

УДК 57.085.23

© Л. А. Алтынбаев, П. С. Плешаков, Н. А. Филатов, А. С. Букатин, 2025

МИКРОФЛЮИДНОЕ УСТРОЙСТВО "ОРГАН-НА-ЧИПЕ" С ПОРИСТОЙ МЕМБРАНОЙ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

В настоящее время микрофлюидные устройства "орган-на-чипе" рассматриваются в качестве альтернативы для тестирования лекарственных препаратов в ходе проведения доклинических исследований. В них можно моделировать строение и функции отдельных органов и систем органов человека, таких как легкие, печень, почки, кишечник и др., и тестировать на них разнообразные вещества. Одним из ключевых элементов устройств "орган-на-чипе" является гибкая пористая мембрана, использование которой для роста клеток позволяет изучать отклик клеток на механические и химические сигналы. В настоящей работе был разработан метод изготовления микрофлюидных устройств "орган-на-чипе" с гибкой подвешенной пористой мембраной из полидиметилсилоксана с добавлением многостенных углеродных нанотрубок, повышающих механическую прочность мембраны и не влияющих на ее оптические свойства. Использование углеродных нанотрубок позволило увеличить площадь изготавливаемых мембран и снизить вероятность их разрыва в процессе изготовления. Для роста клеток в изготовленных устройствах "орган-на-чипе" использовалась пассивная смена питательной среды, основанная на периодическом изменении угла наклона устройства, расположенного на качающейся платформе. Такой подход позволил культивировать клетки модельных клеточных линий в течение более 7 дней с жизнеспособностью более 95%. Полученные результаты свидетельствуют о хорошей биосовместимости используемого композита и его применимости для изготовления гибких пористых мембран в устройствах "орган-на-чипе".

Ключевые слова: микрофлюидика, микрофлюидное устройство, микрофлюидный чип, орган-на-чипе, тканевая инженерия, тестирование лекарств, полидиметилсилоксан, пористая мембрана

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых этапов разработки лекарственных препаратов является проведение исследований эффективности и токсичности перспективных веществ на лабораторных животных. Несмотря на то, что существующие требования предписывают проводить доклинические исследования минимум на двух типах лабораторных животных, один из которых не является грызуном, получаемые результаты часто обладают низкой предсказуемостью в отношении специфичности и токсичности тестируемых препаратов у человека и не позволяют адекватно предсказать эффекты, наблюдаемые в клинических исследованиях [1, 2]. В частности, успешные результаты испытаний новых препаратов, полученные на животных моделях болезни Альцгеймера и воспалительных заболеваний, зачастую не воспроизводятся в клинических исследованиях на людях [3, 4]. Одним из ярких примеров такого провала является моноклональное антитело *Соланезумаб*, которое не показало никакой эффективности в лечении болезни Альцгеймера в экспериментах на людях, несмотря на обнадеживающие результаты в экспериментах на животных [5].

В настоящее время в связи с отсутствием релевантных животных моделей для многих заболеваний наблюдается активный поиск альтернативных методов и технологий, способных заменить традиционные тесты на животных. Микрофизиологические микрофлюидные устройства "орган-на-чипе" (organ-on-a-chip) появились как альтернативная платформа для тестирования лекарственных препаратов *in vitro* для устранения недостатков существующих доклинических моделей [6]. В устройствах "орган-на-чипе" возможно создавать контролируемые микросреды, в которых клетки могут воспроизводить сложные анатомические и функциональные особенности живых человеческих тканей и органов. Предполагается, что такие модели тканей и органов могут предоставить исследователям более полные и точные данные о реакциях на тестируемые молекулы по сравнению с результатами, полученными при использовании традиционных доклинических методов [6].

Одним из первых микрофлюидных устройств, моделирующих функции целого органа, является устройство "легкое-на-чипе", представленное в 2010 г. [7]. С его появлением связывают и возникновение самого термина "орган-на-чипе". В дальнейшем были разработаны устройства, мо-

делирующие функциональность самых разных органов в условиях *in vitro*, таких как печень [8], почки [9], кишечник [10], сердце [11], мозг [12, 13] и др. Также исследователи прилагают большие усилия для объединения моделей нескольких органов в одном мультиорганном устройстве, получившем название "человек-на-чипе", для исследования их взаимодействия между собой и анализа их совместного отклика на введение лекарственных препаратов [14]. Разработанные на сегодняшний день модели таких устройств могут включать от 2 до 10 различных моделей органов и способны обеспечивать имитацию сложных физиологических и патофизиологических реакций, например моделирование регуляции секреции инсулина [1].

В настоящее время разработкой и производством устройств "орган-на-чипе" занимаются не только образовательные и научно-исследовательские организации, но и коммерческие компании, такие как Insphero, Mimetas, Emulate, HesperosInc., TissUse, Bi/ond, NETRI, BiomimX, Cherry-Biotech и AxoSim. Они активно выводят на рынок хорошо зарекомендовавшие себя в исследованиях устройства, которые фармацевтические компании начинают внедрять в процесс разработки лекарственных препаратов. Например, клинические испытания препарата от хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (*Clinical Trial NCT04658472*) были одобрены на основе данных, полученных с использованием микрофлюидного устройства "человек-на-чипе" [15]. Все это позволило Управлению по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) в 2025 г. внести устройства "орган-на-чипе" в дорожную карту снижения использования животных в доклинических исследованиях лекарственных препаратов [16].

Одними из ключевых компонентов устройств "орган-на-чипе" являются гибкие полимерные мембраны, которые позволяют моделировать тканевые барьеры в организме, такие как гематоэнцефалический, гематоофтальмический, гематоплацентарный, азрогематический, гломерулярный и др. барьеры [17]. Исследование развития клеток на пористых мембранах в таких устройствах позволяет изучать, как движение жидкости, механическая деформация и химические сигналы влияют на развитие тканей и органов. Мембраны могут изготавливаться из таких распространённых полимерных материалов, как поликарбонат, полиэтилентерефталат (ПЭТ), полидиметилсидоксан (ПДМС), полилактид (PLA) и др. [18]. Ключевыми преимуществами, такими как оптическая прозрачность, растяжимость, биосовместимость и химическая инертность, обладают пористые мембраны из ПДМС, изготовленные методом "мягкой" лито-

графии. Поэтому они широко используются при изготовлении устройств "орган-на-чипе" [19]. Однако до сих пор до конца не решены проблемы с массовым и надёжным изготовлением устройств с такими мембранами, повышением количества одновременно анализируемых образцов и воспроизводимым развитием и ростом клеток в них, что позволило бы валидировать как сами устройства "орган-на-чипе", так и методики тестирования лекарственных препаратов [20].

Целью данной работы является разработка надёжного метода изготовления микрофлюидных устройств "орган-на-чипе" с гибкой подвешенной пористой ПДМС-мембраной для исследования влияния механических и химических стимулов на рост клеток. Для этого было предложено добавлять в состав ПДМС-мембран многостенные углеродные нанотрубки, выступающие в качестве армирующего материала, укрепляющего материал мембраны. Для роста клеток на ПДМС-мембране в микрофлюидном устройстве использовалась пассивная смена питательной среды, основанная на периодическом изменении угла наклона чипа, расположенного на качающейся платформе. Такой подход позволил культивировать клетки модельных клеточных линий в течение более 7 дней с жизнеспособностью более 95%.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1 Изготовление микрофлюидных устройств

Микрофлюидное устройство "орган-на-чипе" состоит из трех слоев: верхний и нижний слои содержат по одному микроканалу, которые в готовом устройстве будут располагаться друг над другом, разделенные средним слоем, представляющим собой гибкую пористую мембрану толщиной 50 мкм с диаметром пор 10 мкм (см. рис. 1). В верхнем и нижнем слоях каналы окружены с обеих сторон двумя полыми камерами, периодическое заполнение которых сжатым воздухом деформирует пористую мембрану и может обеспечивать механическую стимуляцию клеток, расположенных на мембране.

Устройство "орган-на-чипе" было изготовлено из биосовместимого, эластичного и оптически прозрачного силиконового компаунда полидиметилсидоксана Sylgard 184 (ПДМС, DowCorning, Midland, США) с использованием технологии "мягкая" литография [21]. Его верхний и нижний слои были сформированы путем отверждения дегазированной смеси основы, смешанных в пропорции 10 : 1. Подготовленная смесь заливалась на помещенную в чашку Петри мастер-форму

