

УДК 57.086.83,57.087,62-408.8

ОПТИМИЗАЦИЯ ГАЗОПРОНИЦАЕМОСТИ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ ИЗ ПДМС ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОРГАНОВ-НА-ЧИПЕ

© 2024 г. И. А. Хаустов^{1,2}, Ю. А. Сафронова¹, О. Е. Чеботарева¹, Д. А. Бриантон¹, Е. Н. Князев^{1,2,*}

¹Факультет биологии и биотехнологии,

Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, 101000 Россия

²Лаборатория микрофлюидных технологий для биомедицины, Государственный научный центр

Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: eknyazev@hse.ru

Поступила в редакцию 07.10.2024 г.

После доработки 10.10.2024 г.

Принята к публикации 12.10.2024 г.

Полидиметилсилоксан (ПДМС) остается одним из наиболее востребованных материалов для создания микрофлюидных чипов, однако его высокая газопроницаемость может приводить к образованию пузырьков газа в микроканалах, что затрудняет воспроизводимость экспериментов с органами-на-чипе. Исследована зависимость газопроницаемости ПДМС от соотношения основы и отвердителя (2.5 : 1, 5 : 1 и 10 : 1) и температуры полимеризации (25, 75 и 125°C). Согласно полученным результатам соотношение 5 : 1 при температуре 125°C обеспечивает оптимальное сочетание низкой газопроницаемости, быстрой полимеризации и экономичного расхода компонентов. Тестирование цитотоксичности на клеточных линиях BeWo b30 и EA.hy926, имитирующих трофобласт и эндотелий в модели плаценты-на-чипе, продемонстрировало отсутствие цитотоксических эффектов при использовании различных соотношений компонентов ПДМС, что подтверждает его безопасность для клеточных экспериментов.

Ключевые слова: микрофлюидика, микрофлюидный чип, орган-на-чипе, плацента-на-чипе, ПДМС, газопроницаемость

DOI: 10.56304/S0234275824050077

Полидиметилсилоксан (ПДМС) остается одним из наиболее популярных материалов для изготовления микрофлюидных чипов благодаря своим свойствам: прозрачности, биосовместимости, эластичности, нетоксичности и газопроницаемости, а также простоте изготовления чипов технологией мягкой литографии [1–4]. Эластичность ПДМС позволяет создавать мембраны для насосов и клапанов, интегрируемых непосредственно в чип, что делает микрофлюидную систему автономной и значительно снижает объем циркулирующей питательной жидкости [5].

Однако использование сжатого воздуха для управления такими клапанами может привести к образованию пузырьков под мембранами, нарушению циркуляции питательной жидкости и гибели клеток [6, 7]. Процесс образования пузырьков связан с высокой газопроницаемостью ПДМС, которая обусловлена структурой полимера. Благо-

даря высокой гибкости цепей кремний–кислород (Si–O) в силиконах образуются полости, между которыми в процессе диффузии мигрируют молекулы газа [8].

Коммерческие наборы, такие как Sylgard 184 (Dow Corning, США), включают два компонента, основу и отвердитель, смешение которых определяет механические свойства ПДМС. Стандартное соотношение 10 : 1 (основа к отвердителю) и температура полимеризации 75°C считаются оптимальными для минимизации количества свободных компонентов, не подвергшихся сшиванию. При этом изменение пропорций и температуры процесса влияет на плотность полимерной структуры, изменяя количество полостей и, соответственно, газопроницаемость [9]. Однако такие изменения могут отрицательно сказаться на эластичности и вызвать цитотоксичность материала [10–13].

Нами был разработан микрофлюидный чип с интегрированными микронасосом и клапанами из ПДМС. Для увеличения срока службы чипа необходимо было найти оптимальное соотноше-

Сокращения: ПДМС – полидиметилсилоксан; ПЭТ – полиэтилентерефталат.

