитических приборов для исследований биологических проб является создание „лабораторий на чипе“ (Lab on a Chip) и микроаналитических систем (Micro Total Analysis System) [2]. Основой этих систем является микрофлюидный чип (МФЧ), содержащий различные функциональные микроразмерные элементы (смесители, нагреватели, фильтры, реакционные камеры, каналы, устройства разделения пробы, камеры сбора фракций, сенсоры и т.д.), предназначенные для выполнения технологических, аналитических и прочих операций с пробой. В последнее время исследователей привлекает возможность разработки МФЧ для выделения и фиксации из потока пробы отдельных клеток [3–5] с целью их дальнейшего изучения методами микроскопии высокого разрешения (конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), микроскопии ближнего поля, атомно-силовой микроскопии и др.) [6,7].

В данной статье приводятся результаты работ по созданию МФЧ для выделения из потока пробы отдельных клеток хронической миелоидной лейкемии человека K562, их фиксации и последующей регистрации методом КЛСМ. С целью выделения и фиксации клеток использовался подход, заключающийся в применении гидродинамических ловушек, размещенных в заданной области МФЧ [8,9]. Для определения геометрии отдельной гидродинамической ловушки, количества и порядка размещения ловушек в реакционной камере МФЧ выполнялось двумерное численное моделирование траекторий движения микрочастиц диаметром  $D = 20 \mu\text{m}$  (схожих по размеру с клетками K562) методом конечных элементов с использованием пакета программ COMSOL Multiphysics. При моделировании предполагалось, что проба — водоподобная жидкость (плотностью  $1 \text{ g/cm}^3$ , динамической вязкостью  $0.001 \text{ P} \cdot \text{s}$ ), содержащая сферические недеформируемые микрочастицы (диаметром  $D$ , плотностью  $1.51 \text{ g/cm}^3$ ), скорость расхода

составляла  $\sim 1 \mu\text{л}/\text{мин}$  (соблюдался ламинарный режим). Взаимодействие частиц друг с другом и со стенками канала не учитывалось. На границе раздела частицы и жидкости выполнялось условие равенства их скоростей. Траектория движения частицы определялась на основании второго закона Ньютона. Сила, действующая на поверхность частицы, находилась интегрированием по границе множителей Лагранжа, имеющих в данном случае размерность силы на единицу площади [10]. Моделирование движения частицы осуществлялось посредством деформирования произвольным лагранжево-эйлеровым методом сетки домена, где проводился расчет потока жидкости [11].

Первоначально рассматривалась топология, в которой по центру канала шириной  $140 \mu\text{м}$  на расстоянии  $400 \mu\text{м}$  от входа располагалась ловушка с толщиной стенок  $10 \mu\text{м}$  и двумя симметричными каналами (прорезями) шириной  $5 \mu\text{м}$ , расположенными под углом  $90^\circ$ . При сравнении результатов моделирования траекторий движения частиц для двух геометрий ловушек (прямоугольной формы шириной  $25 \mu\text{м}$ , длиной  $15 \mu\text{м}$ , и полукруглой с внутренним радиусом  $12.5 \mu\text{м}$ ) не было выявлено существенных отличий. Поэтому для дальнейшего рассмотрения была выбрана более технологичная полукруглая форма гидродинамической ловушки.

Поскольку при проведении биологических исследований, как правило, требуется статистика измерений, то было решено разместить в реакционной камере МФЧ девять гидродинамических ловушек (рис. 1, *a*), расположенных в три ряда. Ширина подводящего канала была выбрана  $100 \mu\text{м}$ , расстояние между ловушками —  $45 \mu\text{м}$ , а между рядами ловушек —  $25 \mu\text{м}$ . Результаты моделирования показали, что при вводе пробы с частицами вероятность попадания частицы, двигающейся в центре канала, в ловушку № 1 максимальная, в то время как вероятность попадания частиц в ловушки № 3 и 7 — практически нулевая. При смещении частицы относительно центра канала на величину до  $\pm 0.5 \mu\text{м}$  вероятность ее попадания в ловушку № 1 все еще высока. Для ловушек № 2, 6 подобная оценка смещения частиц составляет  $\pm 7$  и  $\pm 7.5 \mu\text{м}$ , для ловушек № 4 и 8 смещение  $\pm 19.5 \mu\text{м}$ , а для ловушек № 5 и 9 —  $25 \mu\text{м}$  (рис. 1, *b*). Чрезвычайно низкая вероятность попадания частиц в ловушки первого ряда связана с тем, что поток жидкости огибает ловушки под значительным углом, и эффективность такой схемы низка — частицы вслед за потоком минуют ловушку. Для



**Рис. 1.** Топология рабочей зоны МФЧ с пронумерованными ловушками (a). Профиль скорости потока и траектория движения частицы при ее захвате: в ловушке № 5 при начальном смещении на  $+25 \mu\text{m}$  (b); в ловушке № 3 при начальном смещении частицы на  $+16.5 \mu\text{m}$  и повороте ловушки на  $+22.5^\circ$  (c).

