

УДК 53.082.722

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОГО УСТРОЙСТВА СО ВСТРОЕННОЙ СИСТЕМОЙ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ИМПЕДАНС-СПЕКТРОВ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

© 2020 г. В. А. Петров¹, Т. Н. Герасименко¹*, О. В. Киндеева², И. Н. Газизов²,
С. А. Шилин¹, Д. А. Сахаров¹

¹Общество с ограниченной ответственностью “Научно-технический центр “БиоКлиникум”, Москва, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования
“Дальневосточный федеральный университет”, Владивосток, Россия

*E-mail: t.gerasimenko@bioclinicum.com

Поступила в редакцию 30.08.2019 г.

После доработки 16.09.2019 г.

Принята к публикации 28.10.2019 г.

В работе представлена математическая модель распределения потенциала и напряженности электрического поля в ячейках микрофлюидного устройства для культивирования монослоя клеток с различными геометриями встроенных электродов. На основе анализа результатов расчета выбрана конструкция измерительной ячейки и геометрия электродов.

DOI: 10.31857/S0367676520020301

Биологические барьеры (кожа, эпителий кишечника, гематоэнцефалический барьер и т.д.) играют колоссальную роль в поддержании целостности и жизнеспособности живых организмов. Моделирование таких барьеров *in vitro* чрезвычайно важно для разработки новых лекарственных препаратов и поиска способов их эффективной доставки.

Чаще всего моделирование осуществляется с помощью специальных мембранных вставок, на которых выращивается один или несколько слоев клеток. Для воссоздания параметров микроокружения ткани используются различные микрофлюидные устройства, моделирующие кровоток с помощью циркулирующего течения питательной среды. При этом на всех этапах культивирования клеток необходимо иметь возможность неинвазивным образом контролировать их жизнеспособность и барьерную функцию [1].

Классическим методом контроля целостности клеточного монослоя является измерение трансэпителиального сопротивления (transendothelial electrical resistance, TEER) [2]. Интактный монослой, как правило, имеет сопротивление порядка нескольких кОм [2], что существенно превосходит сопротивление культуральной среды между электродами. Резкое падение TEER обычно свидетельствует о нарушении целостности барьера. В большинстве существующих коммерческих ре-

шений измерения осуществляются на частоте порядка 12.5 Гц, для того чтобы избежать экранировки электродов при постоянном токе [3]. Для измерений в них обычно используется внешний электрод, который погружается в ячейку для культивирования клеток. Такой подход оказывается малоприменимым для микрофлюидных устройств, так как требует извлечения мембранной вставки, что нарушает стерильность и микроокружение клеток. Кроме того, измерение импеданса в некотором диапазоне частот и последующий анализ полученных спектров позволяет получить более точные результаты по сравнению с классическим способом измерения TEER на одной частоте [4].

В данной работе решалась задача поиска оптимальной геометрии электродов, встроенных в измерительную ячейку микрофлюидного чипа (рис. 1). Требовалось подобрать такую геометрию, которая была бы максимально простой в изготовлении, обеспечила бы необходимую точность измерений, не влияя при этом на стерильность, объем циркулирующей среды и доступность клеточного монослоя для оптических методов исследования.

Микрофлюидный чип был разработан на базе устройств, совместимых с микробиореактором “Nunculus”, созданных ранее нашей научной группой [5] (рис. 1). Он содержит замкнутый микроканал и три лунки, в две из которых могут быть вставлены мембранные вставки HTS Transwell

(Corning, США), предназначенные для культивирования барьерных тканей. Центральная лунка предназначена для проведения сопутствующих измерений. Питательная среда приводится в движение встроенным перистальтическим микронасосом (рис. 1) [6]. Контроль целостности монослоя предполагалось проводить с помощью разработанного нашей научной группой прибора для импедансной спектроскопии.

Для повышения точности измерений было решено использовать четырехэлектродную измерительную схему [7]. Рабочий (WE) и один из сенсорных электродов (SE2) помещаются в пробку, закрывающую ячейку. Для положения противоэлектрода (CE) и еще одного сенсорного электрода (SE1) возможны различные варианты, однако для обеспечения приемлемой точности измерений измеренное сопротивление среды между электродами и емкость системы электродов не должны превосходить сопротивление и емкость клеточного монослоя (единицы кОм и единицы мкФ [8]).

