

УДК 67.02:[57.086.832.6:57.085.23+53.084.2]+532.5.071.4

© А. С. Якимов, Е. Д. Осипова, А. В. Моргун, Е. Б. Бойцова,
П. И. Белобров, В. В. Салмин, А. Б. Салмина, 2019

ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ МИКРОФЛЮИДНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Прототипирование и разработка микрофлюидных систем для многих неспециализированных исследовательских биомедицинских лабораторий недоступны из-за дороговизны набора необходимого оборудования. Мы разработали способ переноса позитивного рисунка, сформированного методом фрезерования, с поверхности полиметилметакрилата на поверхность полидиметилсилоксана. Было обнаружено, что зуботехническая силиконовая масса для дублирования моделей Zhermack Elite double 22 имеет слабую адгезию на границе между давно застывшим слоем и застывающим. Это позволило дважды снять реплику с канализированной поверхности и получить копию фрезерованной канализированной поверхности на эластичном материале и показать, что полученный таким образом микрофлюидный чип пригоден для культивирования клеток.

Кл. сл.: микрофлюидный чип, полидиметилсилоксан, фрезерование, реплика, проточное культивирование

ВВЕДЕНИЕ

Развитие технологической базы медицинской метрологии требует новых устройств, среди которых микрофлюидные платформы занимают одно из лидирующих мест. Основной особенностью медико-биологических измерений является принципиальная невозможность создания эталонов живых систем. Единственный вариант получения эталонов, допускающих статистическую обработку, дающий возможность получения достоверных данных, состоит в применении приборов, получающих количественные и визуальные биомедицинские характеристики пациента, интегрированные с качественными экспертными оценками в системы калибровок и шаблонов.

Биологические параметры, которые воспроизводятся в таких устройствах, позволяющих совместно согласовать условные числовые характеристики, полученные микрофлюидной системой, и нечисловые медико-биологические переменные, полученные анализом образов состояния биологического объекта, являются основным результатом точной и объективной диагностики. Моделью такого устройства может быть микрофлюидный чип с биологическим модулем, совмещенным с микроскопом, позволяющим делать микрофотографии биологических объектов и структур для их автоматического или полуавтоматического анализа [1, 2].

Поэтому современные микрофлюидные технологии предоставляют широкий инструментарий для исследования и построения новых биологиче-

ских измерителей. Создаются специализированные ячейки, в которых моделируются и изучаются различные биологические структуры, в т.ч. мышца [3], сосуд [4, 5] и гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [6]. Для изготовления этих микрофлюидных структур наиболее распространенным методом изготовления является литография. Но для большинства биомедицинских научных лабораторий такой метод остается недоступным из-за дороговизны. Поэтому для прототипирования микрофлюидных чипов можно использовать метод фрезерования [7] термопластических материалов. Работа с термопластическими материалами осложнена на стадии герметизации: необходимо использовать высокие температуры или органические растворители для приклеивания герметизирующей пластины, что не позволяет встроить во фрезерованный чип материалы с микроструктурами или живые клетки. С помощью фрезерования можно изготавливать не только сами чипы, но и формы для их отливки полидиметилсилоксаном (ПДМС), который имеет хорошую адгезию к стеклу и самому себе. Для этого форма для отливки должна быть негативной, т.е. канализированный рисунок должен возвышаться над основной плоскостью поверхности. При фрезеровании негативной формы возникает проблема того, что основная плоскость получается шероховатой, а это влияет на последующую герметизацию чипа. Полировка сильно меняет геометрию каналов или не приводит к желаемому результату вблизи возвышающихся структур.

Одним из интересных направлений использования микрофлюидных платформ является моделирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и нейрогенной ниши головного мозга *in vitro*. Решение технологических задач в рамках этого направления обеспечит прогресс в разработке новых диагностических и терапевтических технологий при заболеваниях центральной нервной системы. С учетом того, что клетки нейроваскулярной единицы головного мозга (церебральные эндотелиоциты, периваскулярные астроциты, нейроны, перициты) являются весьма чувствительными к условиям культивирования [8], требования к микропотоковой системе для их выживания, развития и функционирования являются достаточно высокими.

