

---

---

**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**

---

---

УДК 004.94+57.086+532.5.011

© К. И. Белоусов, А. С. Букатин, В. И. Чубинский-Надеждин,  
В. Ю. Васильева, Ю. А. Негуляев, А. А. Евстапов, И. В. Кухтевич

## **МИКРОФЛЮИДНОЕ УСТРОЙСТВО С Y-ОБРАЗНОЙ ТОПОЛОГИЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИГРАЦИИ КЛЕТОК В ГРАДИЕНТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОАТТРАКТАНТОВ**

Обсуждаются результаты разработки микрофлюидного устройства для исследования миграции клеток под действием хемоаттрактантов. Проведены численные расчеты распределения концентрации хемоаттрактанта в различных конструкциях микрофлюидного чипа, а также оценена сила взаимодействия клеток с потоком жидкости. На основе результатов моделирования разработана конструкция микрофлюидного чипа. Изготовление микрофлюидных устройств для экспериментальных исследований осуществлялось методом "мягкой" литографии в полидиметилсилоксане. Приведены результаты исследований, выполненные на примере клеток CHO и НерG2, подтверждающие работоспособность чипа и адекватность предлагаемого подхода.

*Кл. сл.:* микрофлюидика, микрофлюидный чип, миграция клеток, градиент концентрации, компьютерное моделирование

### **ВВЕДЕНИЕ**

Направленная клеточная миграция играет важную роль в ряде физиологических процессов, например таких, как защита организма от инфекций и вирусов, заживление ран и т. п. [1, 2]. Одним из факторов, влияющих на клеточную миграцию, является пространственная вариация концентрации активного химического вещества, хемоаттрактанта. К данным веществам можно отнести факторы роста, питательные вещества и др. Изучение их влияния на подвижность клеток позволяет лучше понять как механизмы миграции, так и процессы взаимодействия самих хемоаттрактантов и клеток, что является важным при создании новых лекарственных средств и разработке аналитических методик [3, 4]. В настоящее время распространены традиционные методы изучения миграции клеток в градиенте химических веществ: исследование с помощью камеры Бойдена (проницаемых мембран) [5]; с использованием агарозы [6]; путем раскапывания сверхмалого объема хемоаттрактанта [7]; с применением камер Зигмунда [8] и камер Дунна [9]. Однако данные методы не всегда дают возможность контролировать создаваемый градиент концентрации, поддерживать его постоянное значение или проводить его изменение. Устранить эти недостатки позволяют микрофлюидные устройства, которые, кроме того, уменьшают расход реагентов и обеспечивают условия для наблюдения подвижности отдельных клеток в режиме реального времени методами оптической микроскопии [10].

По принципу формирования градиента микрофлюидные устройства для изучения миграции можно условно разделить на проточные и диффузионные. Если у первых градиент создается за счет смешения контролируемых потоков растворов с разной концентрацией хемоаттрактантов, то у вторых он формируется за счет диффузии молекул химических веществ, переносимых растворами через мембраны или гидрогели [11]. Обе группы обладают своими достоинствами и недостатками. Например, проточные устройства позволяют оперативно изменять величину градиента, но требуют применения внешних устройств для контроля скорости потоков, а сами потоки создают напряжение сдвига, которое может влиять на клетки. Диффузионные устройства, как правило, не нуждаются в применении указанных внешних устройств, в них отсутствует силовое воздействие на клетки со стороны жидкости, но они не обладают возможностью оперативного влияния на значение градиента.

В данной статье освещена работа, целью которой было создание микрофлюидного устройства для исследования миграции клеток, позволяющего быстро изменять величину градиента концентрации хемоаттрактанта и осуществлять изучение клеток методами оптической микроскопии.

В качестве базовой топологии для создания устройства исследования миграции клеток было решено использовать проточную Y-образную топологию [11], в которой имеется два загрузочных

канала, через один из которых подается раствор с хемоаттрактантом, а через другой — буфер. Расположенные симметрично друг напротив друга, эти каналы сопрягаются с реакционной камерой.

Для оптимизации геометрии микрофлюидного устройства были проведены численные исследования распределения концентрации химических веществ в реакционной камере, проведена оценка влияния потоков жидкости на клетки. Одним из важных этапов проведения эксперимента по изучению миграции клеток является их равномерное распределение вдоль контрольной линии (выстраивание). Для осуществления такого выстраивания было проведено численное моделирование седиментации частиц и подготовлена экспериментальная установка. На изготовленных микрофлюидных чипах были проведены тестовые эксперименты для подтверждения адекватности предлагаемого подхода и работоспособности созданных конструкций устройств.

## ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

### Базовые положения

С целью оптимизации выбранной Y-образной топологии для получения наибольшего значения градиента при минимальных расходах пробы было проведено численное моделирование с использованием пакета программ COMSOL Multiphysics. Кроме вышеприведенного критерия учитывались гидродинамические свойства геометрии реакционной камеры и длина пути миграции клеток, которая должна быть достаточной для получения данных об их поведении. При моделировании изучалось влияние гидродинамических потоков на клетки и распределение хемоаттрактанта в каналах и реакционной камере микрофлюидного чипа. Для этого проводилось вычисление распределения концентраций хемоаттрактанта в реакционной камере при различных углах наклона ее стенок, ширины и для разных величин расхода растворов (буфера и хемоаттрактанта). Кроме того, моделировалось движение клеток при их выстраивании вдоль стенки реакционной камеры с помощью центрифугирования, что позволяет получить траектории частиц и оценить время, требуемое для выстраивания клеток. Для определения максимальной скорости подачи реагентов рассчитывались силы, действующие на распластавшуюся клетку со стороны потока раствора.

Для расчета профиля скоростей жидкости решались уравнения Навье—Стокса:

$$\rho \left( \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{u}, \quad (1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0,$$

где  $\mathbf{u}$  — векторное поле скоростей жидкости, м/с;  $\rho$  — плотность жидкости, кг/м<sup>3</sup>;  $\mu$  — вязкость жидкости, Па·с;  $p$  — давление, Па.

Для моделирования распределения концентрации хемоаттрактанта использовался второй закон Фика с добавленным конвективным членом:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla c = D \nabla^2 c, \quad (2)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии реагента, м<sup>2</sup>/с;  $c$  — его концентрация, моль/м<sup>3</sup>.

При исследовании процесса седиментации проекции ускорения по координатам  $a_x$  и  $a_y$ , создаваемого центробежными силами, задавались следующим образом:

$$a_x = -4\pi^2 (v / 60)^2 \sin(\arctan(x / y)) \sqrt{x^2 + y^2},$$

$$a_y = -4\pi^2 (v / 60)^2 \cos(\arctan(x / y)) \sqrt{x^2 + y^2}, \quad (3)$$

где  $v$  — частота вращения центрифуги, об./мин;  $x, y$  — координаты в системе отсчета, связанной с центром центрифуги, м. В качестве противодействующей силы со стороны жидкости на частицу действует сила Стокса

$$\mathbf{F}_s = -6\pi r_p \mu \Delta \mathbf{u}, \quad (4)$$

где  $r_p$  — радиус микрочастицы, м;  $\Delta \mathbf{u}$  — скорость частицы относительно жидкости, м/с.

Траектория движения частицы определялась на основе второго закона Ньютона в импульсной форме

$$\frac{d\mathbf{p}}{dt} = \mathbf{F}, \quad (5)$$

где  $\mathbf{p}$  — вектор момента частицы, кг·м<sup>2</sup>/с<sup>2</sup>;  $\mathbf{F}$  — вектор действующих на нее сил, Н.

Сила, действующая на поверхность клетки, находилась путем интегрирования по ее границе множителей Лагранжа, полученных из ограничений на этой границе и имеющих в данном случае размерность силы на единицу площади. Поскольку рассматривалась плоская задача, полученные значения умножались на среднюю длину распластанной клетки  $l$ , выходящей за плоскость моделирования.

Уравнения решались методом конечных элементов, при этом в случае исследования пространственного распределения реагента и сил, действующих на распластанную клетку, решалась стационарная задача, а при исследовании процесса седиментации были получены значения координат частиц в зависимости от времени.

В качестве среды, заполняющей каналы, рассматривалась водоподобная жидкость с плотностью 1000 кг/м<sup>3</sup> и динамической вязкостью

0.001 Па·с. Коэффициент диффузии хемоаттрактанта выбирался равным  $D = 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  (значение, характерное для белков в воде).

Область моделирования при изучении распределения концентраций веществ представляла собой горизонтальное сечение каналов и реакционной камеры (рис. 1). Было решено ограничиться рассмотрением двумерной задачи, поскольку глубина каналов и реакционной камеры мала (несколько десятков мкм) по сравнению с их длиной (десятки мм) и шириной (сотни мкм) и полагалось, что вертикальные составляющие действующих сил, вертикальный массоперенос не оказывают существенного влияния на исследуемые процессы.

При вводе (загрузке) жидкости по входным каналам (вход 1 и вход 2, рис. 1) использовались граничные условия, соответствующие ламинарному потоку параболического профиля со средней скоростью, равной расходу пробы при глубине каналов 30 мкм. На входе в канал, через который загружался раствор с хемоаттрактантом (вход 1 на рис. 1), выполнялось условие постоянной концентрации, равной 1 моль/м<sup>3</sup>. На входе, соответствующем подаче буферного раствора (вход 2 на рис. 1), — условие нулевой концентрации. На границе, соответствующей выходу, задавалось референтное давление, равное 0. На остальных поверхностях соблюдалось условие "прилипания" жидкости  $\mathbf{u}_{fluid} = 0$ .

