

На правах рукописи



Киндеева Ольга Владимировна

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ БИОТЕХНИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ *IN VITRO*

Специальность 05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского
назначения

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: **Хаустов Александр Иванович,**
доктор технических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Евстратов Анатолий Александрович,**
доктор технических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, заместитель директора по научной работе;

Гаряев Андрей Борисович,
доктор технических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «МЭИ», заведующий кафедрой тепломассообменных процессов и установок.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», г. Москва.

Защита состоится «12» сентября 2018 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.141.14 при Московском государственном техническом университете имени Н.Э. Баумана в зале Ученого Совета по адресу 105005, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д.5, стр.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГТУ им. Н.Э. Баумана и на сайте www.bmstu.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенных гербовой печатью, просьба направлять по адресу: 105005, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр.1, МГТУ им. Н.Э. Баумана, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.141.14.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

Самородов Андрей
Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Создание нового лекарственного вещества является крайне сложным, долгим и требующим огромных финансовых затрат процессом. Как правило, путь от исследовательских работ до получения готового продукта занимает около 10-15 лет. Отсюда возникает острая необходимость в тестировании и подтверждении потенциальных кандидатов на лекарственное вещество на первоначальном этапе разработки.

Попадая в организм, лекарственные вещества (ксенобиотики), подвергаются ряду физико-химических и биохимических превращений, которые называются биотрансформацией или метаболизмом. В большинстве случаев метаболиты лекарственных веществ менее фармакологически активны и менее токсичны, чем исходные соединения. Однако, в результате биотрансформации может произойти: инактивация лекарственных веществ, т.е. снижение их фармакологической активности, повышение активности лекарственных веществ, а также образование токсических метаболитов. Во избежание межлекарственных взаимодействий при единовременном приеме нескольких лекарственных веществ необходимо учитывать, как пути биотрансформации каждого вещества в отдельности, так и их способность влиять на метаболизм других веществ.

Согласно требованиям национальных нормативных документов, все доклинические испытания лекарственных веществ проводятся с использованием лабораторных животных. Однако, данный метод испытания веществ не является достаточно достоверным в связи с наличием серьезных видоспецифических различий между животными и человеком. Отсюда возникает необходимость развития новых методов оценки токсичности. В наши дни решение подобных задач стало возможно благодаря интенсивному развитию клеточных технологий и высокоинформационных *in vitro* тестов.

Тем не менее, при использовании в качестве объекта исследований и испытаний клеточных культур возникает ряд сложностей. Из-за возможной вариабельности условий культивирования объекта исследований затруднено получение воспроизводимых количественных результатов. Поэтому создание достоверных клеточных моделей органов и тканей человека является актуальной задачей для разработки новых лекарственных веществ и эффективной доклинической оценки действия препаратов – их токсичности, поиска молекулярных мишней, путей биотрансформации и т.п.

Последние научные достижения в области микрофлюидики позволили создать биотехнические модели функциональных органов человека, которые получили название «органы-на-чипе». В микрофлюидные устройства могут быть встроены специальные элементы: насосы, клапаны и смесители, которые позволяют управлять точно дозированными объемами жидкости в микромасштабе. Поэтому такие устройства становятся полезными инструментами для разработки новых лекарственных веществ. Кроме того, технология «орган-на-чипе» в будущем имеет перспективы стать основой для доклинических испытаний с высокой предсказательной силой.

Степень разработанности темы исследования. Большинство известных микрофлюидных моделей органов человека представляют собой проточные системы, которые подвержены риску контаминации питательной жидкости. Кроме того, такая конфигурация устройства затрудняет анализ метаболитов, так как они не накапливаются в системе, а удаляются свежим потоком жидкости. Циркуляция жидкости в таких системах обеспечивается работой внешних нагнетательных устройств, не предназначенных для работы с клеточными моделями.

В литературе представлены примеры микрофлюидных устройств, которые включают в себя замкнутые контуры для культивирования независимых клеточных моделей *in vitro*. Однако, количества таких контуров на одном устройстве недостаточно для получения статистически достоверных данных. Насос в таких системах создаёт резкие скачки давления в замкнутом контуре устройства, тем самым травмируя клеточные культуры. А предложенные способы внесения в питательную среду исследуемых лекарственных веществ могут привести к контаминации.

Исходя из анализа литературных данных следует, что на данный момент не существует микрофлюидной биотехнической системы, которая позволила бы проводить медико-биологические исследования биотрансформации и токсичности новых лекарственных веществ *in vitro* и отвечала бы всем требованиям, предъявляемым к системам такого назначения.

Цель работы заключается в разработке микрофлюидной биотехнической системы (МБТС) для исследования процессов биотрансформации лекарственных веществ *in vitro*.

Основные задачи: 1. Разработать метод изготовления биотехнической системы, обеспечивающей высокую биосовместимость материалов с клеточными моделями печени человека. 2. Разработать математическую модель, позволяющую определить основные гидродинамические параметры течения жидкости в биотехнической системе. 3. Оптимизировать и обосновать геометрические параметры биотехнической системы для обеспечения условий культивирования клеточных моделей органов человека, близкие физиологическим. 4. Провести анализ результатов медико-биологических исследований эффективности разработанных средств и методов.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- на основе экспериментально полученных коэффициентов, описывающих механические свойства используемого полимера, составлена математическая модель течения жидкости в микроканале, учитывающая деформацию упругих стенок;

- экспериментально и теоретически получены зависимости давления и расхода жидкости в МБТС от режимных параметров интегрированного мембранный микронасоса;

- исходя из анализа полученных зависимостей, предложено использовать шеститактный алгоритм переключения клапанов;

- разработана микрофлюидная биотехническая система, позволяющая проводить четыре однотипных одномоментных независимых медико-биологических исследований *in vitro*, исходя из требований к течению жидкости, предъявляемых трёхмерной моделью печени – сфероидами клеток НепаRG (напряжения не более 0,05 Па, расход до 17,5 мкл/мин);

- основываясь на теоретически полученных значениях напряжений, действующих на клеточные модели, культивируемые в МБТС (не более 0,05 Па), и на результатах медико-биологических исследований, показано, что при оптимальном режиме работы МБТС (± 10 кПа, 5 Гц) клетки НепаRG демонстрируют жизнеспособность ($142 \pm 5\%$) и высокий уровень экспрессии функциональных генов (более чем в 1,2 раза) относительно статического режима культивирования в 96-луночном планшете.

