

УДК 53.086 + 57.086.2 + 57.086.8

© И. В. Кухтевич, А. А. Евстапов, А. С. Букатин

МИКРОФЛЮИДНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛЕТОК (ОБЗОР)

В обзоре рассмотрено современное состояние исследований и разработок по созданию микрофлюидных устройств для изучения клеток. Предложены способы классификации микрофлюидных устройств по функциональному назначению, по области решаемых задач, по способам детектирования объекта исследования.

Кл. сл.: микрофлюидное устройство, микрофлюидный чип, клетка, бактерия, оптические методы, сканирующая зондовая микроскопия, электрические методы детектирования

ВВЕДЕНИЕ

Микрофлюидные устройства (МФУ) и системы на их основе находят широкое применение при подготовке и анализе жидких проб в биологии, фармакологии и медицине [1]. Интеграция в МФУ специальных функциональных элементов позволяет создавать новые аналитические системы, платформы и приборы с уникальными техническими и эксплуатационными характеристиками для исследования биологических проб [2]. Использование микро- и наноразмерных элементов [3, 4] в МФУ дает возможность реализовать новые методы анализа, например, осуществлять исследование как групп, так и отдельных биологических объектов (клеток, бактерий), находящихся в жидкой пробе [5, 6], активно воздействовать на них, проводить лизис и анализ ДНК отдельных клеток.

Наличие множества разнообразных конструкций МФУ вызывает необходимость их классификации. Один из способов классификации МФУ на пять групп в соответствии с доминирующими принципами движения потоков в устройстве (капиллярные, под действием давления, под действием центробежных сил, электрокинетические и акустические) предложен в работе [7]. Однако во многих исследованиях встречаются устройства и системы, в которых сочетаются различные принципы движения потоков, так что достаточно сложно определить доминирующий. Еще сложнее использовать такой подход в случае устройств для исследований микрообъектов (клеток, бактерий и т. д.), т. к. в них транспортировка микрочастиц может осуществляться с применением одних принципов, фиксация и удерживание — других (например, сочетание гидродинамического транспорта и диэлектрофореза, оптического пинцета, электрофореза и т. д.). Таким образом, такого под-

хода явно недостаточно, и поэтому в данной статье предлагается рассмотреть три отличных от представленного выше принципа классификации МФУ, а именно: по функциональному назначению; в соответствии с решаемыми задачами; по методам регистрации / детектирования объекта исследования.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ НАЗНАЧЕНИЕ МФУ

На основании литературных данных, приводимых в обзорах [1, 8–14], МФУ для исследования биологических микрообъектов можно условно разделить по функциональному назначению, а именно:

- сортировка / разделение частиц;
- фиксация и удерживание частиц;
- культивирование биологических объектов (клеток, бактерий и т. д.);
- пробоподготовка / обработка образцов.

К первой группе устройств следует отнести микрофлюидный чип (МФЧ), рассмотренный в статье [15] и предназначенный для изолирования и сортировки раковых клеток из крови пациентов с опухолями эпителиального происхождения. Чип химически функционализирован антителами к специфическим молекулам, находящимся на эпителиальных клетках (Anti-Epithelial-Cell-Adhesion-Molecule, EpCAM). Этим обеспечивалась специфичность захвата клеток опухолей, т. к. EpCAM отсутствуют в клетках крови.

Сортировка клеток часто используется в лабораториях для клинической диагностики и исследований. Наиболее актуальными областями применения являются: выделение лимфоцитов из крови для анализа на ВИЧ, изучение стволовых клеток и использование цитосенсоров для обнаружения

различных заболеваний [16]. Разработка аналитических платформ / систем на базе микрофлюидных технологий может быть успешной для решения подобных задач. Важным преимуществом таких платформ / систем является их небольшая стоимость по сравнению с полноразмерными системами (например, цитометрами), а также их малый размер. Характеристики платформ / систем на базе МФЧ не уступают полноразмерным аналогам по точности и скорости проведения анализа [17]. Ключевым моментом является то, что МФЧ могут быть сделаны одноразовыми, что обеспечивает возможность безопасной работы с потенциально опасными биологическими материалами, такими как кровь. Кроме того, МФЧ позволяют существенно снизить объем необходимой пробы и реагентов для анализа, существенно уменьшая его стоимость [18].

Еще одним примером МФУ первой группы назначения является МФЧ для проточной цитометрии, описываемый в статьях [19, 20]. Чип состоит из микроканала для транспортировки образца и резервуаров, расположенных по краям канала, а детектирование осуществляется путем фокусировки лазера в микроканале и регистрации отклика при помощи ПЗС-матриц или фотоумножителя. Конструкция такого МФЧ позволяет применять для детектирования методы микроскопии высокого разрешения, такие как конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и микроскопия полного внутреннего отражения, что существенно повышает точность и порог детектирования, а также дает возможность применять широкий спектр флуоресцентных красителей.

Возможность изолировать и сконцентрировать гомогенную популяцию клеток из гетерогенной смеси клеток важно для получения информации о биохимии определенных клеточных типов в смеси. Микрофлюидные технологии позволяют выделять малое количество клеток (иногда одиночные клетки) из большой популяции клеток на основе их различия в физических или химических свойствах и обнаруживать гетерогенности внутри гомогенных популяций клеток [21].

