

14

## Микрофлюидные чипы для исследования миграции клеток при воздействии химических веществ

© И.В. Кухтевич<sup>1,2</sup>, К.И. Белоусов<sup>2</sup>, А.С. Букатин<sup>1,3</sup>,  
В.И. Чубинский-Надеждин<sup>4</sup>, В.Ю. Васильева<sup>4</sup>,  
Ю.А. Негуляев<sup>4,5</sup>, А.А. Евстрапов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН

<sup>4</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
E-mail: ba@inbox.ru

Поступило в Редакцию 16 ноября 2015 г.

Численное моделирование процесса формирования градиента хемоаттрактанта в различных геометриях реакционных камер чипа позволило определить конструкцию для изучения миграции клеток, в соответствии с которой были изготовлены гибридные полимерно-стеклянные микрофлюидные устройства. Проверка методик выстраивания клеток в реакционной камере чипа под действием центробежной силы и последующего культивирования клеток показала возможность применения микрофлюидных чипов для изучения миграции клеток под влиянием градиента хемоаттрактанта *in vitro*.

Клеточная миграция является детерминированным процессом, происходящим при различных взаимодействиях между клетками, тканью и окружающей их средой [1,2]. Эти взаимодействия играют важную роль в биологических процессах, включая иммунные реакции, морфогенез и заживление ран [3,4].

Градиенты концентрации химических веществ относятся к факторам окружающей среды, влияющим на миграцию клеток [5–7]. Из-за высокой биологической и физиологической важности хемотаксиса понимание его механизмов является одной из задач клеточных исследований. В настоящее время при изучении хемотаксиса клеток стали применяться

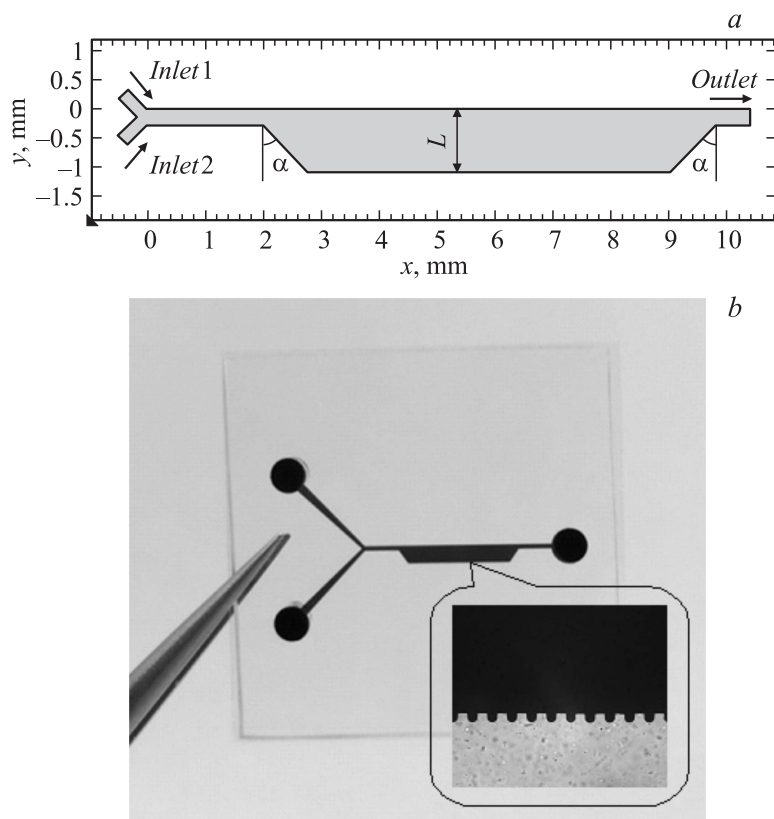
микрофлюидные чипы (МФЧ) [8,9]. Ключевыми преимуществами МФЧ являются возможности: конфигурирования потоков жидкости; создания и стабилизации градиентов концентрации химических веществ; низкого расхода реагентов; постановки высокопроизводительных анализов [10]. Диапазон формируемых в МФЧ концентраций хемоаттрактантов может варьироваться от десятых долей до сотен  $\text{ng/ml}$  [11,12].

