

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПЕРФУЗИИ В МИКРОФЛЮИДНОЙ МОДЕЛИ ПЛАЦЕНТЫ-НА-ЧИПЕ

© 2024 г. С. Ю. Пауль^{1, 2}, Ю. А. Сафронова¹, О. Е. Чеботарева¹, И. А. Хаустов^{1, 3},
А. Э. Каримова¹, Д. В. Колесов^{1, 4, 5}, П. А. Вишнякова^{4, 6}, Ю. А. Макарова¹, Е. Н. Князев^{1, 3, *}

¹Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет
“Высшая школа экономики”, Москва, 101000 Россия

²ООО “Троицкий инженерный центр”, Москва, 108840 Россия

³Лаборатория микрофлюидных технологий для биомедицины, Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117198 Россия

⁵ООО “Микрофлюидные технологии”, Москва, 115088 Россия

⁶Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины,
ФГАОУ ВО “Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы”, Москва, 117198 Россия

*e-mail: eknyazev@hse.ru

Поступила в редакцию 26.05.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 20.06.2024 г.

Разработка и создание модели плаценты-на-чипе востребовано в разных областях клеточной биологии, особенно в исследованиях молекулярных механизмов патогенеза болезней и действия потенциальных лекарственных средств. В настоящее время для изготовления микрофлюидных устройств из термопластов чаще всего используют метод фрезерования. Однако эта технология приводит к формированию нежелательной шероховатости поверхности, способствующей образованию воздушных пузырей и снижающей оптическую прозрачность полимера. В связи с этим назрела необходимость в усовершенствовании технологии изготовления чипов и их эксплуатации. Нами проанализированы различные способы модификации поверхности поликарбонатного чипа и дальнейшей оптимизации контура. Показано, что эффективно удаляет шероховатости с поверхности поликарбонатного чипа паровая обработка препаратом JINHF (JINHF, Китай). Подобранный метод для обработки поверхности значительно уменьшает шероховатость внутренних каналов, что способствует заполнению чипа без образования областей с трудноудаляемыми пузырями воздуха. В процессе оптимизации были изучены два “пассивных” метода по устранению пузырей из микрофлюидной системы: вертикальное позиционирование чипа и создание ловушки для пузырей в конструкции чипа. Проведено сравнение этих способов с “активным” методом удаления пузырей – путем подключения ловушки Elveflow (Elveflow Elveflow, Франция) с вакуумным насосом к чипу. Метод вертикального позиционирования органа-на-чипе во время культивирования оказался более эффективным для удаления пузырей воздуха, чем встроенная и внешняя ловушки. Разработанный вариант микрофлюидного устройства при конфигурации контура, показавшего наилучший результат, апробирован на процессе длительного культивирования клеток BeWo b30 и EA.hy926 как моделей плаценты-на-чипе в динамике.

Ключевые слова: микрофлюидика, орган-на-чипе, плацента-на-чипе, морфология поверхности, шероховатость поверхности, пузыри воздуха, удаление пузырей

DOI: 10.56304/S0234275824030086

В последние десятилетия органы-на-чипе все чаще используют для моделирования физиологических и патологических процессов, что позволяет максимально точно воспроизводить функционирование различных органов и тканей человека

в искусственных условиях. Эти системы имеют ряд преимуществ в сравнении с традиционными методами моделирования тех или иных процессов в живых клетках в статичной среде. В частности, микрофлюидный поток позволяет постоянно доставлять к клеткам обогащенную кислородом и питательными веществами среду, отводя продукты обме-

Список сокращений: ПДМС – полидиметилсилоксан; ПЭТ – полиэтилентерефталат.

на, а также поддерживать в системе напряжение сдвига, значительно влияющее на фенотип клеток. Важно, что в ходе исследования органа-на-чипе можно наблюдать за изучаемыми объектами в режиме реального времени, манипулировать условиями эксперимента, контролировать протекающие процессы [1–3]. Одно из приоритетных направлений микрофлюидики – разработка модели плаценты-на-чипе, которая может быть использована при изучении проницаемости плаценты для лекарственных препаратов и развития различных патологических процессов, в том числе такого осложнения беременности, как преэклампсия. Известные модели плаценты-на-чипе чаще всего включают клетки, имитирующие трофобласт и эндотелий сосудов, например клетки хориокарциномы BeWo и эндотелия пупочной вены HUVEC. Однако в этом случае работа с первичной клеточной линией HUVEC затруднена из-за ее сниженной выживаемости в нестабильной микрофлюидной системе, где клетки подвержены повышенному стрессу. Именно поэтому вместо HUVEC часто используют альтернативные клеточные линии, такие как иммортализованные эндотелиальные клетки EA.hy926 [4].

На сегодняшний день один из самых распространенных материалов для изготовления чипов – полидиметилсилоксан (ПДМС). Этот полимер популярен в сборке и изготовлении чипов в первую очередь благодаря простоте и относительно низкой стоимости [5]. Однако в сравнении с термопластами ПДМС имеет ряд недостатков, обусловленных в основном гидрофобностью этого материала: адсорбирует гидрофобные соединения [6], имеет высокую газопроницаемость [7], из-за чего повышается вероятность образования пузырей в контуре [8]. Среди других материалов, используемых для серийного производства чипов, можно отметить полистирол, поликарбонат и полиметилметакрилат. Эти материалы сильно отличаются по механическим свойствам, в связи с чем на этапе прототипирования коммерческие компании используют различные технологии для изготовления чипов, например фрезерование или лазерную абляцию [9, 10]. У каждого из этих способов есть преимущества и недостатки. Лазерную абляцию можно использовать только на определенных пластиках. Так, эта технология не подходит для легко воспламеняемого поликарбоната [11]. К недостаткам технологии фрезерования относятся характеристики получаемой поверхности: шероховатость и непрозрачность (матовость) [12]. Это создает проблемы при герметизации и визуализации процессов, происходящих в органах-на-чипе [13]. В литературе описано снижение степени шероховатости поверхности чипа путем использования более точного и дорогостоящего оборудования, а также оптимальных сверл и параметров [10]. В нескольких работах описан другой эффективный метод

“борьбы” с шероховатостью поверхности – химическая обработка паром (далее – паровая полировка); при этом для каждого полимера необходимо специально подбирать состав раствора и параметры обработки [14, 15].