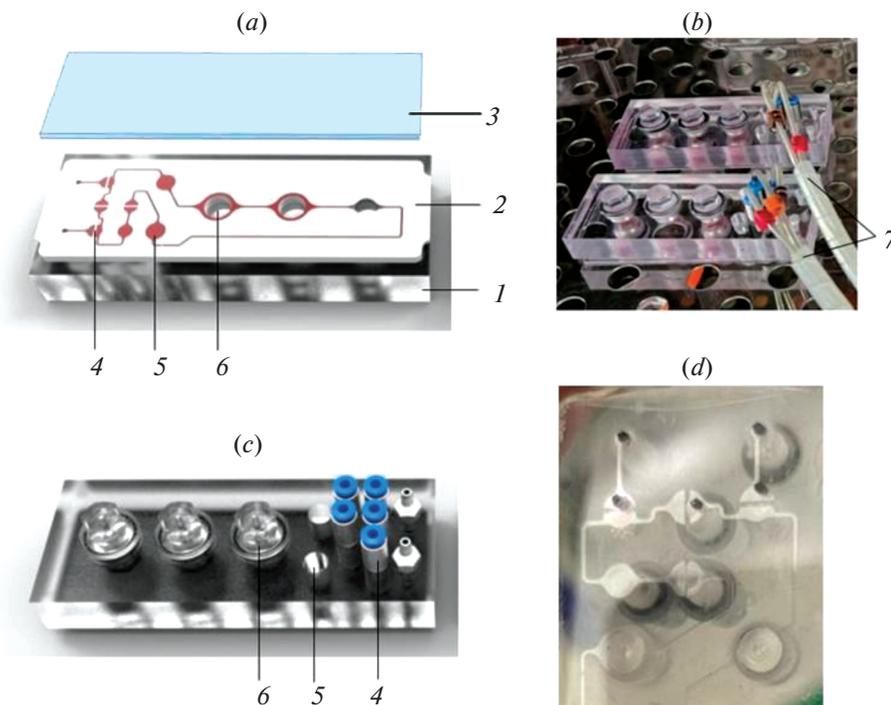


Рис. 1. Устройство микрофлюидного чипа. (a) – Трехслойная структура чипа. (b) – Собранные чипы, подключенные к блоку управления мембранным микронасосом через трубки. (c) – Собранный чип, не подключенный к блоку управления мембранным микронасосом. (d) – Вид микронасоса со стороны предметного стекла. 1 – Поликарбонатное основание; 2 – слой ПДМС с микрофлюидным контуром; 3 – предметное стекло; 4 – мембраны насоса и фитинги для подачи сжатого воздуха; 5 – демпфирующие мембраны; 6 – ячейки для культивирования клеток; 7 – трубки для подачи сжатого воздуха.

Fig. 1. Microfluidic chip device. (a) – Three-layer chip structure. (b) – Assembled chips connected to the membrane micropump control unit via tubing. (c) – Assembled chip not connected to the membrane micropump control unit. (d) – View of the micropump from the slide side. 1 – Polycarbonate base; 2 – PDMS layer with microfluidic circuit; 3 – slide; 4 – pump membranes and compressed air fittings; 5 – damping membranes; 6 – cell culture chambers; 7 – compressed air tubing.

ние между снижением газопроницаемости клапанов и сохранением их эластичности без токсических эффектов. Цель данного исследования – оценить влияние соотношения основа/отвердитель и температуры полимеризации ПДМС на газообразование и клеточную токсичность в микрофлюидных чипах.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конфигурация микрофлюидного устройства

Разработанный микрофлюидный чип представляет собой трехслойную структуру из поликарбонатного основания, слоя ПДМС и предметного стекла (рис. 1a). Слой ПДМС, отливаемый методом мягкой литографии поверх основания, содержит микрофлюидный контур с каналами для циркуляции питательной среды, ячейками для культивирования клеток, демпфирующими камерами и клапанным микронасосом. Микронасос управляется путем подачи сжатого воздуха через трубки, подключенные к фитингам (рис. 1b, 1c). Герметизация чипа выполняется приклеиванием предметного стекла к ПДМС после обработки плазмой.

Объем питательной среды в контуре варьируется от 735 до 1250 мкл, из которых 27 мкл приходится на микроканалы и 3 мкл – на насос. Каналы имеют сечение 100×500 мкм, насос содержит три мембраны из ПДМС толщиной 200 мкм и площадью 5 мм^2 (рис. 1d).

Изготовление чипа

Чипы изготавливали методом мягкой литографии. Для улучшения адгезии ПДМС к поликарбонату использовали праймер PR-1200 (Dow Corning). ПДМС Sylgard 184 (Dow Corning) смешивали в соотношениях 2.5 : 1, 5 : 1 и 10 : 1 (основа : отвердитель) и дегазировали в вакуумной камере. Смесь заливали в формы и полимеризовали в термостатируемой центрифуге (Eppendorf 5810, с модификациями для нагрева внутренней камеры, ротор Eppendorf A-4-81) при температурах 25, 75 и 125°C. Время полимеризации составляло 24 ч при 25°C, 45 мин при 75°C и 15 мин при 125°C. После полимеризации чипы герметизировали предметным стеклом с использованием плазменной обработки.

Оценка газопроницаемости в статике

Для статической оценки газопроницаемости были изготовлены 34 чипа с девятью различными вариантами состава и температуры полимеризации ПДМС. Чипы, заполненные деионизированной водой с 1%-ным раствором антибиотика-антимикотика Gibco Anti-Anti 100x (Thermo Fisher Scientific, США), помещали в контейнер при температуре 25°C и влажности 65%. Для каждого чипа фиксировали время до образования воздушной пробки (пузырек воздуха длиной более 1 мм, что при сечении канала 100 × 500 мкм эквивалентно 0.5 мкл воздуха).