Примером подобного устройства, относящегося к МФУ первой группы, может являться конструкция из статьи [22]. Предложена установка, представляющая собой экспериментальную цитометрическую сортирующую микрофлюидную платформу для генетического скрининга сложных фенотипов биологических клеток. Различные подходы позволяют наблюдать и изолировать одиночные мутантные клетки внутри анализируемой популяции. Микрофлюидная потоковая камера со специальными лунками-ловушками, расположенными на дне, используется для захвата и фиксации клеток с целью последующего анализа методами

микроскопии и может быть оптимизирована для захвата отдельных клеток. После анализа клеток прикладывается радиационное давление от инфракрасного лазерного диода для их поднятия из лунок-ловушек и перемещения в поток. Освобожденные клетки могут быть собраны для дальнейшего анализа. Этот пример является прекрасной иллюстрацией применения нескольких принципов, побуждающих движение изучаемых объектов: под действием гидродинамических сил и электромагнитного (лазерного) излучения.

Другой пример МФУ первой группы приведен в статье [23], где авторы представили устройство для разделения флуоресцентно меченных шариков в зависимости от интенсивности флуоресценции. Микрофлюидная система выполняла 3 функции: фокусировку, детектирование и разделение микрочастиц. Полистирольные шарики вводились в МФУ и фокусировались в центре транспортного канала при помощи гидродинамических потоков из боковых каналов. Флуоресценция шариков возбуждалась лазером, а детектирование флуоресценции выполнялось при помощи фотоумножителя. Далее шарики разделялись на 3 группы в зависимости от интенсивности их флуоресценции при помощи диэлектрофоретических сил, индуцированных микроэлектродами при приложении напряжения на определенной частоте. Таким образом, в устройстве реализованы принципы движения под действием гидродинамических и диэлектрофоретических сил.

Ко второй группе следует отнести МФЧ, представленный в статье [5]. Авторы предложили использовать чип, изготовленный из полидиметилсилоксана (ПДМС), содержащий массивы U-образных гидродинамических ловушек для фиксации на них клеток *HeLa*. В чипе не проводилась никакая-либо предварительная модификация поверхности ловушек, а загрузка клеток производилась менее чем за 30 с. Чип использовался для изучения процесса развития примерно 100 одновременно зафиксированных в ловушках клеток в течение 24 ч.

Примером МФУ второй группы может служить устройство, приведенное в статье [6] и предназначенное для исследования процессов слияния клеток. Функциональные элементы устройства представляют собой массив двухсторонних ловушек. Эксперименты проводились на различных типах клеток, в том числе фибробластах, мышечных эмбриональных стволовых клетках и клетках миеломы, при этом эффективность слияния достигала 70%. Загрузка и слияние клеток в двухсторонних ловушках осуществлялась в 3 этапа: на первом этапе — в меньшую из двух чашек ловушек загружался один из видов выбранных для изучения клеток; на втором — размещенные в маленькой

чашке ловушек клетки перераспределялись в большую; на третьем — поверх размещенных в большой чашке ловушек клеток загружался второй тип клеток.

Ко второй группе относится устройство, совместимое с методом атомно-силовой микроскопии [24]. Авторы статьи предложили использовать открытые микрофлюидные каналы с механическими микроловушками для фиксации одиночных клеток с помощью капиллярных сил. Такой подход дает возможность удерживать клетки в естественной среде на время измерений, обеспечивая свободный доступ зондов для атомно-силовой микроскопии, и тем самым реализовать высокое пространственное разрешение при исследовании клеток.

К третьей группе следует отнести МФУ, представленное в статье [25] и предназначенное для выращивания суспензионных клеток. Клетки под действием силы тяжести помещаются в специальные камеры, которые изолируют их от гидродинамических сил, обеспечивая при этом возможность замены среды.

К третьей и одновременно четвертой группам можно отнести высокопроизводительную микрофлюидную систему, представленную в статье [26]. МФУ системы содержит 7 параллельных каналов, каждый из которых содержит 32 микрофлюидные камеры квадратной формы. Через каналы в данные камеры производилась загрузка культуры бактерий *E.Coli HB101*. Используя принцип, что L-арабинозы (*L-Ara*) может вызвать рекомбинацию *E.Coli* штамма *HB101 pGLO* для синтеза зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ), был выполнен анализ выделения ЗФБ в режиме реального времени для различных начальных плотностей бактерий. Также наблюдалось изменение бактериальной морфологии во время обработки антибиотиками.

МФУ, описанное в статье [27] и способное выполнять в реальном времени подсчет клеток и их лизис под действием оптического излучения, относится к четвертой группе. Первоначально клетки гидродинамически фокусировались в середине канала, а затем производился их подсчет при помощи пары интегрированных оптических волокон. После подсчета клеток на слой фотопроводящего материала, нанесенного на индий-олово-оксид-подложку, фокусировалось оптическое излучение для того, чтобы индуцировать электрическое поле, необходимое для лизиса клеток. Таким образом, клетки лизировались непрерывно за счет генерации трансмембранного потенциала.

