

УДК 53.084

МИЛЛИФЛЮИДНАЯ КЮВЕТА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ОТ ОДИНОЧНЫХ ООЦИТОВ, СФОРМИРОВАННАЯ МЕТОДОМ ФОТОПОЛИМЕРНОЙ СТЕРЕОЛИТОГРАФИИ

© К. А. Окотруб¹, Ю. В. Зайцева¹, С. В. Адищев¹,
Т. А. Рахманова^{1,2}, С. Я. Амстиславский^{1,2}

¹Институт автоматики и электрометрии СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1

²Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10
E-mail: okotrub@iae.nsk.su

Предложено применение фотополимерной стереолитографии для создания миллифлюидных устройств для проведения спектроскопических исследований. Работоспособность подхода была продемонстрирована на примере создания миллифлюидной кюветы для исследования одиночных ооцитов мышцы методом комбинационного рассеяния света (КРС) в условиях меняющегося состава окружающего раствора. Показано, что при использовании конструкции кювет типа «сэндвич» возможно проведение измерений КРС от образцов внутри кюветы, несмотря на интенсивный сигнал от материала, из которого кювета изготовлена.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние света, биологическая клетка, микрофлюидная кювета, фотополимерная стереолитография.

DOI: 10.15372/AUT20230604

EDN: JNPSTI

Введение. Исследование транспорта веществ через клеточную мембрану является распространённой задачей в биофизике. В частности, исследуется транспорт веществ, связанных с клеточным метаболизмом, доставка лекарственных соединений. Транспорт через мембрану может осуществляться как при процессе эндоцитоза (захвата веществ путём образования везикул) [1], так и пассивной диффузии [2] или активным транспортом с участием мембранных белков [3]. Эксперименты проводятся в условиях градиента концентрации. Вместо клеток могут использоваться модельные мембраны, формируемые из синтетических фосфолипидов или липидов, экстрагированных из мембран биологических клеток. В модельных системах можно сформировать бислой, разделяющий два сообщающихся сосуда, либо синтезировать однослойные гигантские везикулы, моделирующие клеточные мембраны. Последние также могут свободно плавать в водном растворе или крепиться к субстрату, что удобнее для отслеживания одиночных везикул. Для изучения транспорта веществ в этих системах необходимо проведение времяразрешённых экспериментов с отслеживанием кинетики изменения градиента концентраций.

Одной из актуальных задач, связанных с проникновением веществ в клетку, является транспорт криопротекторов, которые используются для подавления кристаллизации льда внутри клеток [4]. При высоких концентрациях криопротекторы токсичны. Например, в протоколах быстрой криоконсервации ооцитов и ранних эмбрионов млекопитающих клетки перед охлаждением выдерживаются в высококонцентрированных криопротекторных растворах, в которых их пребывание не должно превышать 30 с [5]. Поскольку на практике разница между минимальной необходимой и предельной допустимой концентрациями криопротекторов оказывается невелика, то исследованию проникновения криопротекторов в клетки в криобиологии уделяют большое внимание. Для отслеживания насыщения

клеток криопротекторами изучается их отклик на осмотическое давление, вызываемое добавлением криопротекторов. Разработаны модели, связывающие осмотический отклик с проникновением криопротекторов в ооциты, основывающиеся на описании осмотических потоков криопротектора внутрь и воды из клетки [6, 7]. Однако непосредственного исследования концентраций криопротекторов в ооцитах не проводилось.

В случае биологических клеток и моделирующих их везикул часто применяются кюветы — чипы с микроканалами, позволяющие изменять состав окружающего раствора непосредственно под микроскопом. Эти системы имеют, как правило, объём, не превышающий по порядку величины десятка микролитров, что позволяет быстро менять состав растворов и работать с малым количеством вещества. Последнее становится важным в условиях, когда используются дорогостоящие растворы. Микрофлюидные устройства применяются для сортировки клеток [8], цитометрии [9], изучения упругих свойств [10]. В случае ооцитов микрофлюидные чипы используются для сортировки качества клеток по плотности [11], для насыщения криопротекторами и исследования осмотического отклика ооцитов [12–14].