Оценка газопроницаемости в динамике

Для динамической оценки использовали 16 чипов с 4 вариантами соотношений состава и температуры полимеризации ПДМС, отобранными по результатам статического теста. Чипы заполняли деионизированной водой с 1%-ным раствором антибиотика-антимикотика Gibco Anti-Anti 100x (Thermo Fisher Scientific) и подключали к блоку управления микронасосом, работающим при давлении ±30 кПа и частоте 3 Гц. Время до образования воздушной пробки фиксировали аналогично статическому эксперименту.

Статистический анализ

Анализ данных проводили в среде R. Для сравнения времени образования пузырьков использовали тест Вилкоксона—Манна—Уитни.

Ведение клеточных линий BeWo b30 и EA.hy926

Для экспериментов с моделью плаценты-на-чипе использовали две клеточные линии. Линия клеток хориокарциномы BeWo b30, моделирующая трофобласт плаценты человека, была любезно предоставлена Prof. Christiane Albrecht (University of Bern, Switzerland) с разрешения MD, PhD Alan L. Schwartz (Washington University in St. Louis, USA). Линия гибридных эндотелиальных клеток EA.hy926, имитирующая эндотелий, была предоставлена Лабораторией регенеративной медицины НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия).

Обе клеточные линии культивировали в полной питательной среде на основе DMEM с L-глутамином и 4.5 г/л глюкозы (Capricorn Scientific, Германия), дополненной 10% FBS (Genesee Scientific, США), 1% заменимых аминокислот (Gibco MEM NEAA, Thermo Fisher Scientific) и 1% раствора антибиотика-антимикотика Anti-Anti (Thermo Fisher Scientific).

Оценка цитотоксичности различных составов ПДМС

После оценки газопроницаемости микрофлюидного контура в динамике был отобран оптимальный состав ПДМС для последующего тестирования цитотоксичности. Оценку цитотоксичности проводили для клеток BeWo b30 и EA.hy926 с использованием двух соотношений основа : отвердитель ПДМС (10 : 1 и 5 : 1), полимеризованных при температуре 125°C.

Для экспериментов использовали блоки ПДМС площадью 1.5 и 7.5 см², контактирующие с 1 мл полной питательной среды, что соответствовало однократному и пятикратному соотношению площади микрофлюидного контура и среды в нем. ПДМС блоки стерилизовали по специальному протоколу для микрофлюидных чипов и инкубировали в полной питательной среде при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. Затем среду удаляли, а блоки после промывки ДПБС с ионами Ca²⁺ и Mg²⁺ (“ПанЭко”, Россия), повторно инкубировали в свежей питательной среде в течение 7 дней. Полученные экстракты использовали для тестов цитотоксичности.

Клетки BeWo b30 и EA.hy926 заседали в 96-луночные планшеты с исходной плотностью 5000 клеток на лунку в 100 мкл экстракта ПДМС и культивировали 3 дня. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью резазуринового теста, измерение поглощения проводили на спектрофотометре xMark (Bio-Rad Laboratories, США) при длине волны 610 нм.

Визуализация жизнеспособных клеток при культивировании в чипе

Для культивирования клеток в микрофлюидном чипе клетки BeWo b30 (30000 клеток) и EA.hy926 (50000 клеток) заседали на апикальную поверхность мембран вставок Transwell (Corning, США) с площадью 0.143 см². Вставки предварительно отделяли от 96-луночной плашки с помощью термически обработанного медицинского скальпеля и помещали в ячейки чипа.

Чипы подключали к контроллеру давления, поддерживающему режим ±30 кПа и частоту 0.2 Гц. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в стандартных условиях на вставках Transwell в 96-луночных планшетах без потока среды, с регулярной сменой среды каждые сутки. В чипах питательная среда менялась каждые 3 дня.

Через 6 сут культивирования мембранные вставки извлекали для окрашивания витальным красителем CellTracker Orange CMRA (Thermo Fisher Scientific) для визуализации жизнеспособных клеток.