Примером МФУ одновременно второй и четвертой группы является МФУ, представленное в статье [28]. В статье речь идет об устройстве

для электропорации клеток *HeLa* с целью окраски ЗФБ. Для электропорации применяется массив золотых микроэлектродов, покрытых тонкой пленкой наноструктурированного (с размером зерна 8–20 нм) диоксида титана (TiO_2) для улучшения биосовместимости и адгезии клеток. На устройстве осуществлялось выращивание клеток *HeLa* при помощи стандартных протоколов.

МФУ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ, ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Помимо классификации МФУ по функциональному назначению, можно провести их классификацию в соответствии с решаемой задачей или группой задач:

- диагностические;
- аналитические / исследовательские;
- технологические.

К МФУ первой группы можно отнести устройство, рассматриваемое в статье [29]. Авторы сообщают о разработке МФУ и оптической системы измерения окклюзионных тромбоцитов тромбозы при начальных скоростях сдвига в интервале от физиологических до патологических состояний ($500\text{--}13\,000\text{ с}^{-1}$) внутри четырех сужающихся каналов. Были проведены эксперименты по меточному измерению тромбоцитов тромбозы в реальном времени путем регистрации оптического излучения, прошедшего поперек заполненных каналов.

Примером МФУ для решения одновременно первой и третьей групп задач является интегрированное устройство для проведения количественной полимеразой цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, представленное в статье [30]. На данном устройстве реализованы следующие стадии: фиксация единичной клетки, лизис, синтез комплементарных ДНК, ПЦР-анализ. При этом пропуская способность оценивается как 300 клеток за цикл. Фиксация отдельных клеток осуществляется при помощи единичных ловушек расположенных в центре специальных камер, в которых после фиксации выполняется процедура лизиса.

К МФУ для решения второй группы задач относится устройство, представленное в статье [31]. Авторы сообщают о разработке МФУ для экспериментальных электрических и оптических измерений на мембране, которое является частью микрофлюидной платформы, позволяющей проводить фундаментальные исследования свойств мембран.

Еще одним примером МФУ для второй группы задач может являться система [32] для проточной цитометрии, основанной на когерентном антистоксовом рамановском (комбинационном) рассеянии

(КАРР). Данная система представляет собой совмещение лазерного сканирующего КАРР-микроскопа с МФУ из ПДМС. Линейное сканирование вдоль центра гидродинамически сфокусированного потока выполнялось для детектирования движущихся в потоке полистирольных шариков, при помощи которых подбирались оптимальные параметры работы системы. Затем было проведено измерение популяции адипоцитов, выделенных из жировых тканей мышей, которые показали применимость микрофлюидного КАРР-цитометра для количественной оценки распределения адипоцитов по размерам.

К МФУ для решения второй группы задач может быть отнесено устройство, представленное в статье [33]. Авторы продемонстрировали основанный на безметочной микроскопии микрофлюидный цитометр, способный регистрировать двумерное рассеяние света от структур отдельных клеток и проводить структурный анализ, который дает возможность определить такие параметры клетки, как размер, ориентацию в пространстве и внутреннюю структуру.

Примером МФУ, решающим вторую и третью группы задач, может служить система из статьи [34]. Авторы представили автоматизированную систему для изучения клеток с оптической системой регистрации экспериментов в режиме реального времени, которая содержит перистальтические насосы и одноразовые полимерные МФУ, изготовленные из ПММА. Система позволяет относительно просто загружать, культивировать и стимулировать клетки, а также оптически регистрировать их изменение в реальном времени.

МЕТОДЫ И СПОСОБЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В МФУ

Кроме классификации МФУ по назначению и по группе решаемых задач, представляется целесообразным провести классификацию по методам регистрации / детектирования, применяемым с данными устройствами. Можно выделить следующие основные группы методов регистрации / детектирования распространенные в микрофлюидных устройствах:

– оптические (оптическая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, двухфотонная сканирующая лазерная микроскопия, микроскопия фазового контраста и т. д.);

– сканирующие зондовые (атомно-силовая микроскопия и т. д.);

– электрические (импедансометрия и т. д.);

– другие.

Оптическая микроскопия и ее применения в микрофлюидике, рассмотрены, например, в обзоре [35], посвященном вопросам оценки скорости микрочастиц. Авторы предлагают использовать оптическую, неинтрузивную технику измерений, позволяющую детально измерять поле потока в микрофлюидных устройствах. В частности, в статье обсуждаются такие теоретические и практические вопросы, как типичная оптическая установка для данной техники, свойства объективов микроскопа, оптические фильтры, отбор частиц, концентрация частиц, освещение потока, разрешение системы, методы анализа данных.

Следующим примером использования МФУ и методов оптической микроскопии является автоматизированная микрофлюидная система, способная регистрировать деформацию отдельных клеток со скоростью около 2000 клеток / с [36]. Принцип работы системы заключается в доставке клеток по оси симметрии канала в центр перекрестия, где происходит их деформация при взаимодействии со встречным потоком. При деформации каждой клетки выполняется регистрация изменения ее формы при помощи высокоскоростной камеры, что позволяет получить количественную оценку параметров.

В статье [37] авторы представили МФУ и автоматизированный оптический микроскоп для регистрации отдельных клеток в потоке, который позволяет проводить скрининг больших популяций (>100 000 000), обеспечивает необходимую чувствительность во время регистрации изображений без их размывания, обладает возможностью непрерывной высокоскоростной записи в реальном времени.