Цель данной работы — создание универсальной топологии МФЧ для изучения миграции клеток под действием градиента хемоаттрактанта, позволяющей выполнять позиционирование и культивирование клеток в реакционной камере чипа, а также регулировать создаваемый градиент плавно и в широком диапазоне.

Существует три базовых топологии МФЧ, применяемых для создания градиентов химических веществ [13]: „Т“ / „У“; „сетевая“ и „диффузионная“. Нами было решено использовать „У“ топологию, где имеются два загрузочных канала, через которые подаются растворы, один из которых содержит хемоаттрактант. Каналы расположены симметрично напротив друг друга и сопрягаются с широким каналом или реакционной камерой. При контакте потоков происходит диффузия хемоаттрактантов, а регулируя скорости потоков, можно создавать необходимый градиент концентрации.

Для определения оптимальной топологии реакционной камеры было проведено численное моделирование с использованием пакета программ COMSOL Multiphysics. Изучалось распределение хемоаттрактанта в каналах и реакционной камере МФЧ при различных углах наклона ее стенок, ширины и для разных величин расходов растворов. Рассматривалась двумерная задача в горизонтальном сечении каналов и реакционной камеры (рис. 1, а). Таким приближением можно воспользоваться, поскольку конвективный перенос в вертикальном направлении отсутствует, а глубина каналов чипа достаточно мала (несколько десятков  $\mu\text{m}$ ), что обеспечивает быстрое достижение диффузионного равновесия. В качестве раствора рассматривалась водоподобная жидкость с плотностью  $1000 \text{ kg/m}^3$  и динамической вязкостью  $0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ .

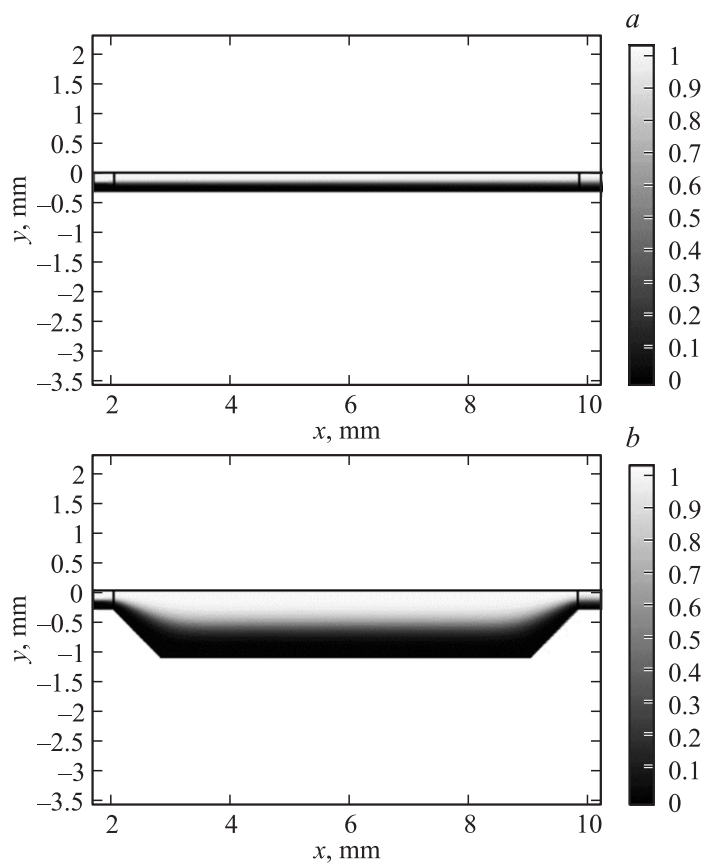
Ширина реакционной камеры  $L$  варьировалась от  $300$  до  $1500 \mu\text{m}$  с шагом  $400 \mu\text{m}$  при  $\alpha = 45^\circ$  (рис. 2). Коэффициент диффузии хемоаттрактанта выбирался равным  $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (характерный для белков в воде). При этом расходы раствора с хемоаттрактантом  $Q_1$  и буферного раствора  $Q_2$  менялись от  $0.01$  до  $2 \mu\text{l}/\text{min}$  при их равенстве ( $Q_1 = Q_2$ ). Так же исследовалось распределение концентраций при



**Рис. 1.** *a* — область моделирования при исследовании распределения концентраций веществ в реакционной камере МФЧ. *b* — экспериментальный образец гибридного ПДМС стеклянного МФЧ; на вставке приведено увеличенное изображение стенки реакционной камеры, оснащенной ловушками для удержания клеток.