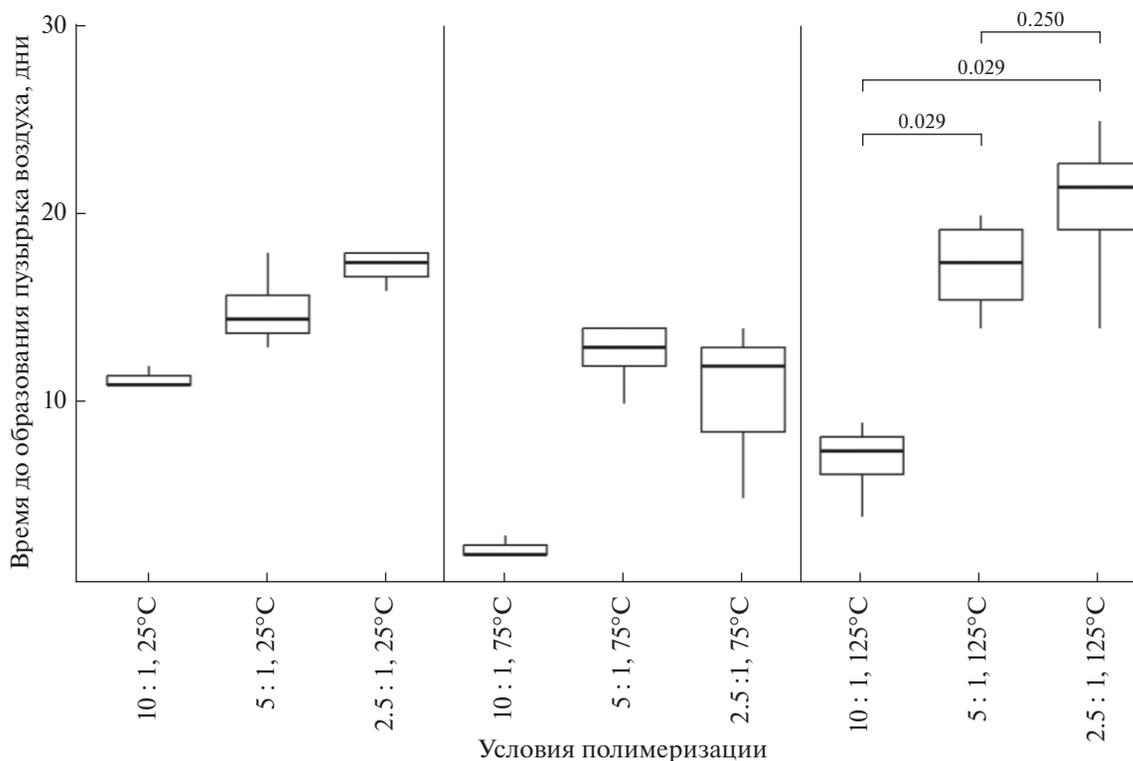


Рис. 2. Зависимость времени до образования пузырьков от условий полимеризации ПДМС в статике. Ось абсцисс: соотношение основы и отвердителя и температура полимеризации.

Fig. 2. Dependence of time to bubble formation on PDMS polymerization conditions in statics. Abscissa axis: base/curing agent ratio and polymerization temperature.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент по оценке газопроницаемости ПДМС был разделен на два этапа: статический, без подключения к контроллеру давления, и динамический, с циркуляцией жидкости при помощи микронасоса. Для наглядности восприятия результаты первого этапа эксперимента, проведенного с образцами, полученными при девяти различных условиях полимеризации ПДМС, были сгруппированы по трем уровням температуры полимеризации: 25, 75 и 125°C (рис. 2).

Наиболее быстрый процесс образования пузырьков воздуха в микрофлюидном контуре наблюдался при полимеризации при 75°C. В частности, стандартное соотношение основы и отвердителя 10 : 1, рекомендованное производителем, приводило к самому быстрому появлению пузырьков. Для соотношений 5 : 1 и 2.5 : 1 при той же температуре значимых различий не наблюдалось: медианное время до появления пузырьков составило 12.6 ± 1.7 и 10.3 ± 4.7 дня соответственно.

Самое длительное время до появления пузырьков было отмечено при температурах полимеризации 25 и 125°C для соотношений 2.5 : 1 и 5 : 1. Между этими условиями статистически значимых различий не выявлено. При 25°C наблюда-

лась наибольшая воспроизводимость результатов: медианное время до образования пузырьков составило 15.0 ± 2.2 дня для соотношения 5 : 1 и 17.3 ± 1.0 дня для 2.5 : 1. При 125°C результаты имели больший разброс: 17.3 ± 2.8 и 20.5 ± 4.7 дня соответственно.

Первый этап эксперимента показал, что изменение температуры полимеризации в обе стороны и уменьшение соотношения основы к отвердителя снижает газопроницаемость ПДМС, а повышение температуры еще и значительно ускоряет процесс полимеризации.

Полученные результаты согласуются с предыдущим исследованием Vegear K. и соавторов, согласно которому увеличение и уменьшение температуры полимеризации ПДМС от стандартных 75°C приводит к снижению газопроницаемости для углекислого газа, азота и метана [9]. Авторы связывают это с менее плотной молекулярной структурой ПДМС при 75°C, что увеличивает количество свободных объемов внутри полимера [9]. Кроме того, повышение доли отвердителя в ПДМС снижает плотность свободных объемов и уменьшает газопроницаемость [7], а также сокращает абсорбцию жидкости из каналов микрофлюидных чипов [14, 15].