Поскольку исследование транспорта криопротекторов в ооциты через изучение осмотического отклика является косвенным методом, интерес представляет возможность прямого изучения локальных концентраций криопротекторов внутри ооцитов. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) является перспективной методикой для данной задачи, так как этот подход не разрушает образец, бесконтактен. Однако применение КРС с микрофлюидными устройствами является затруднительным, поскольку микрофлюидные чипы, как правило, изготавливаются из полидиметилсилоксана (ПДМС), обладающего интенсивным сигналом в спектрах КРС [15, 16], а также примесным флуоресцентным фоном. В результате измерения проводятся на фоне вклада ПДМС, что снижает их точность. Кроме того, создание чипов из ПДМС предполагает отливку изделия с использованием микроструктурированных форм, которые, как правило, формируются микролитрографическими методами (*soft-lithography*). Это делает изготовление таких чипов достаточно сложным и дорогостоящим.

В настоящее время активно развиваются методы трёхмерной печати на основе фотополлимерной стереолитографии. Заявленное XY-разрешение коммерчески доступных принтеров достигает ~ 20 мкм, что, в принципе, оказывается достаточным для целого ряда задач. Экспериментальные исследовательские прототипы показывают разрешение на уровне долей микрона [17]. С одной стороны, фотополлимер также обладает сильным КРС и фотолюминесценцией, даже более интенсивными, чем ПДМС, кроме того, он может оказывать цитотоксические эффекты, что ограничивает продолжительность экспериментов [18, 19]. С другой стороны, создание чипов с помощью стереолитографии намного дешевле и быстрее, при этом сами чипы могут изготавливаться сразу со встроенными соединениями для трубок и прочей оснасткой. Стереолитография даёт возможность относительно просто создавать кюветы типа «сэндвич», где стёкла наклеиваются с двух сторон над и под образцом, что теоретически позволяет полностью избежать вклада от материала самой кюветы не только в КРС, но и ИК-спектроскопии.

Цель работы заключается в проверке возможностей применения фотополлимерной стереолитографии в разработке миллифлюидных чипов для спектроскопических исследований. Описывается процесс изготовления миллифлюидного устройства методом фотополлимерной стереолитографии и демонстрируется возможность его использования в экспериментах по измерению спектров КРС. В работе представлена миллифлюидная кювета, позволяющая измерять спектры КРС от одиночных клеток и совместимая с криостатом THMS350V (Linkam).

Эксперимент.

Конструкция и изготовление кюветы. Чип был напечатан на фотополлимерном 3D-принтере Photon Mono X 6K (Anycubic), в котором для фотополлимеризации использу-