Образование газовых пузырей в контуре – еще одна распространенная техническая проблема микрофлюидики. Это очень нежелательное явление, так как из-за пузырей на клетки начинают действовать факторы, снижающие их жизнеспособность: межфазная сила на границе раздела жидкой и газообразной фаз; окислительный стресс, развивающийся из-за контакта с воздухом; нарушение циркуляции питательной среды через каналы чипа. D. Nuh с соавт. [8] в числе основных причин проблем при работе с микрофлюидными устройствами приводят неоптимальные условия заполнения чипов питательной средой, гидрофобные свойства ПДМС и испарение жидкости внутри каналов. Для решения этих технических моментов микрофлюидики предложены различные способы, которые условно можно разделить на две группы. “Пассивные” методы включают обработку поверхности и формирование камер или мембран, встроенных в чип, для удаления пузырей из системы; в то время как действие “активных” способов основано на применении отрицательного давления, акустического или лазерного воздействия [16–19]. Стоит заметить, что “пассивные” методы, как правило, дешевле и проще “активных” в использовании, поэтому их применение считается более целесообразным. Несмотря на явные преимущества “пассивных” технологий, их масштабирование до промышленного формата требует больших вложений, что приводит к повышению стоимости органов-на-чипе и ограничению способов их применения [16, 19, 20]. Обработка поверхности и другие используемые модификации не предотвращают образования пузырей в самом органе-на-чипе, поэтому необходима комбинация подходов для удаления пузырей из контура.

Одно из предназначений модели плацента-на-чипе – исследование преэклампсии. Однако для этого необходимо выполнение двух основных требований: (i) длительное культивирование клеток – вплоть до 7 суток [4] – и (ii) отсутствие избыточного кислорода в контуре для минимизации гипоксии. В случае с деликатным культивированием клеток сразу на двух сторонах мембраны, что позволяет моделировать барьерную функцию плаценты, особенно важно минимизировать воздействие разных видов стресса, в частности окислительного и механического, вызванных образованием пузырей.

Целью представленного исследования было изучение и применение методов удаления пузырей из каналов микрофлюидных чипов для опти-

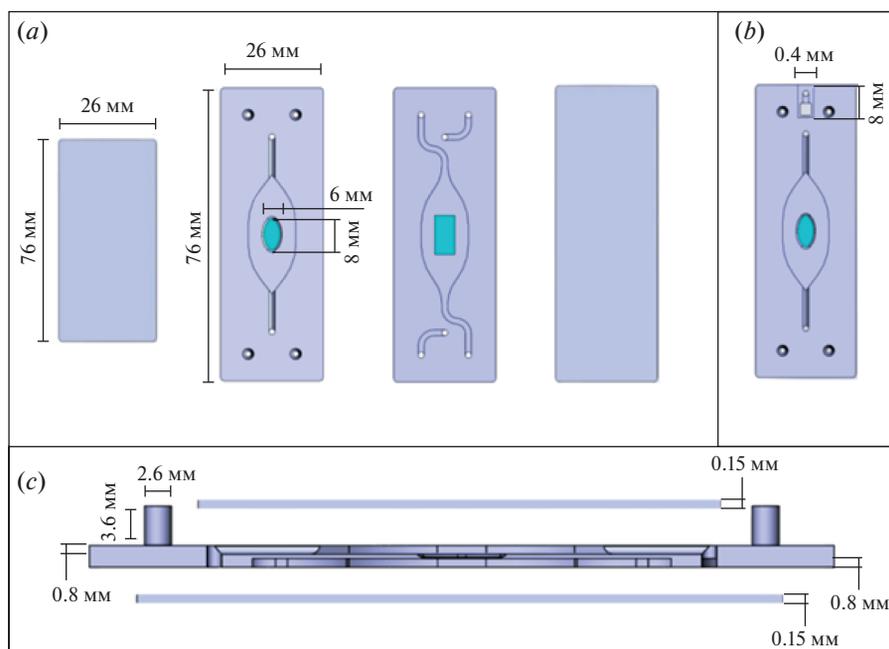


Рис. 1. Конфигурация чипа. 3D-модель чипа с пленкой для герметизации (a) или с интегрированной ловушкой для пузырей (b). Вид сбоку 3D-модели без интегрированной ловушки для воздуха (c).

Fig. 1. Chip configuration. 3D model of the chip with sealing film (a) or with integrated air bubble trap (b). Side view of the 3D model without the built-in bubble trap (c).

мизации условий культивирования клеток в модели плацента-на-чипе.

ве чипа при помощи находящихся на верхней части устройства четырех выступов с диаметром 2.8 мм и высотой 3.6 мм (рис. 1c).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конфигурация чипа

Для разработки трехмерной (3D) модели чипа использована программа Solidworks (Dassault Systèmes, Франция). Разработанный чип имеет общие габариты $76 \times 26 \times 5.6$ мм (Д \times Ш \times В). Микрофлюидная система состоит из двух параллельных проточных каналов: верхнего и нижнего (рис. 1a). Каждый канал состоит из подводящего микроканала, расширительной камеры и отводящего микроканала. По центру расширительных камер располагается отверстие эллипсоидной формы, соединяющее верхний и нижний канал, закрытое полупроницаемой мембраной. Компоненты чипа имеют следующие габариты: микроканалы 1.5×0.8 мм (Ш \times В); отверстие для пористой мембраны $8 \times 6 \times 0.4$ мм (Д \times Ш \times В), площадь отверстия 36.5 мм²; расширительные камеры $29 \times 12 \times 0.8$ мм (Д \times Ш \times В). В одном из исполнений чипа для пассивного удаления газовых пузырей в верхний контур был добавлен дополнительный резервуар-ловушка с габаритами $8 \times 4 \times 3.6$ мм (Д \times Ш \times В) и объемом 55 мкл (рис. 1b). Систему перфузии подключают к органу-на-чипе с помощью силиконовых трубок с внутренним диаметром от 1.6 до 1.8 мм. Силиконовые трубки закрепляют на осно-

Изготовление чипа

Чипы изготавливали из монолитного листа поликарбоната ("Вогтех", Россия) толщиной 5.6 мм на фрезерно-гравировальном станке с числовым программным управлением Волжанин-1 (ООО "РОСФРЕЗЕР", Россия). Широким сверлом (6 мм) снимали весь лишний пластик с монолитного листа и вырезали формы чипов. Более тонкие структуры изготавливали с использованием сверл соответствующих диаметров. Использовали следующие режимы: средняя частота вращения шпинделя – 10000 об/мин, скорость подачи режущего инструмента – 1000 мм/мин для верхней части чипа и 500 мм/мин для расширительных каналов.