При расчете измеряемого сопротивления среды и емкости системы электродов предполагалось, что среда электронейтральна и изотропна. Распределение потенциала в системе в этом случае описывается уравнением Лапласа с граничными условиями, соответствующими ненулевому постоянному потенциалу на рабочем электроде и нулевому потенциалу на противоэлектроде (заземление). На сенсорных электродах было задано условие плавающего потенциала [9]. Точные аналитические решения подобных задач известны только для ограниченного числа геометрий [10], поэтому поставленная задача была решена численно. Плавающий потенциал на сенсорных электродах задавался так, как это описано в работе [9]: при численном решении электрод заменялся диэлектриком с очень большой (бесконечной) по сравнению со средой диэлектрической проницаемостью. Окончательно, решаемая краевая задача имеет следующий вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \epsilon \Delta \varphi = 0, \quad r \in \Omega_m \\ \epsilon_{el} \Delta \varphi_{el} = 0, \quad r \in \Omega_{el} \\ \varphi = \varphi_{WE}, \quad r \in \Gamma_{WE} \\ \varphi = \varphi_{CE}, \quad r \in \Gamma_{CE} \\ \varphi = \varphi_{el}, \quad r \in \Gamma_{SE1}, \quad r \in \Gamma_{SE2} \\ \epsilon \frac{\partial \varphi}{\partial \vec{n}} = \epsilon_{el} \frac{\partial \varphi_{el}}{\partial \vec{n}}, \quad r \in \Gamma_{SE1}, \quad r \in \Gamma_{SE2} \\ \frac{\partial \varphi}{\partial \vec{n}} = 0, \quad r \in \partial \Omega / \{ \Gamma_{WE}, \Gamma_{CE} \} \end{array} \right. , \quad (1)$$

где Ω_m – область, занятая средой, рассматриваемая область; Ω_{el} – область сенсорных электродов; Γ_{WE} , Γ_{CE} , Γ_{SE1} , Γ_{SE2} – границы между средой и соответствующим электродом; \vec{n} – внешняя нормаль к поверхности; ϵ – диэлектрическая проницае-

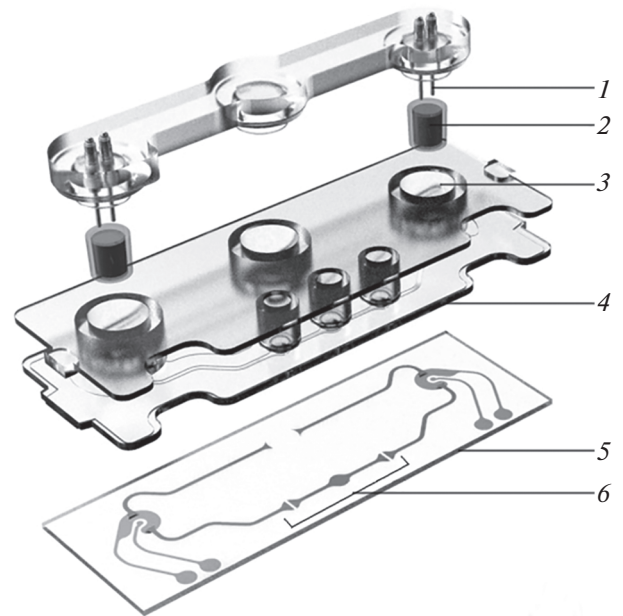


Рис. 1. Микрофлюидный чип (вид с разнесенными элементами): 1 – крышка с электродами, 2 – мембранная вставка, 3 – клеточная ячейка, 4 – слой полимера с микроканалами для циркуляции питательной среды, 5 – предметное стекло с напыленными электродами, 6 – перистальтический насос.

мость среды, $\epsilon_{el} \rightarrow \infty$ – “диэлектрическая проницаемость” сенсорных электродов; φ_{WE} и φ_{CE} – потенциалы рабочего и противоэлектрода соответственно; φ_{el} – потенциал в области, занятой сенсорными электродами. В результате численного решения были получены значения потенциала u_i в узлах сетки. Пример численного решения этой задачи для двух из рассматриваемых конфигураций электродов представлен на рис. 2. Приведены распределения потенциала с эквипотенциальными линиями и электрическое поле (длина векторов на рисунке не пропорциональна напряженности поля) в поперечном сечении измерительной ячейки.