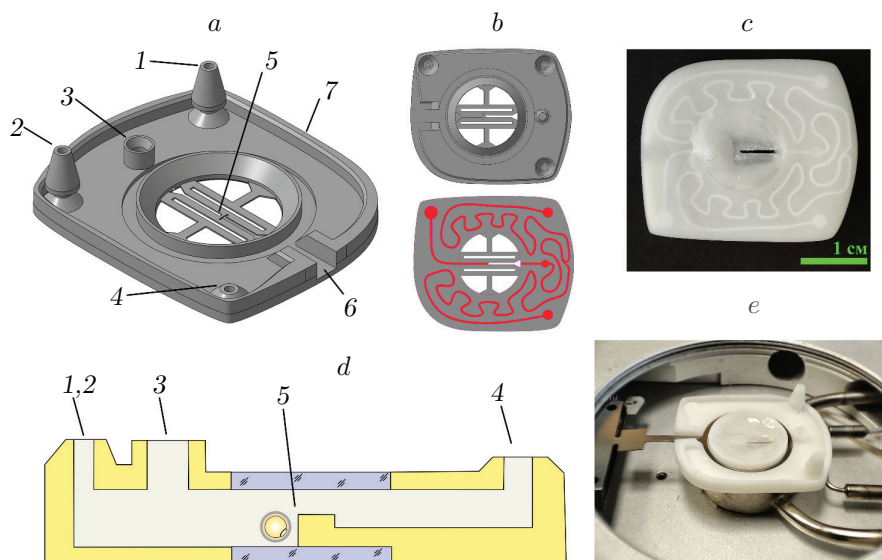


Рис. 1. Схема микрофлюидного чипа: *a* — изометрическое изображение трёхмерной модели микрофлюидной кюветы: 1, 2 — каналы, по которым поступают разные растворы, 3 — выход для закладывания образцов (ооцитов), 4 — излив для вывода замещающего раствора, 5 — канал для измерений с препятствием, блокирующим дальнейшее продвижение ооцитов к изливу, 6 — гнездо для стандартного держателя криостата Linkam, 7 — бортики, препятствующие проливу жидкости из излива; *b* — вид модели кюветы сверху и снизу, линиями выделены микрофлюидные каналы внутри кюветы; *c* — фотография готового устройства (вид снизу); *d* — схематический вид кюветы в разрезе (растворы поступают в кювету по каналам 1 и 2, через канал 3 закладывается ооцит, который потоком сдвигается в центральную область кюветы, задерживаясь на выступе 5, замещающий раствор выходит из кюветы через излив 4); *e* — фотография кюветы, установленной в оптический криостат Linkam с использованием стандартного держателя

ется диодное излучение 405 нм, для формирования слоя это излучение блокируется маской, формируемой жидкокристаллической матрицей с размером пиксела 34×34 мкм. Ключевые параметры печати: номинальная толщина слоя 50 мкм, фактическая глубина проникновения излучения в фотополимерную смолу ~ 150 мкм (глубина полимеризации), стандартное время экспозиции слоя 3 с, в участке печати микроканалов — 2 с. Между печатью слоёв модель поднималась на 8 мм со скоростью 2 мм/с. Модели печатались из смолы Plant-based UV Resin White (Anycubic). Известно, что свойства фотополимерных смол могут заметно меняться в зависимости от добавок, в том числе красителей. Было протестировано четыре смолы данной марки, из которых подходящими упругими свойствами обладали только модели, изготовленные из смол белого и серого цветов. Изделия из прозрачной и чёрной смол оказались слишком хрупкими и неподходящими для создания прочных монослоёв.

На рис. 1, *a*—*e* показаны 3D-модель и фотографии готовой кюветы. После печати, отмывки модели и удаления поддержек закрытые каналы изделия прокачиваются изопропиловым спиртом для очистки неполимеризованной смолы. После этого заготовка дополнительно равномерно облучается излучением 405 нм на протяжении 2 мин. В расчётной модели сечение каналов составляет 400 мкм в ширину и 400 мкм в высоту, однако с учётом глубины проникновения излучения фактическая высота каналов оценивается ~ 300 мкм.