В процессе моделирования варьировалась ширина  $L$  реакционной камеры от 300 мкм до 1500 мкм с шагом 400 мкм при  $\alpha = 45^\circ$ . При этом расходы раствора с хемоаттрактантом  $Q_1$  и буферного раствора  $Q_2$  менялись от 0.01 мкл/мин до 2 мкл/мин при равенстве их друг другу. Также исследовалось распределение концентраций при суммарном потоке, равном 2 мкл/мин, и увеличении расхода раствора с хемоаттрактантом с 1 мкл/мин до 1.8 мкл/мин. Изменение угла наклона стенок

камеры  $\alpha$  рассматривалось в интервале от  $75^\circ$  до  $0^\circ$  с шагом  $15^\circ$ .

Моделирование процесса седиментации проводилось на примере микрочастиц диаметром 12, 16 и 25 мкм, соответствующих минимальным, средним и максимальным размерам фибробластов (наиболее исследуемым в биологии клеткам). При этом плотность микрочастиц задавалась равной  $1050 \text{ кг/м}^3$ . Геометрия реакционной камеры соответствовала той, которая была выбрана на предыдущем этапе моделирования. Реакционная камера располагалась в 24 мм от оси вращения центрифуги, что соответствует реальному положению чипа в собранном роторе. Вдоль ближайшей к оси стенки камеры были заданы начальные координаты клеток с шагом 100 мкм, для определения максимального времени седиментации. Частота вращения центрифуги задавалась равной 2000 об./мин.

Расчет сил, действующих на распластавшуюся клетку со стороны потока, также проводился на примере фибробластов. Во взвешенном состоянии они имеют сферическую форму со средним диаметром 16 мкм. При контакте с поверхностью они вытягиваются, достигая в длину 50 мкм при ширине 15 мкм. Таким образом, в первом приближении форму клетки можно представить в виде участка цилиндра, отсеченного плоскостью, параллельной его оси, обладающей тем же объемом, что и клетка в свободном состоянии. Предполагалось, что распластанная клетка располагается поперек потока. Так как размеры клеток много меньше ширины реакционной камеры, то было сделано предположение, что на них действует однородный в поперечном направлении канала поток. Область моделирования представляла собой сечение по глубине реакционной камеры вдоль направления течения жидкости. Значения сил, действующих со стороны натекающего потока жидкости на распластанную клетку, находились для расходов жидкости  $Q$  от 1 мкл/мин до 5000 мкл/мин.

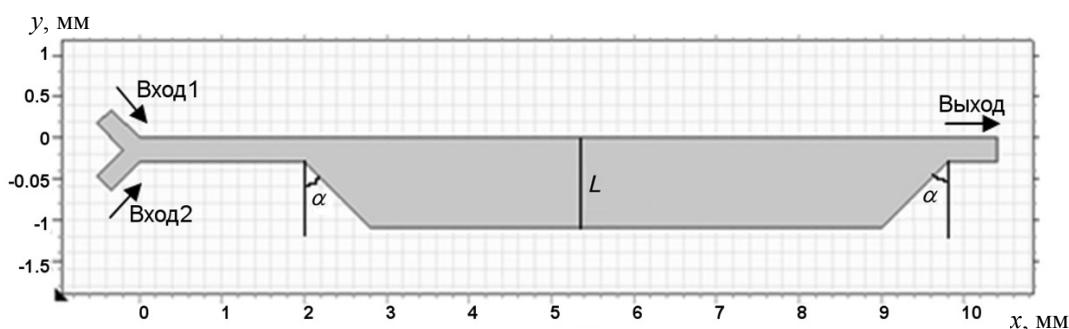
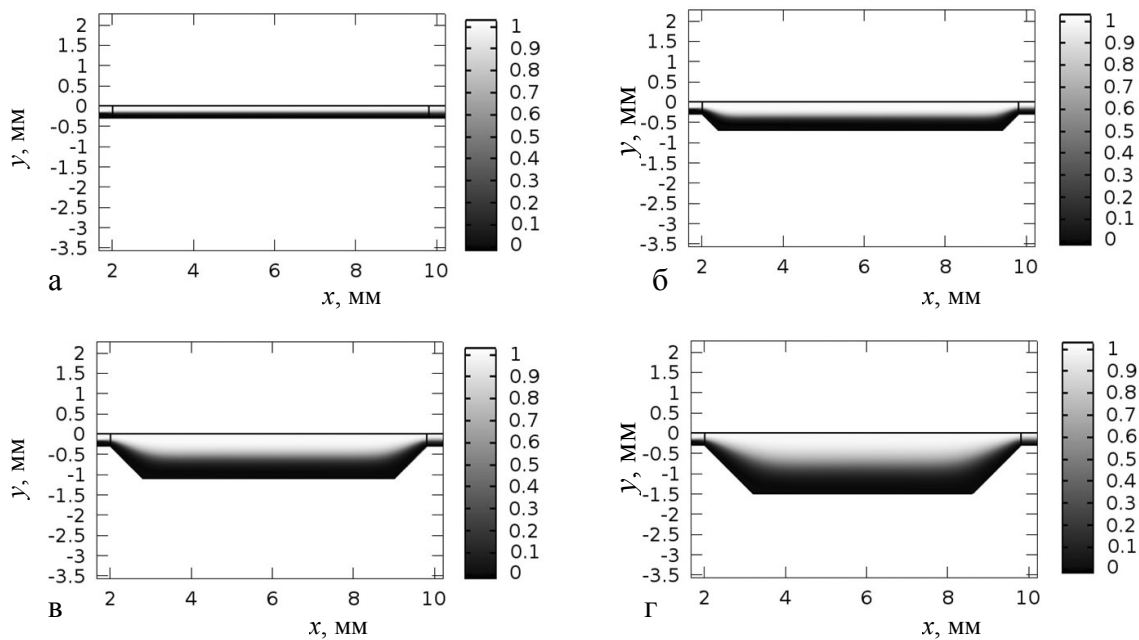