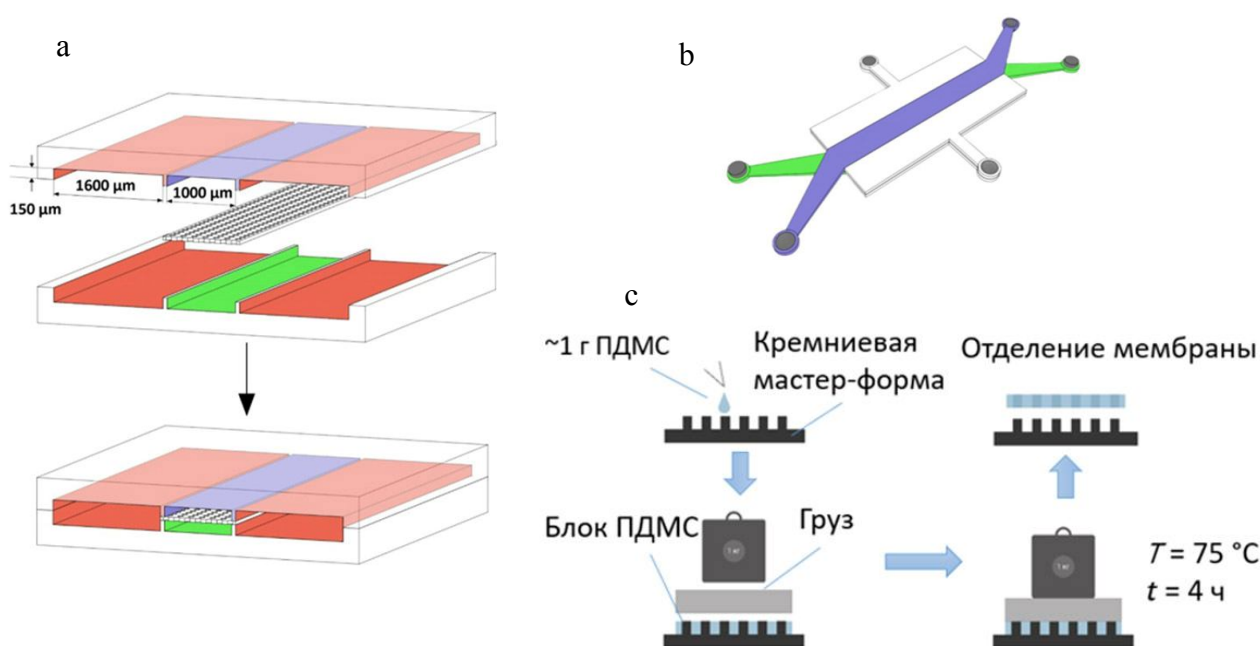


Рис. 1. Принципиальная схема микрофлюидного устройства "орган-на-чипе".
а — схема сборки; б — 3D-модель каналов; с — принцип изготовления пористой мембраны

и выдерживалась 4 ч при температуре 65 °С. Мастер-форма представляла собой кремниевую подложку, на поверхности которой методом фотолитографии в фоторезисте SU-8 2025 (Kayaku AdvancedMaterials, USA) были сформированы микроканалы [22]. После отверждения ПДМС реплика отделялась от формы и разрезалась на отдельные устройства. С помощью пробойника для биопсии кожи в репликах были сделаны входные и выходные отверстия диаметром 2 мм.

Для изготовления пористой мембраны методом фотолитографии и реактивного ионного травления была создана кремниевая мастер-форма, содержащая массив цилиндрических микростолбиков диаметром 10 мкм, высотой 50 мкм и межцентровым расстоянием 40 мкм. Для уменьшения адгезии ПДМС к мастер-форме она была покрыта слоем Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (Sigma-Aldrich, Германия) в вакуумной камере при комнатной температуре в течение 12 ч. На мастер-форму помещалось ~ 1 г тщательно перемешанной в соотношении 10 : 1 и дегазированной смеси основы и отвердителя Sylgard 184. После этого на мастер-форму накладывался прямоугольный блок из ПДМС, на котором располагался груз массой ~ 1 кг. Отверждение мембраны осуществлялось при температуре 75 °С в течение 4 ч. Соотношение основы и отвердителя в ПДМС-блоке —

15 : 1; поверхности были покрыты слоем Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane. Получившаяся мембрана аккуратно отделялась от мастер-формы и от ПДМС-блока в емкости с этиловым спиртом.

Сборка микрофлюидного "органа-на-чипе" осуществлялась путем последовательного соединения всех слоев после обработки поверхностей кислородной плазмой в установке V15-G (PINK GmbH Thermosysteme, Германия). Наложение и выравнивание слоев друг относительно друга осуществлялось сразу после плазменной обработки поверхностей с контролем совмещения в оптический микроскоп. Собранная конструкция выдерживалась при температуре 75 °С в течение 12 ч.

Для повышения механической прочности ПДМС-мембраны и снижения вероятности ее разрыва в процессе отделения от мастер-формы в ее состав были добавлены многослойные углеродные нанотрубки (УНТ) (Китай), формирующие армирующую сетку в материале. Для создания такого композита готовится суспензия нанотрубок в изопропиловом спирте в концентрации 0.02 г/мл, которая тщательно перемешивается и обрабатывается в ультразвуковой ванне в течение 4 ч. После обработки нанотрубки осаждаются на металлическую подложку, а излишки изопропилового спирта

та удаляются. Получившаяся концентрированная суспензия добавляется в основу Sylgard 184 в концентрации ~ 5% (по массе), тщательно перемешивается и дегазируется в течение 12 ч. Получившаяся смесь основы с углеродными нанотрубками может храниться при комнатной температуре до использования. Перед изготовлением мембраны данная смесь смешивается с отвердителем в соотношении 1 : 10 (по массе), тщательно перемешивается и дегазируется, после чего используется согласно протоколу, приведенному выше.

Геометрические размеры всех полученных микроструктур были определены с помощью оптической инспекционной станции INM 100 (Leica Microsystems, Германия), сканирующего электронного микроскопа Supra 25 (Carl Zeiss, Германия) и стилусного профилометра XP-1 (Ambios Technology, Санта-Крус, Калифорния, США). Для оценки влияния углеродных нанотрубок на оптические свойства ПДМС-мембран использовался спектрофотометр Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, США).

1.2. Клеточные культуры

В качестве модельных клеточных культур для тестирования устройств "орган-на-чипе" использовались адгезионные опухолевые линии аденокарциномы толстой кишки мыши CT26-eGFP, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок, и карциномы шейки матки человека HeLa. Культуры были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки CT26-eGFP культивировались в среде RPMI (БиоЛот, Россия), а клетки HeLa — в среде DMEM (БиоЛот, Россия). В обоих случаях в среду были добавлены 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США) и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл). Клетки культивировались в инкубаторе, в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, при температуре 37 °С.

Жизнеспособность клеток CT26-eGFP в процессе роста в устройствах "орган-на-чипе" оценивалась по интенсивности флуоресценции зеленого флуоресцентного белка в цитоплазме. Для контрастирования ядер мертвых клеток в клеточную среду добавлялся йодистый пропидий в концентрации 2 мкг/мл. Для оценки взаимодействия ПДМС мембраны с цитоскелетом использовались клетки HeLa, ядра которых окрашивались с помощью флуоресцентного красителя DAPI (Sigma-Aldrich, США), а актиновые филаменты — с помощью флуоресцентно меченного фаллоидина (Invitrogen, США) в концентрации 1 мкл/мл (в соответствии с протоколом производителя). Перед окрашиванием клетки фиксировались в канале микрофлюидного устройства в 4% растворе параформальдегида. После фиксации клеток верхний канал устрой-

ства заполнялся смесью флуоресцентных красителей и инкубировался в течение 15 мин при 37 °С. После окрашивания все образцы анализировались на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с конфокальным модулем Yokogawa CSU-X1 (Yokogawa, Япония).

1.3 Функционализация мембраны и загрузка клеток в устройства

С целью повышения адгезии клеток к ПДМС-мембране она покрывалась слоем коллагена. Раствор коллагена готовился путем смешивания в соотношении 9 : 1 предварительно нагретой до температуры +37 °С среды DMEM/F12 со стоковым раствором мышинного коллагена I (концентрация 0.7 мг/мл) в 0.2 М уксусной кислоте. Стоковый раствор мышинного коллагена I был предоставлен лабораторией клеточных биотехнологий Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Перед обработкой мембраны коллагеном микрофлюидное устройство было повторно обработано кислородной плазмой. Затем его каналы заполнялись приготовленным раствором коллагена с концентрацией 0.07 мг/мл, после чего устройство инкубировалось 1 ч в термостате при температуре 37 °С. После окончания инкубации каналы промывались средой DMEM/F12, имевшей температуру 37 °С. Для загрузки клеток в микрофлюидное устройство в его верхний канал вводилось 50–100 мкл суспензии клеток с концентрацией ~ 1 млн/мл. Для закрепления клеток на мембране устройство инкубировалось в CO₂-инкубаторе в течение 12 ч без смены питательной среды. После этого клеточная среда заменялась на свежую.

1.4 Периодическая смена питательной среды

Так как объем камеры с клетками в микрофлюидном устройстве составляет ~ 1.5 мкл, то для эффективного роста клеток в течение длительного времени в нем необходимо обеспечить периодическую смену питательной среды с периодом в несколько часов [23]. Для этого устройство располагалось на специально разработанной качающейся платформе, обеспечивающей периодическое изменение угла наклона устройства по заданному алгоритму. При изменении угла наклона происходило перетекание жидкости из одного резервуара микрофлюидного устройства в другой за счет разницы гидростатических давлений в них (см. рис. 2, а). В качестве резервуаров использовались пластиковые коннекторы объемом 1.5 мл, изготовленные на 3D-принтере Formlabs 3B+ (FormLabs, США). При изменении угла наклона платформы время течения жидкости в микрофлюидном устройстве не превышает 5 мин. Полная замена среды в резервуарах устройства проводилась каждые два дня.