Цель работы: провести полный цикл изготовления микрофлюидной проточной камеры для культивирования клеток, доступных для проведения медико-биологических измерений, и согласовать микрофлюидную платформу с достаточным комплектом периферического оборудования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оптимизации топологии микрофлюидного чипа в системе проектирования COMSOL Multiphysics (COMSOL, Швеция) строилась двумерная математическая модель ламинарных многофазных потоков на основе метода функции уровня. Геометрическая модель канализированной поверхности и алгоритм технологического процесса производства подготавливались в системе Fusion 360 (Autodesk, США). Канализированная поверхность изготавливалась из пластинки полиметилметакрилата (ПММА) Novattro (СафПласт, Россия) толщиной 2 мм на фрезерном станке с ЧПУ Modela MDX-20 (Roland, Япония) с помощью торцевой двузубой фрезы RM-0100.3.030.40, T2-10 (Hanita Metal Works, Израиль). Параметры фрезерования: режим фрезерования "на зуб", глубина реза — 0.25 мм, подача на зуб — 23 мкм, охлаждающая жидкость — дистиллированная вода. После фрезерования поверхность полировалась над парами дихлорэтана-1,2 (ч.д.а.) в течение 10 с. Для изготовления отливочной формы использовалась смесь эпоксидной смолы Type R123 и отвердителя Type R614 (VossChemie, Германия) в соотношении 100:49. Корпус чипа изготавливался из компаунда полидиметилсилоксана (ПДМС) Sylgard 184 (Dow Corning, США). Для присоединения фитингов в ПДМС вырезались отверстия с помощью пробойника диаметром 1 мм (Miltex, Япония). Для герметизации микрофлюидных чипов использовалась предварительная активация соединяемых поверхностей в холодной плазме в течение 120 с, и после соединения чип выдержи-

вался при температуре 115 °С в течение 15 мин. Прочка жидкости осуществлялась с помощью шприцевого насоса, оснащенного шаговым двигателем PL57GH76-50D8 (Purelogic, Россия) с редуктором, и стеклянных шприцев со штоками из фторопласта (Hamilton, Швейцария) объемом 5 и 1 мл, которые были подключены к микрофлюидным чипам гибким капилляром (Tygon Tubing, Франция) с внутренним диаметром 0.5 мм и фитингами, изготовленными из точных дозирующих наконечников 0.5'' (Adhesive Dispensing, Англия).

Выделение клеток головного мозга крыс и получение культуры астроцитов производили по описанной ранее методике [8]. Далее клетки культивировались в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамин и антибиотика (пенициллин/стрептомицин). Визуализация клеток проводилась методом микроскопии с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad Laboratories, США), для регистрации ядер использовался флуоресцентный краситель DAPI.

Анализ образов и связь с внешней базой данных медицинских и биологических нечисловых переменных производились коллективом авторов с помощью пакета для обработки изображений ImageJ (NIH, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Была изготовлена позитивная копия канализированной поверхности из ПДМС по позитивному шаблону, изготовленному методом фрезерования ПММА. Для этого с поверхности ПММА была снята реплика силиконовой массой Elitedouble 22 (Zhermack, Италия). И затем, после полного отверждения в течение нескольких часов, в эту реплику была повторно залита та же силиконовая масса без использования разделяющих слоев. Сразу после того как второй слой перестал липнуть и приобрел достаточную прочность, но не отвердел окончательно и не набрал номинальную упругость, слои были механически рассоединены, и в результате получилась позитивная копия канализированной поверхности из эластичного материала, сформированная методом фрезерования. Используя эту реплику можно изготовить отливочную форму для заливки ПДМС [9]. Использование первичной реплики в качестве формы для заливки ПДМС привело к тому, что застывший ПДМС не удалось извлечь из формы из-за слишком высокой адгезии.