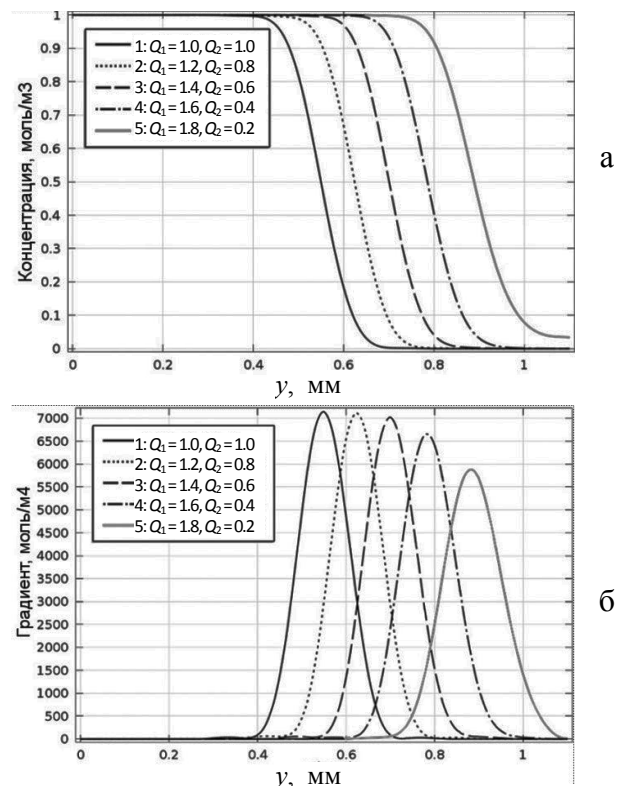
Рис. 1. Область моделирования при исследовании распределения концентраций веществ в реакционной камере



**Рис. 2.** Распределение концентраций хемоаттрактанта и буферного раствора в реакционной камере микрофлюидного чипа при расходах  $Q_1 = Q_2 = 1$  мкл/мин. Ширина реакционной камеры: а) 300 мкм; б) 700 мкм; в) 1100 мкм; г) 1500 мкм. Ширина входных и выходных каналов равна 300 мкм

### Результаты моделирования

В ходе моделирования была выявлена обратно пропорциональная зависимость величины градиента концентрации от ширины реакционной камеры (рис. 2). Так, с ростом ширины в 5 раз (с 300 до 1500 мкм) максимальное значение градиента уменьшилось в 5.3 раза. Это связано с тем, что с ростом ширины реакционной камеры при сохранении постоянным расхода жидкости ее скорость падает, что ведет к увеличению влияния диффузионной составляющей движения реагента и, как следствие, более быстрому выравниванию концентраций. Для исследований была выбрана ширина рабочей камеры, равная 1.1 мм, обеспечивающая возможность как длительного наблюдения миграции клеток, так и получения достаточно больших и протяженных градиентов. Величина расхода жидкостей также влияет на величину градиента. Так, с ростом расходов  $Q_1$  и  $Q_2$  в 200 раз (с 0.01 до 2 мкл/мин) градиент для ширины камеры 1.1 мм увеличился в 33 раза (с 260 до 8570 моль/м<sup>4</sup>), что связано с увеличением влияния конвективной составляющей движения реагента. При изменении отношения потоков  $Q_1$  к  $Q_2$  от 1:1 до 9:1 происходит сдвиг фронта концентрации от середины реакционной камеры на позицию, равную 4/5 от ее ширины (рис. 3, а), при этом величина градиента падает на 18 % (рис. 3, б), что вызвано смещением диффузионной границы в область с меньшей скоростью потока. При вариации угла  $\alpha$  наклона сте-



**Рис. 3.** Концентрационные профили (а) и градиенты концентрации (б), вычисленные в центре реакционной камеры шириной 1.1 мм с углом наклона стенок 45° при различных отношениях расходов хемоаттрактанта и буфера

нок камеры было обнаружено, что плавный переход от каналов к реакционной камере приводит к уменьшению величины градиента. При этом чем меньше скорость жидкости, тем более существенно влияние  $\alpha$ . Так, если расходы  $Q_1$  и  $Q_2$  равны 0.01 мкл/мин, то градиент увеличивается на треть при изменении  $\alpha$  от  $75^\circ$  до  $0^\circ$ , а при  $Q_1 = Q_2 = 2$  мкл/мин — на 6.4 %.