После изготовления чипы визуально осматривали на предмет заусенцев и брака. Заусенцы убрали под оптическим микроскопом при помощи скальпеля. Далее чипы очищали в ультразвуковой ванне Pro Ultrasonic Cleaner (ООО "СПЕЦМАШ-СОНИК", Россия) в течение 45 мин при 65°C и высушивали в шкафу UT-4610 (HongKong Xieli International Trading Co., Ltd, Китай) при 65°C в течение 45 мин.

Паровая полировка поверхности. Для паровой полировки поверхности чипов использовали набор для бесконтактной химической полировки

HNP37016-D3005 с составом для химической полировки JINHF (JINHF, Китай), состоящим из синтетических смол и метилбензола. Состав для полировки заливали в нагревательную кружку со встроенной крышкой для точечного распределения пара. Как только устройство было готово к использованию, нагревательную кружку с крышкой подносили к поверхности чипа на расстояние 1–2 см и удерживали на таком расстоянии для равномерной обработки поверхности. Плавным движением, без задержек на одном месте, обрабатывали всю поверхность чипа. После паровой полировки поверхности чипа повторяли описанные выше этапы очистки в ультразвуковой ванне с последующим высушиванием и каждый чип помещали в индивидуальную упаковку для хранения.

В качестве альтернативного метода проводили паровую полировку с использованием растворов ацетона с концентрацией 50 и 99.75%. Для этого в стеклянную чашку Петри вносили 5 мл раствора ацетона (“ХлоренХима”, Россия), на металлическую подложку устанавливали чип, чашку Петри накрывали крышкой и герметизировали парафином в течение 24 ч. Чип вынимали из чашки Петри, промывали в дистиллированной воде и использовали для анализа топологии.

Сборка контура чипа. При сборке контура верхний и нижний каналы чипа герметизировали тонкой пленкой из поликарбоната (0.2 мм), которую крепили к основе чипа при помощи двусторонней клейкой ленты 3M 468MP 200MP (3M, Китай). Двусторонний скотч необходимой формы вырезали с помощью CO₂-лазера Mini (EpilogLaser, США). Для фиксации на чипе полупроницаемой мембраны с порами использовали тонкий двусторонний скотч 3M 467MP 200MP (3M). В экспериментах с клетками применяли мембрану из полиэтилентерефталата (ПЭТ) с диаметром пор 0.4 мкм и плотностью расположения (4.0×10^6)/см² (Corning, США).

Анализ топологии. При исследовании поверхностной топологии использовали оптический профилометр ContourGT-K (Bruker Nano Inc., США), предназначенный для измерения линейных размеров и проведения бесконтактного анализа рельефа поверхностей при помощи лазера. В программном обеспечении прибора выставляли параметры поля зрения по осям X, Y и Z (ось X – 310 мкм, ось Y – 230 мкм, ось Z – до 25 мкм). Исследовали поверхность, к которой был приклеен двусторонний скотч для мембраны и для герметизации системы каналов. Каждую поверхность изучали в разных точках ($n = 3$), которые выбирали случайным образом.

Культивирование клеточных линий

Для экспериментов с моделями плаценты-на-чипе использовали две клеточные линии. Клон линии клеток хориокарциномы BeWo b30, используемый для моделирования трофобласта плаценты человека, был любезно предоставлен Prof., PhD Christiane Albrecht (University of Bern, Switzerland) с разрешения MD, PhD Alan L. Schwartz (Washington University in St. Louis, USA). Гибридные эндотелиальные клетки EA.hy926, имитирующие эндотелий, были любезно предоставлены сотрудниками Лаборатории регенеративной медицины НИИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия).

Для культивирования клеточной линии EA.hy926 использовали среду Gibco Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота GenClone (FBS; Genesee Scientific, США), 1% Gibco GlutaMax (Thermo Fisher Scientific) и 1% раствора антибиотика-антимикотика Anti-Anti (Thermo Fisher Scientific). Для культивирования клеточной линии BeWo b30 использовали среду DMEM с L-глутамином и 4.5 г/л глюкозы (Capricorn Scientific, Германия), 10% FBS (Genesee Scientific), 1% заменимых аминокислот Gibco MEM NEAA (Thermo Fisher Scientific) и 1% раствора антибиотика-антимикотика Anti-Anti (Thermo Fisher Scientific).

Сборка и стерилизация контура

При пересадке клеток их концентрацию в суспензии определяли на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США). Для визуализации клеток на мембране, а также отслеживания их жизнеспособности использовали краситель CellTracker Green CMFDA Dye (Thermo Fisher Scientific). Клетки окрашивали в суспензии по протоколу производителя, используя раствор красителя CellTracker в конечной концентрации 20 мкМ в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. После этого раствор красителя заменяли на полную питательную среду и высевали клетки на чип. Клетки визуализировали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 с модулем флуоресценции (Zeiss, Германия).

Контур микрофлюидной системы включал резервуар со средой, перистальтический насос (ООО “Троицкий инженерный центр”, Россия), силиконовые трубки (“Siltax”, Россия) и пластиковые трубки (Elveflow, Франция), адаптеры D-646 (Chrom Tech, США) и собранный мембранный чип. В одной серии экспериментов в контур также вводили ловушку для пузырей Elveflow (Elveflow), подключенную через химически устойчивый мембранный вакуумный насос WELCH MPC 301 Z (Welch, Германия). При установке контура регу-

лировали относительную высоту чипа и резервуара, для чего чип закрепляли в штативе в необходимом (вертикальном или горизонтальном) положении и помещали в CO_2 -инкубатор при 37°C и $5\% \text{CO}_2$.

Трубки, коннекторы и основа чипа проходили 2 этапа стерилизации: автоклавирование при 121°C в течение 15 мин и обработку 70%-ным этанолом в течение 30 мин – с последующей сборкой в единую систему в ламинарном шкафу.

Культивирование клеток на чипе

Перед посевом клеток на чип приклеивали двусторонний скотч и пористую ПЭТ-мембрану и стерилизовали ультрафиолетом в течение 30 мин. После этого на мембрану наносили 3×10^4 клеток в суспензии объемом 35 мкл и инкубировали в течение 2 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C и $5\% \text{CO}_2$. В качестве контроля такое же число клеток в таком же объеме высевали на 96-луночный планшет с площадью поверхности 30 мм^2 (Corning). После прикрепления клеток канал чипа заполняли 150 мкл полной питательной среды и инкубировали 2 сут в CO_2 -инкубаторе при 37°C и $5\% \text{CO}_2$ в закрытой чашке Петри со стерильными салфетками, пропитанными DPBS (“ПанЭко”, Россия) для снижения испарения культуральной среды. Перед подключением чипа к микрофлюидной установке трубки контура стерилизовали, пропуская через них 70%-ный этанол в течение 30 мин, после чего промывали DPBS в течение 30 мин. Далее контур в течение 15 мин заполняли полной питательной средой. Перед подключением чипа к контуру средой над прикрепившимися к мембране клетками удаляли и заклеивали чип с верхней и нижней стороны пленкой из поликарбоната с помощью двустороннего скотча. К чипу подсоединяли короткие силиконовые трубки и заполняли каналы полной питательной средой. Чип подключали к основному контуру и включали поток среды на скорости 15 мкл/мин в течение 5 мин – чтобы удалить пузыри из системы. После этого поток переключали на скорость 2 мкл/мин и инкубировали чипы в CO_2 -инкубаторе при 37°C и $5\% \text{CO}_2$ до окончания эксперимента.