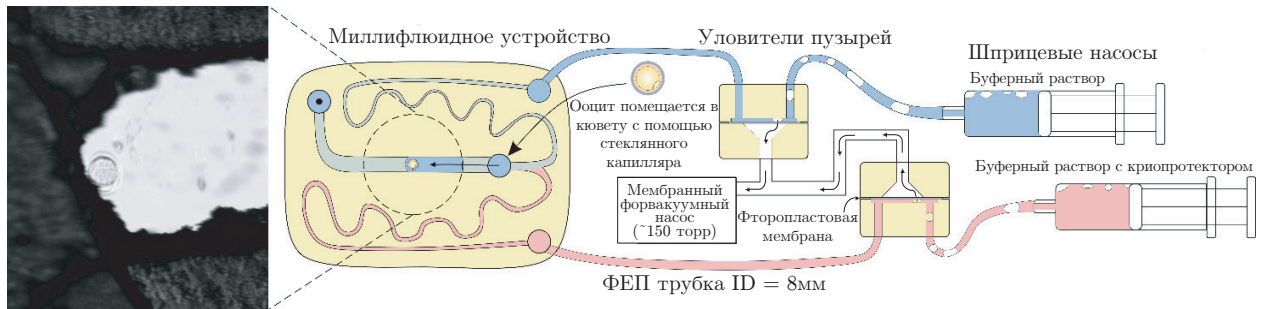


Рис. 2. Полная схема микрофлюидной системы. Слева показана фотография ооцита в кювете

Дальнейшее уменьшение высоты приводит к увеличению сопротивления в каналах и их закупориванию.

Также важно отметить, поскольку кювета рассчитана на использование при различных температурах, то при смене раствора необходимо сохранять температуру образца. Для увеличения объёма растворов и скорости теплообмена в кювете увеличена длина каналов, через которые поступают растворы. В результате объём каждого канала соответствует 8–10 мкл (1, 2). Это соответствует общему объёму буферного канала и канала, в котором находится ооцит во время эксперимента. Для того чтобы сохранять перепад высот между изливом (4) и поступающей жидкостью, в качестве ёмкости для вытекающей жидкости используется верхняя часть самой кюветы, для чего в модели кюветы предусмотрены бортики (7). Данный подход также упрощает оперирование с кюветой внутри криостата, минимизируя количество внешних соединений.

Следующим этапом после отмытки напечатанного изделия было вклеивание покровных стёкол (толщина 170 мкм) сверху и снизу кюветы. Для вклеивания использовалась та же смола, что и при печати кюветы, которая сразу после нанесения облучалась полимеризующим излучением. Поскольку в процессе печати дно кюветы образовывалось всего одним слоем фотополимера (во избежание полимеризации смолы внутри каналов паразитной засветкой), снизу вручную наносился дополнительный слой смолы толщиной $\sim 0,5$ мм, защищающий каналы чипа от царапин или механических воздействий. В конце изделие заполняется водой и облучается УФ-излучением на протяжении часа для полной стабилизации материала.

Эксперимент с миллифлюидной кюветой. Поскольку общий объём кюветы не превышает 30 мкл и сечение каналов $\sim 0,1$ мм², то для работы с ней требуется система, обеспечивающая контроль над потоками в кювете. На рис. 2 показана схема, используемая в эксперименте. Подача растворов обеспечивалась шприцевыми насосами, поддерживающими расход от 0,25 мкл/мин при использовании шприца объёмом 1 мл (инсулиновый шприц). В работе применялись два раствора: фосфатный буфер с добавлением поливинилпирролидона и такой же раствор 10 %-ного дейтерированного диметилсульфоксида (ДМСО). Дейтерированное соединение было использовано во избежание перекрытия спектра ДМСО со спектром от клеточной органики [20, 21].

В эксперименте необходимо обеспечить отсутствие воздушных пузырей в подаваемом растворе, в противном случае пузыри проталкивают вперёд клетки. Для этого в микрофлюидных системах применяются различные конструкции уловителей пузырей. В данной работе были использованы самодельные уловители, напечатанные из того же фотополимера, что и кювета. Принцип действия таких уловителей заключается в прокачивании водного раствора в контакте с фторопластовой мембраной с размером пор 220 нм. В отличие от воздуха вода плохо проникает в мембрану и не заходит в поры. Для повышения

эффективности ловушки подключены к мембранному насосу для образования перепада давления на мембране.