Данный метод позволил изготовить методом фрезерования микрофлюидную камеру из ПДМС для культивирования клеток головного мозга. Для этого на основе чипов, описанных в статьях [10, 11], была предложена конструкция микрофлюид-

ного чипа. На пластинках чипа формируется по одному прямому каналу таким образом, чтобы при склеивании этих пластинок образовывалось место пересечения каналов. В этой области пересечения между пластинками располагается полупроницаемая мембрана из поликарбоната с размером пор 3 мкм, вырезанная из вставки от 24-луночного планшета для культивирования клеток (SPL Lifesciences, Южная Корея). В месте пересечения каналы расширяются для увеличения полезной площади. Таким образом каждый канал формирует камеру, состоящую из двух сонаправленных гидродинамических диффузоров.

Для решения проблемы заполнения этой камеры питательной средой без образования пузырей воздуха и застойных зон, где среда в процессе

перфузирования чипа не будет меняться, были предложены несколько топологий и проведена их оптимизация. В результате выявлено, что при краевом угле смачивания 87° , при увеличении ширины камеры относительно ширины капилляра более чем в 3 раза и при угле диффузора $>50^\circ$ в углах камеры образуется пузырь воздуха. Наличие препятствий на осевой линии канала не решает эту проблему, т.к. появляется пузырь воздуха за препятствием. При увеличении длины камеры во время ее заполнения пузыри не образуются при расширении канала до 4 раз при угле диффузора 50° . В углах такой камеры наблюдаются обратные потоки в результате эффекта ламинарной рециркуляции, что препятствует образованию зон застоя среды (рис. 1).