Обработка результатов

Все эксперименты проводили минимум в трех повторах. Для статистического анализа использовали программу IBM SPSS Statistics. Достоверным считали изменение исследуемого параметра в 1.5 раза при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод фрезерования относится к грубым методам обработки поверхности пластика. При фор-



Рис. 2. Чип до (справа) и после (слева) паровой полировки поверхности раствором PF500.

Fig. 2. Chip before (right) and after (left) vapor polishing the surface with PF500.

мирования необходимой геометрии заготовки под действием фрезы с определенной площадью снимается большой объем материала. Во время механической обработки образуются структурные рельефы: следы после прохождения фрезы и заусенцы в мелких каналах и отверстиях. Эти искажения в поверхностной структуре негативно влияют на работу таких чувствительных систем как органа-чипе. Во-первых, вместо прозрачной поверхность становится матовой, что ухудшает оптические свойства системы и визуализацию клеток [21]. Во-вторых, шероховатость стимулирует образование пузырей воздуха [20]. В-третьих, шероховатая поверхность влияет на распределение клеток по поверхности [10]. В-четвертых, неровность поверхности может приводить к разгерметизации системы из-за микротрещин [13]. В результате разработанной нами методики паровой обработки эти проблемы были устранены, как показано в демонстрационных экспериментах.

На рис. 2 изображено два чипа после фрезеровки: до паровой обработки (справа) и после (слева). Как нетрудно заметить, после паровой обработки поверхность чипа становится прозрачной и не содержит матовых участков. Несмотря на то, что эта технология полировки ранее описана в работах С. Matellan и др. [14] и I. Ogilvie и др. [15] и, безусловно, представляет важный инструмент современной микрофлюидики, задачу удаления шероховатостей с поверхности чипа приходится решать чаще всего экспериментальным путем, так как для каждого типа полимера необходимо подбирать оптимальные условия обработки.

Таблица 1. Анализ шероховатости фрезерованной поверхности до и после полировки паром
Table 1. Analysis of milled surface roughness before and after vapor polishing

Поверхность	Шероховатость поверхности*, нм
Фрезерованная поверхность сверху до полировки	726 ± 237
Фрезерованная поверхность в нижнем расширительном канале до полировки	1620 ± 243
Полированная поверхность сверху при обработке составом для полировки JINHF	240 ± 116
Полированная поверхность в нижнем расширительном канале при обработке составом для полировки JINHF	357 ± 35
Полированная поверхность сверху при обработке 50%-ным ацетоном	790 ± 231
Гладкая, нефрезерованная поверхность при обработке 50%-ным ацетоном	40 ± 10
Полированная поверхность сверху при обработке 99.75%-ным ацетоном	395 ± 18
Гладкая, нефрезерованная поверхность при обработке 99.75%-ным ацетоном	402 ± 232

*Примечание: Шероховатость измерена профилометром ContourGT-K (Bruker Nano Inc.) и представлена как $R_a \pm SD$.

*Note: Roughness was measured with a ContourGT-K profilometer (Bruker Nano Inc.) and is presented as $R_a \pm SD$.

Для полировки поверхности чипа нами проанализировано два раствора: состав JINHF, предназначенный для химической полировки, и ацетон, ранее описанный как эффективный полирующий препарат для обработки шероховатой поверхности полимеров [14], в том числе для полимерных изделий, изготовленных на 3D-принтере [22]. Нами обнаружено, что 50%-ный раствор ацетона в деионизованной воде качества Milli-Q Integral (Millipore, Германия) не давал желаемого поверхностного эффекта при паровой полировке чипа. Чистый раствор ацетона (99.75%) улучшал структуру поверхности после фрезерной обработки, но при этом повреждал гладкую поверхность, которая не была обработана механически.

После паровой обработки анализировали поверхностную морфологию чипа с помощью профилометра. На рис. 3 отображены поверхности чипа до и после паровой обработки. Проанализировано три поверхности чипа: (i) верхняя часть, на которую приклеивают двусторонний скотч для герметизации верхнего канала (рис. 3a, 3c, 3e, 3g); (ii) расширительная камера нижнего канала, к которой приклеивают двусторонний скотч для фиксации пористой мембраны (рис. 3b, 3d); (iii) гладкая нефрезерованная поверхность монолитного листа после обработки ацетоном (рис. 3f, 3h).

Анализ поверхности показал, что паровая полировка с использованием состава JINHF удаляет все мелкие шероховатости, но оставляет плавные перепады, которые образуются после прохождения сверла. На фрезерованных поверхностях до паровой обработки имеются белые “пустые” участки без цветовой кодировки глубины. Отсутствие цветовой кодировки в этих местах связано с тем, что профилометр не смог провести анализ из-за глубины дефектов поверхности, но после паровой обработки все участки стали доступны для оценки. Напомним, что основные компоненты раствора JINHF – синтетические смолы и метилбензол.

В образцах, обработанных 50%-ным ацетоном, на поверхности пластика все еще оставались резкие перепады, то есть шероховатость сохранялась. При этом исходно гладкая, механически не обработанная поверхность сохраняла морфологию без резких перепадов. Обработка чипа практически чистым ацетоном (99.75%) приводила к удалению большей части неровностей на механически обработанной поверхности, но при этом на механически не обработанной поверхности появились резкие перепады и грубые структуры. Ранее Y. Cui с соавт. [23] сообщали, что при контакте с ацетоном на поверхности поликарбоната идет процесс кристаллизации, который увеличивает степень ее шероховатости. Таким образом, на фрезерованных поверхностях перепады по высоте резкие, а использование раствора для полировки JINHF или 99.75%-ного ацетона устраняет грубые структуры и сглаживает перепады. Следует заметить, что при этом пары ацетона повреждают гладкую поверхность пластика, а значит это соединение не подходит для полировки микрофлюидных чипов.