В ходе эксперимента сначала система наполнялась водными растворами и обследовалась на наличие пропущенных воздушных пузырей. Затем по спектрам КРС, измеряемым в режиме реального времени, проводилась проверка замещения растворов. После этого в кювету с помощью микрокапилляра складывался ооцит и включалась прокачка буферного раствора. Поскольку ооциты могут прилипать к поверхностям или цепляться за выступы, в буферный раствор добавлен поливинилпирролидон, снижающий эффект «залипания» ооцитов. Также кратковременно увеличивался расход буферного раствора вплоть до 30 мкл/мин, что соответствовало скорости потока 4 мм/с. После того как ооцит выносило в ту часть кюветы, в которой можно проводить непосредственное наблюдение, расход раствора снижался до 10 мкл/мин. В среднем около 30 % ооцитов удавалось увидеть и захватить в кювете. Остальные 70 % либо зацеплялись в тех участках кюветы, где их не видно, либо проплывали слишком быстро, чтобы их можно было заметить или остановить. Опытным путём обнаружено, что в разработанной кювете ооциты задерживаются при расходе жидкости не более 10 мкл/мин. При больших потоках ооциты захватываются течением и проходят над удерживающим барьером.

Измерения спектров КРС. Основные измерения КРС проводились на созданном в лаборатории микроскопном стенде, собранном из модифицированного микроскопа Orthoplan (Leitz) и решёточного монохроматора SP2500i (Princeton Instruments), оснащённого ПЗС-детектором Spec-10:2K (Princeton Instruments). Спектры КРС возбуждались твердотельным лазером Excelsior с длиной волны 532,1 нм (мощность лазерного пучка на образце ~ 15 мВт). Лазерное излучение фокусировалось на образец, и рассеянный свет собирался с помощью микроскопного объектива PL Fluotar L ($NA = 0,75$, Leica Microsystems).

Для проведения измерений с возбуждением 780 нм использовался другой самодельный стенд, собранный на базе микроскопа BX43 (Olympus) и решёточного монохроматора MS5204i (Sol Instruments) с ПЗС-детектором HS 101H (Sol Instruments). Для возбуждения КРС применялось излучение от твердотельного лазера Tiger (Sacher Lasertechnik). Мощность излучения на образце ~ 50 мВт. В экспериментах использовался тот же микроскопный объектив, что и в измерениях с возбуждением зелёным светом.

Спектры рассеянного света измерялись без селекции по поляризации. Спектральное разрешение во всех экспериментах было не хуже $2,5 \text{ см}^{-1}$. Спектры калибровались по линиям неоновой лампы с абсолютной точностью 1 см^{-1} .

Результаты и обсуждение. На рис. 3 показаны измеренные спектры от полимеризованного пластика, полученные на длинах волн возбуждающего излучения 532 и 780 нм. Видно, что при возбуждении зелёным излучением присутствует интенсивный фотолюминесцентный вклад на частотах, соответствующих валентным CD ($2000\text{--}2300 \text{ см}^{-1}$) и СН ($2800\text{--}3100 \text{ см}^{-1}$) колебаниям. В целом спектры содержат набор пиков, соответствующих органическим соединениям, в частности пики валентных ($2800\text{--}3100 \text{ см}^{-1}$) и деформационных CH_2/CH_3 колебаний в диапазоне между $1450\text{--}1500 \text{ см}^{-1}$, а также пики на частотах $1618\text{--}1662 \text{ см}^{-1}$, характерных для валентных $\text{C}=\text{C}$ колебаний. Интенсивный пик $\text{C}=\text{O}$ на 1752 см^{-1} указывает на акрилатную основу использованного фотополимера. Таким образом, спектр КРС фотополимера значительно перекрывается характерными спектрами от биологических объектов.

В спектре буферного раствора доминирует вклад воды, при добавлении дейтерированного ДМСО в спектрах возникают пики валентных CD-колебаний (рис. 4). Наиболее интенсивные линии соответствуют симметричным (2136 см^{-1}) и антисимметричным (2262 см^{-1}) CD_3 -модам. Для характеристики концентрации ДМСО использовалось соотношение интенсивностей пика 2136 см^{-1} (с усреднением по 7 наиболее интенсивным пикселям) и средняя интенсивность спектра воды (с усреднением в диапазоне $3160\text{--}3466 \text{ см}^{-1}$).