Высокопроизводительная "биофизическая" точная цитометрическая техника, реализуемая на МФУ в сочетании с оптической микроскопией и позволяющая проводить измерения времени прохождения отдельных клеток крови через сеть разветвленных микроканалов, рассмотрена в работе [38]. Для демонстрации клинической значимости системы, авторы использовали клетки, подверженные заболеваниям (сепсис и лейкостаз), при которых их механические свойства приводят к микрососудистой непроходимости.

В статье [39], посвященной исследованию упругих свойств клеток, авторы отмечают, что использование методов, основанных на фотофорезе микрочастиц, имеет большой потенциал, т. к. не требует специальных реагентов (например, красителей) для идентификации клеток, позволяет определять ее фенотип и осуществлять обнаружение заболеваний. Однако низкая пропускная способность, связанная с необходимостью изоляции и исследования отдельной клетки, существенно ограничивает применение. Для увеличения произ-

водительности авторы предлагают использовать однопучковый метод, при котором сила, вызванная электромагнитным полем, прикладывается анизотропно для растяжения эритроцитов в потоке, а регистрация осуществляется при помощи оптической микроскопии и ССD-камеры.

Явление автофлуоресценции (АФ) довольно широко распространено в живой природе. Среди биологических объектов АФ обладают, в частности, клеточные органеллы, лизосомы и митохондрии [40]. Как показали исследования, АФ этих органелл может обеспечивать получение важной информации о клетке и происходящих в ней биологических процессах. К примеру, АФ митохондрий может отражать метаболический статус, в то время как АФ лизосом может быть индикатором пролиферативной активности и возраста клетки [41]. Кроме того, в процессе патологической трансформации нормальных клеток определенные изменения происходят в фенотипе и генотипе клетки, что может приводить к определенным изменениям клеточной АФ.

Примером успешного применения комбинации конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и микрофлюидных технологий для регистрации АФ клеток крови может служить специальная экспериментальная установка, рассмотренная в статье [42]. Установка может быть использована для разделения клеток по принципу АФ (к примеру, сортировка нормальных и трансформированных клеток), а также для изучения процессов клеточного лизиса и апоптоза.

Еще одним примером комбинации микрофлюидных технологий и методов двухфотонной сканирующей лазерной микроскопии (ДСЛМ) может являться МФУ из статьи [43]. Авторы представили устройство для *in vitro* анализа, которое можно имплантировать в череп живых животных с целью локальной доставки химических препаратов и наблюдения в течение долгого времени нейронов мозга методом ДСЛМ. Устройство состоит из гидрогеля и ПДМС, в котором изготовлены трехмерные микроканалы для локальной доставки химических препаратов. Устройство имплантировалось в мозг живой мыши, а затем осуществлялось наблюдение при помощи ДСЛМ.

В статье [44] также приводится пример совмещения микрофлюидных технологий и ДСЛМ. Авторы продемонстрировали подход к неинвазивной и высокопропускной иммобилизации физиологически активных объектов, таких как *C. Elegans*, без использования анестезии или охлаждения, но обладающий необходимой стабильностью даже для самых требовательных задач. Были проведены наблюдение и манипуляции на субклеточном уровне путем использования ДСЛМ и фемтосекундной лазерной микрохирургии.

Сочетание последних достижений в области флуоресцентной микроскопии с микрофлюидными технологиями предоставляет уникальную возможность для работы с живыми клетками и изучения сложных взаимосвязей в сигнальных цепях. Используя данный подход, представляется возможным проводить визуализацию на молекулярном уровне в одиночной клетке, что способствует изучению динамических свойств биологических систем и позволяет оценить тонкие клеточные механизмы регуляции [45].

Один из примеров вышеописанного сочетания технологий и методов приведен в статье [46]. Для изучения динамических свойств митохондрий в клетках эндотелия капилляров было применено специально разработанное МФУ для независимой подачи двух красителей с разных сторон одиночной клетки в сочетании с методом КЛСМ.

Другой яркий пример комбинации микрофлюидных технологий и флуоресцентных методов для анализа сигнальных систем представлен в статье [47], в которой описаны эксперименты по исследованию поведения рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР). Изучение данного рецептора представляет собой важность для биологии и медицины в связи с тем, что его повышенная активность и экспрессия ассоциирована с некоторыми видами рака, такими как рак легких и глиобластома (опухоль мозга). Известно, что мутации в рецепторе были обнаружены при некоторых формах рака, а сам рецептор является мишенью для антираковой терапии [48, 49]. Авторы статьи [47] с помощью МФУ показали, что активация РЭФР остается на локальном уровне в нормальных (неоверэкспрессированных) клетках, в то время как при оверэкспрессии рецептор фосфорилируется по всей клетке.