При анализе всех сторон чипа обнаружено, что шероховатость верхней стороны до полировки составила 726 нм, а после паровой полировки с раствором JINHF снизилась до 240 нм. Таким образом, уровень шероховатости снизился в три раза. В расширительном канале уровень шероховатости после фрезерования составил 1620 нм, а после паровой полировки с раствором JINHF снизился до 357 нм, то есть в 4.5 раза (табл. 1). Шероховатость поверхности чипа, который полировали с 50%-ным ацетоном, составила 790 нм, а на гладкой поверхности (механически не обработанной) – 40 нм. При использовании 99.75%-ного ацетона шероховатость механически обработанной поверхности составила 395 нм, а гладкой – 402 нм (табл. 1).

Rahim & Ehsan [24] добились низкого значения шероховатости поверхности (67 нм) при фре-

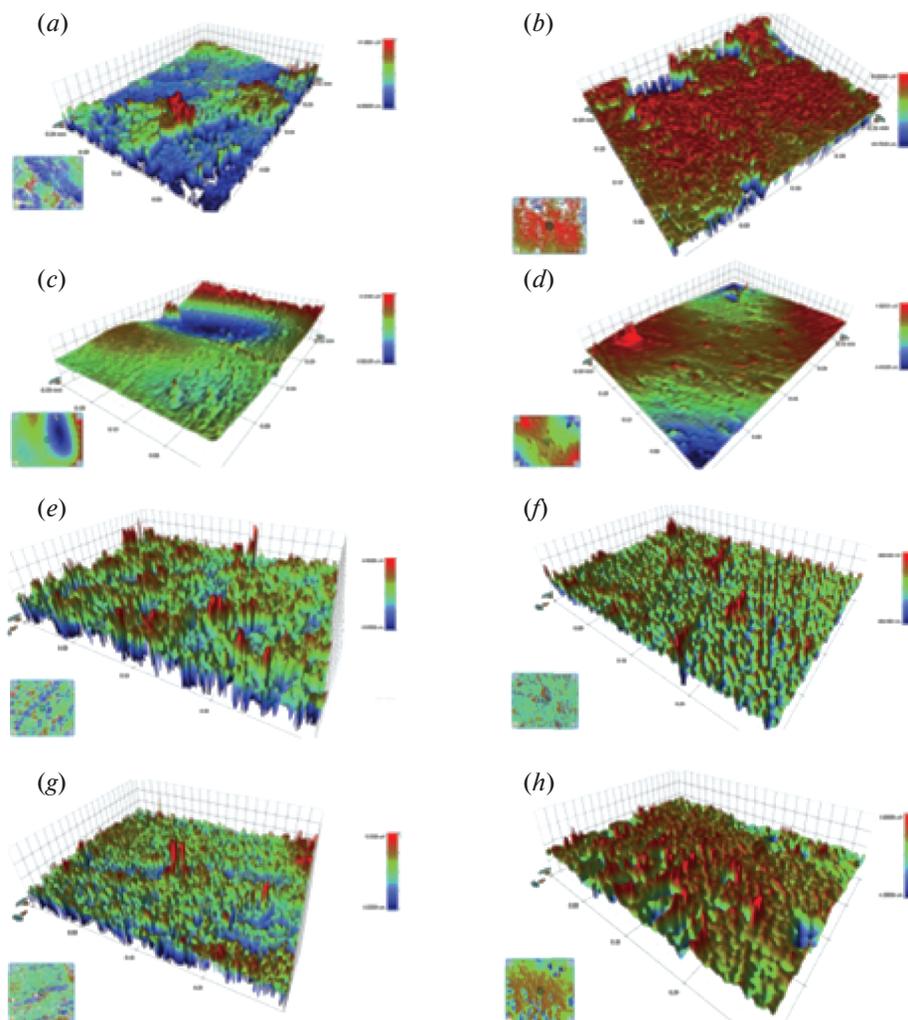


Рис. 3. Морфология поверхности чипа при разных условиях паровой обработки. Поверхностная морфология верхней части чипа (a) и нижнего расширительного канала (b) до паровой обработки. Поверхностная морфология верхней части чипа (c) и нижнего расширительного канала (d) после паровой обработки раствором JINHF. Поверхностная морфология верхней части чипа (e) и гладкой нижней части чипа (f) после паровой обработки 50%-ным ацетоном. Поверхностная морфология верхней части чипа (g) и гладкой нижней части чипа (h) после паровой обработки 99.75%-ным ацетоном. Снимки получены с использованием профилометра ContourGT-K (Bruker Nano Inc.).

Fig. 3. Chip surface morphology under different conditions of vapor treatment. Surface morphology of the upper part of the chip (a) and the lower expansion channel (b) before vapor polishing. Surface morphology of the upper part of the chip (c) and the lower part of the expansion channel (d) after vapor polishing with JINHF solution. Surface morphology of the upper part (e) and the smooth lower part (f) of the chip after vapor treatment with 50% acetone. Surface morphology of the upper part (g) and the smooth lower part (h) of the chip after vapor treatment with 99.75% acetone. The images were obtained using a ContourGT-K profilometer (Bruker Nano Inc.).

зеровании на полиметилметакрилате. Степень шероховатости авторы контролировали, задавая определенные параметры фрезерования, в том числе частоту вращения шпинделя и скорость подачи режущего инструмента. Понижение частоты вращения до 4000 об/мин и скорости подачи до 10 мм/мин давали лучший результат. Ранее D. Guckenberger с соавт. [10] сообщали об аналогичной зависимости между этими параметрами: при снижении скорости подачи уменьшалась шероховатость поверхности. В проведенных нами

экспериментах скорость подачи режущего инструмента была в 100 раз выше, чем в работе Rahim & Ehsan. Дело в том, что использование низких скоростей подачи отражается на времени изготовления чипов — оно заметно увеличивается — и, как следствие, их стоимости. При выборе параметров фрезерования следует выбирать режим, наиболее подходящий к назначению поверхности. Так, если для изготовления чипа требуемой толщины необходимо убрать большой объем полимера из монолитного листа, используют высокоскоростной ре-