суммарном потоке, равном  $2 \mu\text{l}/\text{min}$ , и увеличении расхода раствора с хемоаттрактантом с 1 до  $1.8 \mu\text{l}/\text{min}$ .

Выявлено, что с увеличением ширины камеры от  $300$  до  $1500 \mu\text{m}$  максимальный градиент уменьшился в 5.3 раза, что связано с его масштабированием при изменении геометрии камеры. Бы-



**Рис. 2.** Распределение концентраций хемоаттрактанта в реакционной камере МФЧ при расходах  $Q_1 = Q_2 = 1 \mu\text{l}/\text{min}$  и ее ширине:  $a$  —  $300 \mu\text{m}$ ;  $b$  —  $1100 \mu\text{m}$ . Ширина боковых каналов равна  $300 \mu\text{m}$ .

ло определено, что изменение расходов от  $Q_1 = Q_2 = 0.01 \mu\text{l}/\text{min}$  до  $Q_1 = Q_2 = 2 \mu\text{l}/\text{min}$  при ширине камеры  $1.1 \text{ mm}$  приводит к изменению градиента в 33 раза с  $260$  до  $8570 \text{ mol}/\text{m}^4$ . В то время как при больших расходах жидкости достигаются большие значения градиента, меньшая величина потоков позволяет получить градиенты, более

плавно изменяющиеся по ширине канала. При изменении отношения потоков  $Q_1 : Q_2$  от 1 : 1 до 9 : 1 происходит сдвиг фронта концентрации с середины реакционной камеры на позицию, равную  $4/5$  от ее ширины, при этом величина градиента снижается на 18%. Изменение угла наклона стенок камеры  $\alpha$  от  $75^\circ$  до  $0^\circ$  приводит к росту величины градиента для  $Q_1 = Q_2 = 0.01 \mu\text{l}/\text{min}$  на 33%, а для  $Q_1 = Q_2 = 2 \mu\text{l}/\text{min}$  на 6.4%. Геометрия реакционной камеры с углом наклона стенок  $45^\circ$  позволяет при меньших расходах жидкости получить больший градиент концентрации. Были выполнены расчеты для геометрии, предложенной в статье [14], где контакт жидкостей с хемоаттрактантом и без происходил в прямом канале шириной порядка  $300 \mu\text{m}$ . Результаты моделирования для прямого канала и предложенной нами реакционной камеры (рис. 2) показали, что в первом случае профиль концентрации меняется достаточно резко, что снижает возможности исследований, напротив, во втором случае можно в более широких диапазонах регулировать градиенты, а также добиться более плавного изменения профиля концентрации, что говорит об универсальности предлагаемой реакционной камеры. В итоге выбор был остановлен на геометрии реакционной камеры шириной  $1100 \mu\text{m}$  и с углом наклона стенок  $45^\circ$ , так как такая конфигурация позволяет при меньших расходах растворов получить больший градиент концентрации хемоаттрактанта.

С учетом результатов моделирования была разработана топология МФЧ, особенностью которой является массив из 78 ловушек (габаритные размеры ловушки  $40 \times 40 \mu\text{m}$ , радиус скругления  $20 \mu\text{m}$ ), расположенных вдоль всей длины одной из стенок реакционной камеры (рис. 1, *b*). Глубина всех структур  $30 \mu\text{m}$ . Ловушки предназначены для удержания клеток, оказавшихся в них во время центрифугирования, и позволяют добиться их выстраивания вдоль стенки, т.е. создать единую „стартовую“ позицию (базовую линию), что открывает новые возможности при изучении гетерогенности клеточной популяции.