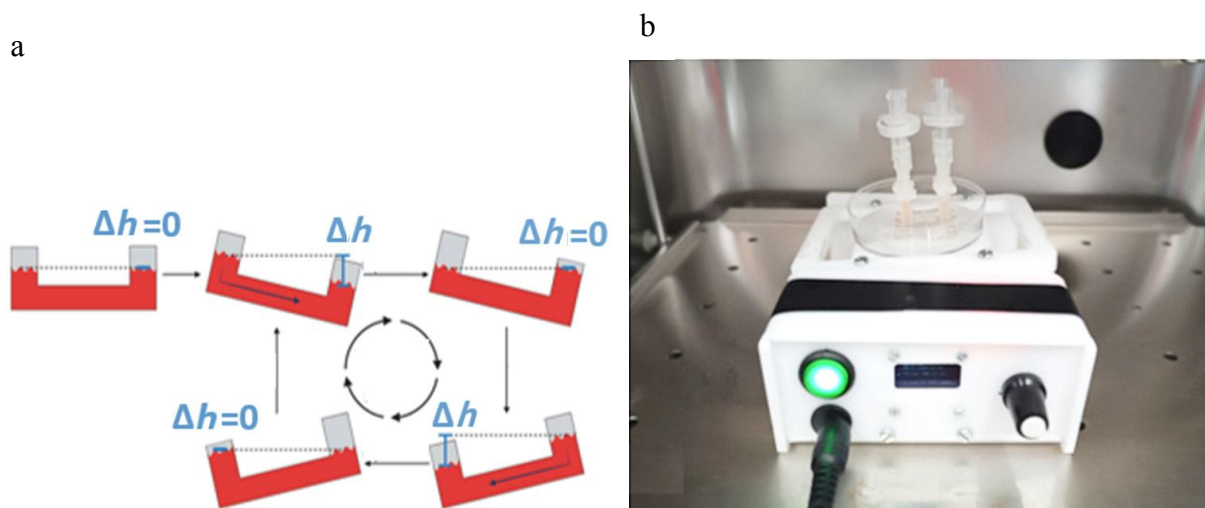


Рис. 2. Система периодической смены питательной среды в микрофлюидном устройстве "орган-на-чипе". а — принципиальная схема смены среды; б — общий вид качающейся платформы с микрофлюидным устройством в CO_2 инкубаторе

Разработанная качающаяся платформа обладает компактными габаритными размерами $139 \times 101 \times 53$ мм и способна работать автономно в условиях атмосферы CO_2 инкубатора (5% CO_2 , температура $+37^\circ\text{C}$) (рис. 2, б). Платформа содержит шаговый электродвигатель, микроконтроллер Arduino Nano, OLED-дисплей и энкодер, позволяющие задавать алгоритм изменения угла наклона платформы в диапазоне ± 400 и выполнять его в течение длительного времени работы устройства (более 7 дней).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1 Изготовление и характеристика микрофлюидных устройств

Основным функциональным элементом микрофлюидного устройства "орган-на-чипе" является гибкая пористая мембрана, на которой закрепляются и растут клетки. Благодаря своей биосовместимости, химической инертности и оптической прозрачности, полидиметилсилоксан (ПДМС) является одним из основных материалов, которые применяются для создания гибких мембран. В процессе изготовления микрофлюидного устройства мембрана соединяется с верхней и нижней частями устройства, выступая разделителем между двумя камерами, к которым подведены микроканалы для ввода клеток, питательной среды и активных биомолекул, а также отбора среды для анализа продуктов жизнедеятельности клеток.

Изображение микрофлюидного устройства в сборе приведено на рис. 3, а.

Для изготовления пор в ПДМС-мембранах на кремниевой подложке методом фотолитографии и реактивного ионного травления был изготовлен массив цилиндрических микростолбиков диаметром 10 мкм и высотой 50 мкм (см. рис. 3, б). При отверждении ПДМС на такой подложке в получаемой ПДМС-пленке толщиной менее 50 мкм образуются сквозные отверстия, обеспечивающие транспорт веществ между верхней и нижней камерами устройства (см. рис. 3, с–е). При этом размер пор в мембране меньше характерного размера клеток млекопитающих (~ 20 мкм), поэтому мембрана служит определенным барьером для перемещения клеток из одной камеры в другую.

Изготовление ПДМС-мембран толщиной менее 50 мкм сопряжено с высокой вероятностью их разрыва при отделении от кремниевой мастер-формы и от прижимающего ПДМС-блока, что не позволяло воспроизводимо получать мембраны площадью более (5×5) мм². Для улучшения прочности мембран было предложено их изготавливать из нанокompозита, получаемого путем добавления в ПДМС многостенных углеродных нанотрубок. Добавление углеродных нанотрубок увеличивает модуль Юнга ПДМС и предел прочности на разрыв, а также приводит к увеличению контактного угла воды на поверхности и снижает удельное электрическое сопротивление материала [24, 25]. Также углеродные нанотрубки, размещенные на подложке, в подавляющем большинстве исследований не проявляют токсического действия

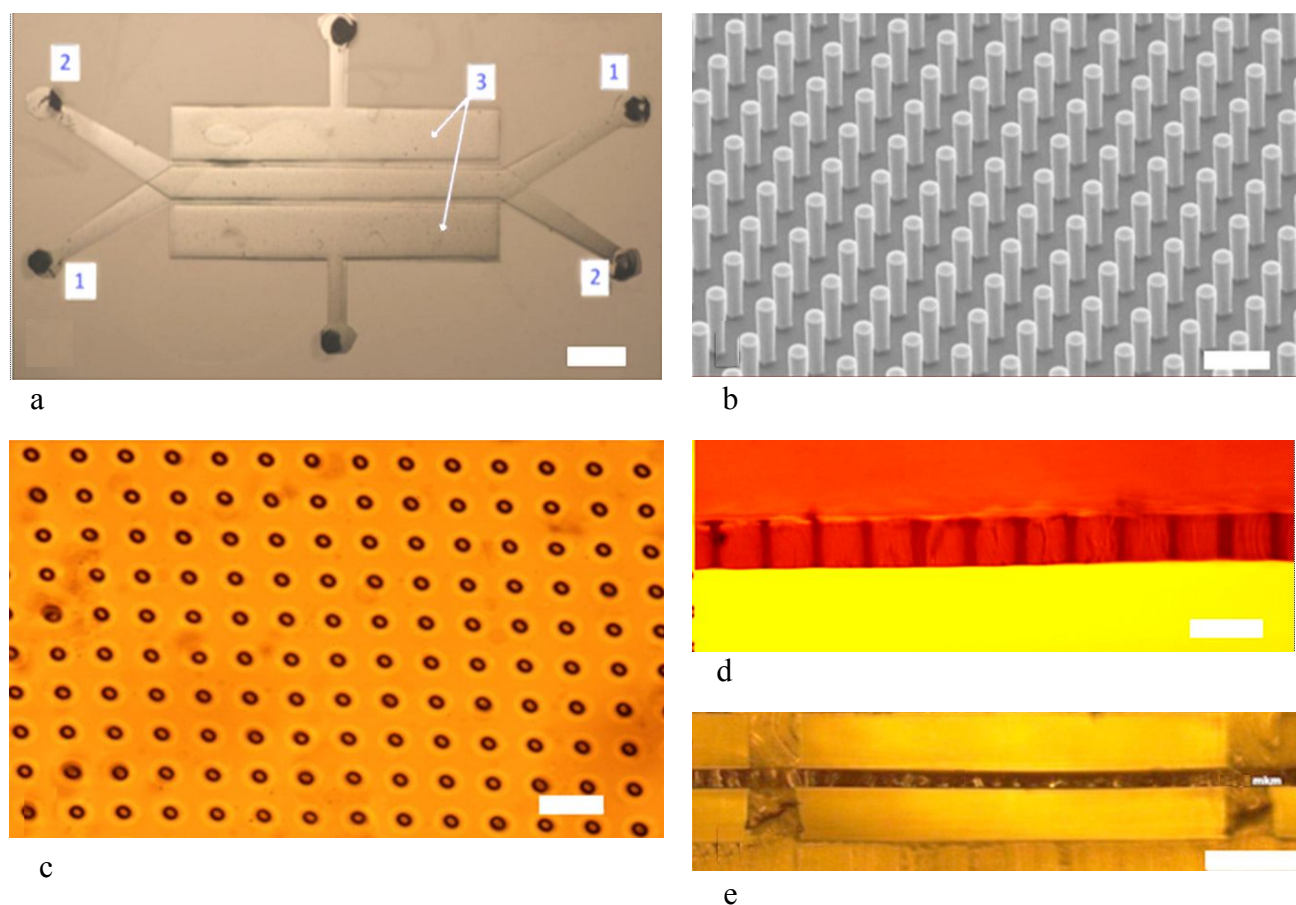


Рис. 3. Микрофлюидное устройство "орган-на-чипе".

а — топология каналов устройства (1 — верхний канал, 2 — нижний канал, 3 — камеры для механической деформации мембраны), масштаб — 1 мм; б — массив микроструктур на мастер-форме для изготовления мембраны, масштаб — 30 мкм; с — фрагмент мембраны, масштаб — 50 мкм; д — поперечное сечение мембраны, масштаб — 50 мкм; е — поперечное сечение микрофлюидного чипа. Все мембраны, приведенные на изображениях, содержали 5% многостенных углеродных нанотрубок, масштаб — 200 мкм

на клетки, что крайне важно для длительного культивирования клеток в устройствах "орган-на-чипе" [26]. Однако добавление углеродных нанотрубок может ухудшить оптические характеристики мембраны в видимом спектральном диапазоне, что может сказаться на применимости методов оптической микроскопии для мониторинга физиологического состояния клеток. Для исследования данного эффекта были проведены измерения спектров оптического пропускания ПДМС-мембран с содержанием углеродных нанотрубок 2.5–10%, результаты которых приведены на рис. 4. Представленные данные показывают, что в видимом спектральном диапазоне 400–750 нм добавление углеродных нанотрубок снижает коэффициент пропускания мембраны толщиной 50 мкм не более чем на 8%, что не должно ухудшить качество получаемых микроскопических изображений. В свя-

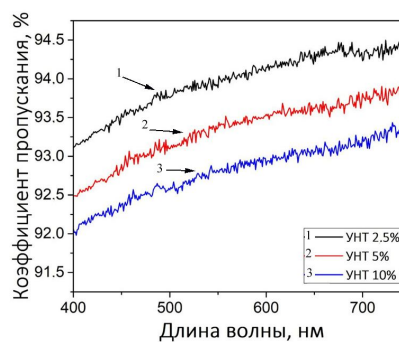


Рис. 4. Спектры пропускания ПДМС-пленок толщиной 50 мкм в зависимости от концентрации многостенных углеродных нанотрубок (УНТ).