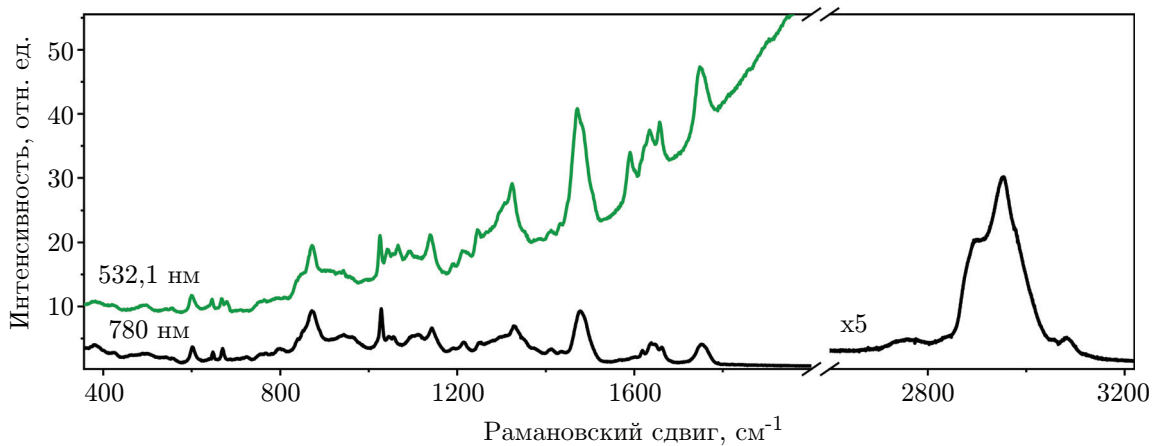


Рис. 3. Спектры от фотополимерного пластика, использованного в изготовлении микрофлюидной кюветы, измеренные с возбуждением на 532 и 780 нм

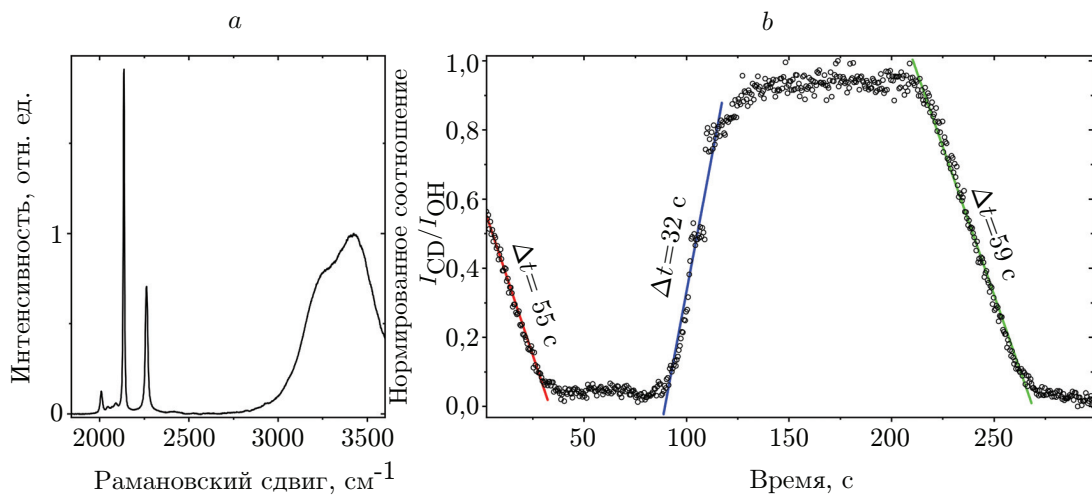


Рис. 4. Измерение концентрации ДМСО в микрофлюидном чипе: *a* — спектр раствора с дейтерированным ДМСО (10 %), *b* — динамика изменения концентрации ДМСО в микрофлюидной кювете по соотношению линий КРС от ДМСО и воды (на начальный момент времени в кювету подавался буферный раствор с расходом 10 мкл/мин, подающий раствор с ДМСО с расходом 20 мкл/мин, потом снова подавался буферный раствор (10 мкл/мин))