Необходимо отметить, что микрофлюидные технологии в комбинации с методами оптической микроскопии применяются для моделирования различных внутренних систем организма. Так, широкое распространение получили МФУ, позволяющие имитировать микрокапилляры сердечно-сосудистой системы и изучать механические воздействия на клетки эндотелия сосудов [50]. Эти исследования имеют большую прикладную и фундаментальную значимость в связи с тем, что хорошо известна зависимость между механическими свойствами стенки сосудов и такими распространенными болезнями, как атеросклероз и гипертония. Кроме того, существуют МФУ, имитирующие физиологические и патофизиологические механические процессы в дыхательных путях [51]. Пример такого применения МФУ, а также пример устройства совмещаемого с первой группой методов регистрации / детектирования, приведен в статье [52], в которой авторы использовали комбинацию

флуоресцентной микроскопии и МФЧ, моделирующего систему капилляров для изучения перемещений раковых клеток до и после обработки химиотерапевтическими агентами. С помощью флуоресцентной микроскопии осуществлялось выявление погибших клеток.

К МФУ первой группы также можно отнести устройство, представленное в статье [53]. Рассматривается микрофлюидная система для измерения внутриклеточных и внеклеточных белков отдельных клеток. В МФУ с сетью параллельных микроканалов был организован ток бактерий *E.coli* с флуоресцентно мечеными белками, а определение количества белков в каждой отдельной бактерии происходило, при помощи регистрации сигнала флуоресценции.

Пример использования МФУ в сочетании с флуоресцентными методами приведен и в статье [54]. Авторы разработали специальный автоматический деформационный цитометр, который измеряет в динамическом режиме механическую деформацию для 10^3 – 10^4 красных кровяных телец (ККТ) в популяции с одновременным измерением их флуоресценции. Благодаря этому возможно отслеживать корреляцию между биохимическими свойствами и механической деформацией. Авторы отмечают, что разработанная система хорошо применима для исследования гетерогенных клеточных популяций.

В работе [55] отмечается, что исследования клеточных процессов и генных регуляторных сетей внутри живых клеток требуют улучшения технологии динамического клеточного отображения. В качестве решения авторы предлагают микрофлюидную систему, которая обладает специальными камерами для механического захвата клеток в непрерывном потоке, а также способностью переключения потока во время покадровой флуоресцентной регистрации с высоким увеличением. Функциональность системы была подтверждена путем наблюдения за реакцией феромон-индуцированной экспрессии ЗФБ в клетках *Saccharomyces cerevisiae*.

Другой пример использования флуоресцентной микроскопии в качестве метода регистрации микрочастиц рассмотрен в статье [56]. В работе изложена методика измерения кинетики связывания антиген—антитело для антител, выделяемых из отдельной клетки, при помощи флуоресцентных микрочастиц (шариков).

Известно, что развитие некоторых инфекционных заболеваний может быть связано с подавлением или усилением апоптоза (программируемая клеточная гибель, регулируемый процесс самоликвидации на клеточном уровне). Например, массовый апоптоз развивается при сепсисе. Гибель

лимфоцитов путем апоптоза находится в положительной корреляции с быстрой прогрессией СПИДа. Кроме того, апоптоз является преобладающей формой гибели клеток миокарда в ранний период развития инфаркта. На основе экспериментальных данных выявлено, что программируемая гибель кардиомиоцитов также может быть обусловлена гипоксией, ишемией, перегрузкой клетки кальцием, воспалением, токсинами [57].

В области изучения программируемой клеточной гибели за прошедшие несколько лет стали успешно применяться микрофлюидные технологии, с помощью которых возможно осуществлять иммобилизацию клеток, не влияя на их жизнеспособность, и детально контролировать условия эксперимента. Особого внимания заслуживает статья [58], в которой был предложен простой и эффективный метод визуализации процессов апоптоза при помощи комбинации КЛСМ и МФУ, позволяющий обеспечить постоянное и одновременное наблюдение различных апоптотических событий в одиночных клетках в режиме реального времени.

Пример совмещения МФУ с методом динамической микроскопии фазового контраста приведен в статье [59]. Динамическая микроскопия фазового контраста позволяет осуществлять детектирование в реальном времени с учетом дифракционного предела наблюдения динамических процессов в микроскопическом масштабе. Для микробиологических приложений данный подход является более эффективным по сравнению с традиционной оптической микроскопией из-за присущей фазовой чувствительности низкого светового фона, отсутствия флуоресцентных красителей и возможности регистрировать движение. Динамическая микроскопия фазового контраста в комбинации с МФУ более выгодна по трем причинам: трассирующие частицы выделяются, в то время как статический фон подавляется, что дает контрастные изображения для последующей оценки поля скорости потока; если постоянная времени системы выбрана соответствующим образом, наблюдаются траектории формирования и движения частиц, что позволяет наблюдать непосредственно поле скоростей потока; микропроцессы перемешивания можно наблюдать без трассирующих частиц.

К МФУ второй группы, можно отнести устройство, представленное в статье [60]. Авторы приводят конструкцию разработанной ими микрофлюидной ячейки, совместимой с атомно-силовой микроскопией и силовой спектроскопией. Ячейка собрана из трех сформированных из ПДМС частей и зонда. Зонд для атомно-силовой микроскопии был встроен так, что консоль зонда и наконечник выступают в микрофлюидном канале. Это устройство предназначено для применения

при высоких скоростях сдвига и условии ламинарности потока в водных средах.

В статье [61] также представлен пример МФУ второй группы. Речь идет о специальной жидкостной ячейке в сочетании с кантилевером, предназначенной для системы *patch-clamp*. Используя данный подход, авторы составили карту токов, проявляющихся при стимулировании клеток кератиноцитов человека (*HaCaT*) при помощи кантилевера.