Основные положения, выносимые на защиту: разработанная математическая модель течения жидкости в микроканале с упругими стенками позволяет определять значения давления и скорости жидкости в каждой точке канала в любой момент времени; разработанные математическая модель и подтверждающие её достоверность экспериментальные исследования позволяют определять напряжения, которые действуют на культивируемые клетки, тем самым, оптимизировать геометрические параметры МБТС и режимные характеристики насоса; метод изготовления МБТС, основанный на заполнении мастер-форм полимером ПДМС в центрифуге и последующей полимеризацией, обеспечивает изготовление МБТС, удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к системам для исследования биотрансформации лекарственных веществ; разработанная на основе теоретических и экспериментальных исследований МБТС реализует такое течение питательной жидкости, при котором клеточные модели демонстрируют жизнеспособность, и может быть использована для проведения статистически достоверных исследований процессов биотрансформации веществ.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученная методика проектирования МБТС использует математическую модель с минимальными допущениями, которая учитывает особенности микроканалов БТС, что позволяет оценить влияние геометрических и режимных параметров на характеристики течения жидкости.

Практическая значимость работы: Разработан метод проектирования МБТС на заданные параметры, которые могут быть использованы при проведении медико-биологических исследований *in vitro* различной направленности. Спроектирована, изготовлена и испытана МБТС, позволяющая проводить четыре однотипных одномоментных независимых медико-биологических исследования *in vitro*, исходя из требований, предъявляемых трёхмерной моделью печени – сфероидами НепаRG. Разработан метод изготовления МБТС с конкретными геометрическими параметрами, обеспечивающей биосовместимость материалов и повторяемость результатов. Разработанный метод проектирования МБТС может быть использован для создания микрофлюидных систем разного назначения.

Методология и методы исследования Методологическую основу работы составляют труды отечественных и зарубежных учёных в области проектирования микрофлюидных биотехнических систем, гидродинамики микроканалов, физико-химических свойств полимерных материалов и проведения медико-биологических исследований *in vitro*.

Методы исследования выбирались исходя из постановки решаемых задач с учётом особенностей изучаемых объектов и включали в себя определение физико-химических свойств используемых материалов; измерение скорости жидкости методом цифровой трассерной визуализации потока; анализ и сравнение полученных теоретически и экспериментально физических параметров потока жидкости в разрабатываемой системе.

Достоверность результатов работы обеспечена: базированием на строго доказанных и корректно используемых фундаментальных законах физики при проведении математического моделирования; согласованием полученных теоретических результатов с экспериментальными данными; большим статистическим экспериментальным материалом, который получен с использованием откалиброванных приборов. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с помощью общепринятых методов статистики.

Основные результаты и положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на 13-й и 15-й Международных конференциях «Авиация и космонавтика» (Москва, 2014, 2016); XLII Международной молодёжной научной конференции «Гагаринские чтения – 2016» (Москва, 2016); Международном научном семинаре с элементами научной школы для молодых ученых на базе Отдела трансляционной онкологии МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России (Москва, 2016); Научной конференции с элементами научной школы для молодых ученых «Современные подходы к клеточным исследованиям *in vitro* в медицине» МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России (Москва, 2017); на многочисленных заседаниях кафедры 614 МАИ (НИУ); на научно-техническом семинаре факультета «Биомедицинская техника» МГТУ им. Н.Э. Баумана (Москва, 2017).

Внедрение результатов работы. Полученный в результате исследований метод проектирования и изготовления микрофлюидных биотехнических систем используется в научно-производственной фирме «БиоКлиникум» для создания микрофлюидных устройств различного назначения.

Результаты диссертации были использованы при выполнении ПНИ в рамках федеральных целевых программ Министерства образования и науки РФ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» № 14.579.21.0018 (уникальный идентификатор RFMEFI57914X0018).

В отделе Трансляционной онкологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России проводятся исследования

клеточных культур с применением микрофлюидных биотехнических систем, разработанных согласно методу проектирования, предложенному соискателем.

Публикации. Основные результаты опубликованы в 13 печатных работах: 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 2 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных Scopus, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ и 6 в сборниках тезисов конференций.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, основных выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах, содержит 65 рисунков и 7 таблиц. Библиографический список насчитывает 155 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении диссертации обоснована актуальность выбранной темы исследования, сформулирована цель работы и поставлены задачи для достижения этой цели, раскрыта научная новизна и практическая значимость данной работы.

В первой главе представлен аналитический обзор имеющихся литературных источников в области микрофлюидных устройств для проведения исследования процессов биотрансформации веществ *in vitro*. Рассмотрены основные подходы к созданию клеточных моделей различных органов человека. Несмотря на многообразие подобного рода систем, сделан вывод от том, что в настоящее время не существует микрофлюидной биотехнической системы, которая позволила бы проводить медико-биологические исследования биотрансформации и токсичности новых лекарственных веществ *in vitro*.

Показано, что наиболее перспективной и оптимальной конструкцией для исследования путей биотрансформации веществ является устройство с несколькими замкнутыми независимыми контурами микроканалов с клеточными ячейками, выполненными из биосовместимого материала. А использование в замкнутом контуре микронасоса требует интеграции в канал демпфирующего элемента, который будет сглаживать резкие пульсации скорости и давления на входе в клеточную ячейку. Сделан вывод, что геометрические и режимные параметры разрабатываемого устройства должны определяться исходя из физиологических условий моделируемого органа. Для апробации разрабатываемого устройства была выбрана трёхмерная клеточная модель клеток гепатомы линии НераRG. Сформулированы требования к потоку питательной жидкости в замкнутом контуре МБТС.