В результате моделирования была выбрана топология реакционной камеры с шириной 1100 мкм и углом наклона стенок  $45^\circ$ , которая позволяет при меньших расходах пробы получить больший градиент концентрации, обладающий достаточной протяженностью для длительного воздействия на клетки.

Моделирование процесса седиментации микрочастиц позволило получить траектории их движения и определить время, требуемое для выравнивания всех частиц вдоль стенки, которое оказалось равным 2.5, 1.5 и 0.6 с соответственно для диаметров 12, 16 и 25 мкм. Полученные траектории имеют прямолинейный характер, и, несмотря на близкое расстояние к оси вращения и большую протяженность камеры, микрочастицы во время центрифугирования не покидают камеру.

Изучение влияния натекающего потока жидкости показало, что достижение силы в 450 нН, необходимой для отрыва фибробласта от стекла [12], происходит при расходе жидкости больше 2000 мкл/мин. Таким образом, предельная величина расхода реагентов значительно превосходит реально используемые.

### ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ

На основе результатов численного моделирования были определены основные размеры элементов конструкции микрофлюидного устройства. Чтобы предотвратить разупорядочивание клеток после их центрифугирования вдоль стенки реакционной камеры, где производится выстраивание клеток, был выполнен массив из 78 углублений-ловушек (с размерами  $40 \times 40$  мкм) (рис. 4, выноска). Изготовление данных устройств осуществлялось из полидиметилсилоксана (ПДМС) методом "мягкой" литографии (отливкой по шаблону/мастер-форме). Для изготовления мастер-форм был применен фоторезист SU-8 2025 (MicroChem, США). Толщина нанесенного слоя фоторезиста составляла 30 мкм. Экспонирование слоя SU-8 осуществлялось методом контактной фотолитографии на установке MJB4 (SUSS MicroTec, Германия). Фотошаблоны для контактной литографии представляли собой стеклянную пластинку с нанесенным слоем хрома. Рисунок, соответствующий

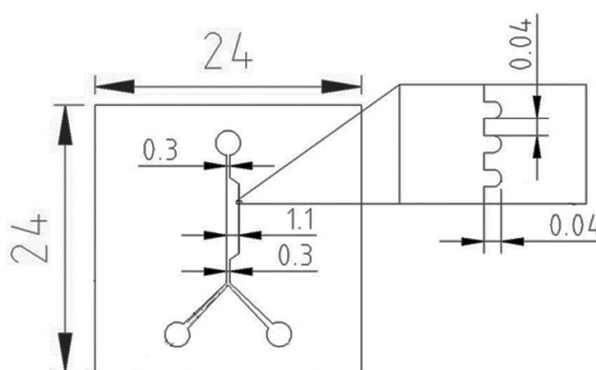


Рис. 4. Эскиз топологии микрофлюидного чипа для изучения влияния хемоаттрактантов на клетки. Размеры указаны в мм

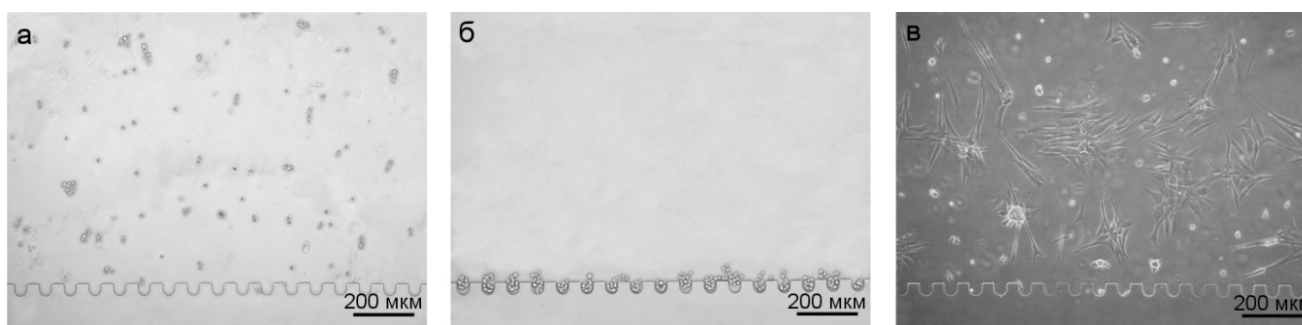
разработанной топологии, формировался на установке лазерной литографии DWL 66FS (Heidelberg Instruments, Германия).