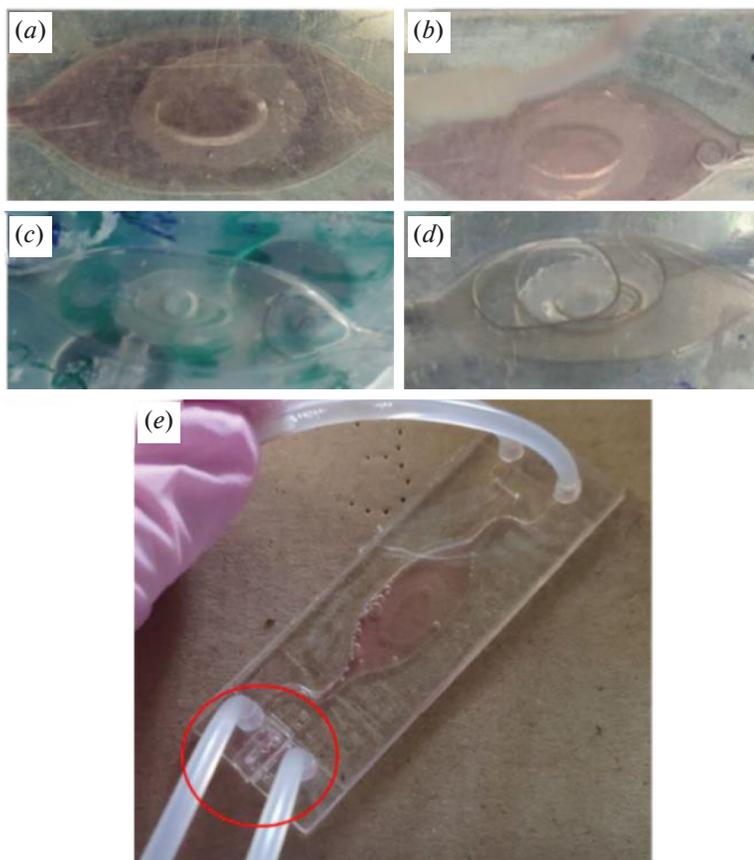


Рис. 4. Использование активных и пассивных ловушек для удаления пузырей воздуха из системы культивирования. Работа чипа с горизонтальным позиционированием и активной внешней ловушкой с вакуумным насосом в день 0 (a), через 1 (b), 3 (c) и 5 (d) суток после подключения потока среды. Видно скопление пузырей в расширительной камере и в районе мембраны с клетками. (e) – Накопление пузырей в чипе с пассивной ловушкой для пузырей после ее полного заполнения пузырями. Ловушка обведена красным.

Fig. 4. Use of active and passive traps to remove air bubbles from the culture system. Operation of the chip with horizontal positioning and active external trap with vacuum pump on day 0 (a), 1 (b), 3 (c) and 5 (d) after the media flow was connected. The accumulation of bubbles in the expansion chamber and around the membrane with cells can be seen. (e) – Accumulation of bubbles in a chip with a passive bubble trap after it is completely filled with bubbles. The trap is circled in red.

жим; если нужна поверхность с низкой шероховатостью, например внутри микрофлюидного канала, используют низкую скорость подачи режущего инструмента.

В большинстве микрофлюидных систем образование и скопление пузырей воздуха и других газов неизбежно и требует специальной оптимизации [8, 20]. Ранее разработаны различные методы для удаления пузырей из микрофлюидной системы, например встраиваемые в органы-на-чипе ловушки или дополнительные резервуары для контролируемого сбора пузырей воздуха, а также использование вакуумных насосов с внешними ловушками для пузырей [7, 20].

В проведенном нами исследовании использованы следующие методы ликвидации пузырей: подключение внешней ловушки для пузырей Elveflow с вакуумным насосом, встроенная в чип пассивная ловушка в канале чипа, а также вертикальное по-

зиционирование чипа в облегченном варианте контура без ловушек. При культивировании клеток в горизонтальном положении к системе подключали внешнюю ловушку для воздуха в активном режиме (то есть с подключенным вакуумным насосом). При культивировании клеток в горизонтальном положении внешняя ловушка, хотя и минимизировала поступление воздуха в чип, не предотвращала образования крупного пузыря над центральной областью мембраны, что негативно влияло на жизнеспособность и адгезию клеток. На рис. 4(a–d) показано, как при культивировании клеток уже на третьи сутки накапливался критический уровень пузырей в рабочей зоне. Кроме того, использование ловушки усложняет сборку контура, тем самым повышая риск контаминации.

При выполнении работы был разработан чип со встроенной ловушкой для пузырей воздуха, которая не требует дополнительного подключе-

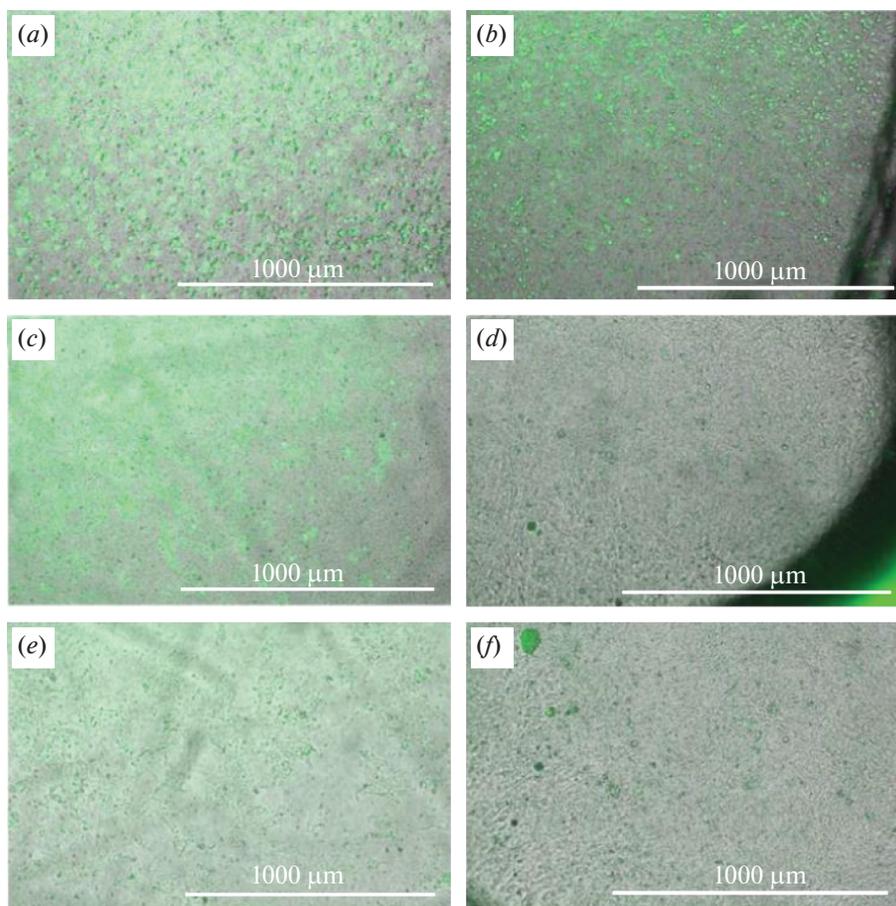


Рис. 5. Длительное культивирование клеточных линий на вертикально расположенном чипе. Клетки BeWo b30 в потоке через 1 (a), 7 (c) и 14 (e) суток. Клеточная линия EA.hy926 в потоке через 1 (b), 7 (d) и 14 (f) суток. Клетки окрашены флуоресцентным красителем CellTracker CMFDA.