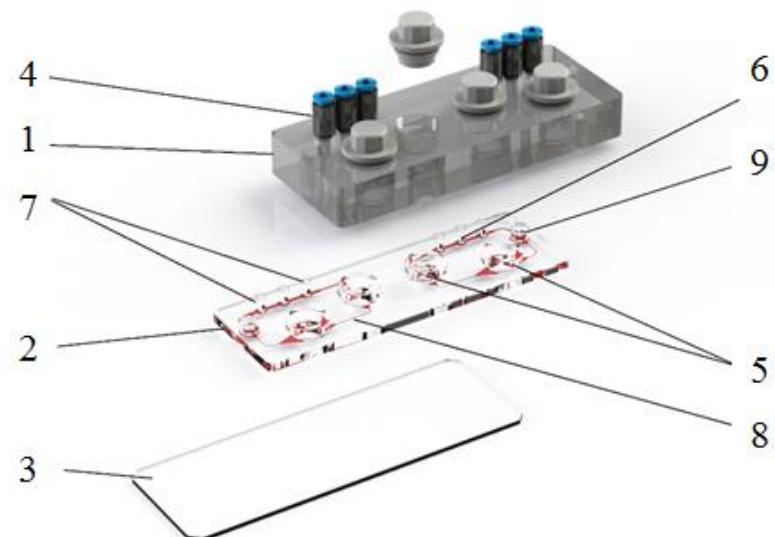
Во второй главе выполнен обзор литературы, посвященной физико-математическому моделированию течения вязкой несжимаемой жидкости в микроканале биотехнической системы с упругими стенками. Анализ показал целесообразность использования для моделирования нестационарных течений

вязкой несжимаемой жидкости в микроканалах с упругими стенками электромеханической аналогии.

Для апробации разрабатываемых методов, выбрана и доработана известная конструкция МБТС, которая состоит из трёх основных элементов (Рисунок 1): плата (поз. 1) – основа, к которой крепится слой с микроканалами, и в которой располагаются держатели с клеточными культурами; полимерный эластичный слой (поз. 2) – слой с сетью микроканалов, подводящих к клеткам питательную среду, и клапанами насоса, которые интегрированы в канал и реализуют циркуляцию питательных веществ; подложка (поз. 3), формирующая нижнюю стенку микроканала.

МБТС содержит два замкнутых независимых контура. Каждый контур имеет один микронасос (поз. 4), который обеспечивает перфузию питательных веществ, и две ячейки под клеточные модели (поз. 5). Насос состоит из рабочей камеры (поз. 6) и двух клапанов (поз. 7). Клапаны и рабочая камера представляют собой гибкие тонкостенные мембранны, которые приводятся в движение от внешнего источника давления и вакуума. Ячейки соединены последовательно микроканалом прямоугольного поперечного сечения с шириной 500 мкм и высотой 100 мкм (поз. 8). В отличие от прототипа «мультиорганных чипа» в конструкцию МБТС был добавлен демпфирующий элемент (поз. 9), который необходим для сглаживания резких пульсаций давления жидкости в устройстве.

Рисунок 1. Конструкция микрофлюидного устройства: 1 – поликарбонатная пластина, 2 – слой ПДМС, 3 – предметное стекло, 4 – система подачи воздуха к микронасосу, 5 – ячейки с клетками, 6 – рабочая камера, 7 – боковые клапаны, 8 – прямолинейный канал, 9 – демпфер



Один цикл работы микронасоса состоит из пяти тактов последовательной смены положения клапанов (Рисунок 2).

В рамках работы проведён выбор материалов: плата изготавливается из поликарбоната, эластичный слой из полидиметилсилоксана (ПДМС), подложка из предметного стекла. В тексте подробно описан способ изготовления и приводится определение оптимальных параметров.

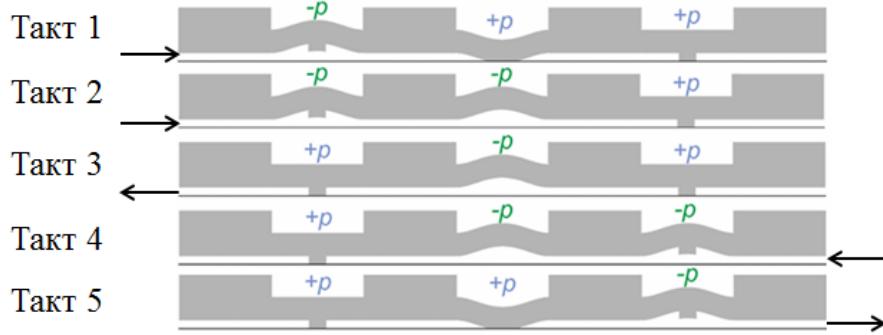


Рисунок 2. Пятитактный цикл работы микронасоса. Стрелками показано направление движения жидкости

Объектом моделирования является контур микрофлюидного устройства, представленного на Рисунке 3. Контур состоит из микронасоса, демпферной мембранны диаметром D_m , двух клеточных ячеек диаметрами D_{c1} и D_{c2} , и упругого микроканала шириной W и высотой H . Задачей моделирования являлось определение средних по поперечному сечению канала значений давления среды в каждый момент времени. Давление в замкнутом микроканале складывается из двух компонент: статической составляющей и динамической.

При моделировании потока принимались следующие допущения:

- 1) Насос заменен зависимостями давления от времени на входе в канал $p_{dyn_in}(t)$ и на выходе $p_{dyn_out}(t)$;
- 2) Давление постоянно по поперечному сечению канала:

$$\frac{\partial p}{\partial y} = 0; \frac{\partial p}{\partial z} = 0.$$

- 3) Пренебрегаем текучестью ПДМС.