зи с этим для изготовления мембран устройств "орган-на-чипе" было выбрано добавлять в ПДМС 5% углеродных нанотрубок по массе, что позволило воспроизводимо получать мембраны площадью (35×20) мм².

2.2 Исследование развития клеток на пористой мембране в микрофлюидном устройстве "орган-на-чипе"

В связи с тем, что ПДМС является гидрофобным материалом, адгезия клеток к нему существенно хуже, чем к стандартному лабораторному пластику [27]. Для повышения адгезии клеток поверхность ПДМС можно обрабатывать фибронектином, коллагеном, альбумином и другими белками

внеклеточного матрикса. Для обработки ПДМС-мембраны в микрофлюидном устройстве "орган-на-чипе" был выбран мышинный коллаген I типа. Эксперименты по росту клеток на мембранах в многолуночном планшете показали, что на нативной поверхности ПДМС клетки СТ26 формируют трехмерные клеточные агрегаты из-за плохой адгезии к поверхности (см. рис. 5, а). Однако, на мембранах, покрытых коллагеном, клетки равномерно распределились по всей поверхности и закрепились на ней, приобретя вытянутую форму, что свидетельствует о хорошей адгезии клеток к поверхности (рис. 5, б).

На основании полученных результатов во всех экспериментах мембраны микрофлюидных устройств перед загрузкой клеток покрывались слоем коллагена. После загрузки и закрепления клеток на поверхности мембраны устройства "орган-на-чипе" размещались в СО₂-инкубаторе на качающейся платформе для периодической (1 раз в час) смены питательной среды. Через семь дней инкубирования на мембране устройства был сформирован клеточный монослой. Данные оптической микроскопии показывают, что клетки СТ26 и HeLa успешно закрепились на поверхности ПДМС и сохраняли жизнеспособность более 95% в течение всего периода инкубации (см. рис. 6, а–с). Окраска цитоскелета клеток HeLa (см. рис. 6, d) показала, что большинство клеток приобрели вытянутую форму, распластавшись на ПДМС-мембране, что свидетельствует об их успешном прикреплении к ней. Полученные результаты показывают, что в разработанных микрофлюидных устройствах "орган-на-чипе" возможны длительный рост и развитие клеточных культур.

3. ВЫВОДЫ

Таким образом, в рамках настоящей работы был разработан метод изготовления микрофлюидных устройств "орган-на-чипе" с гибкой подвешенной пористой мембраной для роста клеток. Мембрана выполнена из полидиметилсилоксана (ПДМС) с добавлением 5% многостенных углеродных нанотрубок. Методом мягкой литографии с помощью кремниевой мастер-формы в ней сформированы сквозные поры диаметром 10 мкм с межцентровым расстоянием 40 мкм. Добавление в состав мембраны углеродных нанотрубок повышает ее механическую прочность и снижает вероятность разрыва в процессе отделения от мастер-формы. Это позволило стабильно получать мембраны толщиной ~ 50 мкм и площадью (35×20) мм². При этом добавление 5% нанотрубок

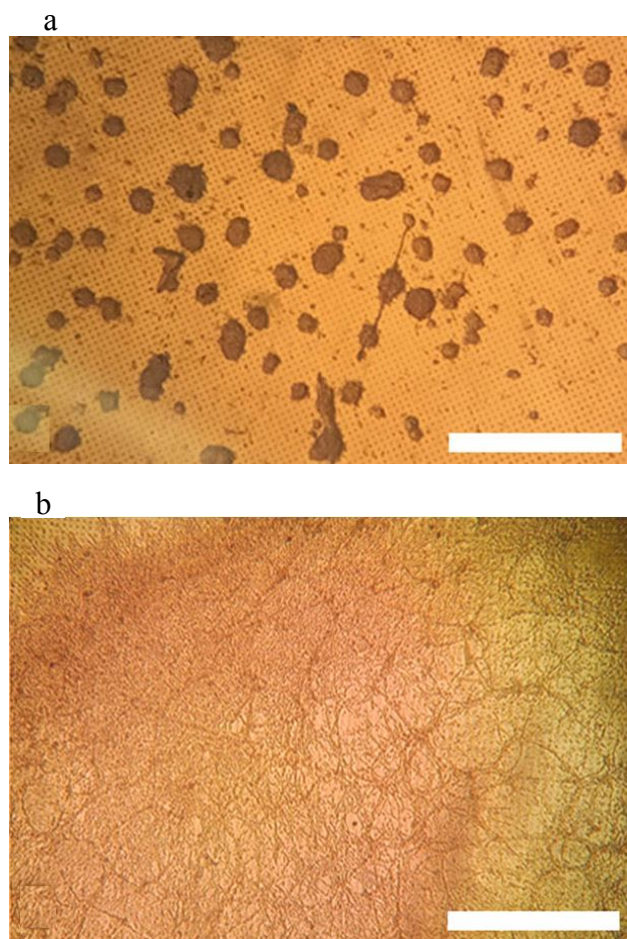


Рис. 5. Морфология клеток СТ26 на поверхности ПДМС-мембран.
а — нативная мембрана, масштаб 1000 мкм; б — мембрана, покрытая пленкой коллагена, масштаб 1000 мкм. Изображения получены на 4-й день культивирования

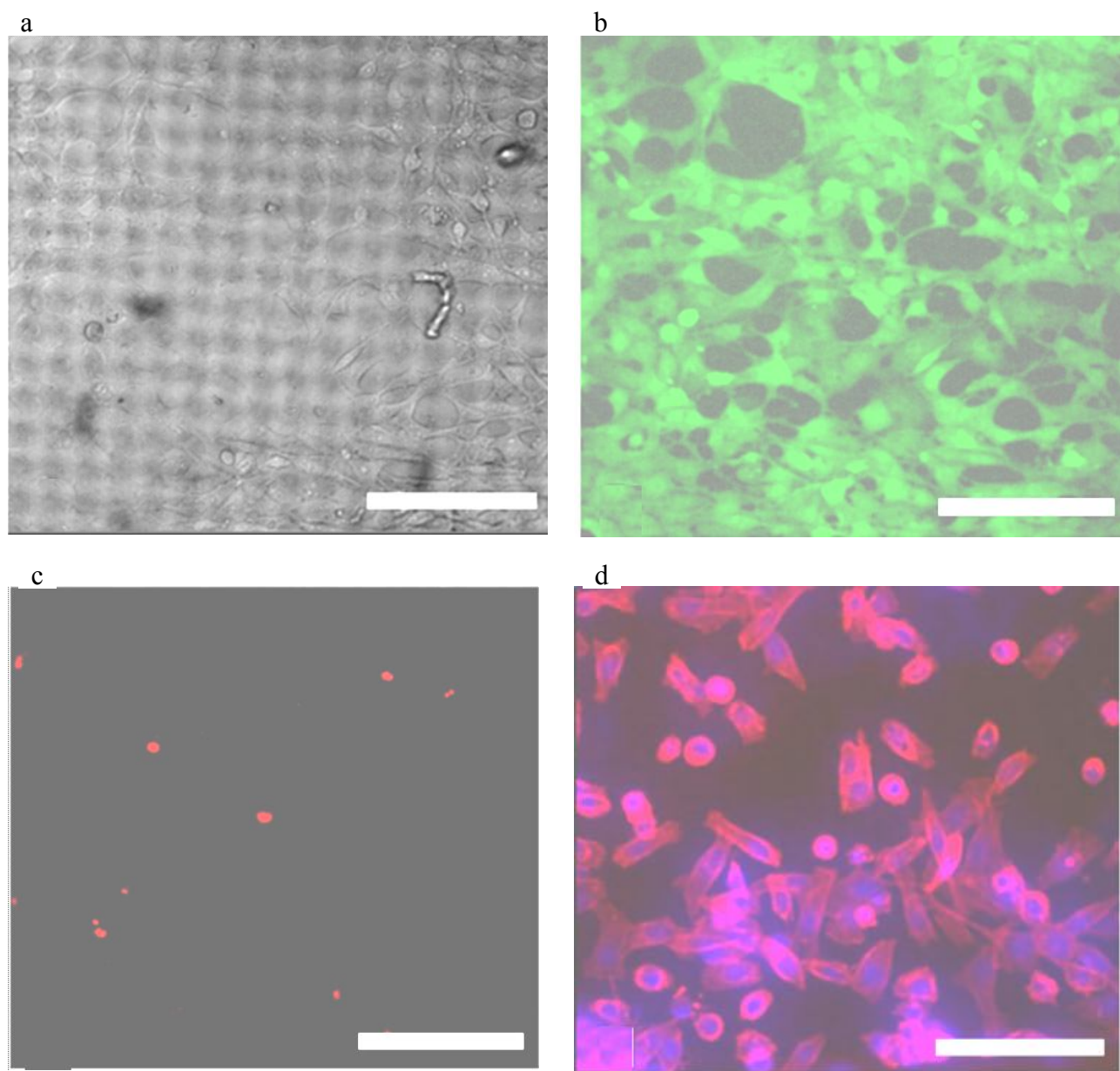


Рис. 6. Развитие клеток ST26-eGFP и HeLa на ПДМС-мембране в микрофлюидном устройстве "орган-на-чипе". а — клетки ST26 на 7 день культивирования в режиме светлого поля, совмещенного с флуоресцентным изображением в канале GFP, масштаб 200 мкм; б — флуоресцентное изображение в канале GFP клеток ST26, масштаб 200 мкм; в — флуоресценция клеток ST26 в канале йодистого пропидия, масштаб 200 мкм; д — флуоресцентное изображение клеток HeLa на 7 день культивирования, масштаб 100 мкм

по массе незначительно снижает ее оптическое пропускание — не более чем на 8% в видимом спектральном диапазоне 400–750 нм.