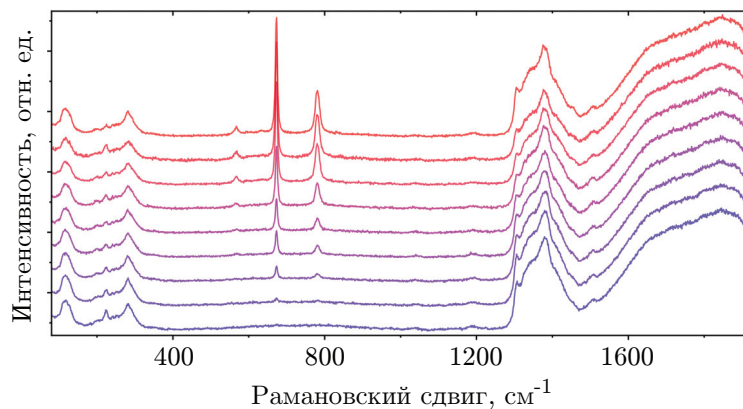


Рис. 5. Серия спектров КРС, измеренных от одиночного ооцита в условиях меняющейся концентрации криопротектора

Исследование динамики соотношения интенсивностей (I_{CD}/I_{OH}) показало, что при устойчивом расходе 10 мкл/мин смена раствора в кювете происходит за 1 мин. Относительно плавная смена концентрации, вероятнее всего, связана со смешиванием растворов в каналах и неоднородностью скоростей в потоке. Время смены раствора качественно соответствует скорости смены раствора на подобных микрофлюидных устройствах [12, 14]. При этом представленное решение позволяет измерять спектры КРС от одиночного ооцита без значительных сторонних вкладов (рис. 5). Соотношение между интенсивностью КРС в области валентных СН-колебаний и интенсивностью фотолюминесценции в среднем находится на уровне 1 : 1. В этот фотолюминесцентный вклад также входит естественная фотолюминесценция клетки. Паразитных линий КРС от пластика выявлено не было.

Таким образом, разработанное решение позволяет проводить эксперименты по измерению спектров КРС с возбуждением 532 нм с одиночными ооцитами и относительно небольшим количеством растворов (расходуемые при смене раствора объёмы соответствуют десяткам микролитров). Помимо возможности измерения КРС без паразитного вклада от пластика, сильной стороной предложенного подхода является широкая доступность. Для изготовления подобного изделия не требуется профессиональное литографическое оборудование — достаточно фотополимерного 3D-принтера любительского класса. Главным же недостатком является цитотоксичность материала. Это значительно ограничивает длительность экспериментов с биологическими клетками. В случае необходимости проведения продолжительных экспериментов изделия могут быть покрыты защитным слоем, например париленом [18]. С расширением областей применения стереолитографии растут и требования к разрабатываемым фотополимерным смолам, в том числе к их биосовместимости и низкой цитотоксичности. Поэтому можно ожидать появления в скором будущем материалов для стереолитографии с меньшим уровнем токсичности.