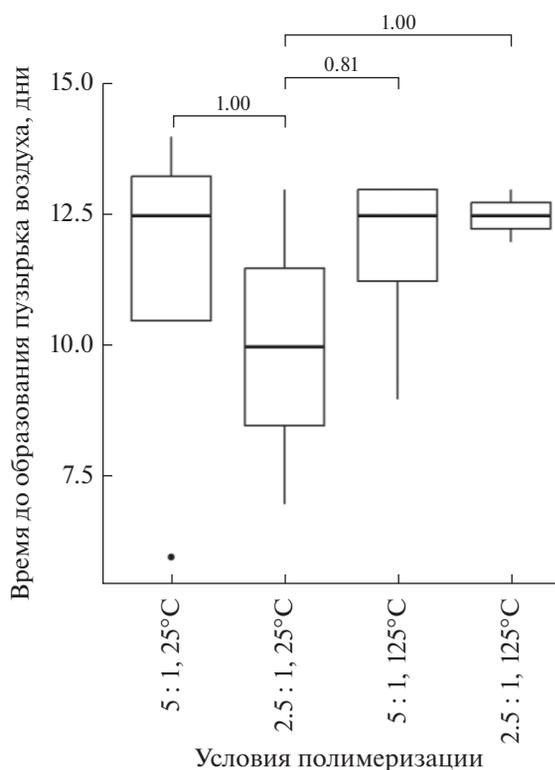


Рис. 3. Зависимость времени до образования пузырьков от условий полимеризации ПДМС в динамике. Ось абсцисс: соотношение основы и отвердителя и температура полимеризации.

Fig. 3. Dependence of time to bubble formation on PDMS polymerization conditions in dynamics. Abscissa axis: base/curing agent ratio and polymerization temperature.

Для второго этапа эксперимента, оценки газопроницаемости в динамических условиях, были выбраны четыре комбинации соотношений и температур, которые продемонстрировали лучшие результаты на первом этапе: 2.5 : 1 и 5 : 1 при 25 и 125°C (рис. 3).

В динамических условиях статистически значимых различий между выбранными условиями полимеризации выявлено не было. Основным газообмен происходил через клапаны насоса, поскольку под воздействием сжатого воздуха увеличивается площадь и уменьшается толщина мембран насоса. Было показано, что повышение давления увеличивает газопроницаемость мембран из ПДМС даже при увеличении доли отвердителя в смеси [7]. Это обусловило снижение медианного времени до появления пузырьков по сравнению со статическими условиями: время до появления пузырьков варьировалось от 10.0 до 12.5 дней для всех вариантов полимеризации (рис. 3).

Ввиду отсутствия значимых различий в динамике выбор оптимальных условий основывался на времени изготовления ПДМС. Полимеризация при 25°C требует около 24 ч. В то же время

при 125°C процесс полимеризации и сборки занимает около 25 мин, что делает этот температурный режим наиболее удобным для лабораторных условий. Соотношение основы и отвердителя 5 : 1 предпочтительно, так как позволяет экономить отвердитель при сохранении сопоставимых показателей газопроницаемости. Кроме того, при повышении доли отвердителя в ПДМС происходит повышение модуля Юнга, т.е. материал становится более жестким [7], что плохо сказывается на свойствах мембранных насосов.

Клетки EA.hy926, являющиеся гибридным производным эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC), и BeWo b30 активно используются при моделировании эндотелия и трофобласта плацентарного барьера человека [16–19]. Для создания микрофлюидной модели плаценты-на-чипе из ПДМС необходимо убедиться в отсутствии цитотоксичности материалов при оптимизации газопроницаемости. Тест на цитотоксичность с использованием резазурина для клеток BeWo b30 и EA.hy926, инкубирувавшихся с экстрактами ПДМС при соотношениях основы и отвердителя 10 : 1 и 5 : 1, не выявил значимых различий по сравнению с контролем как для однократного, так и для пятикратного соотношения площади ПДМС к объему среды (рис. 4).

В чипах с оптимальным соотношением основы и отвердителя (5 : 1, температура полимеризации 125°C) клетки BeWo b30 и EA.hy926, моделирующие трофобласт и эндотелий плацентарного барьера, культивировали в динамических условиях в течение 7 дней. Окрашивание витальным красителем CellTracker Orange CMRA показало, что на 7 сутки клетки сохраняли 100% конфлюэнтности без признаков стресса или гибели (рис. 5). Характерных морфологических изменений, таких как отек клеток, изменение формы или разрушение монослоя не зафиксировано.

Ранее были отмечены различные эффекты изменения состава или метода полимеризации ПДМС на клетки. При выращивании клеток прямо на ПДМС, покрытом фибронектином, для остеобластов MC3T3-E1 наблюдали снижение прикрепления и пролиферации при очистке ПДМС от несвязанных сшивающих молекул отвердителя и не отмечено значимых изменений при повышении доли отвердителя, а для клеток HeLa эффект был противоположен: очистка от несвязанных компонентов повышала прикрепление и пролиферацию, а повышение доли отвердителя снижало эти показатели [13]. Клетки Caco-2 плохо прикреплялись и пролиферировали на ПДМС с повышенной долей отвердителя [20]. Клетки в нашем чипе растут на мембране вставки Transwell, а не на самом ПДМС, однако было показано, что неполимеризованные компоненты могут выделяться в среду внутри канала из ПДМС даже после их