При создании математической модели предполагалось, что на стенках микроканала справедливы условия прилипания, а в начальный момент времени жидкость покоялась. Таким образом, получим следующую краевую задачу:

$$\begin{cases} \frac{\partial u(y, z, t)}{\partial t} = \nu \left(\frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right) - \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x}; \\ u(y, z, 0) = 0; \\ u(0, z, t) = u(W, z, t) = 0; \\ u(y, 0, t) = u(y, H, t) = 0. \end{cases} \quad (1)$$

В качестве исходных данных задается зависимость падения давления на рассматриваемом участке микроканала от времени, геометрия поперечного сечения микроканала, длина рассматриваемого участка и параметры жидкости (ρ – плотность, ν – кинематическая вязкость). Отсюда возникает задача определения значения давления в поперечном сечении микроканала для любого значения x , то есть $p(x, t)$.

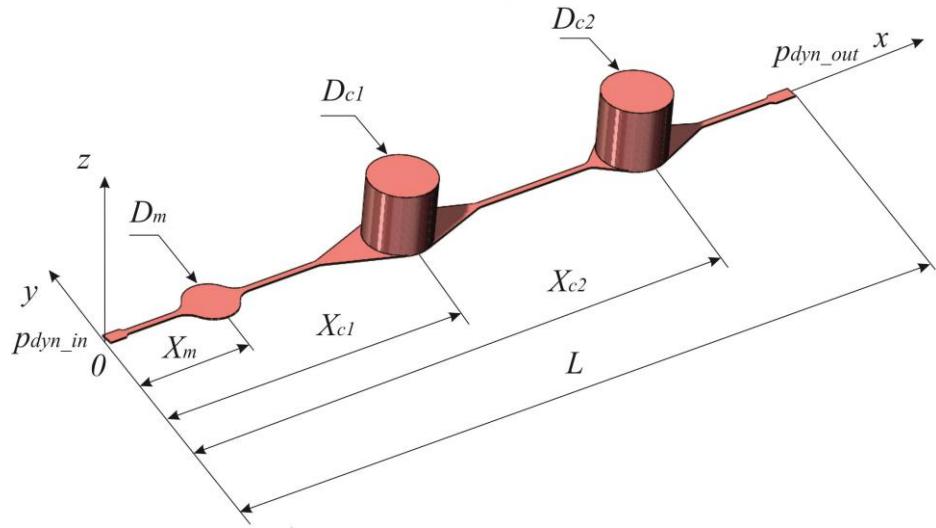


Рисунок 3. Геометрические характеристики исследуемого контура

Эквивалентная электрическая цепь микроканала показана на Рисунке 4. Для описания электромеханических характеристик канала вводятся следующие обозначения: $R_{ch_i}(x)$ – гидравлическое сопротивление каждой части канала, $R_m(x)$ – гидравлическое сопротивление мембранны, $R_{c_i}(x)$ – гидравлическое сопротивление клеточной ячейки, $C_{ch_i}(x)$ – податливость упругой стенки канала ($i=1,2,3,4$), $C_m(x)$ – податливость упругой мембранны.

С учетом всех допущений было составлено уравнение, дополненное начальными и граничными условиями:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial p_{dyn}}{\partial t} = \frac{1}{C_x} \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{1}{R_x} \frac{\partial p_{dyn}}{\partial x} \right); \\ p_{dyn}(0, x) = 0; \\ p_{dyn}(t, 0) = p_{dyn_in}(t); \\ p_{dyn}(t, L) = p_{dyn_out}(t). \end{array} \right. \quad (2)$$

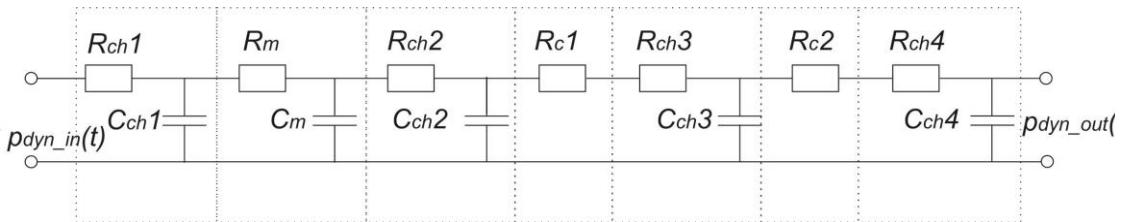


Рисунок 4. Эквивалентная электрическая цепь микроканала.

Линейное гидравлическое сопротивление для канала получено из закона Пуазейля для каналов прямоугольного сечения. Податливость упругих стенок МБТС определялась для трех составляющих контура микроканала: прямоугольного микроканала, демпферной мембранны и клеточной ячейки. В тексте диссертации описан эксперимент, благодаря которому были определены коэффициенты, описывающие механические свойства материала, необходимые

для определения податливости. В результате, для нахождения податливости стенок контура МБТС была составлена кусочно-непрерывная функция.

Статическая составляющая давления связана с изменением объёма канала в МБТС, которое происходит за счёт подъёма или опускания клапанов, поэтому была найдена интегрированием объёмного расхода по периоду работы насоса. Необходимый для этого коэффициент пропорциональности был получен экспериментально.

В расчётных исследованиях определялось влияние величины режимных параметров работы микронасоса (давления воздуха на клапанах и частоты переключения) и геометрических параметров демпфирующего элемента на величину давления жидкости в клеточных ячейках и на расход жидкости через систему. Было выяснено, что изменение толщины мембранны демпфера определяет скорость изменения давления жидкости в клеточной ячейке. С увеличением управляющего давления на клапанах микронасоса растёт амплитуда пиков давления в клеточных ячейках и скорость жидкости в микроканале. Средний по времени цикла расход жидкости в канале линейно зависит от частоты переключения клапанов. Однако частота работы насоса не влияет на пиковые значения расхода вследствие переключения отдельно взятого клапана.