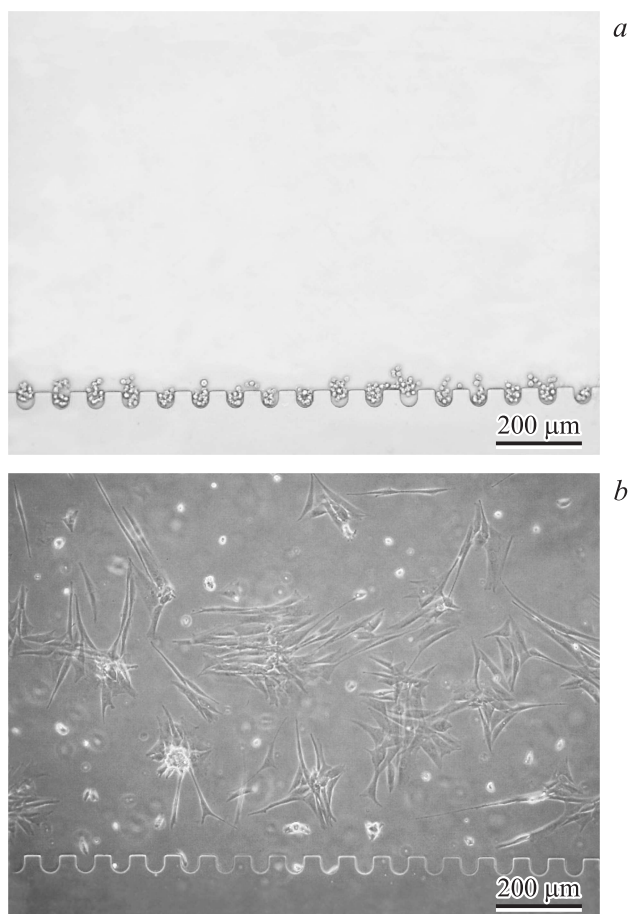
На основе разработанной топологии МФЧ были изготовлены мастер-формы для отливки по ним полидиметилсилоксановых (ПДМС) реплик. Изготовление мастер-форм из кремния с нанесенным слоем фоторезиста SU-8 (MicroChem, США) выполнялось стандартным способом [15]. Получение реплик микроструктур проводилось путем отливки ПДМС Sylgard 184 (Dow Corning, США) по изготовленным мастер-формам в соответствии с известным протоколом [15]. Герметизация выполнялась путем соединения реплики из ПДМС и

стеклянной пластины после активации их поверхностей в кислородной плазме в течение 1.5 min на установке Plasma Systems ZEPHO (Diener Electronic, Германия). Изображение изготовленного гибридного ПДМС стеклянного МФЧ приведено на рис. 1, *b*.

Отработка методики выстраивания и последующего культивирования клеток в реакционной камере МФЧ проводилась на клетках постоянной клеточной линии СНО, имеющих происхождение из яичника китайского хомячка. Методика выстраивания состояла из стадий: загрузки 20  $\mu$ l пробы с требуемой концентрацией клеток в МФЧ; выстраивания клеток в МФЧ путем центрифугирования в течение 15 s при 2000 rpm (рис. 3, *a*). После позиционирования клеток в реакционной камере чип помещался в чашку Петри и заливался средой DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки. Затем чашка Петри с чипом помещалась в инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры в 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> на уровне 5%, и выдерживалась 20 h для обеспечения распластывания клеток, выстроенных в реакционной камере, и запуска цикла деления (рис. 3, *b*).

Методика выстраивания и культивирования клеток в реакционной камере МФЧ позволяет подготовить условия для эксперимента по изучению клеточной миграции. Процедуру выстраивания клеток (центрифугирования) можно не выполнять, если нет необходимости в получении единой „стартовой“ позиции.

Были проведены эксперименты, подтверждающие функциональную пригодность разработанного устройства для исследования миграции на примере клеток линии HepG2, имеющих происхождение из опухоли печени человека. В качестве тестовой реакции изучался отклик данных клеток на наличие градиента эпидермального фактора роста в реакционной камере устройства. Известно, что клетки HepG2 имеющих рецепторы, способные реагировать с фактором роста, что приводит к миграции и разрастанию клеток в направлении увеличения его концентрации, в то время как при отсутствии фактора роста в среде эти процессы не имеют строго детерминированного направления [16]. Данные клетки растут в виде колоний, поэтому было решено отказаться от проведения процедуры выстраивания, поскольку каждая колония клеток обладает выраженной границей, которую можно считать за базовую линию. Колонии были расположены по центру реакционной камеры, что обеспечило циркуляцию жидкости со всех сторон и предотвратило возможное влияние распределения вещества на направления



**Рис. 3.** Изображения распределения клеток СНО в реакционной камере МФЧ: *a* — после центрифугирования; *b* — после культивирования на чипе в течение 20 h.