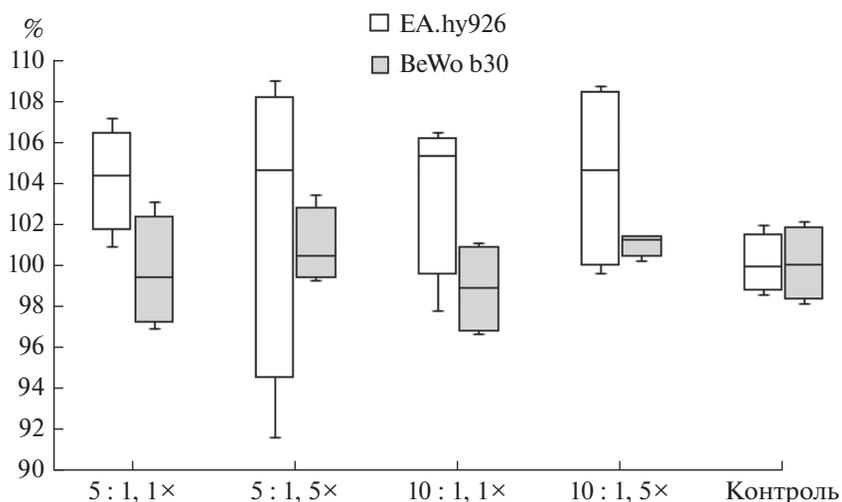


Рис. 4. Жизнеспособность клеток в резазуриновом тесте. 5 : 1 и 10 : 1 – соотношение основы и отвердителя ПДМС; 1× и 5× – экстракты из ПДМС с отношением контактной площади ПДМС к объему полной питательной среды, эквивалентным однократному и пятикратному отношению таковых в микрофлюидном чипе.

Fig. 4. Cell viability in the resazurin test. 5 : 1 and 10 : 1 are the ratio of PDMS base and curing agent; 1× and 5× are extracts from PDMS with the ratio of PDMS contact area to the volume of complete medium equivalent to one and five times the ratio of such in the microfluidic chip.

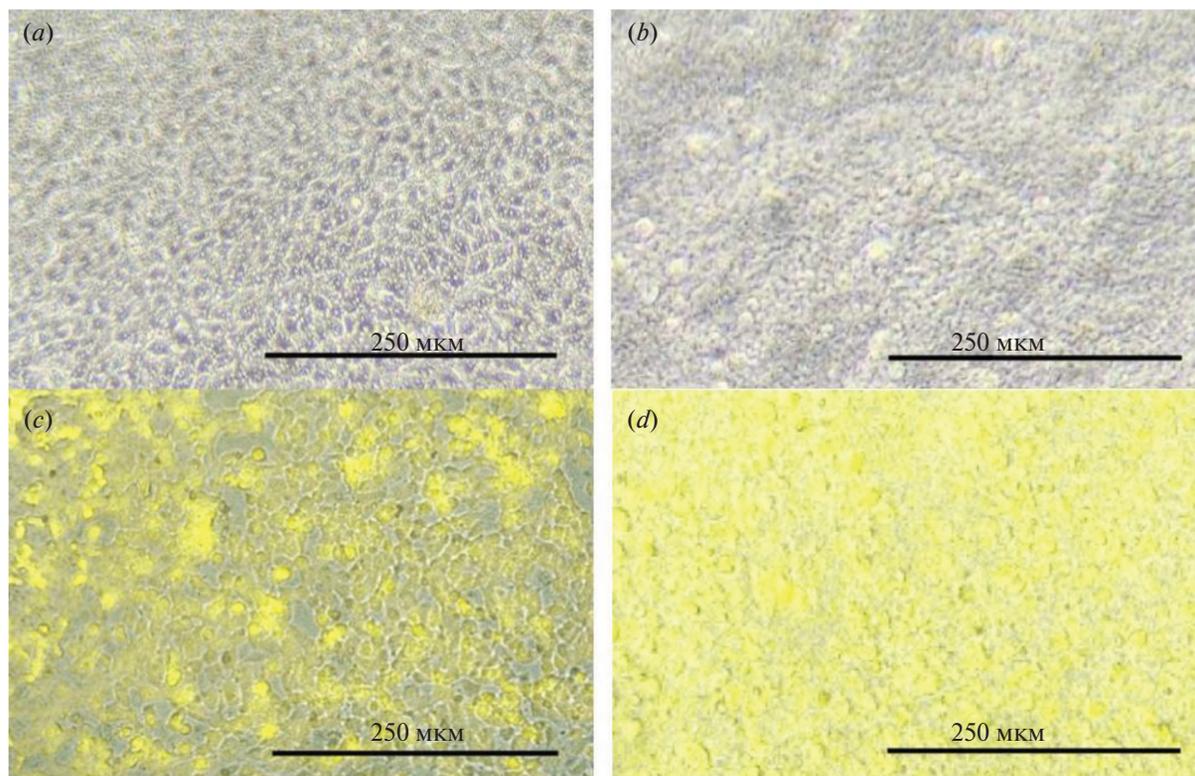


Рис. 5. Культивирование клеток в чипе. Через 24 ч после посадки без окраски: (a) – EA.hy926, (b) – BeWo b30; через 7 сут культивирования, окраска CellTracker Orange CMRA: (c) – EA.hy926, (d) – BeWo b30.