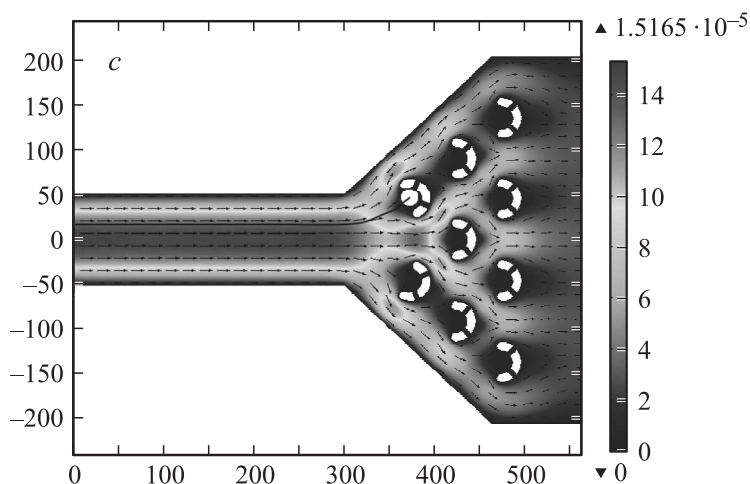
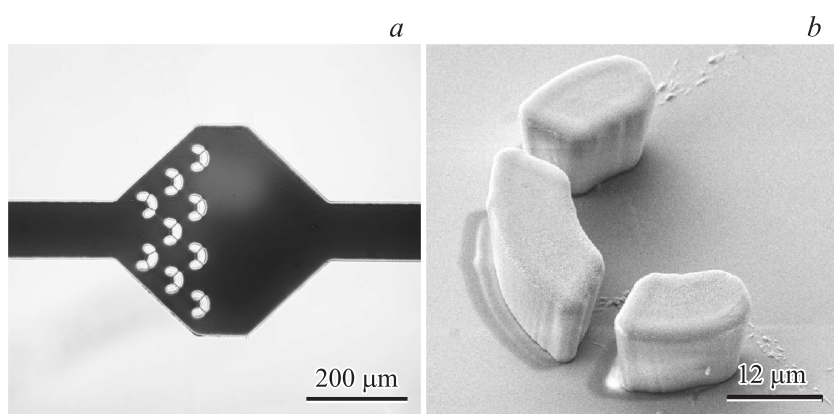


Рис. 1 (продолжение).

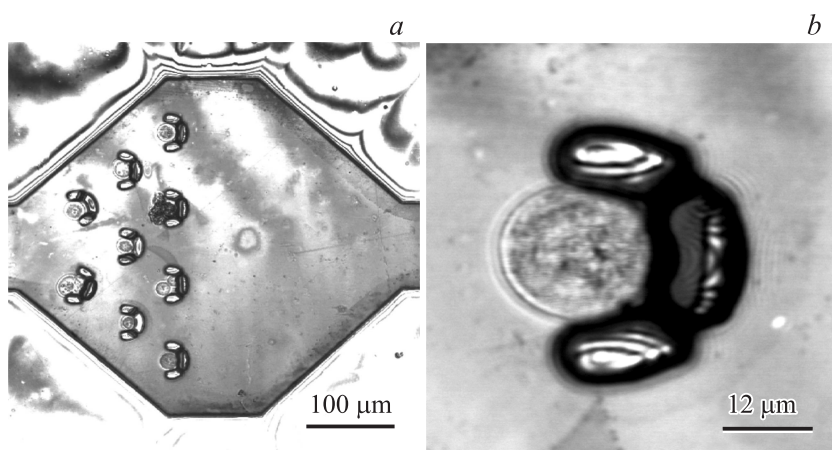
устранения этого эффекта следует или изменить геометрию реакционной камеры, или „развернуть“ ловушки первого ряда так, чтобы перед ними формировался симметричный профиль потока. Последний вариант был реализован на практике при „повороте“ ловушек на угол  $22.5^\circ$  (рис. 1, *c*). Величины смещений частицы относительно центра канала, при которых происходит ее захват в ловушках № 3, 7, составили  $\pm 16$  и  $\pm 16.5 \mu\text{m}$ .