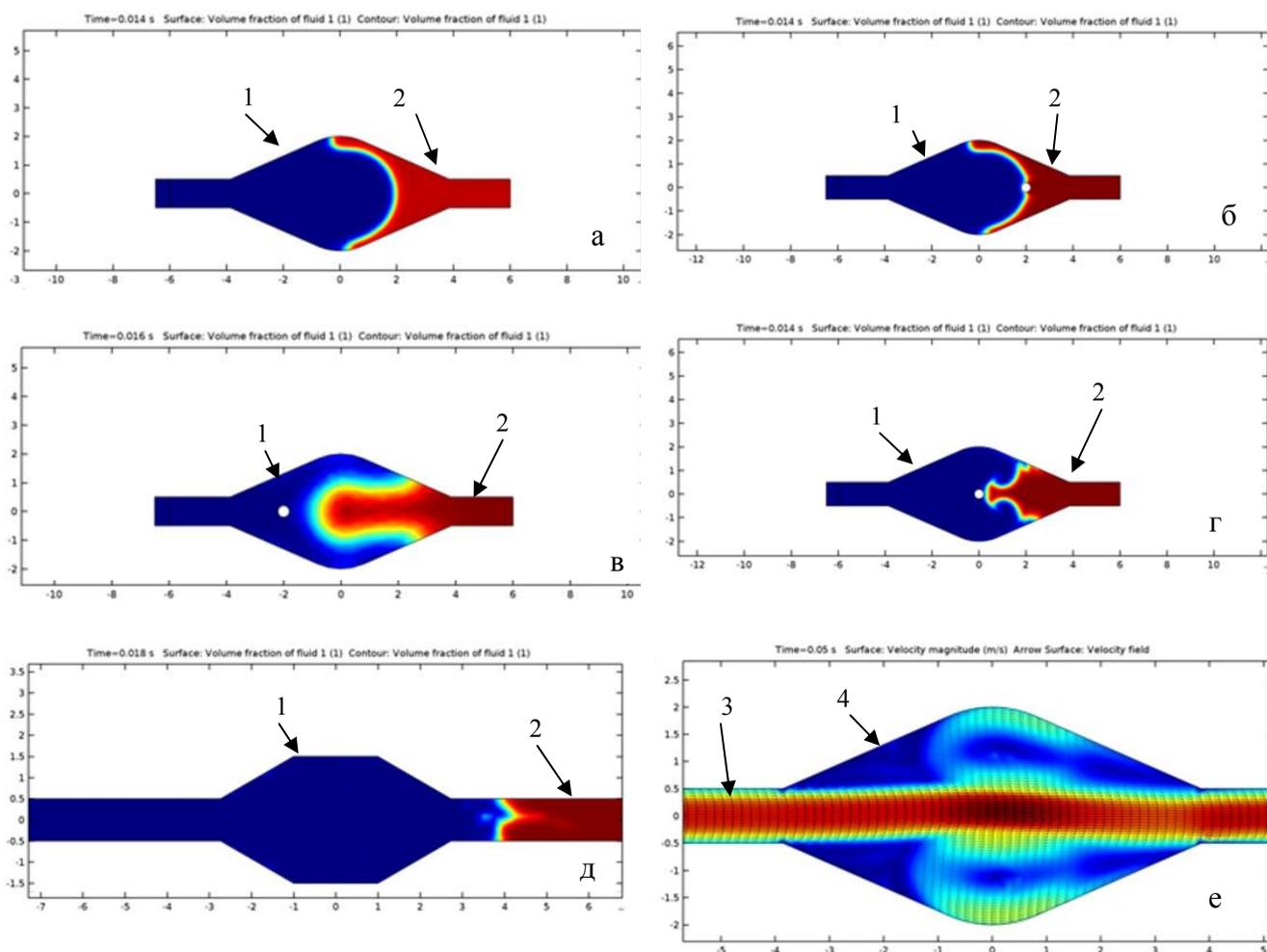


Рис. 1. Результаты моделирования процесса заполнения камер различной формы и с различными разделителями потока.

Поток направлен слева направо. На а–д: 1 —заполняющая жидкость, 2 — вытесняемый жидкостью воздух. Пузыри образуются: а, б — в углах камеры; в, г — за разделителем потока. На е — магнитуда скорости установившегося потока в камере чипа без препятствий (окрас 3 соответствует максимальной скорости, 4 — минимальной)

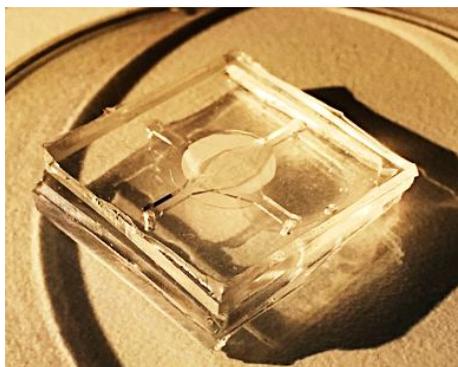
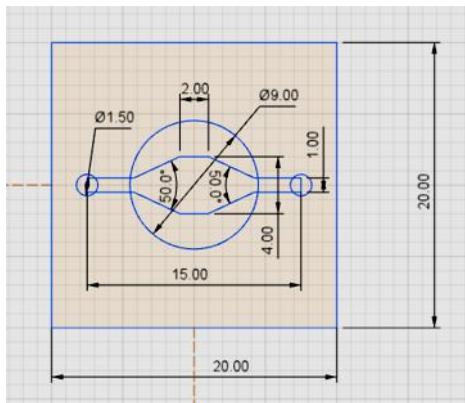


Рис. 2. Чертеж пластинки чипа (а) и изготовленный чип с полупроницаемой мембраной после герметизации (б)