Fig. 5. Cell culture in the chip. 24 h after seeding without staining: (a) – EA.hy926, (b) – BeWo b30; after 7 days of cultivation, CellTracker Orange CMRA staining: (c) – EA.hy926, (d) – BeWo b30.

предварительной экстракции этанолом [21]. Нейроны в канале со стеклянным дном и стенками из ПДМС, как в нашем устройстве, не выживали, однако предварительное автоклавирувание ПДМС улучшало выживаемость нейронов, что может быть связано с уменьшением несвязанных компонентов [22]. В то же время жизнеспособность и пролиферация трех клеточных линий, K562, U937 и U2OS, в чипе из ПДМС не отличалась от таковой в плашках из полистирола [23]. Нашим экспериментом мы подтвердили, что подобранные условия изготовления чипа не влияют на жизнеспособность клеток BeWo b30 и EA.hy926, используемых для моделирования плаценты-на-чипе.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при получении ПДМС изменение соотношения основы и отвердителя с 10 : 1 до 5 : 1 и 2.5 : 1 и изменение температуры полимеризации с 75 до 25°C и 125°C происходит уменьшение газопроницаемости контура микрофлюидного чипа, что позволяет культивировать органы-на-чипе в течение более длительного времени без образования воздушных пузырей. При этом соотношении 5 : 1 с температурой полимеризации 125°C характеризуется оптимальным сочетанием низкой газопроницаемости, быстрой полимеризации и экономичного расхода компонентов, не оказывая цитотоксического действия на клетки EA.hy926 и BeWo b30, используемые в качестве эндотелия и трофобласта в модели плаценты-на-чипе.

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

- Xu W., Chahine N., Sulchek T.* Extreme Hardening of PDMS Thin Films Due to High Compressive Strain and Confined Thickness. *Langmuir*, 2011, 27(13), 8470–8477. <https://doi.org/10.1021/la201122e>
- Vlassov S., Oras S., Antsov M., Sosnin I., Polyakov B., Shutka A., Krauchanka M.Y., Dorogin L.M.* Adhesion and Mechanical Properties of PDMS-Based Materials Probed with AFM: A Review. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 2018, 56(1), 62–78. <https://doi.org/10.1515/rams-2018-0038>
- Maram S.K., Barron B., Leung J.C.K., Pallapa M., Rezai P.* Fabrication and thermoresistive behavior characterization of three-dimensional silver-polydimethylsiloxane (Ag-PDMS) microbridges in a mini-channel. *Sens. Actuators A Phys.*, 2018, 277, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.04.047>
- Akther F., Yakob S.B., Nguyen N.-T., Ta H.T.* Surface Modification Techniques for Endothelial Cell Seeding in PDMS Microfluidic Devices. *Biosensors*, 2020, 10(11), 182. <https://doi.org/10.3390/bios10110182>
- Wu X., Kim S.-H., Ji C.-H., Allen M.G.* A solid hydraulically amplified piezoelectric microvalve. *J. Micro-mech. Microeng.*, 2011, 21(9), 095003. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/21/9/095003>
- 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>
- Lamberti A., Marasso S.L., Cocuzza M.* PDMS membranes with tunable gas permeability for microfluidic applications. *RSC Adv.*, 2014, 4(106), 61415–61419. <https://doi.org/10.1039/C4RA12934B>
- Merkel T.C., Bondar V.I., Nagai K., Freeman B.D., Pinnau I.* Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane). *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 2000, 38(3), 415–434. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(20000201\)38:3<415::AID-POLB8>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(20000201)38:3<415::AID-POLB8>3.0.CO;2-Z)
- Berean K., Ou J.Z., Nour M., Latham K., McSweeney C., Paull D., Halim A., Kentish S., Doherty C.M., Hill A.J., Kalantar-zadeh K.* The effect of crosslinking temperature on the permeability of PDMS membranes: Evidence of extraordinary CO₂ and CH₄ gas permeation. *Sep. Purif. Technol.*, 2014, 122, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.11.006>
- Carrillo F., Gupta S., Balooch M., Marshall S.J., Marshall G.W., Pruitt L., Puttlitz C.M.* Nanoindentation of polydimethylsiloxane elastomers: Effect of crosslinking, work of adhesion, and fluid environment on elastic modulus. *J. Mater. Res.*, 2005, 20(10), 2820–2830. <https://doi.org/10.1557/JMR.2005.0354>
- Teixeira A.I., Ilkhanizadeh S., Wigenius J.A., Duckworth J.K., Inganäs O., Hermanson O.* The promotion of neuronal maturation on soft substrates. *Biomaterials*, 2009, 30(27), 4567–4572. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.013>
- Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R., Fleming R.M.T.* Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 63, 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>
- Lee J.N., Jiang X., Ryan D., Whitesides G.M.* Compatibility of Mammalian Cells on Surfaces of Poly(dimethylsiloxane). *Langmuir*, 2004, 20(26), 11684–11691. <https://doi.org/10.1021/la048562+>
- Chang W.-J., Akin D., Sedlak M., Ladisch M.R., Bashir R.* Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and Silicon Hybrid Biochip for Bacterial Culture. *Biomed. Microdevices*, 2003, 5(4), 281–290. <https://doi.org/10.1023/A:1027301628547>