Полученные теоретические выкладки были подтверждены в ходе экспериментальных исследований:

- были проведены гидродинамические исследования для определения влияния режимных параметров микронасоса и геометрических характеристик системы на давление и расход жидкости в микроканалах МБТС;

- получены профили скорости течения жидкости по ширине микроканала, которые позволили определить силы, действующие на клеточные модели в МБТС со стороны жидкости;

- поставлены и проанализированы биологические исследования по определению оптимального режима циркуляции жидкости в МБТС для клеточной культуры НераRG.

Для проведения экспериментальных исследований был спроектирован и изготовлен стенд, позволяющий определять расход жидкости в микроканале и давление в клеточных ячейках в замкнутом контуре. На Рисунке 5 приведена полученная зависимость давления в клеточных ячейках от времени цикла работы насоса. На графике отчётливо видны все такты переключения (T1...T5) клапанов насоса, продолжительность одного такта 0,5 с.

Для каждой точки кривой разности давлений в замкнутом контуре по данным, представленным на Рисунке 5, получены значения расхода через контур (Рисунок 6). Погрешность измерения расхода складывается из погрешности, вносимой приборами, которые используются в экспериментальном стенде (датчиками давления, секундомером, весами), и случайной погрешности измерений. Для данных измерений погрешность составила $\pm 5\%$. В Таблице 1 и Таблице 2 представлены средние за цикл и пиковые скорости в микроканале для разных режимов работы микронасоса.

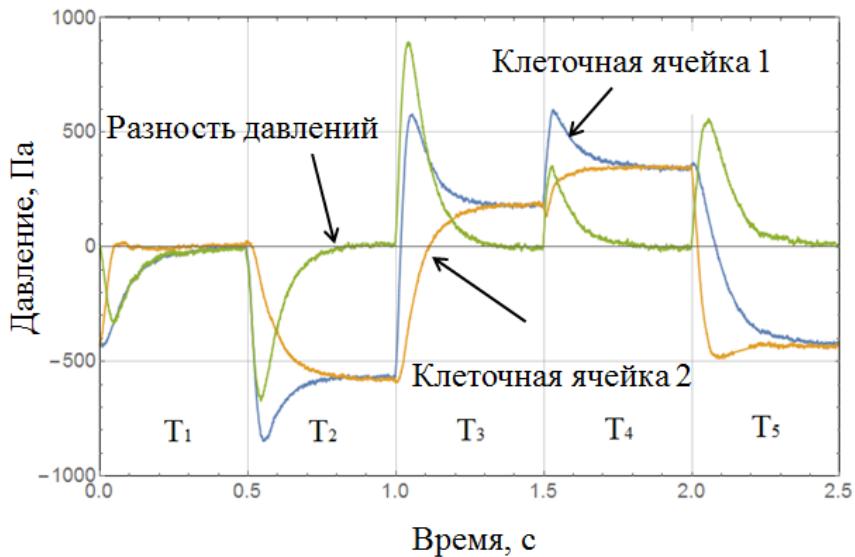


Рисунок 5. Изменение давления в клеточных ячейках за один цикл работы насоса

Таблица 1.

Средние скорости за цикл в микроканале

Частота, Гц	Средняя скорость в микроканале за цикл, мм/с		
	±10 кПа	±30 кПа	±50 кПа
0,1	0,17±0,005	0,42±0,022	0,6±0,03
1	0,69±0,028	0,87±0,043	6,1±0,32
2	1,23±0,074	8,6±0,5	12,3±0,62
3	1,58±0,079	12,1±0,6	17±1
5	2,6±0,15	20,2±1	26,1±1,04

Таблица 2.

Пиковые значения скорости для каждого такта работы насоса в зависимости от давления на насосе

Такт	Пиковое значение скорости, мм/с		
	±10 кПа	±30 кПа	±50 кПа
T ₁	-4±0,6	-33±2	-49±3
T ₂	-19,3±0,06	-51±3	-64±3,8
T ₃	42,4±1,2	110±6	158±9
T ₄	11,6±0,6	48,2±2,9	55,8±3,3
T ₅	25,2±0,6	100±6	146±8,6

Измерение и последующая обработка мгновенных полей скорости потоков жидкости в МБТС проводилась измерительной системой «ПОЛИС» на базе Института теплофизики СО РАН. Используемая система базируется на методе трассерной визуализации потока.

На Рисунке 7 показаны результаты расчётных и экспериментальных исследований изменения давления жидкости в клеточной ячейке в зависимости от цикла работы насоса. Наблюдается достаточно хорошее совпадение результатов. Однако, в начале пятого такта происходит резкий скачок давления.

Во избежание нежелательных эффектов предлагается увеличить цикл работы насоса до шести тактов так, чтобы каждому такту соответствовало переключение положения одного клапана. Результаты определения эпюры скорости по сечению микроканала представлены на Рисунке 8.

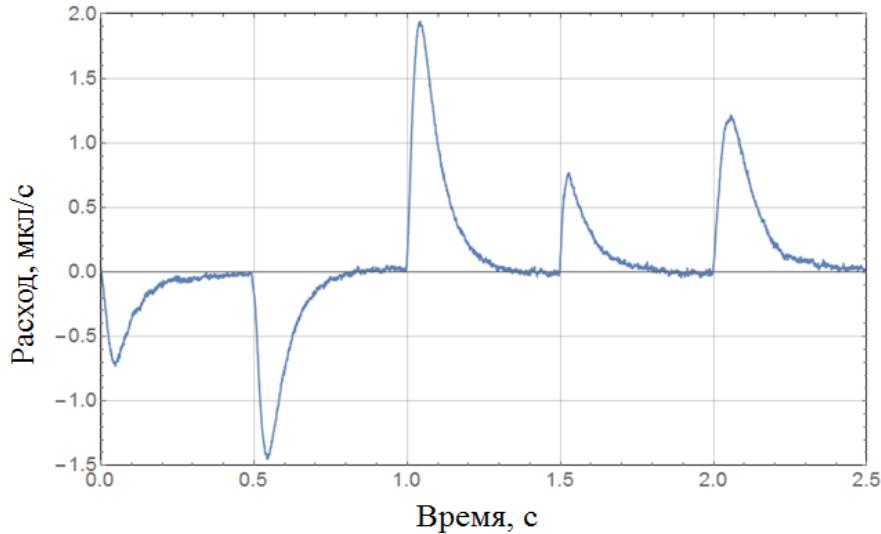


Рисунок 6. Изменение расхода в микроконтуре за цикл работы насоса

Из полученных характеристик потока жидкости определялись значения сил, действующих на биологические объекты в канале на примере сферида клеток НераRG (Таблица 3).