Fig. 5. Long-term cultivation of cell lines on a chip in a vertical position. BeWo b30 cells cultured in flow for 1 (a), 7 (c) and 14 (e) days. EA.hy926 cells cultured in flow after 1 (b), 7 (d) and 14 (f) days of cultivation. Cells were stained with CellTracker CMFDA fluorescent dye.

ния вакуумного насоса. Ловушка находится перед верхним расширительным каналом, поэтому во время перфузии пузырьки остаются в ней за счет пассивного всплывания, а питательная среда проходит, не задерживаясь. Однако, быстро наполнившись пузырьками воздуха, ловушка перестает работать, что приводит к накоплению пузырей в микроканалах и расширительном канале чипа (рис. 4e). Также при заполнении ловушки воздухом может перекрыться канал перфузии, что приводит к остановке потока питательной среды и гибели клеток. С. Huang с соавт. [7] описали встроенную в чип ловушку для воздуха, которая при длительном культивировании клеток тоже перестает работать, поэтому необходимо останавливать поток, чтобы удалить пузырьки при помощи вакуума. Следовательно, для использования аналогичной ловушки в разработанном нами чипе потребуется ее модификация – чтобы подключить к ней вакуум или значительно увеличить ее объем для увеличения длительности ее ра-

боты. Хотя радикально это не решит проблему удаления пузырей.

При вертикальном позиционировании чипов проблема образования пузырей в области мембраны с клетками решается радикально. В диапазоне скоростей от 2 до 100 мкл/мин пузырьки пассивно поднимаются по контуру и не задерживаются в чипе, попадая в дальнейшем в резервуар с отработанной питательной средой. В ходе двухнедельного эксперимента чипы оставались заполненными питательной средой и не накапливали пузырьки, что способствовало высокой выживаемости клеток BeWo b30 и EA.hy926 – в отличие от чипа с горизонтальным позиционированием, где происходило накопление пузырей в районе мембраны с формированием одного большого пузыря и, как следствие, гибель клеток. Культивирование клеток BeWo b30 и EA.hy926 на чипе регистрировали в динамике: на следующий день после посева, а также на 7 и 14 сутки (рис. 5). Заметим, что мате-

риал чипа позволяет модифицировать дизайн таким образом, чтобы усовершенствовать вертикальную модель и встроить дополнительные датчики.

Таким образом, нами продемонстрировано несколько решений по удалению пузырей из системы перфузии, что позволило проводить длительное культивирование клеток в динамике. Разработан протокол и оптимизированы условия паровой полировки фрезерованной поверхности чипа для удаления заусенцев и шероховатости на поверхности чипа. Лучшие результаты паровой полировки получены при использовании препарата JINHf: поверхность чипа становилась гладкой и прозрачной. Также выявлено, что пассивное удаление пузырей из микрофлюидного контура за счет вертикального позиционирования чипа работает намного эффективнее, чем пассивная ловушка или активная ловушка с вакуумным насосом. На протяжении длительного времени пузыри не образовывались над клетками, что позволило проводить их культивирование в потоке в течение двух недель.

В результате устранения шероховатости поверхности чипа, затрудняющей прохождение и выход пузырей воздуха из контура, и оптимизации микрофлюидного контура были созданы стабильные условия для длительного культивирования клеточных культур в динамике. Повышение выживаемости клеток положительно влияет как на воспроизводимость результатов экспериментов, так и на количество и качество материала для дальнейших аналитических процедур. Кроме того, оптимизация условий обработки микрочипов позволила улучшить их оптические свойства и снизить процент “брака” из-за разгерметизации.

В результате выполненной работы открывается возможность изучения в динамике барьерных функций плаценты на модели совместного культивирования клеточных линий EA.hy926 и BeWo b30 в течение более трех суток. Использование оптимизированной микрофлюидной системы позволит углубить наше понимание механизмов формирования индуцированной гипоксией опасной патологии беременности – преэклампсии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-14-00382, <https://rscf.ru/project/24-14-00382/>).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leung C.M., de Haan P., Ronaldson-Bouchard K., Kim G.A., Ko J., Rho H.S., Chen Z., Habibovic P., Jeon N.L., Takayama S., Shuler M.L., Vunjak-Novakovic G., Frey O., Verpoorte E., Toh Y.C. A guide to the organ-on-a-chip. *Nat. Rev. Methods Primers*, 2022, 2(1), 33. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>
2. Vera D., García-Díaz M., Torras N., Álvarez M., Villa R., Martínez E. Engineering tissue barrier models on hydrogel microfluidic platforms. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, 13(12), 13920–13933. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C21573>
3. Koch E.V., Ledwig V., Bendas S., Reichl S., Dietzel A. Tissue barrier-on-chip: a technology for reproducible practice in drug testing. *Pharmaceutics*, 2022, 14(7), 1451. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14071451>
4. Elzinga F.A., Khalili B., Touw D.J., Prins J.R., Olinga P., Leuvenink H.G.D., van Goor H., Gordijn S.J., Nagelkerke A., Mian P. Placenta-on-a-chip as an *in vitro* approach to evaluate the physiological and structural characteristics of the human placental barrier upon drug exposure: a systematic review. *J. Clin. Med.*, 2023, 12(13), 4315. <https://doi.org/10.3390/jcm12134315>
5. Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J.A., Whitesides G.M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, 1998, 70(23), 4974–4984. <https://doi.org/10.1021/AC980656Z>
6. Winkler T.E., Herland A. Sorption of neuropsychopharmacology in microfluidic materials for *in vitro* studies. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, 13(38), 45161–45174. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.1C07639>
7. Huang C., Wippold J.A., Stratis-Cullum D., Han A. Eliminating air bubble in microfluidic systems utilizing integrated in-line sloped microstructures. *Biomed. Microdevices*, 2020, 22(4), 76. <https://doi.org/10.1007/s10544-020-00529-w>
8. Huh D., Kim H.J., Fraser J.P., Shea D.E., Khan M., Bahinski A., Hamilton G.A., Ingber D.E. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat. Protoc.*, 2013, 8(11), 2135–2157. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.137>
9. Wei Y., Wang T., Wang Y., Zeng S., Ho Y.P., Ho H.P. Rapid prototyping of multi-functional and biocompatible Parafilm®-based microfluidic devices by laser ablation and thermal bonding. *Micromachines*, 2023, 14(3), 656. <https://doi.org/10.3390/MI14030656>
10. Guckenberger D.J., Groot T.E. De, Wan A.M.D., Beebe D.J., Young E.W. Micromilling: a method for ultrarapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab Chip*, 2015, 15(11), 2364–2378. <https://doi.org/10.1039/C5LC00234F>
11. Singh S.S., Baruah P.K., Khare A., Joshi S.N. Incubation studies and the threshold for surface damage and cavity formation in the processing of polycarbonate by Nd:YAG laser. *Opt. Laser Technol.*, 2018, 108, 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.07.030>
12. O’Toole L., Kang C.W., Fang F.Z. Precision micro-milling process: state of the art. *Adv. Manuf.*, 2021, 9(2), 173–205. <https://doi.org/10.1007/S40436-020-00323-0>
13. Vogt J., Rosenthal K. Validation of easy fabrication methods for PDMS-based microfluidic (bio)reactors. *Science*, 2022, 4(4), 36. <https://doi.org/10.3390/SCI14040036>
14. Matellan C., Del Río Hernández A.E. Cost-effective rapid prototyping and assembly of poly(methyl methacry-