клеточной миграции без фактора роста. Таким образом, после загрузки клеток в чип выполнялась только процедура их культивирования. Затем чашка Петри с МФЧ, залитым жидкостью, переносилась из инкубатора на предметный столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl

Zeiss, Германия), к чипу присоединялись капилляры, через которые осуществлялась подача раствора DMEM с фактором роста и без. Скорость расхода растворов регулировалась при помощи шприцевого насоса 70-2209 (Harvard apparatus, США). Расход растворов был задан равным  $0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ . Микроскоп оснащен системой контроля температуры, влажности и  $\text{CO}_2$ , что позволило обеспечить поддержание температуры в  $37^\circ\text{C}$ , уровня  $\text{CO}_2$  в 5% и предотвратить испарение жидкости. Эксперимент проводился в течение 10 h с регистрацией процессов, происходящих в реакционной камере МФЧ каждые 5 min. Результаты, полученные в ходе эксперимента, показали, что разрастание колоний клеток HepG2 происходит преимущественно в направлении увеличения концентрации фактора роста примерно на  $\sim 10\%$ , в то время как в противоположном направлении прирост колоний составил всего  $\sim 1\%$ .

Итак, на основе результатов численного моделирования градиентов хемоаттрактанта в различных геометриях реакционных камер была предложена оригинальная топология МФЧ для изучения влияния концентрации химических веществ на клетки. По данной топологии были оперативно изготовлены из ПДМС и стекла микрофлюидные чипы, обеспечивающие возможность применения оптической микроскопии для наблюдений за клетками. На МФЧ отработывалась методика выстраивания клеток СНО под действием центробежной силы с целью создания базовой линии для изучения процесса миграции. На примере клеток HepG2 была подтверждена работоспособность устройства при проведении длительных экспериментов (до 10 h). Таким образом, МФЧ может являться ценным инструментом для решения задач по изучению влияния градиентов химических веществ на живые клетки, что является одной из важных задач современной биологии и экологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 14-08-31641, 15-04-00905, 16-04-00467 и централизованных средств Университета ИТМО, проект № 415831.

## Список литературы

- [1] *Vicente-Manzanares M. et al. // J. Cell Sci. 2005. V. 118. P. 4917–4919.*
- [2] *Berzat A., Hall A. // EMBO J. 2010. V. 29. P. 2734–2745.*
- [3] *Jin T. et al. // Cytokine. 2008. V. 44. P. 1–8.*



- [4] *Baggiolini M.* // Nature. 1998. V. 392. P. 565–568.
- [5] *Luster A.* et al. // Nature Immunology. 2005. V. 6. P. 1182–1190.
- [6] *Muller A.* et al. // Nature. 2001. V. 410. P. 50–56.
- [7] *Raman D.* et al. // Cancer Lett. 2007. V. 256. P. 137–165.
- [8] *Li J., Lin F.* // Trends Cell Biol. 2011. V. 21. N 8. P. 489–497.
- [9] *Chung B.G., Choo J.* // Electrophoresis. 2010. V. 31. P. 3014–3027.
- [10] *Kim S.* et al. // Integrative Biology. 2010. V. 2. P. 584–603.
- [11] *Chung B.G., Choo J.* // Electrophoresis. 2010. V. 31. P. 3014–3027.
- [12] *Fernandes J.T.S.* et al. // Lab Chip. 2014. V. 14. P. 3949–3957.
- [13] *Кухтевич И.В.* и др. // Научное приборостроение. 2015. № 1. С. 3–16.
- [14] *Lin F., Butcher E.* // Lab Chip. 2006. V. 6. P. 1462–1469.
- [15] <https://gmwgroup.harvard.edu/pubs/pdf/1073.pdf>
- [16] *Hu Z.* et al. // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. 38777.