Таблица 3.

Механические воздействия потока жидкости на сфероид в ячейке для разных режимов работы насоса

Давление на насосе, кПа	Перепад давлений на сфериоде, Па	Скорость фильтрации сквозь сфероид, мкм/с	Касательное напряжение, Па	Минимальное за цикл давление в ячейке, Па	Максимальное за цикл давление в ячейке, Па
±10	0,38	1,33	0,09	-880	608
±30	0,9	3,1	0,2	-1400	2370

Во второй главе также приводится описание эксперимента по определению режима микроциркуляции в МБТС, не превышающего физиологически допустимых значений механических воздействий на клетки НераRG в составе сфероидов и, который поддерживал бы экспрессию функциональных генов печени.

Оценка влияния различных режимов микроциркуляции на функциональное состояние клеток НераRG в составе сфероидов, культивируемых в МБТС, проводилась по уровню экспрессии основных функциональных генов печени. Режим работы насоса ±10 кПа, по всем параметрам в наибольшей степени приближающий условия культивирования в МБТС к физиологическим, поддерживает также высокий уровень экспрессии основного цитохрома печени 3A4, цитохромов 2C9 и 2C19, а также

функционального маркера печени – альбумина, в клетках HepaRG в составе сфероидов.

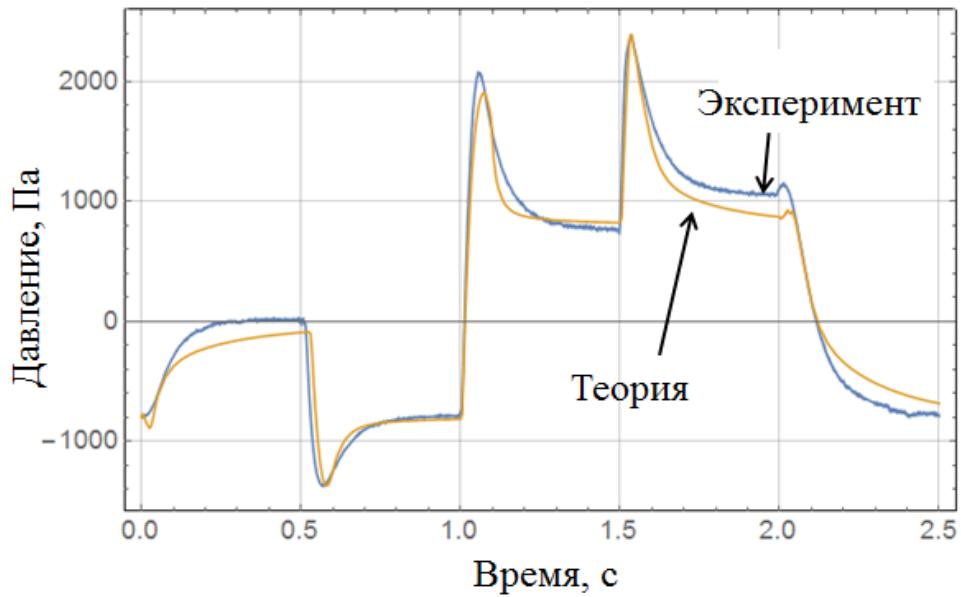


Рисунок 7. Сравнение избыточного давления в первой клеточной ячейке, полученного в результате расчёта и эксперимента. Режим при давлении на насосе ± 30 кПа и частоте переключения клапанов 2 Гц