- late) microfluidic devices. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25202-4>
15. Ogilvie I.R.G., Sieben V.J., Floquet C.F.A., Zmijan R., Mowlem M.C., Morgan H. Reduction of surface roughness for optical quality microfluidic devices in PMMA and COC. *J. Micromech. Microeng.*, 2010, 20(6), 065016. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/20/6/065016>
 16. Liu C., Thompson J.A., Bau H.H. A membrane-based, high-efficiency, microfluidic debubbler. *Lab Chip*, 2011, 11(9), 1688–1693. <https://doi.org/10.1039/C1LC20089E>
 17. Choi M., Na Y., Kim S.J. Hydrophilic strips for preventing air bubble formation in a microfluidic chamber. *Electrophoresis*, 2015, 36(23), 2896–2901. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201500258>
 18. Yang M., Sun N., Luo Y., Lai X., Li P., Zhang Z. Emergence of debubblers in microfluidics: a critical review. *Biomicrofluidics*, 2022, 16(3), 031503. <https://doi.org/10.1063/5.0088551>
 19. Guo L., Liu Y., Ran P., Wang G., Shan J., Li X., Liu C., Li J. A bioinspired bubble removal method in microchannels based on angiosperm xylem embolism repair. *Microsys. Nanoeng.*, 2022, 8(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41378-022-00367-1>
 20. Pereira I., Fomitcheva Khartchenko A., Petrini L., Kagalga G.V. Nip the bubble in the bud: a guide to avoid gas nucleation in microfluidics. *Lab Chip*, 2019, 19(14), 2296–2314. <https://doi.org/10.1039/C9LC00211A>
 21. Yen D.P., Ando Y., Shen K. A cost-effective micromilling platform for rapid prototyping of microdevices. *Technology*, 2016, 4(4), 234. <https://doi.org/10.1142/S2339547816200041>
 22. Gache C.C.L., Mesa S.A., Prado T.C.L., Canonoy C.G., Pengson J.E., Tuazon B.J., Espino M.T., Advincula R.C., Dizon J.R.C. Fabrication and testing of a vapor polishing device for ABS 3D-printed parts. *SciEnggJ*, 2023, 16, 001–007. <https://doi.org/10.54645/2023161ZYP-27>
 23. Cui Y., Paxson A.T., Smyth K.M., Varanasi K.K. Hierarchical polymeric textures via solvent-induced phase transformation: a single-step production of large-area superhydrophobic surfaces. *Colloids Surf. A*, 2012, 394, 8–13. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2011.11.014>
 24. Rahim M.S., Ehsan A.A. Micro milling process for the rapid prototyping of microfluidic devices. In: *Advances in Microfluidics and Nanofluids*, ed. Murshed S.M.S. London, UK: IntechOpen, 2021, pp. 81–92. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.96723>

Placenta-on-a-Chip Microfluidic Model: Optimization of Perfusion Conditions

S. Yu. Paul^{a, b}, Yu. A. Safronova^a, O. E. Chebotareva^a, I. A. Khaustov^{a, c}, A. E. Karimova^a, D. V. Kolesov^{a, d, e}, P. A. Vishnyakova^{d, f}, J. A. Makarova^a, and E. N. Knyazev^{a, c, #}

^aFaculty of Biology and Biotechnology, National Research University “Higher School of Economics”, Moscow, 101000 Russia

^bTroitsk Research and Development Centre LLC, Moscow, 108840 Russia

^cLaboratory of Microfluidic Technologies for Biomedicine, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

^dNational Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117198 Russia

^eMicrofluidic Technologies LLC, Moscow, 115088 Russia

^fResearch Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples’ Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

[#]e-mail: eknyazev@hse.ru

Abstract—The design and development of a placenta-on-a-chip model is of great importance for various fields of cell biology, especially in studies of the molecular mechanisms of disease pathogenesis and the action of potential drugs. Currently, milling technique is most commonly used to fabricate microfluidic devices from thermoplastics. However, this technology leads to the formation of undesirable surface roughness, which promotes the formation of air bubbles and reduces the optical transparency of the polymer. In this regard, the problem of improving the technology of chip manufacturing and operation seems to be very important. We have analyzed various methods of surface modification of polycarbonate and further optimizing the circuit. It was shown that vapor polishing treatment with JINHF solution (JINHF, China) effectively removed roughness from the surface of the polycarbonate chip. The selected surface treatment method significantly reduced the roughness of the internal channels, which facilitated the filling of the chip without forming areas with stubborn air bubbles. During the optimization process, two “passive” methods for eliminating bubbles from the microfluidic system were explored, namely vertical positioning of the chip and creating air bubble traps inside the chip. These methods were compared with the “active” bubble removal by connecting an Elveflow trap (Elveflow Elvesys, France) with a vacuum pump to the chip. The method of vertical positioning of the organ-on-a-chip during cultivation proved to be more effective in removing air bubbles than built-in and external traps. The developed variant of the microfluidic device with the contour configuration that showed the best result was tested on the process of long-term cultivation of BeWo b30 and EA.hy926 cells as models of placenta-on-chip in dynamics.

Keywords: microfluidics, organ-on-a-chip, placenta-on-a-chip, surface morphology, surface roughness, air bubbles, air-escape