При отливке реплик (отпечатков) микроструктур по мастер-формам использовался набор Sylgard 184 (Dow Corning, США), состоящий из основы и отвердителя, смешиваемых в пропорции 10:1. Смесь дегазировали в течение 20 мин, а затем наносили на шаблон и производили ее отверждение при температуре  $65^\circ\text{C}$  в течение 4 ч. По окончании процесса отверждения готовые реплики отделялись от формы, обрезались до требуемого размера ( $24 \times 24$  мм) и в них проделывались отверстия под загрузочные/сливные резервуары с помощью пробойника.

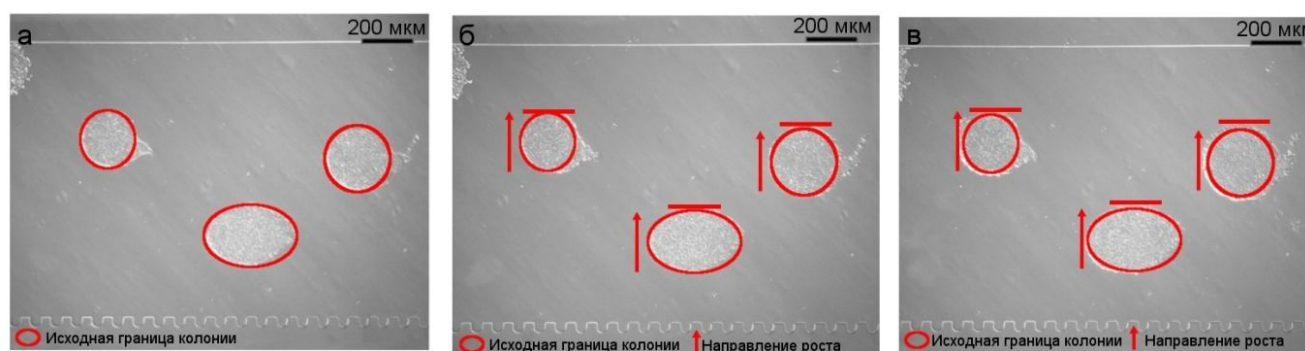
Герметизация микрофлюидных устройств проводилась путем активации поверхностей ПДМС реплики и стекла в кислородной плазме с последующим их соединением. Плазменная обработка в кислородной среде проводилась в течение 1.5 мин на установке Plasma Systems ZEPТО (Diener Electronic, Германия).

### ПРОВЕРКА РАБОТОСПОСОБНОСТИ УСТРОЙСТВА

Проверка работоспособности микрофлюидных устройств проводилась на клетках CHO и HepG2. На клетках CHO была отработана методика выстраивания клеток в реакционной камере микрофлюидного устройства и их культивирования. Методика выстраивания состояла из стадий: загрузки в устройство (рис. 5, а); выстраивания клеток в устройстве путем центрифугирования в течение 15 с (с учетом времени выхода на режим и времени, необходимого на остановку) при 2000 об./мин (рис. 5, б). После позиционирования клеток



**Рис. 5.** Изображения распределения клеток СНО в реакционной камере микрофлюидного устройства. а — после загрузки; б — после центрифугирования; в — после 20 ч культивирования клеток на чипе



**Рис. 6.** Влияние градиента фактора роста на клетки HepG2 в реакционной камере микрофлюидного устройства. а — начало эксперимента; б — спустя 5 ч; в — спустя 10 ч

в реакционной камере чип помещался в чашку Петри и заливался раствором DMEM. Затем чашка Петри с содержимым помещалась в инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры в 37 °С и концентрации CO<sub>2</sub> на уровне 5 %, и выдерживалась 20 ч для распластывания клеток в реакционной камере и начала цикла деления (рис. 5, в).

На примере HepG2 были проведены эксперименты, подтверждающие работоспособность разработанного устройства для исследования миграции клеток. Известно, что в присутствии фактора роста данные клетки начинают мигрировать в направлении увеличения его концентрации [13]. Так как клетки HepG2 растут в виде колоний, то было решено отказаться от процедуры выстраивания, поскольку каждая колония клеток обладает выраженной границей, которую можно принять за базовую линию. Поэтому после загрузки клеток в устройство выполнялась только процедура их культивирования. Затем чашка Петри с микрофлюидным устройством, залитым жидкостью, переносилась из инкубатора на предметный столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия), к устройству присоединялись капилляры, через которые осуществлялась подача растворов