Компоненты вектора напряженности электрического поля определялись численным дифференцированием потенциала, после чего суммарный ток, текущий через рабочий электрод, вычислялся в соответствии с дифференциальным законом Ома. Измеряемое сопротивление среды затем определялось как отношение разности потенциалов между сенсорными электродами к суммарному току через рабочий электрод.

При расчете емкости суммарный заряд на рабочем электроде определялся из теоремы Остроградского–Гаусса, а соответствующая емкость затем вычислялась как отношение этого заряда к разности потенциалов между рабочим и противоэлектродом.

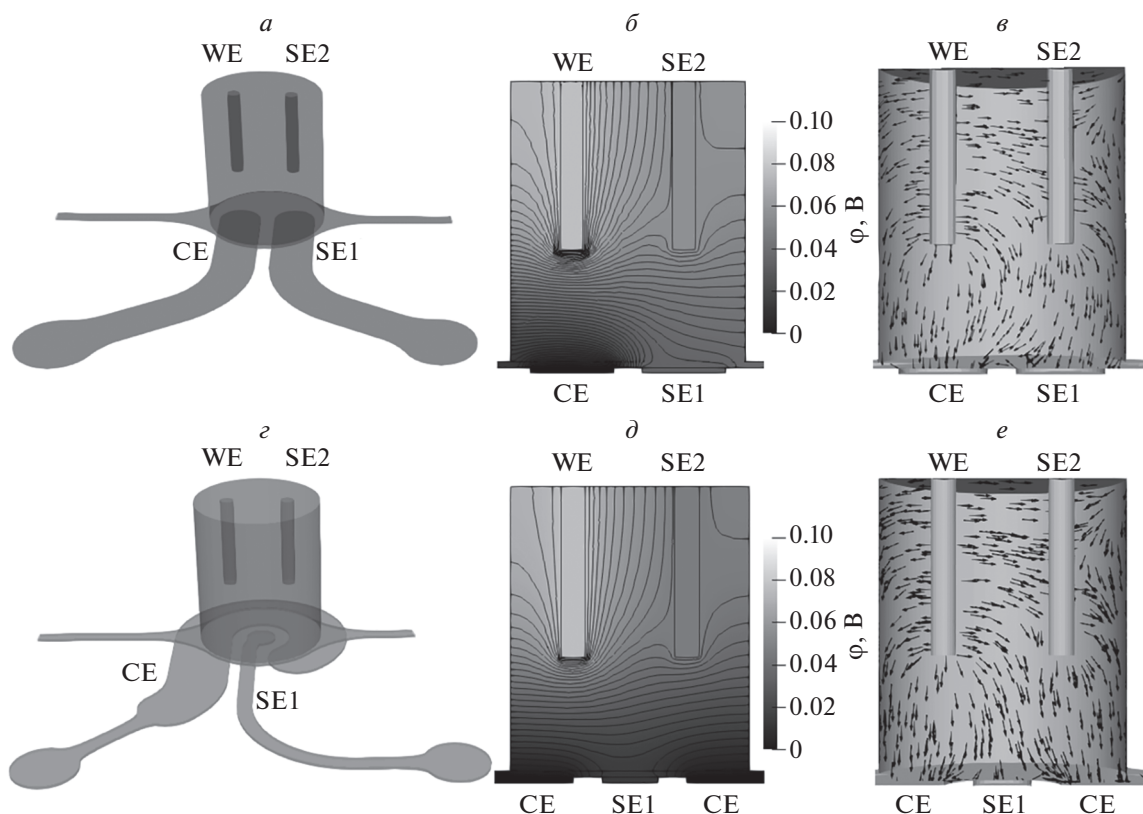


Рис. 2. Моделируемые измерительные ячейки с планарными (а) и круговыми (z) электродами; б, д – распределения потенциала; в, e – электрического поля в них.

Во всех расчетах предполагалось, что на рабочий электрод подается напряжение 100 мВ. Электрические характеристики были взяты для натрий-фосфатного буфера, проводимость которого составляет $1.5 \text{ См} \cdot \text{м}^{-1}$, а диэлектрическая проницаемость – 80 [11]. Значения проводимости варьируются у разных производителей в диапазоне $1.1\text{--}2.2 \text{ См} \cdot \text{м}^{-1}$, поэтому расчет дает возможность оценить порядок величины, но не ее точное значение.

Наиболее удобной для изготовления и практического использования является конфигурация, при которой все четыре электрода стержневые и располагаются в соседних лунках микрофлюидного устройства.