Экспериментально было показано, что клетки ST26 и HeLa имеют низкую адгезию к ПДМС-мембране с углеродными нанотрубками и форми-

руют на ее поверхности трехмерные клеточные агрегаты. Обработка поверхности мембраны коллагеном I типа повышает клеточную адгезию и приводит к образованию монослоя клеток ST26 и HeLa в процессе культивирования. Для длительного культивирования клеток в устройствах "ор-

ган-на-чипе" была разработана компактная качающаяся платформа для пассивной периодической смены питательной среды в камере с клетками за счет возникновения разности гидростатических давлений при изменении угла наклона устройства. Такой способ смены питательной среды позволяет культивировать клетки модельных клеточных линий СТ26 и HeLa на мембране в микрофлюидном устройстве "орган-на-чипе" в течение более 7 дней с жизнеспособностью более 95%. Полученные результаты свидетельствуют о хорошей биосовместимости используемого композита и его применимости для изготовления гибких пористых мембран в устройствах "орган-на-чипе".

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках проекта № 20-74-10117. Филатов Н.А. благодарит за финансовую поддержку проект Российского Научного Фонда № 23-79-01212.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ingber D.E. Human organs-on-chips for disease modeling, drug development and personalized medicine // *Nat Rev Genet.* 2022. Vol. 23. P. 467–491. DOI: 10.1038/s41576-022-00466-9
2. Mullard A. Parsing clinical success rates // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016. Vol. 15. Id. 447. DOI: 10.1038/nrd.2016.136
3. Pippin J.J., Cavanaugh S.E., Pistollato F. Ch. 20. Animal Research for Alzheimer Disease: Failures of Science and Ethics // *Animal experimentation: working towards a paradigm change. Series: Human-Animal Studies*, Vol. 22, 2019. P. 480–516. URL: <https://www.jstor.org/stable/10.1163/j.ctvjhzq0f.27>
4. Seok J., Warren H.S., Cuenca A.G., et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. Vol. 110, no. 9. P. 3507–3512. DOI: 10.1073/pnas.1222878110
5. Lozupone M., Dibello V., et al. Lessons learned from the failure of solanezumab as a prospective treatment strategy for Alzheimer's disease // *Expert. Opin. Drug. Discov.* 2024. Vol. 19, iss. 6. P. 639–647. DOI: 10.1080/17460441.2024.2348142
6. Teixeira Carvalho D.J., Moroni L., Giselbrecht S. Clamping strategies for organ-on-a-chip devices // *Nat. Rev. Mater.* 2023. Vol. 8. P. 147–164. DOI: 10.1038/s41578-022-00523-z
7. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip // *Science.* 2010. Vol. 328. P. 1662–1668. DOI: 10.1126/science.1188302
8. Yang J., Hirai Y., Iida K., et al. Integrated-gut-liver-on-a-chip platform as an in vitro human model of non-alcoholic fatty liver disease // *Commun. Biol.* 2023. Vol. 6. Id. 310. DOI: 10.1038/s42003-023-04710-8
9. Lee J., Kim S. Kidney-on-a-Chip: A New Technology for Predicting Drug Efficacy, Interactions, and Drug-induced Nephrotoxicity // *Curr. Drug. Metab.* 2018. Vol. 19, iss. 7. P. 577–583. DOI: 10.2174/1389200219666180309101844
10. Nguyen O.T.P., Misun P.M., Hierlemann A., Lohasz C.A. Versatile Intestine-on-Chip System for Deciphering the Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease // *Adv. Healthc. Mater.* 2024. Vol. 13, iss. 7. Id. 2302454. DOI: 10.1002/adhm.202302454
11. Werdich A.A., Lima E.A., Ivanov B., et al. A microfluidic device to confine a single cardiac myocyte in a sub-nanoliter volume on planar microelectrodes for extracellular potential recordings // *Lab Chip.* 2004. Vol. 4. P. 357–362. DOI: 10.1039/B315648F
12. Servais B., Mahmoudi N., Gautam V. et al. Engineering Brain-on-a-Chip Platforms // *Nature Reviews Bioengineering.* 2024. Vol. 2. P. 691–709. DOI: 10.1038/s44222-024-00184-3
13. Leung C. M., de Haan P., Ronaldson-Bouchard K., et al. A guide to the organ-on-a-chip // *Nature Reviews Methods Primers.* 2022. Vol. 2. Id. 33. DOI: 10.1038/s43586-022-00118-6
14. Abrignani M.G., Gatta L., Gabrielli D., et al. Gastroprotection in patients on antiplatelet and/or anticoagulant therapy: a position paper of National Association of Hospital Cardiologists (ANMCO) and the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (ALGO) // *Eur. J. Intern. Med.* 2021. Vol. 85. P. 1–13. URL: [https://www.ejinme.com/article/S0953-6205\(20\)30424-6/fulltext](https://www.ejinme.com/article/S0953-6205(20)30424-6/fulltext)
15. Rumsey J.W., Lorange C., Jackson M., et al. Classical Complement Pathway Inhibition in a "Human-On-A-Chip" Model of Autoimmune Demyelinating Neuropathies // *Adv. Ther. (Weinh).* 2022. Vol. 5, iss. 6. DOI: 10.1002/adtp.202200030
16. FDA: Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies. URL: <https://www.fda.gov/media/186092/download>
17. Zhang B., Korolj A., Lai B.F.L., Radisic M. Advances in organ-on-a-chip engineering // *Nat. Rev. Mater., Springer, US.* 2018. Vol. 3. P. 257–278. DOI: 10.1038/s41578-018-0034-7
18. Corral-Nájera K., Chauhan G., Serna-Saldívar S.O. et al. Polymeric and biological membranes for organ-on-a-chip devices // *Microsyst. Nanoeng.* 2023. Vol. 9. Id. 107. DOI: 10.1038/s41378-023-00579-z
19. Huh D., Kim H.J., Fraser J.P., et al. Microfabrication of human organs-on-chips // *Nat Protoc.* 2013. Vol. 8. P. 2135–2157. DOI: 10.1038/nprot.2013.137
20. Low L.A., Mummery C., Berridge B.R., et al. Organs-on-chips: into the next decade // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2021. Vol. 20. P. 345–361. DOI: 10.1038/s41573-020-0079-3
21. Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning // *Nat. Protoc.* 2010. Vol. 5. P. 491–502. DOI: 10.1038/nprot.2009.234
22. Bukatin A.S., Malyshev E.I., Kukhtevich I.V., et al. Fabrication of High-Aspect-Ratio Microstructures in Polymer Microfluid Chips for in Vitro Single-Cell Analysis // *Tech. Phys.* 2016. Vol. 61, iss. 10. P. 1566–1571. DOI: 10.1134/S106378421610008X

23. *Giulitti S., Magrofuoco E., Prevedello L., Elvassore N.* Optimal periodic perfusion strategy for robust long-term microfluidic cell culture. // *Lab Chip*. 2013. Vol. 13. P. 4430–4441. DOI: 10.1039/C3LC50643F
24. *Kim J., Hwang J.Y., Hwang H. et al.* Simple and cost-effective method of highly conductive and elastic carbon nanotube/polydimethylsiloxane composite for wearable electronics // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. Id. 1375. DOI: 10.1038/s41598-017-18209-w
25. *Du J., Wang L., Shi Y., et al.* Optimized CNT-PDMS Flexible Composite for Attachable Health-Care Device // *Sensors (Basel)*. 2020. Vol. 20, iss. 16. Id. 4523. DOI: 10.3390/s20164523
26. *Chetyrkina M.R., Fedorov F.S., Nasibulin A.G.* In Vitro Toxicity of Carbon Nanotubes: A Systematic Review // *RSC Adv.* 2022. Vol. 12. P. 16235–16256. DOI: 10.1039/D2RA02519A
27. *Zhang W., Choi D.S., Nguyen Y.H., Chang J.C., Qin L.* Studying Cancer Stem Cell Dynamics on PDMS Surfaces for Microfluidics Device Design // *Scientific Reports*. 2013. Vol. 3. Id. 2332. DOI: 10.1038/srep02332
- СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова, Санкт-Петербург**
(Алтынбаев Л.А., Плешаков П.С., Филатов Н.А., Букатин А.С.)
- Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург** (Букатин А.С.)
- Контакты: Букатин Антон Сергеевич,
antbuk.fiztek@gmail.com
- Материал поступил в редакцию 12.05.2025