Пример использования микрофлюидики и атомно-силовой микроскопии для изучения влияния химиотерапии на механические параметры клеток рассмотрен в статье [52]. Авторы анализировали эффективность антираковой химиотерапии широко используемыми препаратами (даунорубицин и дексаметазон) на примере клеток лимфобластной и миелоидной лейкемии человека, выделенных из проб нескольких пациентов. Для иммобилизации одиночных клеток применялось многоканальное МФУ, а регистрация изменения механических параметров клетки осуществлялась путем определения давления, оказываемого на нее кантилевером.

Относящееся к первой и третьей группам МФУ, применяемое в комбинации с электрическим и оптическим методами регистрации, рассмотрено в статье [62]. Для изучения механических и электрических свойств клеток в каналах специальной формы (зауженный канал) МФУ на пути тока буферной жидкости размещены электроды. Во время проведения экспериментов выполнялась регистрация профиля импеданса и происходила запись изображений движения клетки через канал. Исходя из полученных данных, авторы определяли время прохождения клетки через канал, отношение амплитуды импеданса во время прохождения клетки через канал, удлинение клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее востребованными МФУ для проведения исследований в биологии и медицине являются устройства, предназначенные для проведения различных манипуляций и операций с биологическими микрочастицами (в том числе с клетками и бактериями). Современные технологии позволяют создать в микро- и наноразмерных масштабах различные функциональные структуры, интегрировать их в каналы или камеры МФУ, а все это дает возможность реализовать новые методы управления биообъектами, разрабатывать принципиально новые методы анализа и диагностики биологических проб. В данном обзоре рассмотрены лишь некоторые примеры микрофлюидных систем,

ориентированных на изучение клеток. На основании анализа современного состояния работ по созданию систем на основе МФУ предложены способы их классификации.

МФУ можно классифицировать, исходя из их функционального назначения, а именно:

- сортировка / разделение частиц;
- фиксация / удерживание частиц;
- культивирование биологических объектов (клеток, бактерий);
- пробоподготовка / обработка образцов.

Другой способ классификации ориентирован на область решаемых задач:

- диагностических;
- аналитических / исследовательских;
- технологических.

Так как в МФУ для регистрации событий применяются различные типы детектирующих устройств и приборов, то еще один способ классификации предполагает дифференциацию устройств в соответствии с методами детектирования:

- оптические;
- сканирующие зондовые;
- электрические.

Применение данного подхода к классификации МФУ охватывает наиболее значимые аспекты, соотносимые с целью, задачами и особенностями приборной реализации устройств.

Работа проведена при поддержке ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы; программы "У.М.Н.И.К."; гранта для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rivet C., Lee H., Hirsch A. et al. Microfluidics for medical diagnostics and biosensors // *Chemical Engineering Science*. 2011. V. 66. P. 1490–1507.
2. Choi S., Goryll M., Sin L.Y.M. et al. Microfluidic-based biosensors toward point-of-care detection of nucleic acids and proteins // *Microfluidics and Nanofluidics*. 2011. V. 10, N 2. P. 231–247.
3. Kaji N., Okamoto Y., Tokeshi M., Baba Y. Nanopillar, nanoball, and nanofibers for highly efficient analysis of biomolecules // *Chemical Society Reviews*. 2010. V. 39. P. 948–956.
4. Li S.-J., Li J., Wang K. et al. A nanochannel array-based electrochemical device for quantitative label-free DNA analysis // *ACS Nano*. 2010. V. 4, N 11. P. 6417–6424.
5. Di Carlo D., Wu L.Y., Lee L.P. Dynamic single cell culture array // *Lab on a chip*. 2006. V. 6. P. 1445–1449.