Расчетное сопротивление среды и емкость электродов в этом случае составили 150 кОм и 0.003 пФ соответственно. Столь высокое значение сопротивления делает невозможным применение такой конфигурации электродов. Существенно уменьшить вклад среды в импеданс можно, отказавшись от вставки электродов сверху устройства и нанося их на стекло так, чтобы один из сенсорных электродов и противозлектрод были расположены в ячейке непосредственно под рабочим электродом. Были рассмотрены два ва-

рианта геометрии: в одной из них оба электрода представляют собой одинаковые параллельные полоски (рис. 2а), в другой – имеют форму, близкую к концентрическим окружностям (рис. 2z). Для обоих этих вариантов дополнительно была исследована зависимость сопротивления и емкости от угла поворота верхних стержневых электродов. Было показано, что в обоих случаях сопротивление среды не превышает 150 Ом, а емкость – единиц пФ, что существенно меньше ожидаемых значений для клеточного монослоя. При этом было показано, что геометрия с круговыми электродами в силу своей симметрии приводит к существенно меньшим вариациям измеряемых значений емкости и сопротивления, а электрическое поле внутри измерительной ячейки оказывается более однородным, чем в случае одинаковых параллельных электродов.

На основе проведенного анализа было принято решение использовать концентрические электроды. Экспериментальные измерения импеданс-спектров в пустой ячейке, проведенные в растворе PBS pH 7.2 (Gibco) при комнатной температуре в диапазонах частот от 10 Гц до 1 кГц с шагом 10 Гц и от 1 до 100 кГц с шагом 1 кГц, дали результаты порядка сотен Ом для сопротивления

и единицы пФ для емкости в зависимости от угла поворота верхних стержневых электродов, что согласуется с теоретическими оценками. Дальнейшие эксперименты с клетками [12] показали, что предложенная геометрия электродов позволяет с достаточной точностью измерять импеданс-спектры клеточного монослоя.

Проведено математическое моделирование распределения потенциала и напряженности электрического поля в ячейках для культивирования монослоя клеток с различными геометриями встроенных электродов. Исходя из анализа полученных данных была выбрана геометрия электродов для измерительной ячейки, которая хорошо подходит для интеграции в микрофлюидное устройство и позволяет исследовать целостность клеточного монослоя неинвазивными методами. Теоретические оценки были подтверждены экспериментально. Разработанное в результате микрофлюидное устройство впоследствии успешно применялось для измерений импеданс-спектров клеточного монослоя.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 16-19-10597).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Walter F.R., Valkai S., Kincses A. et al.* // Sens. Actuators B. Chem. 2016. V. 222. P. 1209.
2. *Odijk M., van der Meer A.D., Levner D. et al.* // Lab. Chip. 2015. V. 15. P. 745.
3. *Безбородов И.С., Поляков П.А., Русакова Н.Е.* // Изв. РАН. Сер. физ. 2018. Т. 82. С. 1055; *Bezborodov I.S., Polyakova P.A., Rusakova N.E.* // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2018. V. 82. P. 953.
4. *Никулин С.В., Князев Е.Н., Полозников А.А. и др.* // Мол. биол. 2018. Т. 52. С. 667.
5. *Киндеева О.В., Петров В.А., Герасименко Т.Н. и др.* Демпфирующий элемент микрофлюидного чипа и микрофлюидный чип. Пат. РФ № 2016152523, кл. G01N33/48. 2018.
6. *Gerasimenko T.N., Kindeeva O.V., Petrov V.A. et al.* // Appl. Math. Model. 2017. № 52. P. 590.
7. *Heaney M.B.* Electrical conductivity and resistivity, electrical measurement, signal processing and displays. Los Angeles: CRC Press, 2003. 465 p.
8. *van der Meer A.D., Jung K.H., van der Helm M.W. et al.* // Lab. Chip. 2015. V. 15. P. 745.
9. *Konrad A., Graovac M.* // IEEE Trans. Magn. 1996. V. 32. P. 4329.
10. *Polyakov P.A., Rusakova N.E., Samukhina Yu.V.* // J. Electrostat. 2015. V. 77. P. 147.
11. *Binette J.S., Garon M., Savard P. et al.* // J. Biomech. Engin. 2004. V. 126. P. 475.
12. *Никулин С.В., Герасименко Т.Н., Шилин С.А. и др.* // Бюл. эксп. биол. и мед. 2018. Т. 166. С. 570.