MICROFLUIDIC ORGAN-ON-A-CHIP DEVICE WITH POROUS MEMBRANE FOR LONG-TERM CELL CULTIVATION

L. A. Altyntbaev¹, P. S. Pleshakov¹, N. A. Filatov¹, A. S. Bukatin^{1,2}

¹Alferov University, St. Petersburg, Russia

²Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia

Currently, microfluidic organ-on-a-chip devices are considered as an alternative for drug testing in preclinical studies. They can simulate the structure and functions of individual human organs and organ systems, such as lungs, liver, kidneys, intestines, etc. for screening various substances. One of the key elements of organ-on-a-chip devices is a flexible porous membrane. Cell growth on such membranes allows studying the cellular response to mechanical and chemical stimuli. In this research, we developed a method for fabricating microfluidic organ-on-a-chip devices containing a flexible suspended porous membrane made of polydimethylsiloxane (PDMS) with the addition of multi-walled carbon nanotubes, which increase the mechanical strength of the membrane and do not affect its optical properties. The use of carbon nanotubes made it possible to increase the surface area of the obtained membranes and reduce their rupture during production. For cell growth in the organ-on-a-chip devices, a passive change of the nutrient medium was used. It was based on periodic changes in the tilt angle of the device located on an oscillating platform. This approach allowed growing cells of model cell lines for more than 7 days with a viability of more than 95%. The results obtained indicate good biocompatibility of the used material and its applicability for the fabrication of flexible porous membranes in organ-on-a-chip devices.

Keywords: microfluidics, microfluidic device, microfluidic chip, organ-on-a-chip, tissue engineering, drug testing, polydimethylsiloxane, porous membrane

REFERENCES

- Ingber D.E. Human organs-on-chips for disease modeling, drug development and personalized medicine. *Nat. Rev. Genet.*, 2022, vol. 23, pp. 467–491. DOI: 10.1038/s41576-022-00466-9
- Mullard A. Parsing clinical success rates. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2016, vol. 15, Id. 447. DOI: 10.1038/nrd.2016.136
- Pippin J.J., Cavanaugh S.E., Pistollato F. Ch. 20. Animal Research for Alzheimer Disease: Failures of Science and Ethics. In: *Animal experimentation: working towards a paradigm change. Series: Human-Animal Studies*, vol. 22, 2019, pp. 480–516. DOI: 10.1163/9789004391192_021
- Seok J., Warren H.S., Cuenca A.G., et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 9, pp. 3507–3512. DOI: 10.1073/pnas.1222878110
- Lozupone M., Dibello V., et al. Lessons learned from the failure of solanezumab as a prospective treatment strategy for Alzheimer's disease. *Expert. Opin. Drug. Discov.*, 2024, vol. 19, no. 6, pp. 639–647. DOI: 10.1080/17460441.2024.2348142
- Teixeira Carvalho D.J., Moroni L., Giselsbrecht S. Clamping strategies for organ-on-a-chip devices. *Nat. Rev. Mater.*, 2023, vol. 8, pp. 147–164. DOI: 10.1038/s41578-022-00523-z
- Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 2010, vol. 328, no. 5986, pp. 1662–1668. DOI: 10.1126/science.1188302
- Yang J., Hirai Y., Iida K., et al. Integrated-gut-liver-on-a-chip platform as an in vitro human model of non-alcoholic fatty liver disease. *Commun. Biol.*, 2023, vol. 6, Id. 310. DOI: 10.1038/s42003-023-04710-8
- Lee J., Kim S. Kidney-on-a-Chip: A New Technology for Predicting Drug Efficacy, Interactions, and Drug-induced Nephrotoxicity. *Curr. Drug. Metab.*, 2018, vol. 19, no. 7, pp. 577–583. DOI: 10.2174/1389200219666180309101844
- Nguyen O.T.P., Misun P.M., Hierlemann A., Lohasz C.A. Versatile Intestine-on-Chip System for Deciphering the Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Adv. Healthc. Mater.*, 2024, vol. 13, no. 7, Id. 2302454. DOI: 10.1002/adhm.202302454
- Werdich A.A., Lima E.A., Ivanov B., et al. A microfluidic device to confine a single cardiac myocyte in a sub-nanoliter volume on planar microelectrodes for extracellular potential recordings. *Lab Chip*, 2004, vol. 4, pp. 357–362. DOI: 10.1039/B315648F
- Servais B., Mahmoudi N., Gautam V., et al. Engineering Brain-on-a-Chip Platforms. *Nature Reviews Bioengineering*, 2024, vol. 2, pp. 691–709. DOI: 10.1038/s44222-024-00184-3
- Leung C.M., de Haan P., Ronaldson-Bouchard K., et al. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, vol. 2, Id. 33. DOI: 10.1038/s43586-022-00118-6
- Abrignani M.G., Gatta L., Gabrielli D., et al. Gastroprotection in patients on antiplatelet and/or anticoagulant therapy: a position paper of National Association of Hos-

- pital Cardiologists (ANMCO) and the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO). *Eur. J. Intern Med.*, 2021, vol. 85, pp. 1–13. DOI: 10.1016/j.ejim.2020.11.014
15. Rumsey J.W., Lorange C., Jackson M., et al. Classical Complement Pathway Inhibition in a "Human-On-A-Chip" Model of Autoimmune Demyelinating Neuropathies. *Adv. Ther. (Weinh.)*, 2022, vol. 5, no. 6, Id. 2200030. DOI: 10.1002/adtp.202200030
 16. FDA: Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies.
URL: <https://www.fda.gov/media/186092/download>
 17. Zhang B., Korolj A., Lai B.F.L., Radisic M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat. Rev. Mater., Springer, US*, 2018, vol. 3, pp. 257–278. DOI: 10.1038/s41578-018-0034-7
 18. Corral-Nájera K., Chauhan G., Serna-Saldívar S.O., et al. Polymeric and biological membranes for organ-on-a-chip devices. *Microsyst. Nanoeng.*, 2023, vol. 9, Id. 107. DOI: 10.1038/s41378-023-00579-z
 19. Huh D., Kim H.J., Fraser J.P., et al. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat. Protoc.*, 2013, vol. 8, pp. 2135–2157. DOI: 10.1038/nprot.2013.137
 20. Low L.A., Mummery C., Berridge B.R., et al. Organs-on-chips: into the next decade. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2021, vol. 20, pp. 345–361. DOI: 10.1038/s41573-020-0079-3
 21. Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat. Protoc.*, 2010, vol. 5, pp. 491–502. DOI: 10.1038/nprot.2009.234
 22. Bukatin A.S., Malyshev E.I., Kukhtevich I.V., et al. Fabrication of High-Aspect-Ratio Microstructures in Polymer Microfluid Chips for in Vitro Single-Cell Analysis. *Tech. Phys.*, 2016, vol. 61, no. 10, pp. 1566–1571. DOI: 10.1134/S106378421610008X
 23. Giulitti S., Magrofuoco E., Prevedello L., Elvassore N. Optimal periodic perfusion strategy for robust long-term microfluidic cell culture. *Lab Chip*, 2013, vol. 13, no. 22, pp. 4430–4441. DOI: 10.1039/C3LC50643F
 24. Kim J., Hwang J.-Y., Hwang H., et al. Simple and cost-effective method of highly conductive and elastic carbon nanotube/polydimethylsiloxane composite for wearable electronics. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, Id. 1375. DOI: 10.1038/s41598-017-18209-w
 25. Du J., Wang L., Shi Y., et al. Optimized CNT-PDMS Flexible Composite for Attachable Health-Care Device. *Sensors (Basel)*, 2020, vol. 20, no. 16, Id. 4523. DOI: 10.3390/s20164523
 26. Chetyrkina M.R., Fedorov F.S., Nasibulin A.G. In Vitro Toxicity of Carbon Nanotubes: A Systematic Review. *RSC Adv.*, 2022, vol. 12, no. 25, pp. 16235–16256. DOI: 10.1039/D2RA02519A
 27. Zhang W., Choi D.S., Nguyen Y.H., Chang J.C., Qin L. Studying Cancer Stem Cell Dynamics on PDMS Surfaces for Microfluidics Device Design. *Scientific Reports*, 2013, vol. 3, Id. 2332. DOI: 10.1038/srep02332

Contacts: Bukatin Anton Sergeevich,
antbuk.fiztek@gmail.com

Article received by the editorial office on 12.05.2025

INTRODUCTION

One of the key stages of drug development is conducting studies of the efficacy and toxicity of promising drugs on laboratory animals. Despite the fact that existing requirements dictate preclinical studies on at least two types of laboratory animals, one of which is not a rodent, the results obtained often have low predictability with respect to the specificity and toxicity of the tested drugs in humans and do not allow adequately predicting the effects observed in clinical trials [1, 2]. In particular, successful results of testing new drugs obtained on animal models of Alzheimer's disease and inflammatory diseases are often not reproduced in clinical trials on humans [3, 4]. One of the striking examples of such a failure is the monoclonal antibody Solanezumab, which has shown no efficacy in the treatment of Alzheimer's disease in human experiments, despite encouraging results in animal experiments [5].