DMEM с эпидермальным фактором роста и с буферным раствором. Скорость расхода растворов 0.25 мкл/мин обеспечивалась при помощи шприцевого насоса 70-2209 (Harvard apparatus, США). Предметный столик микроскопа, оснащенный системой контроля температуры и CO<sub>2</sub>, осуществлял поддержание температуры в 37 °С и уровня CO<sub>2</sub> в 5 %. Эксперимент проводился в течение 10 ч с регистрацией процессов в реакционной камере микрофлюидного устройства каждые 5 мин. Результаты, полученные в ходе эксперимента (рис. 6), свидетельствуют, что разрастание колоний клеток HepG2 происходит преимущественно в направлении увеличения концентрации фактора роста примерно на 10 %, в то время как в противоположном направлении прирост колоний составил не более 1 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микрофлюидное устройство, созданное на основе Y-образной топологии, позволяет осуществлять исследования влияния градиента концентрации химических веществ на миграцию клеток. Проведенное численное моделирование дало оп-

тимизацию базовой Y-образной проточной топологии микрофлюидного устройства по величине формируемого градиента концентрации хемоаттрактанта, а также возможность исследовать режимы центрифугирования и силу воздействия потока жидкости на распластавшуюся клетку. Установлено, что геометрия реакционной камеры шириной 1.1 мм с углом перехода между каналами и реакционной камерой, равным 45°, позволяет при наименьших расходах пробы получить наибольший градиент концентрации, имеющий достаточную протяженность для длительного воздействия на клетки.

Результаты расчета процесса седиментации клеток показали, что клетки во время центрифугирования не покидают камеру, а время, необходимое для выстраивания клеток вдоль базовой линии, не превышает 2.5 с. Установлено, что использование потоков жидкости в интервале от 0.01 до 2 мкл/мин является недостаточным для отрыва клеток от стеклянной подложки.

Отработанные методики выстраивания и культивирования на примере клеток СНО в реакционной камере устройства позволяют относительно просто организовывать базовую линию клеток в специальных фиксирующих ловушках для экспериментов по исследованию миграции. Тестовые испытания, проведенные с использованием клеток HepG2, свидетельствуют, что разрастание колоний клеток преимущественно происходит в направлении увеличения концентрации фактора роста, что подтверждает работоспособность предложенного устройства.

Таким образом, рассмотренный в работе подход позволяет рассчитывать и создавать микрофлюидные устройства для исследования миграции клеток в градиенте концентрации хемоаттрактантов. Такие микрофлюидные устройства могут найти широкое применение при проведении фундаментальных и прикладных исследований в биологии, фармакологии и экологии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Университета ИТМО в рамках проекта № 415831, а также поддержке РФФИ в рамках проектов № 14-08-31641, №15-04-00905 и № 16-04-00467.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jin T., Xu X., Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease // *Cytokine*. 2008. Vol. 44. P. 1–8. Doi: 10.1016/j.cyto.2008.06.017.
2. Zhao M. Electrical fields in wound healing-an overriding signal that directs cell migration // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2009. Vol. 20. P. 674–682. Doi: 10.1016/j.semcdb.2008.12.009.
3. Luster A.D., Alon R., von Andrian U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets // *Nature Immunology*. 2005. Vol. 6. P. 1182–1190. Doi: 10.1038/ni1275.
4. Yonekawa K., Harlan J.M. Targeting leukocyte integrins in human diseases // *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. Vol. 77. P. 129–140. Doi: 10.1189/jlb.0804460.
5. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes // *Journal of Experimental Medicine*. 1962. Vol. 115. P. 453–466. Doi: 10.1084/jem.115.3.453.
6. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes // *Journal of Immunology*. 1975. Vol. 115. P. 1650–1656.
7. Lohof A.M., Quillan M., Dan Y., Poo M.M. Asymmetric modulation of cytosolic cAMP activity induces growth cone turning // *Journal of Neuroscience*. 1992. Vol. 12, no. 4. P. 1253–1261.
8. Zigmond S. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors // *Journal of Cell Biology*. 1977. Vol. 75. P. 606–616. Doi: 10.1083/jcb.75.2.606.
9. Zicha D., Dunn G., Jones G. Analyzing chemotaxis using the Dunn direct viewing chamber // *Methods in Molecular Biology*. 1997. Vol. 75. P. 449–457. Doi: 10.1385/0-89603-441-0:449.
10. Kim S., Kim H.J., Jeon N. Biological applications of microfluidic gradient devices // *Integrative Biology*. 2010. Vol. 2. P. 584–603. Doi: 10.1039/c0ib00055h.
11. Кухтевич И.В., Белоусов К.И., Букатин А.С., Евстапов А.А. Топологии микрофлюидных устройств для изучения миграции клеток в градиентах химических веществ (обзор) // *Научное приборостроение*. 2015. Т. 25, № 1. С. 3–16. URL: <http://213.170.69.26/mag/2015/abst1.php#abst1>.
12. Yamamoto A., Mishima S., Maruyama N., Sumita M. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000. Vol. 50, no. 2. P. 114–124. Doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(200005)50:2<114::AID-JBM4>3.0.CO;2-6.
13. Hu Z.Z., Du J., Yang L. et al. GEP100/Arf6 is required for epidermal growth factor-induced ERK/Rac1 signaling and cell migration in human hepatoma HepG2 cells // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, no. 6. e38777. Doi: 10.1371/journal.pone.0038777.