15. Ziemecka I., Haut B., Scheid B. Continuous separation, with microfluidics, of the components of a ternary mixture: from vacuum to purge gas pervaporation. *Microfluid. Nanofluidics*, 2017, 21(5), 84. <https://doi.org/10.1007/s10404-017-1915-6>
16. Rudimov E.G., Knyazev E.N., Khaustova N.A., Grigorieva O. V., Buravkova L.B. Transcriptomic changes in human umbilical cord blood endothelial cells under simulated microgravity. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, 472(1), 1–4. <https://doi.org/10.1134/S160767291701001X>
17. Knyazev E.N., Mal'tseva D. V., Zacharyants A.A., Zakharova G.S., Zhidkova O.V., Poloznikov A.A. TNF α -Induced Expression of Transport Protein Genes in HUVEC Cells Is Associated with Enhanced Expression of Transcription Factor Genes RELB and NFKB2 of the Non-Canonical NF- κ B Pathway. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, 164(6), 757–761. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4074-1>
18. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., Shilin S.A., Gazizov I.N., Zakharova G.S., Poloznikov A.A., Sakharov D.A. Impedance Spectroscopy and Transcriptome Analysis of Choriocarcinoma BeWo b30 as a Model of Human Placenta. *Mol. Biol.*, 2019, 53(3), 411–418. <https://doi.org/10.1134/S0026893319030130>
19. Knyazev E.N., Zakharova G.S., Astakhova L.A., Tsygina I.M., Tonevitsky A.G., Sukhikh G.T. Metabolic Reprogramming of Trophoblast Cells in Response to Hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166(3), 321–325. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04342-1>
20. Wang L., Sun B., Ziemer K.S., Barabino G.A., Carrier R.L. Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco-2 cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2010, 93A(4), 1260–1271. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32621>
21. Regehr K.J., Domenech M., Koepsel J.T., Carver K.C., Ellison-Zelski S.J., Murphy W.L., Schuler L.A., Alarid E.T., Beebe D.J. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab. Chip*, 2009, 9(15), 2132. <https://doi.org/10.1039/b903043c>
22. Millet L.J., Stewart M.E., Sweedler J.V., Nuzzo R.G., Gillette M.U. Microfluidic devices for culturing primary mammalian neurons at low densities. *Lab Chip*, 2007, 7(8), 987. <https://doi.org/10.1039/b705266a>
23. Wlodkowic D., Faley S., Skommer J., McGuinness D., Cooper J.M. Biological Implications of Polymeric Microdevices for Live Cell Assays. *Anal. Chem.*, 2009, 81(23), 9828–9833. <https://doi.org/10.1021/ac902010s>

Optimization of Gas Permeability in PDMS Microfluidic Chips for Organ-on-a-Chip Modeling

I. A. Khaustov^{a, b}, Yu. A. Safronova^a, O. E. Chebotareva^a, J. A. Brianton^a, and E. N. Knyazev^{a, b, #}

^aFaculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, 101000 Russia

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

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

Abstract—Polydimethylsiloxane (PDMS) remains one of the most popular materials for microfluidic chips, but its high gas permeability can lead to the formation of gas bubbles in microchannels, which hampers the reproducibility of experiments in organ-on-a-chip systems. The dependence of the gas permeability of PDMS on the ratio of base to curing agent (2.5 : 1, 5 : 1, and 10 : 1) and polymerization temperature (25°C, 75°C, and 125°C) was investigated. According to the results obtained, the 5 : 1 ratio at 125°C provides an optimal combination of low gas permeability, fast polymerization and economical consumption of components. Cytotoxicity testing on BeWo b30 and EA.hy926 cell lines, representing the trophoblast and endothelium in a placenta-on-a-chip model, demonstrated the absence of cytotoxic effects using different ratios of PDMS components, which confirms its safety for cellular experiments.

Keywords: microfluidics, microfluidic chip, organ-on-a-chip, placenta-on-a-chip, PDMS, gas permeability