Currently, due to the lack of relevant animal models for many diseases, there is an active search for alternative methods and technologies that can replace traditional animal tests. Microphysiological microfluidic organ-on-a-chip devices have emerged as an alternative platform for *in vitro* drug testing to eliminate the shortcomings of existing preclinical models [6]. In organ-on-a-chip devices, it is possible to create controlled microenvironments in which cells can reproduce the complex anatomical and functional features of living human tissues and organs. It is assumed that such tissue and organ models can provide researchers with more complete and accurate data on reactions to test molecules compared to the results obtained using traditional preclinical methods [6].

One of the first microfluidic devices simulating the functions of an entire organ is the lung-on-a-chip device, presented in 2010 [7]. Its appearance is also associated with the emergence of the term organ-on-a-chip. Later, devices were developed to simulate the functionality of a wide variety of organs *in vitro*, such as the liver [8], kidneys [9], intestines [10], heart [11], brain [12], [13] etc. Researchers are also making great efforts to combine models of several organs in one multi-organ device, called human-on-a-chip, to study their interactions with each other and analyze their joint response to the introduction of drugs [14]. Models of such devices developed to date can include from 2 to 10 different organ models and are capable of simulating complex physiological and pathophysiological reactions, such as modeling the regulation of insulin secretion [1].

Currently, not only educational and research organizations, but also commercial companies such as

Insphero, Mimetas, Emulate, HesperosInc., TissUse, Bi/ond, NETRI, BiomimX, CherryBiotech, and Axo-Sim are developing and producing organ-on-a-chip devices. They are actively bringing to market devices that have proven themselves at the research stage and that pharmaceutical companies are beginning to implement in the drug development process. For example, clinical trials of a drug for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (*Clinical Trial NCT04658472*) were approved based on data obtained using a microfluidic "human-on-a-chip" device [15]. All this allowed the US Food and Drug Administration (FDA) to include organ-on-a-chip devices in the roadmap for reducing the use of animals in preclinical drug trials in 2025 [16].

One of the key components of organ-on-a-chip devices are flexible polymer membranes that allow modeling tissue barriers in the body, such as the blood-brain barrier, blood-ophthalmic barrier, blood-placental barrier, air-blood barrier, glomerular barrier, and others [17]. Studying the development of cells on porous membranes in such devices allows us to study how fluid movement, mechanical deformation, and chemical signals affect the development of tissues and organs. Membranes can be made of such common polymeric materials as polycarbonate, polyethylene terephthalate (PET), polydimethyl siloxane (PDMS), polylactide (PLA), etc. [18]. Porous PDMS membranes produced by soft lithography have key advantages: optical transparency, stretchability, biocompatibility, and chemical inertness. Therefore, they are widely used in the manufacture of organ-on-a-chip devices [19]. However, the problems of mass and reliable production of devices with such membranes, increasing the number of simultaneously analyzed samples, and reproducible development and growth of cells in them, which would allow validation of both the organ-on-a-chip devices themselves and drug testing methods, have not yet been fully resolved [20].

The aim of this work is to develop a reliable method for the fabrication of microfluidic organ-on-a-chip devices with a flexible suspended porous PDMS membrane to study the effect of mechanical and chemical stimuli on cell growth. For this purpose, it was proposed to include multi-walled carbon nanotubes into the PDMS membranes, so that the former act as a reinforcing material that strengthens the membrane material. For cell growth on the PDMS membrane in the microfluidic device, a passive change of the nutrient medium was used, based on periodic changes in the tilt angle of the chip located on a rocking platform. This approach allowed cell culture of model cell lines for more than 7 days with a viability of more than 95%.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Fabrication of microfluidic devices

The microfluidic organ-on-a-chip device consists of three layers: the upper and lower layers contain one microchannel each—in the complete device they are located one above the other, separated by a middle layer, which is a flexible porous membrane 50 μm thick with a pore diameter of 10 μm (see Fig. 1). In the upper and lower layers, the channels are surrounded on both sides by two hollow chambers, the periodic filling of which with compressed air deforms the porous membrane and can provide mechanical stimulation of the cells located on the membrane.

The organ-on-a-chip device was fabricated from a biocompatible, elastic and optically transparent silicone compound Sylgard 184 polydimethylsiloxane (PDMS, DowCorning, Midland, USA) using soft lithography technology [21]. Its upper and lower layers were formed by curing a degassed base mixture mixed in a 10 : 1 ratio. The prepared mixture was poured onto a master mold placed in a Petri dish and kept for 4 h at a temperature of 65 °C. The master mold was a silicon substrate on the surface of which microchannels were formed using photolithography in SU-8 2025 photoresist (Kayaku Advanced Materials, USA) [22]. After curing the PDMS, the replica was separated from the mold and cut into individual devices. Input and output holes with a diameter of 2 mm were made in the replicas using a skin biopsy punch.

Fig. 1. Schematic diagram of the organ-on-a-chip microfluidic device.

a — assembly diagram; b — 3D model of channels;
c — principle of manufacturing a porous membrane

To fabricate the porous membrane using photolithography and reactive ion etching, a silicon master mold containing an array of cylindrical micropillars with a diameter of 10 μm , a height of 50 μm , and an intercenter distance of 40 μm was created. To reduce the adhesion of PDMS to the master mold, the latter was coated with a layer of Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (Sigma-Aldrich, Germany) in a vacuum chamber at room temperature for 12 h. ~ 1 g of a thoroughly mixed and degassed mixture of the base and the Sylgard 184 hardener in a ratio of 10 : 1 was placed on the master mold. After this, a rectangular block of PDMS was placed on the master mold, on which a load weighing ~ 1 kg was placed. The membrane was cured at 75 °C for 4 h. The ratio of the base and curing agent in the PDMS block was 15 : 1; the surfaces were coated with a layer of Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane. The resulting membrane was carefully separated from the master

mold and the PDMS block in a container with ethyl alcohol.

The assembly of the microfluidic organ-on-a-chip was carried out by sequentially connecting all the layers after treating the surfaces with oxygen plasma in a V15-G installation (PINK GmbH Thermosysteme, Germany). The layers were superimposed and aligned relative to each other immediately after plasma treatment of the surfaces with alignment control in an optical microscope. The assembled structure was kept at a temperature of 75 °C for 12 h.

To increase the mechanical strength of the PDMS membrane and reduce the likelihood of its rupture during separation from the master mold, multilayer carbon nanotubes (CNTs) (China) were added to its composition, forming a reinforcing mesh in the material. To create such a composite, a suspension of nanotubes in isopropyl alcohol at a concentration of 0.02 g/ml is prepared, thoroughly mixed and processed in an ultrasonic bath for 4 h. After processing, the nanotubes are deposited on a metal substrate, and excess isopropyl alcohol is removed. The resulting concentrated suspension is added to the Sylgard 184 base at a concentration of ~ 5% (by weight), thoroughly mixed and degassed for 12 h. The resulting mixture of the base with carbon nanotubes can be stored at room temperature until use. Before the membrane production, this mixture is mixed with the hardener in a ratio of 1 : 10 (by weight), thoroughly stirred and degassed, and then used according to the protocol given above.

The geometric dimensions of all the obtained microstructures were determined using an INM 100 optical inspection station (Leica Microsystems, Germany), a Supra 25 scanning electron microscope (Carl Zeiss, Germany) and an XP-1 stylus profilometer (Ambios Technology, Santa Cruz, California, USA). To evaluate the influence of carbon nanotubes on the optical properties of PDMS membranes, an Evolution 300 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) was used.

1.2. Cell cultures

The adhesive tumor lines of mouse colon adenocarcinoma CT26-eGFP expressing green fluorescent protein and human cervical carcinoma HeLa were used as model cell cultures for testing the organ-on-a-chip devices. The cultures were received from the Russian Collection of Vertebrate Cell Cultures of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg. CT26-eGFP cells were cultured in RPMI medium (БиоЛот, Russia), and HeLa cells in DMEM medium (БиоЛот, Russia). In both cases, 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA) and the antibiotic gentamicin (40 μg /ml) were added to the medium. The cells were cultured in an incubator in

a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at a temperature of 37 °C.

The viability of CT26-eGFP cells during growth in the organ-on-a-chip devices was assessed by the fluorescence intensity of green fluorescent protein in the cytoplasm. To contrast the nuclei of dead cells, propidium iodide was added to the cell medium at a concentration of 2 µg/ml. To assess the interaction of the PDMS membrane with the cytoskeleton, HeLa cells were used, the nuclei of which were stained with the fluorescent dye DAPI (Sigma-Aldrich, USA), and actin filaments were stained with fluorescently labeled phalloidin (Invitrogen, USA) at a concentration of 1 µl/ml (according to the manufacturer's protocol). Before staining, the cells were fixed in the channel of the microfluidic device in a 4% paraformaldehyde solution. After fixation of the cells, the upper channel of the device was filled with a mixture of fluorescent dyes and incubated for 15 min at 37 °C. After staining, all samples were analyzed on an Axio Observer Z1 inverted microscope (Carl Zeiss, Germany) with a Yokogawa CSU-X1 confocal module (Yokogawa, Japan).

1.3. Functionalization of the membrane and loading of cells into the devices

In order to increase cell adhesion to the PDMS membrane, it was covered with a collagen layer. The collagen solution was prepared by mixing DMEM/F12 medium preheated to +37 °C with a stock solution of mouse collagen I (concentration 0.7 mg/ml) in 0.2 M acetic acid in a 9:1 ratio. The stock solution of mouse collagen I was provided by the Laboratory of Cell Biotechnology, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg. Before treating the membrane with collagen, the microfluidic device was re-treated with oxygen plasma. Then its channels were filled with the prepared collagen solution with a concentration of 0.07 mg/ml, after which the device was incubated for 1 h in a thermostat at a temperature of 37 °C. After incubation, the channels were washed with DMEM/F12 medium at a temperature of 37 °C. To load cells into the microfluidic device, 50–100 µl of cell suspension with a concentration of ~ 1 million/ml were introduced into its upper channel. To fix the cells on the membrane, the device was incubated in a CO₂ incubator without changing the nutrient medium for 12 h. After that, the cell medium was replaced with fresh one.