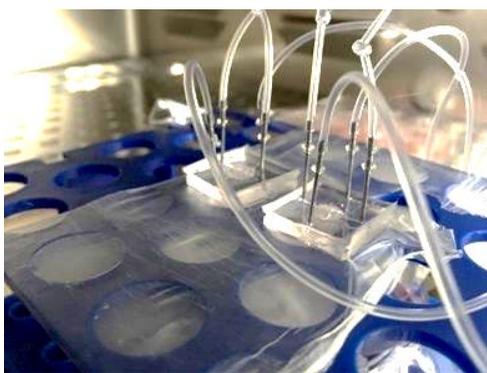


Рис. 3. Микрофлюидный чип для культивирования клеток головного мозга в CO_2 -инкубаторе, подключенный к системе перфузирования питательной средой

В результате была выбрана топология, которая представлена на рис. 1, д, и 2, а, и изготовлен из ПДМС микрофлюидный чип для культивирования клеток мозга (рис. 2, б). При глубине рисунка 0.5 мм объем камер с каждой стороны мембраны был по 16 мкл.

Было изготовлено 2 чипа. Они были заполнены питательной средой и затем верхние камеры заправлялись средой с клетками плотностью $2 \cdot 10^4 \text{ мл}^{-1}$. Скорость потока устанавливалась 1.2 мкл/мин и 5.6 мкл/мин, и чипы помещались в условия CO_2 -инкубатора при 37°C для культивирования клеток (рис. 3).

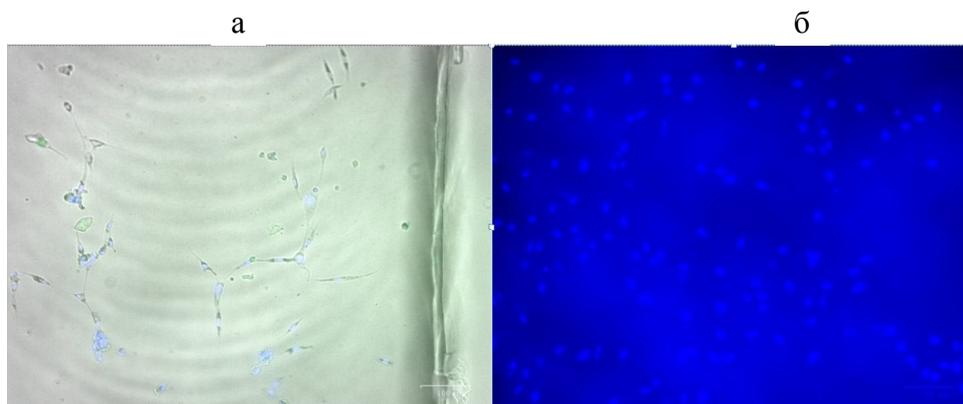


Рис. 4. Микрофотографии астроцитов, окрашенных красителем DAPI. а — в канале микрофлюидного чипа с наложением фазового контраста и аутофлуоресценции, б — в камере микрофлюидного чипа после культивирования, увеличение $\times 175$

Через сутки культивирования при микроскопии в чипе были обнаружены живые адгезированные астрциты (рис. 4).