**Университет ИТМО, Санкт-Петербург**  
(Белоусов К.И., Евстапов А.А., Кухтевич И.В.)

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

**Санкт-Петербургский национальный исследова-**  
**тельский академический университет РАН**  
(Букатин А.С., Евстапов А.А.)

**Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург**  
(Чубинский-Надеждин В.И., Васильева В.Ю., Негуляев Ю.А.)

**Санкт-Петербургский политехнический**  
**университет Петра Великого** (Негуляев Ю.А.)

Контакты: Белоусов Кирилл Ильич,  
belousov\_k.i@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 23.12.2015

## MICROFLUIDIC DEVICE WITH Y-SHAPED DESIGN FOR STUDY OF CELL MIGRATION IN CONCENTRATION GRADIENT OF CHEMOATTRACTANTS

**K. I. Belousov<sup>1</sup>, A. S. Bukatin<sup>2,3</sup>, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin<sup>4</sup>, V. Y. Vasilyeva<sup>4</sup>,  
Y. A. Negulyaev<sup>4,5</sup>, A. A. Evstrapov<sup>1,2,3</sup>, I. V. Kukhtevich<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*ITMO University, Saint-Petersburg, Russia*

<sup>2</sup>*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia*

<sup>3</sup>*Saint-Petersburg National Research Academic University RAS, Russia*

<sup>4</sup>*Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

<sup>5</sup>*Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Russia*

Results of a development of microfluidic device for a study of cell migration under an influence of chemoattractant are discussed. Numerical simulation of chemoattractant distribution in various designs of microfluidic chip and estimations of the cells' interaction with the liquid flow are conducted. Microfluidic chip design is chosen based on the simulation results. Microfluidic devices for experimental research are made by a soft lithography method in polydimethylsiloxane. The results of experiments carried out using CHO and HepG2 cells confirm the efficiency of the microfluidic chip and proposed approach.

**Keywords:** microfluidics, microfluidic device, cell migration, concentration gradient, computer simulation

### REFERENCES

- Jin T., Xu X., Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*, 2008, vol. 44, pp. 1–8. Doi: 10.1016/j.cyto.2008.06.017.
- Zhao M. Electrical fields in wound healing—an overriding signal that directs cell migration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2009, vol. 20, pp. 674–682. Doi: 10.1016/j.semedb.2008.12.009.
- Luster A.D., Alon R., von Andrian U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, 2005, vol. 6, pp. 1182–1190. Doi: 10.1038/ni1275.
- Yonekawa K., Harlan J.M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005, vol. 77, pp. 129–140. Doi: 10.1189/jlb.0804460.
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1962, vol. 115, pp. 453–466. Doi: 10.1084/jem.115.3.453.
- Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Journal of Immunology*, 1975, vol. 115, pp. 1650–1656.
- Lohof A.M., Quillan M., Dan Y., Poo M.M. Asymmetric modulation of cytosolic cAMP activity induces growth cone turning. *Journal of Neuroscience*, 1992, vol. 12, no. 4, pp. 1253–1261.
- Zigmond S. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *Journal of Cell Biology*, 1977, vol. 75, pp. 606–616. Doi: 10.1083/jcb.75.2.606.
- Zicha D., Dunn G., Jones G. Analyzing chemotaxis using the Dunn direct viewing chamber. *Methods in Molecular Biology*, 1997, vol. 75, pp. 449–457. Doi: 10.1385/0-89603-441-0:449.
- Kim S., Kim H.J., Jeon N. Biological applications of micro-



- fluidic gradient devices. *Integrative Biology*, 2010, vol. 2, pp. 584–603. Doi: 10.1039/c0ib00055h.
11. Kukhtevich I.V., Belousov K.I., Bukatin A.S., Evstrapov A.A. [Designs of microfluidic devices for cell migration study in chemical gradients (review)]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Science Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 1, pp. 3–16. Doi: 10.18358/np-25-1-i316 (In Russ.).
  12. Yamamoto A., Mishima S., Maruyama N., Sumita M. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, vol. 50, no. 2, pp. 114–124. Doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(200005)50:2<114::AID-JBM4>3.0.CO;2-6.
  13. Hu Z.Z., Du J., Yang L. et al. GEP100/Arf6 is required for epidermal growth factor-induced ERK/Rac1 signaling and cell migration in human hepatoma HepG2 cells. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 6, e38777. Doi: 10.1371/journal.pone.0038777.

Contacts: *Belousov Kirill Il'ich*,  
belousov\_k.i@mail.ru

Article received in edition: 23.12.2015