1.4. Periodic change of the nutrient medium

Since the volume of the chamber with cells in the microfluidic device is ~ 1.5 µl, then for effective cell growth over a long period of time, it is necessary to

ensure a periodic change of the nutrient medium with a period of several hours [23]. For this purpose, the device was placed on a specially designed rocking platform that provided a periodic change in the tilt angle of the device according to a given algorithm. When the tilt angle changed, the liquid flowed from one reservoir of the microfluidic device to another due to the difference in hydrostatic pressures in them (see Fig. 2, a).

1.5 ml plastic connectors manufactured on a Formlabs 3B+ 3D printer (FormLabs, USA), were used as reservoirs. When the tilt angle of the platform changed, the liquid flow time in the microfluidic device did not exceed 5 min. A complete replacement of the medium in the reservoirs of the device was carried out every two days.

Fig. 2. System of periodic change of nutrient medium in microfluidic organ-on-a-chip device.
a — schematic diagram of medium replacement; b — general view of rocking platform with microfluidic device in CO₂ incubator

The developed rocking platform has compact dimensions of 139 × 101 × 53 mm and is capable of autonomous operation in CO₂ incubator atmosphere (5% CO₂, temperature +37 °C) (Fig. 2, b). The platform contains a stepper motor, Arduino Nano microcontroller, OLED display and encoder, allowing to set the algorithm of platform tilt angle change in the range of ±400 and execute it for a long time of device operation (more than 7 days).

2. RESULTS

2.1. Fabrication and characterization of microfluidic devices

The main functional element of the microfluidic organ-on-a-chip device is a flexible porous membrane on which cells are attached and grow. Due to its biocompatibility, chemical inertness and optical transparency, polydimethylsiloxane (PDMS) is one of the main materials used to create flexible membranes. During the fabrication of the microfluidic device, the membrane is connected to the upper and lower parts of the device, acting as a separator between two chambers to which microchannels are connected for the introduction of cells, nutrient medium and active biomolecules, as well as for the output of the medium for the analysis of cellular waste products. An image of the assembled microfluidic device is shown in Fig. 3, a.

To produce pores in PDMS membranes, an array of cylindrical micropillars with a diameter of 10 µm and a height of 50 µm was produced on a silicon sub-

strate using photolithography and reactive ion etching (see Fig. 3, b). When PDMS is cured on such a substrate, through holes are formed in the resulting PDMS film with a thickness of less than 50 μm , ensuring the transport of substances between the upper and lower chambers of the device (see Fig. 3, c–e). In this case, the pore size in the membrane is smaller than the characteristic size of mammalian cells ($\sim 20 \mu\text{m}$), so the membrane serves as a certain barrier to the movement of cells from one chamber to another.

Fig. 3. Microfluidic organ-on-a-chip device. a — topology of the device channels (1 — upper channel, 2 — lower channel, 3 — chambers for mechanical deformation of the membrane), scale — 1 mm; b — array of microstructures on the master mold for membrane fabrication, scale — 30 μm ; c — membrane fragment, scale — 50 μm ; d — membrane cross-section, scale — 50 μm ; e — cross-section of the microfluidic chip. All membranes shown in the images contained 5% multi-walled carbon nanotubes, scale — 200 μm

The production of PDMS membranes with a thickness of less than 50 μm is associated with a high probability of their rupture when separated from the silicon master mold and from the PDMS pressing block, which did not allow reproducibly obtaining membranes with an area of more than $(5 \times 5) \text{ mm}^2$. To improve the strength of the membranes, it was proposed to produce them from a nanocomposite obtained by adding multi-walled carbon nanotubes to PDMS. The addition of carbon nanotubes increases the Young's modulus of PDMS and the tensile strength, and also leads to an increase in the contact angle of water on the surface and reduces the specific electrical resistance of the material [24, 25]. Also, carbon nanotubes placed on a substrate do not exhibit a toxic effect on cells in the overwhelming majority of studies, which is extremely important for long-term cell cultivation in organ-on-a-chip devices [26]. However, the addition of carbon nanotubes can degrade the optical characteristics of the membrane in the visible spectral range, which can affect the applicability of optical microscopy methods for monitoring the physiological state of cells. To study this effect, we measured the optical transmission spectra of PDMS membranes with a carbon nanotube content of 2.5–10%; results are shown in Fig. 4. The presented data show that in the visible spectral range of 400–750 nm, the addition of carbon nanotubes reduces the transmittance of a 50- μm -thick membrane by no more than 8%, which should not worsen the quality of the obtained microscopic images. In this regard, for the manufacture of membranes for organ-on-a-chip devices, we chose to

add 5% carbon nanotubes by weight to PDMS, which made it possible to reproducibly obtain membranes with an area of $(35 \times 20) \text{ mm}^2$.

Fig. 4. Transmission spectra of 50 μm thick PDMS films depending on the concentration of multi-walled carbon nanotubes (CNTs).

2.2. Study of cell growth on a porous membrane in an organ-on-a-chip microfluidic device

Since PDMS is a hydrophobic material, cell adhesion to it is significantly worse than to standard laboratory plastic [27]. To enhance cell adhesion, the PDMS surface can be treated with fibronectin, collagen, albumin, and other extracellular matrix proteins. Mouse collagen type I was chosen to treat the PDMS membrane in the organ-on-a-chip microfluidic device. Experimental cell growth on membranes in a multi-well plate showed that CT26 cells form three-dimensional cell aggregates on the native PDMS surface due to poor adhesion to the surface (see Fig. 5, a). However, on the membranes coated with collagen, the cells were uniformly distributed over the entire surface and attached to it, acquiring an elongated shape, which indicates good adhesion of the cells to the surface (Fig. 5, b).

Fig. 5. Morphology of CT26 cells on the surface of PDMS membranes. a — native membrane, scale 1000 μm ; b — membrane coated with collagen film, scale 1000 μm . Images were obtained on the 4th day of cultivation

Based on the obtained results, in all experiments, the membranes of the microfluidic devices were coated with a collagen layer before loading the cells. After loading and attaching the cells to the membrane surface, the organ-on-a-chip devices were placed in a CO_2 incubator on a rocking platform for periodic (once per hour) replacement of the nutrient medium. After seven days of incubation, a cell monolayer was formed on the membrane of the device. Optical microscopy data show that CT26 and HeLa cells were successfully attached to the PDMS surface and retained more than 95% viability during the entire incubation period (see Fig. 6, a–c). Staining of the cytoskeleton of HeLa cells (see Fig. 6, d) showed that most of the cells acquired an elongated shape, spreading out on the PDMS membrane, which indicates their successful attachment to it. The results obtained show that long-term growth and development of cell cul-

tures are possible in the developed microfluidic organ-on-a-chip devices.

Fig. 6. Development of CT26-eGFP and HeLa cells on PDMS membrane in microfluidic organ-on-a-chip device.

a — CT26 cells on day 7 of cultivation in bright field mode combined with fluorescence image in GFP channel, scale bar 200 μm ; b — fluorescence image in GFP channel of CT26 cells, scale bar 200 μm ; c — fluorescence of CT26 cells in propidium iodide channel, scale bar 200 μm ; d — fluorescence image of HeLa cells on day 7 of cultivation, scale bar 100 μm

CONCLUSIONS

Thus, within the framework of this work, a method for the fabrication of microfluidic organ-on-a-chip devices with a flexible suspended porous membrane for cell growth was developed. The membrane is made of polydimethylsiloxane (PDMS) with the addition of 5% multi-walled carbon nanotubes. Through pores with a diameter of 10 μm and an intercenter distance of 40 μm are formed in it using the soft lithography method and a silicon master mold. Addition of carbon nanotubes to the membrane increases its mechanical strength and reduces the probability of rupture during separation from the master mold. This made it possible to stably obtain membranes with

a thickness of $\sim 50 \mu\text{m}$ and an area of $(35 \times 20) \text{ mm}^2$. Addition of 5% nanotubes by weight slightly reduces its optical transmittance by no more than 8% in the visible spectral range of 400–750 nm.

It was experimentally shown that CT26 and HeLa cells have low adhesion to the PDMS membrane with carbon nanotubes and form three-dimensional cellular aggregates on its surface. Treatment of the membrane surface with type I collagen increases cellular adhesion and leads to the formation of a monolayer of CT26 and HeLa cells during cultivation. For long-term cell culturing in organ-on-a-chip devices, a compact rocking platform was developed for passive periodic replacement of the nutrient medium in the cell chamber due to the occurrence of a difference in hydrostatic pressures when changing the tilt angle of the device. This method of changing the nutrient medium allows culturing cells of the model cell lines CT26 and HeLa on a membrane in a microfluidic organ-on-a-chip device for more than 7 days with a viability of more than 95%. The results obtained indicate good biocompatibility of the composite used and its applicability for the manufacture of flexible porous membranes in organ-on-a-chip devices.

Acknowledgments

The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation within the framework of project No. 20-74-10117. Filatov N.A. thanks the project of the Russian Science Foundation No. 23-79-01212 for financial support.