6. Skelley A.M., Kirak O., Suh H. et al. Microfluidic control of cell pairing and fusion // *Nature Methods*. 2009. V. 6. P. 147–152.
7. Mark D., Haeberle S., Roth G. et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications // *Chemical Society Reviews*. 2010. V. 39. P. 1153–1182.
8. Zhao C.-X., Middelberg A.P.J. Two-phase microfluidic flows // *Chemical Engineering Science*. 2011. V. 66. P. 1394–1411.
9. Pratt E.D., Huang C., Hawkins B.G. et al. Rare cell capture in microfluidic devices // *Chemical Engineering Science*. 2011. V. 66. P. 1508–1522.
10. Giordano B.C., Burgi D.S., Hart S.J., Terray A. On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2012. V. 718. P. 11–24.
11. Le Gac S., Van den Berg A. Single cells as experimentation units in lab-on-a-chip devices // *Trends in Biotechnology*. 2009. V. 28, N 2. P. 55–62.
12. Lavrik N.V., Taylor L.T., Sepaniak M.J. Nanotechnology and chip level systems for pressure driven liquid chromatography and emerging analytical separation techniques: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2011. V. 694. P. 6–20.
13. Wang L., Li P.C.H. Microfluidic DNA microarray analysis: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2011. V. 687. P. 12–27.
14. Xu Y., Yang X., Wang E. Review: Aptamers in microfluidic chips // *Analytica Chimica Acta*. 2010. V. 683. P. 12–20.
15. Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S. et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology // *Nature*. 2007. V. 450. P. 1235–1239.
16. Didar T.F., Tabrizian M. Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices // *Lab on a chip*. 2010. V. 10. P. 3043–3053.
17. Radisic M., Iyer R.K., Murthy S.K. Micro- and nanotechnology in cell separation // *International Journal of Nanomedicine*. 2006. V. 1, N 1. P. 3–14.
18. Godin J., Chen C.-H., Cho S.H. et al. Microfluidics and photonics for Bio-System-on-a-Chip: a review of advancements in technology towards a microfluidic flow cytometry chip // *Biophotonics*. 2008. V. 1, N 5. P. 355–376.
19. Takeda K., Jimma F. Maintenance free biosafety flow-cytometer using disposable microfluidic chip (FISH-MAN-R) // 24th Annual Meeting of the Clinical Cytometry Society, October 16–18, 2009, Jacksonville, Florida. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2009. V. 76 B. P. 395–407.
20. Takao M., Jimma F., Takeda K. Expanded applications of new-designed microfluidic flow cytometer (FISH-MAN-R) // *Ibid*.
21. El-Ali J., Sorger P.K., Jensen K.F. Cells on chips // *Nature Insight: Lab on a chip*. 2006. V. 442, N 7101. P. 367–418.
22. Kovac J., Voldman J. Facile image-based cell sorting using OPTO-FluCS (Opto-fluidic Cell Sorting) // *Proceedings of 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. November 5–9, 2006, Tokyo, Japan. P. 1483–1485.
23. Kim H.-J., Moon H.-S., Kwak B.S., Jung H.-I. Microfluidic device to separate micro-beads with various fluorescence intensities // *Sensors and Actuators B*. 2011. V. 160. P. 1536–1543.
24. Ryu W.H., Huang Z., Park J.S. et al. Open microfluidic system for atomic force microscopy-guided in situ electrochemical probing of a single cell // *Lab on a chip*. 2008. V. 8. P. 1460–1467.
25. Lecault V., Van Insberghe M., Sekulovic S. et al. High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays // *Nature Methods*. 2011. V. 8. P. 581–586.
26. Sun P., Liu Y., Sha J. et al. High-throughput microfluidic system for long-term bacterial colony monitoring and antibiotic testing in zero-flow environments // *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. V. 26. P. 1993–1999.
27. Lin Y.-H., Lee G.-B. An integrated cell counting and continuous cell lysis device using an optically induced electric field // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010. V. 145. P. 854–860.
28. Odorizzi L., Ress C., Collini C. et al. An integrated platform for in vitro single-site cell electroporation: Controlled delivery and electrodes functionalization // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012. V. 170. P. 182–188.
29. Wallace H., George W. Microfluidic system for multi-channel optical measurement of shear-induced platelet thrombosis in unfractionated blood // *Proceedings of 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. October 2–6, 2011. Seattle, Washington, USA. P. 541–543.
30. White A.K., Van Insberghe M., Petriv O.I. et al. High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2011. V. 108. P. 13999–14004.
31. Stimberg V.C., Van den Berg A., Le Gac S. Integrated microfluidic platform for bilayer studies and experimentation on single pore-forming species // *Proceedings of 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. October 2–6, 2011. Seattle, Washington, USA. P. 1400–1402.
32. Wang H.-W., Bao N., Le T.T. et al. Microfluidic CARS cytometry // *Optics Express*. 2008. V. 16, N 8. P. 5782–5789.
33. Su X., Kirkwood S.E., Gupta M. et al. Microscope-based label-free microfluidic cytometry // *Optics Express*. 2011. V. 19, N 1. P. 387–398.
34. Skafte-Pedersen P., Hemmingsen M., Sabourin D. et al. A self-contained, programmable microfluidic cell culture system with real-time microscopy access // *Biomedical Microdevices*. 2012. V. 14, N 2. P. 385–399.
35. Mielnik M.M., Saetran L.R. Micro particle image velocimetry — an overview // *Turbulence*. 2004. V. 10. P. 83–90.
36. Gossett D.R., Tsea H.T.K., Lee S.A. et al. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2012. V. 109, N 20. P. 7630–7635.
37. Godaa K., Ayazi A., Gossett D.R. et al. High-throughput single-microparticle imaging flow analyzer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the USA. 2012. V. 109, N 29. P. 11630–11635.