ВЫВОДЫ

Создан прототип измерительной микрофлюидной системы для культивирования клеток головного мозга млекопитающих, в которой использована оригинальная методика изготовления микрофлюидных чипов из ПДМС по позитивной фрезерованной мастер-форме из ПММА, детальное описание которой является предметом патентования.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания Министерства здравоохранения РФ (2018–2020 гг.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евстапов А.А., Белобров П.И., Буляница А.Л., Белосусов К.И., Букатин А.С., Денисов И.А., Есимбекова Е.Н., Кухтевич И.В., Лукьяненко К.А., Посмитная Я.С., Сорокин В.В., Якимов А.С. Микрофлюидные технологии биологического анализа природных и промышленных вод. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2017. 176 с.
2. Bates K., Jiang S., Chaudhary S., Jackson-Holmes E., Jue M.L., McCaskey E., Goldman D.I., Lu H. Fast, versatile and quantitative annotation of complex images // *Bio-Techniques*. 2019. Vol. 66, no. 6. P. 269–275.
3. Agrawal G., Aung A., Varghese S. Skeletal muscle-on-a-chip: An *in vitro* model to evaluate tissue formation and injury // *Lab on a Chip*. 2017. Vol. 17, no. 20. P. 3447–3461.
4. Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R.T. Small-diameter artificial arteries engineered *in vitro* // *Circulation research*. 2006. Vol. 98, no. 1. P. 25–35. DOI: 10.1039/c7lc00512a
5. Juskova P., Ollivraut A., Serra M., Viovy J.L., Malaquin L. Resolution improvement of 3D stereolithography through the direct laser trajectory programming: Application to microfluidic deterministic lateral displacement device // *Analytica chimica acta*. 2018. Vol. 1000. P. 239–247. DOI: 10.1016/j.aca.2017.11.062
6. Palmiotti C.A., Prasad S., Naik P., Abul K.M., Sajja R.K., Achyuta A.H., Cucullo L. *In vitro* cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies // *Pharmaceutical research*. 2014. Vol. 31, no. 12. P. 3229–3250. DOI: 10.1007/s11095-014-1464-6
7. Guckenberger D.J., de Groot T.E., Wan A.M., Beebe D.J., Young E.W. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices // *Lab on a Chip*. 2015. Vol. 15, no. 11. P. 2364–2378. DOI: 10.1039/c5lc00234f
8. Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro* // *Цитология*. 2015. Т. 57, № 10. С. 710–713.
9. Посмитная Я.С., Букатин А.С., Макаров Д.А., Юдин К.В., Евстапов А.А. Альтернативные подходы при создании мастер-форм для изготовления микрофлюидных чипов методом "мягкой" литографии // *Научное приборостроение*. 2017. Т. 27, № 2. С. 13–20. URL: <http://iairas.ru/mag/2017/full2/Art2.pdf>
10. Booth R., Kim H. Characterization of a microfluidic *in vitro* model of the blood-brain barrier (μ BBB) // *Lab on a Chip*. 2012. Vol. 12, no. 10. P. 1784–1792. DOI: 10.1039/c2lc40094d
11. Griep L.M., Wolbers F., de Wagenaar B., ter Braak P.M., Weksler B.B., Romero I.A., Couraud P.O., Vermes I., van der Meer A.D., van den Berg A. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function // *Biomedical microdevices*. 2013. Vol. 15, no. 1. P. 145–150. DOI: 10.1007/s10544-012-9699-7

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск (Якимов А.С., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Бойцова Е.Б., Салмин В.В., Салмина А.Б.)

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск (Белобров П.И.)

Контакты: Якимов Антон Сергеевич,
asyakimov@gmail.com

Материал поступил в редакцию 12.10.2019

MEASURING MICROFLUIDIC SYSTEM FOR THE MAMMALIAN BRAIN CELLS CULTIVATION

A. S. Yakimov¹, E. D. Osipova¹, A. V. Morgun¹, E. B. Boytsova¹,
P. I. Belobrov², V. V. Salmin¹, A. B. Salmina¹

¹Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Prototyping and development of microfluidic systems for many non-specialized biomedical research laboratories are not available due to the high cost of the necessary equipment. One of the interesting directions of using microfluidic platforms is the modelling of the blood-brain barrier and the neurogenic niche of the brain in vitro. The solution of technological problems within this area will ensure progress in the development of new diagnostic and therapeutic technologies for diseases of the central nervous system. Given that the cells of the neurovascular unit of the brain (cerebral endotheliocytes, perivascular astrocytes, neurons, pericytes) are very sensitive to culturing conditions, the requirements for the micro-stream system for their survival, development and functioning are quite high.

Purpose of work: to conduct a full cycle of manufacturing a microfluidic flow chamber for culturing cells available for biomedical measurements, and to coordinate the microfluidic platform with a sufficient set of peripheral equipment. We have developed a method for transferring a positive pattern formed by milling from the surface of polymethylmethacrylate to the surface of polydimethylsiloxane. It was found that dental silicone mass for duplication Zhermack Elite double 22 models has poor adhesion at the interface between the long-frozen layer and the freezing layer. This made it possible to double take a replica from the canalized surface and obtain a copy of the milled canalized surface on the elastic material. We have shown that the microfluidic chip obtained by our method can be useful for cell cultivation.