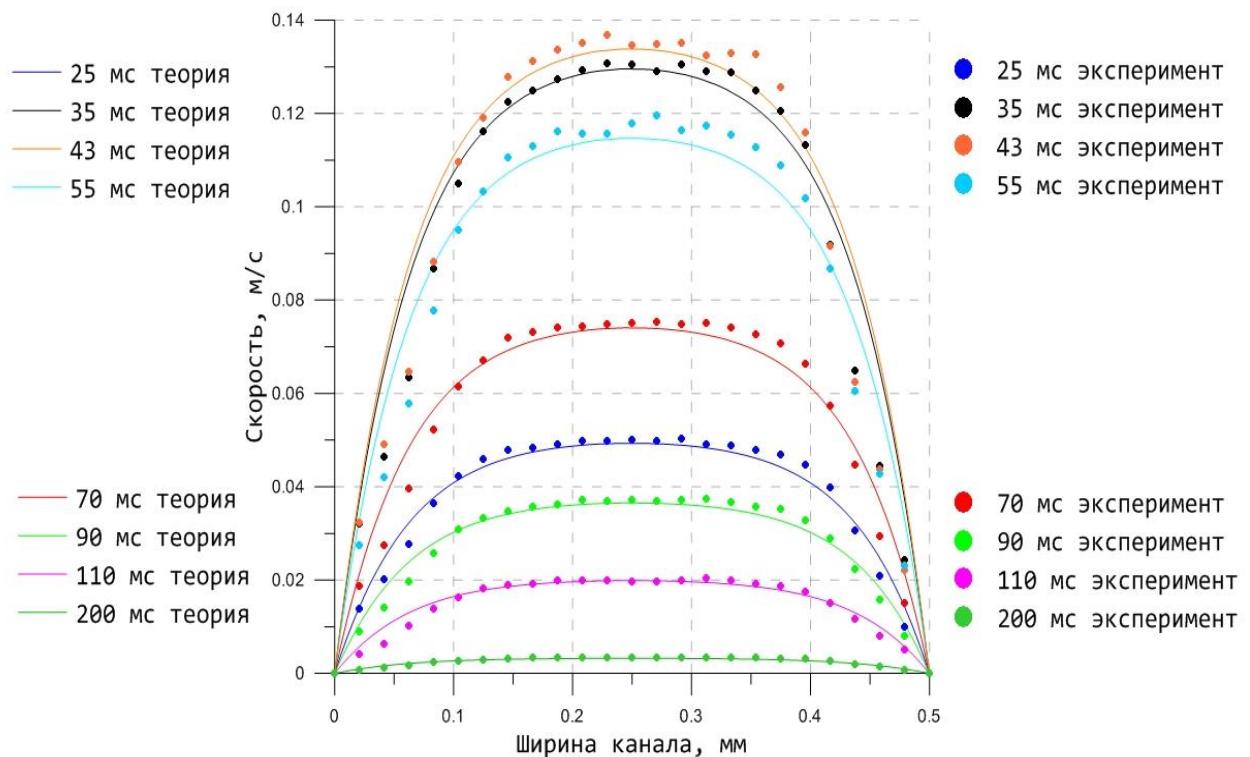


Рисунок 8. Сравнение профилей скорости по сечению микроканала в разные моменты времени, полученные теоретически и экспериментально

В ходе экспериментов были замечены некоторые недостатки выбранной МБТС. В частности на одно устройство приходится всего два замкнутых контура микроканалов. В целях снижения риска контаминации было решено уменьшить количество клеточных ячеек до одной, что позволило увеличить число замкнутых контуров на одном устройстве. Решение добавить в микроканал демпфирующий элемент себя оправдало и перенесено на новое устройство.

В третьей главе разработанный метод проектирования новых микрофлюидных устройств был использован на практике при создании МБТС для проведения токсикологических исследований и оценки гепатотоксичности новых лекарственных веществ (Рисунок 9).



Рисунок 9. Готовая к работе микрофлюидная биотехническая система

МБТС состоит из четырёх независимых контуров с одной клеточной ячейкой (поз. 4 Рисунок 10). Такое количество контуров обеспечивает проведение стандартизованных однотипных одномоментных независимых исследований, достаточных для получения статистически достоверных результатов. В каждом контуре интегрирован в конструкцию микронасос поз. 3. Близ насоса располагается демпфирующий элемент поз. 1. В конструкции предусмотрено технологическое отверстие поз. 2, необходимое для заполнения контура.

Микронасос ранее работал по пяти последовательным тактам переключения (Рисунок 2). Во время такта 1 боковые клапаны срабатывали одновременно. Этот такт создавал неконтролируемые возмущения давления жидкости в канале, так как невозможно достичь одновременного переключения двух клапанов. Таким образом, один из них закрывался чуть раньше другого, что создавало противоток внутри насоса. Для того чтобы это избежать, был добавлен дополнительный такт.

Полученная в результате расчётов геометрия микроканалов нового устройства была проверена экспериментально на соответствие требованиям, предъявляемым к потоку жидкости в замкнутых микроканалах для культивирования сфероидов НераRG.

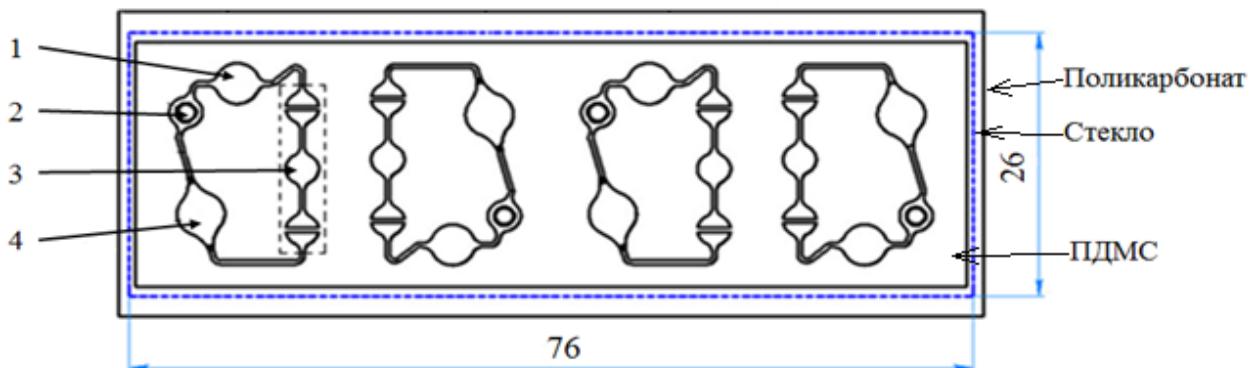


Рисунок 10. Структура микроканалов МБТС

В четвертой главе представлены результаты медико-биологических исследований, с целью определения функционального состояния клеточной модели печени, культивируемой в разработанной МБТС.

Для успешного проведения испытаний лекарственных препаратов с целью оценки их гепатотоксичности и биотрансформации в системе *in vitro* устройство должно обеспечивать такие условия культивирования клеточных моделей печени человека, при которых жизнеспособность клеток после 72 часов инкубации составляет не менее 80 % от исходной, при этом уровень экспрессии функциональных генов, в том числе изоформ цитохрома P450, находится или превышает исходный уровень.