38. *Rosenbluth M.J., Lam W.A., Fletche D.A.* Analyzing cell mechanics in hematologic diseases with microfluidic biophysical flow cytometry // *Lab on a chip*. 2008. V. 8, N 7. P. 1062–1070.
 39. *Sraj I., Eggleton C.D., Jimenez R. et al.* Cell deformation cytometry using diode-bar optical stretchers // *Journal of Biomedical Optics*. 2010. V. 15, N 4. 047010 (8 pages).
 40. *Andersson H., Baechli T., Hoechl M., Richter C.* Autofluorescence of living cells // *Journal of Microscopy*. 1998. V. 191. P. 1–7.
 41. *DaCosta R., Wilson B., Marcon N.* New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2002. V. 17. P. 85–104.
 42. *Emmelkamp J., Wolbers F., Andersson H. et al.* The potential of autofluorescence for the detection of single living cells for label-free cell sorting in microfluidic systems // *Electrophoresis*. 2004. V. 25. P. 3740–3745.
 43. *Takehara H., Nagaoka A., Noguchi J. et al.* Microfluidic interface devices for in vivo analysis of neural cells using 2-photon laser scanning microscopy // *Proceedings of 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 3–7 October, 2010. Groningen, Netherlands. P. 2111–2113.
 44. *Zeng F., Rohde C.B., Yanik M.F.* Sub-cellular precision on-chip small-animal immobilization, multi-photon imaging and femtosecond-laser manipulation // *Lab on a chip*. 2008. V. 8. P. 653–656.
 45. *Breslauer D.N., Lee P.J., Lee L.P.* Microfluidics-based systems biology // *Molecular BioSystems*. 2006. V. 2. P. 97–112.
 46. *Takayama S., Ostuni E., Le Duc P. et al.* Selective chemical treatment of cellular microdomains using multiple laminar streams // *Chemistry & Biology*. 2003. V. 10. P. 123–130.
 47. *Sawano A., Takayama S., Matsuda M., Miyawaki A.* Lateral propagation of EGF signaling after local stimulation is dependent on receptor density // *Developmental Cell*. 2002. V. 3. P. 245–257.
 48. *Herbst R.S.* Review of epidermal growth factor receptor biology // *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2004. V. 59 (2 Suppl). P. 21–26.
 49. *Zhang H., Berezov A., Wang Q. et al.* ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies // *Journal of Clinical Investigation*. 2007. V. 117, N 8. P. 2051–2058.
 50. *Song J.W., Gu W., Futai N. et al.* Computer-controlled microcirculatory support system for endothelial cell culture and shearing // *Analytical Chemistry*. 2005. V. 77. P. 3993–3999.
 51. *Huh D., Fujioka H., Tung Y.C. et al.* Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2007. V. 104. P. 18886–18891.
 52. *Lam W.A., Rosenbluth M.J., Fletcher D.A.* Chemotherapy exposure increases leukemia cell stiffness // *Blood*. 2007. V. 109, N 8. P. 3505–3508.
 53. *Taniguchi Y., Choi P., Li G.H. et al.* Quantifying E-coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells // *Science*. 2010. V. 329. P. 533–538.
 54. *Bow H., Pivkin I.V., Diez-Silva M. et al.* A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria // *Lab on a Chip*. 2011. V. 11. P. 1065–1073.
 55. *Lee P.J., Helman N.C., Lim W.A., Hung P.J.* A microfluidic system for dynamic yeast cell imaging // *Bio-Techniques*. 2008. V. 44, N 1. P. 91–95.
 56. *Singhal A., Haynes C.A., Hansen C.L.* Microfluidic measurement of antibody–antigen binding kinetics from low-abundance samples and single cells // *Analytical Chemistry*. 2010. V. 82. P. 8671–8679.
 57. *Ярилин А.А.* Апоптоз и его роль в целостном организме // *Глаукома*. 2003. № 1. С. 46–54.
 58. *Munoz-Pinedo C., Green D.R., Van den Berg A.* Confocal restricted-height imaging of suspension cells (CRISC) in a PDMS microdevice during apoptosis // *Lab on a chip*. 2005. V. 5. P. 628–633.
 59. *Denz C., Holtmann F., Woerdemann M. et al.* Nonlinear dynamic phase contrast microscopy for microfluidic and microbiological applications // *Proceedings of SPIE*. 2008. V. 7038. 70380X (10 pages).
 60. *Schoenwald K., Peng Z.C., Noga D. et al.* Integration of atomic force microscopy and a microfluidic liquid cell for aqueous imaging and force spectroscopy // *Review of Scientific Instruments*. 2010. V. 81, N 5. 053704 (5 pages).
 61. *Upadhye K.V., Candiello J.E., Davidson L.A., Lin H.* Whole-cell electrical activity under direct mechanical stimulus by AFM cantilever using planar patch clamp chip approach // *Cellular and molecular bioengineering*. 2011. V. 4, N 2. P. 270–280.
 62. *Chen J., Zheng Y., Tan Q. et al.* Classification of cell types using mechanical and electrical measurement on single cells // *Proceedings of 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. October 2–6, 2011. Seattle, Washington, USA. P. 795–797.

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (Кухтевич И.В., Евстапов А.А., Букатин А.С.)

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Кухтевич И.В., Евстапов А.А.)

Санкт-Петербургский академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН (Евстапов А.А., Букатин А.С.)

Контакты: Кухтевич Игорь Владимирович, ba@inbox.ru

Материал поступил в редакцию 15.07.2013

MICROFLUIDIC DEVICES FOR CELL STUDIES: REVIEW

I. V. Kukhtevic^{1,2}, A. A. Evstrapov^{1,2,3}, A. S. Bukatin^{1,3}

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*

²*St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics*

³*St. Petersburg Academic University — Nanotechnology Research and Education Center RAS*

In the review modern works devoted to study and development of microfluidic devices are discussed. Ways of microfluidic devices classification are suggested. These ways connected with: functional purpose of devices; field of tasks which devices are solved; investigated object detection methods that applied to microfluidic devices.

Keywords: microfluidic device, microfluidic chip, cell, bacterium, optical methods, scanning probe microscopy, electrical detection methods