На основании результатов моделирования была разработана топология МФЧ размерами  $24 \times 24 \text{ mm}$ , которая содержала входные/сливные резервуары, сеть микроканалов и 2 реакционные камеры с 9 гидродинамическими ловушками в каждой (рис. 2). Изготовление функциональных элементов МФЧ (резервуары, каналы, реакционные камеры, ловушки) выполнялось с использованием фоторезиста SU-8 2025, нанесенного на плоскопараллельную пластину из стекла марки К8. Экспонирование фоторезиста осуществлялось на установке ультрафиолетовой контактной фотолитографии MJB4 (SUSS MicroTec, Германия). Герметизация изготовленных микроструктур на подложках проводилась путем покрытия их пленками из полидиметилсилоксана.



**Рис. 2.** Изображения МФЧ с гидродинамическими ловушками в реакционной камере (а); СЭМ-изображение отдельной гидродинамической ловушки (b).

Для подтверждения возможности выделения из потока пробы клеток хронической миелоидной лейкемии человека K562, их фиксации и исследования методом КЛСМ были проведены испытания изготовленных образцов МФЧ. На базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SL (Leica, Германия) была собрана экспериментальная установка, в которой для создания ламинарных потоков жидкости в МФЧ использовался шприцевой насос 70-2209 (Harvard Apparatus, США). Расход пробы с клетками K562, как и в случае моделирования, составлял  $1 \mu\text{l}/\text{min}$ . Полученные при испытаниях результаты (рис. 3) свидетельствуют, что во всех ловушках МФЧ можно организовать необходимые условия для удержания клеток K562, что подтверждает результаты моделирования. В некоторых случаях в отдельной ловушке происходит удержание нескольких клеток (рис. 3, а, ловушка № 6), так как, несмотря на то что средний диаметр клеток K562 составляет  $\sim 20 \mu\text{m}$ , встречаются экземпляры и с меньшим диаметром. Кроме того, в ловушках можно осуществлять фиксацию как живых клеток, так и клеток с разрушенной мембраной (рис. 3, а, ловушка № 2, нумерация ловушек соответствует рис. 1, а). При заполнении всех гидродинамических ловушек клетками другие клетки, содержащиеся в



**Рис. 3.** Изображение реакционной камеры МФЧ с гидродинамическими ловушками после загрузки пробы с клетками K562 (*a*) и увеличенное изображение клетки K562, удерживаемой в отдельной ловушке (*b*).

пробе, будут огибать ловушки, что также соответствует результатам моделирования.

Таким образом, в работе: а) предложен и смоделирован вариант конфигурации микрофлюидного чипа с системой гидродинамических ловушек; б) продемонстрирован способ оперативного изготовления микрофлюидных чипов из фоторезиста SU-8, стекла и полидиметилсилоксана; в) экспериментально подтверждена возможность выделения из потока одиночных клеток хронической миелоидной лейкемии человека K562 и их устойчивой фиксации для последующего изучения методом КЛСМ в условиях *in vitro*.

Работа проведена при поддержке Федеральной целевой программы „Научные и научно-педагогические кадры инновационной России“ на 2009–2013 годы (соглашение № 14.132.21.1777).

## Список литературы

- [1] *Carlo D.D., Lee L.P.* // Analytical chemistry. 2006. P. 7919–7925.
- [2] *Manz A., Graber N., Widmer H.M.* // Sensors and Actuators. B: Chemical. 1990. V. 1. P. 244–248.
- [3] *Skelley A.M., Kirak O., Suh H., Jaenisch R., Voldman J.* // Nature Methods. 2009. V. 6. P. 147–152.
- [4] *Kaji N., Okamoto Y., Tokeshi M., Baba Y.* // Chemical Society Reviews. 2010. V. 39. P. 948–956.
- [5] *Grunberger A., Wiechert W., Kohlheyer D.* // Current Opinion in Biotechnology. 2014. V. 29. P. 15–23.
- [6] *Ryu W.H., Huang Z., Park J.S.* et al. // Lab on a Chip. 2008. V. 8. P. 1460–1467.
- [7] *Chung K., Rivet C.A., Kemp M.L., Lu H.* // Analytical Chemistry. 2011. V. 83. P. 7044–7052.
- [8] *Евстратов А.А., Мухин И.С., Кухтевич И.В., Букатин А.С.* // Письма в ЖТФ. 2011. Т. 37. В. 20. С. 32–40.
- [9] *Evstrapov A.A., Mukhin I.S., Bukatin A.S., Kuhtevich I.V.* // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 2012. V. 282. P. 145–148.
- [10] *Karabulut H.* // European J. Physics. 2006. V. 27. P. 709–718.
- [11] *Encyclopedia of Computational Mechanics. Vol. 1. Fundamentals* / Stein E., de Borst R., Hughes T.J.R. Wiley John & Sons, 2004. 798 p.