Для того чтобы оценить функциональное состояние клеточной модели печени человека в условиях культивирования, проводились сравнительные исследования экспрессии генов и жизнеспособности клеток после культивирования в микрофлюидном устройстве и в планшетах (статический режим). В исследовании использовались десять микрофлюидных устройств. В клеточные ячейки микрофлюидного устройства и в лунки 96-луночного планшета вносили по 30 образцов клеточной модели печени в бессывороточной питательной среде. Клетки культивировали в течение 72 часов при режиме работы насоса ± 10 кПа, 5 Гц. После этого проводился отбор питательной среды для проведения анализа уровня экспрессии генов методом RT-PCR. Экспрессия генов функции печени (Alb, CYP3A4, CYP2C19 и CYP2C9) при культивировании в исследуемом устройстве, превосходит контрольные результаты не менее чем в 1,2 раза. Сконструированную МБТС можно использовать для проведения исследований по оценке процессов биотрансформации новых лекарственных веществ *in vitro*.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработана и экспериментально проверена математическая модель течения жидкости в МБТС с учётом гибкости стенок канала.
2. Определены зависимости давления и расхода жидкости в МБТС от режимных параметров интегрированного мембранных микронасоса.

3. Разработан экспериментальный стенд, позволяющий определять расход и давление в микрофлюидных устройствах разных типов.
4. Разработана МБТС, позволяющая проводить четыре однотипных одномоментных независимых медико-биологических исследований *in vitro*, исходя из требований, предъявляемых трёхмерной моделью печени – сфераидами НераRG.
5. Предложено использовать шеститактный алгоритм работы мембранныго микронасоса.
6. Основываясь на теоретически полученных значениях механических воздействий потока на клеточные модели, культивируемые в МБТС, и на результатах медико-биологических исследований, были определены оптимальные значения режима работы МБТС, при которых клетки НераRG демонстрируют жизнеспособность и высокий уровень экспрессии функциональных генов.
7. Разработан метод изготовления МБТС, удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к системам для исследования биотрансформации лекарственных веществ.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Разработка метода определения расхода питательной жидкости в замкнутом микроканале биореактора на орбитальной станции / Семёнова О.В. (Киндеева О.В.) [и др.] // Биотехносфера. 2014. № 4. С. 49-54. (0,31 п.л./0,23 п.л.)
2. Определение параметров пульсирующего течения жидкости в замкнутом микроканале биореактора на орбитальной станции / Семёнова О.В. (Киндеева О.В.) [и др.] // Труды МАИ. 2015. № 81. С. 1-19. (1,19 п.л./0,89 п.л.)
3. Семёнова О.В. (Киндеева О.В.), Петров В.А., Хаустов А.И. Метод определения скорости пульсирующего течения питательной жидкости в замкнутом микроканале биореактора на орбитальной станции // 13-я Международная конференция «Авиация и космонавтика – 2014». Тез. докл. Межд. конф. Москва. 2014. С. 183-184. (0,125 п.л./0,06 п.л.)
4. Герасименко Т.Н., Петров В.А., Семёнова О.В. (Киндеева О.В.) Математическое моделирование работы микронасоса для нагнетания жидкости в микрофлюидных системах // XLII Международная молодёжная научная конференция «Гагаринские чтения – 2016». Тез. докл. Межд. конф. Москва. 2016. Т. 2. С. 96. (0,06 п.л./0,03 п.л.)
5. Герасименко Т.Н., Петров В.А., Семёнова О.В. (Киндеева О.В.) Математическая модель течения пульсирующего потока жидкости в микроканале с гибкими стенками и демпфирующим элементом // XLII Международная молодёжная научная конференция «Гагаринские чтения – 2016» Тез. докл. Межд. конф. Москва. 2016. Т. 3, С. 606. (0,06 п.л./0,04 п.л.)

6. Анализ влияния режимов циркуляции на функциональное состояние сфероидов НераRG, культивируемых в микробиореакторе / Семёнова О.В. (Киндеева О.В.) [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 161. № 3., С. 405-410. (0,31 п.л./0,23 п.л.)
7. Киндеева О.В. Математическое моделирование микроканала генерирующего физиологически близкое к реальному течение питательной жидкости в микробиореакторе крови в условиях космического полёта // 15-я Международная конференция «Авиация и космонавтика – 2016» Тез. докл. Межд. конф. Москва. 2016. С.111-112. (0,125 п.л.)
8. Киндеева О.В., Петров В.А., Хаустов А.И. Моделирование физиологически подобного течения жидкости питательной среды в микрофлюидном устройстве // Международный научный семинар с элементами научной школы для молодых ученых на базе Отдела трансляционной онкологии МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России - 2016. Тез. докл. Москва. 2016. С. 7-8. (0,125 п.л./0,06 п.л.)
9. Определение закона изменения управляющего давления над клапанами микронасоса с пневматическим приводом / Киндеева О.В. [и др.] // Инженерный журнал: наука и инновации. 2017. № 7 (67). С. 12. (0,75 п.л./0,19 п.л.)
- 10.Микронасосы для микрофлюидных устройств: особенности выбора материалов и технология изготовления / Киндеева О.В. [и др.] // Машиностроение и инженерное образование. 2017. № 2 (51). С. 44-50. (0,375 п.л./0,19 п.л.)
11. Modelling and characterization of a pneumatically actuated peristaltic micropump / Kindeeva O.V. [et. al.] // Appl. Math. Model. 2017. Vol. 52. P. 590–602 (0,75 п.л./ 0,19 п.л.)
- 12.Свидетельство №2017617885. Программа для определения расходных характеристик насосов с пневматическим приводом: свидетельство о государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ / Герасименко Т.Н., Петров В.А., Киндеева О.В., Хаустов А.И. - №2017614707/69; заявл. 18.05.2017; зарег. 14.07.2017.
- 13.Киндеева О.В., Хаустов А.И. Метод определения физических параметров жидкости в элементах микрофлюидной биотехнической системы // Научная конференция с элементами научной школы для молодых ученых «Современные подходы к клеточным исследованиям *in vitro* в медицине» МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. Тез. докл. Москва. 2017. С. 19. (0,06 п.л./0,05 п.л.)

Подана заявка о выдаче патента на изобретение. Демпфирующий элемент микрофлюидного чипа и микрофлюидный чип / Киндеева О.В. [и др.] - №2016152523; заявл. 30.12.2016.