Keywords: lab-on-a-chip, polydimethylsiloxane, milling, master-form, flow-through cultivation

REFERENCES

1. Evstrapov A.A., Belobrov P. I., Bulyanica A. L., Belousov K. I., Bukatin A. S., Denisov I. A., Esimbekova E. N., Kuhtevich I. V., Luk'yanenko K. A., Posmitnaya Y.A.S., Sorokin V. V., YAKimov A.S. *Mikroflyuidnye tekhnologii biologicheskogo analiza prirodnyh i promyshlennyh vod* [Microfluidic technologies for biological analysis of natural and industrial waters]. Novosibirsk, SF RAS Publ, 2017. 176 p. (In Russ.).
2. Bates K., Jiang S., Chaudhary S., Jackson-Holmes E., Jue M.L., McCaskey E., Goldman D.I., Lu H. Fast, versatile and quantitative annotation of complex images. *Bio-Techniques*, 2019, vol. 66, no. 6, pp. 269–275. DOI: 10.2144/btn-2019-0010
3. Agrawal G., Aung A., Varghese S. Skeletal muscle-on-a-chip: An in vitro model to evaluate tissue formation and injury. *Lab on a Chip*, 2017, vol. 17, no. 20, pp. 3447–3461. DOI: 10.1039/c7lc00512a
4. Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R.T. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circulation research*, 2006, vol. 98, no 1, pp. 25–35. DOI: 10.1161/01.RES.0000196867.12470.84
5. Juskova P., Ollitrault A., Serra M., Viovy J.L., Malaquin L. Resolution improvement of 3D stereolithography through the direct laser trajectory programming: Application to microfluidic deterministic lateral displacement device. *Analytica chimica acta*, 2018, vol. 1000, pp. 239–247. DOI: 10.1016/j.aca.2017.11.062
6. Palmiotti C.A., Prasad S., Naik P., Abul K.M., Sajja R.K., Achyuta A.H., Cucullo L. In vitro cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies. *Pharmaceutical research*, 2014, vol. 31, no. 12, pp. 3229–3250. DOI: 10.1007/s11095-014-1464-6
7. Guckenberger D.J., de Groot T.E., Wan A.M., Beebe D.J., Young E.W. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2015, vol. 15, no. 11, pp. 2364–2378. DOI: 10.1039/c5lc00234f
8. Khilazheva E. D., Boytsova E. B., Pozhilenkova E. A., Solonchuk Yu. R., Salmina A. B. The model of neurovascular unit in vitro consisting of three cells types. *Cytology [Citologiya]*, 2015, vol. 57, no. 10, pp. 710–713. (In Russ.).
9. Posmitnaya Y.S., Bukatin A.S., Makarov D.A., Yudin K.V., Evstrapov A.A. Alternative solutions of master molds creation for fabrication microfluidic chips by "soft" lithography. *Nauchnoe priborostroenie* [Scientific instrumentation], 2017, vol. 27, no. 2, pp. 13–20. DOI: 10.18358/np-27-2-i1320 (In Russ.).
10. Booth R., Kim H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, no. 10, pp. 1784–1792. DOI: 10.1039/c2lc40094d

11. Griep L.M., Wolbers F., de Wagenaar B., ter Braak P.M., Weksler B.B., Romero I.A., Couraud P.O., Vermes I., van der Meer A.D., van den Berg A. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically mod-

ulate blood-brain barrier function. *Biomedical microdevices*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 145–150.
DOI: 10.1007/s10544-012-9699-7

Contacts: *Yakimov Anton Sergeevitch*,
asyakimov@gmail.com

Article received by the editorial office on 12.10.2019