Заключение. В данной работе предложено и апробировано применение фотополимерной стереолитографии для создания микрофлюидных устройств для проведения спектроскопических исследований биологических объектов. Разработана совместимая с оптическим криостатом Linkam кювета типа «сэндвич» с двумя стеклянными окнами, позволяющая проводить измерения от одиночных ооцитов без какого-либо заметного вклада от фотополимерного пластика. Кювета даёт возможность менять состав раствора за минуту при расходе 10 мкл/мин и скорости потока $\sim 1,4$ мм/с. Предлагаемое решение является доступным подходом для проведения спектроскопических исследований с малыми объёмами жидкости и одиночными клетками.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10108).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sahay G., Alakhova D. Y., Kabanov A. V. Endocytosis of nanomedicines // *Journ. Controlled Release*. 2010. **145**, N 3. P. 182–195.
2. Tomkins M., Hughes A., Morris R. J. An update on passive transport in and out of plant cells // *Plant Physiol*. 2021. **187**, N 4. P. 1973–1984.
3. Skou J. C. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane // *Physiol. Rev*. 1965. **45**, N 3. P. 596–618.
4. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. 2003. **46**, N 3. P. 205–229.
5. Antonouli S., Di Nisio V., Messini C. et al. A comprehensive review and update on human fertility cryopreservation methods and tools // *Front. Vet. Sci*. 2023. **10**. P. 1151254.

6. **Kedem O., Katchalsky A.** Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes // *Biochim. et Biophys. Acta.* **1958**. 27. P. 229–246.
7. **Kleinhans F. W.** Membrane permeability modeling: Kedem–Katchalsky vs a two-parameter formalism // *Cryobiology.* 1998. **37**, N 4. P. 271–289.
8. **Khodamoradi M., Rafizadeh Tafti S., Mousavi Shaegh S. A. et al.** Recent microfluidic innovations for sperm sorting // *Chemosensors.* 2021. **9**, N 6. P. 126.
9. **Piyasena M. E., Graves S. W.** The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication // *Lab on a Chip.* 2014. **14**, N 6. P. 1044–1059.
10. **Trejo-Soto C., Lázaro G. R., Pagonabarraga I. et al.** Microfluidics approach to the mechanical properties of red blood cell membrane and their effect on blood rheology // *Membranes.* 2022. **12**, N 2. P. 217.
11. **Iwasaki W., Yamanaka K., Sugiyama D. et al.** Simple separation of good quality bovine oocytes using a microfluidic device // *Sci. Rep.* 2018. **8**, N 1. P. 14273.
12. **Lei Z., Xie D., Mbogba M. K. et al.** A microfluidic platform with cell-scale precise temperature control for simultaneous investigation of the osmotic responses of multiple oocytes // *Lab on a Chip.* 2019. **19**, N 11. P. 1929–1940.
13. **Guo X., Chen Z., Memon K., Chen X. et al.** An integrated microfluidic device for single cell trapping and osmotic behavior investigation of mouse oocytes // *Cryobiology.* 2020. **92**. P. 267–271.
14. **Chen Z., Memon K., Cao Y., Zhao G.** A microfluidic approach for synchronous and nondestructive study of the permeability of multiple oocytes // *Microsyst. & Nanoeng.* 2020. **6**, N 1. P. 55.
15. **Chrimes A. F., Khoshmanesh K., Stoddart P. R. et al.** Microfluidics and Raman microscopy: Current applications and future challenges // *Chem. Soc. Rev.* 2013. **42**, N 13. P. 5880–5906.
16. **Kim H. S., Waqued S. C., Nodurft D. T. et al.** Raman spectroscopy compatible PDMS droplet microfluidic culture and analysis platform towards on-chip lipidomics // *Analyst.* 2017. **142**, N 7. P. 1054–1060.
17. **Miwa M., Juodkazis S., Kawakami T. et al.** Femtosecond two-photon stereo-lithography // *Appl. Phys. A.* 2001. **73**, N 5. P. 561–566.
18. **Kreß S., Schaller-Ammann R., Feiel J. et al.** 3D printing of cell culture devices: Assessment and prevention of the cytotoxicity of photopolymers for stereolithography // *Materials.* 2020. **13**, N 13. P. 3011.
19. **Rogers H. B., Zhou L. T., Kusuhara A. et al.** Dental resins used in 3D printing technologies release ovo-toxic leachates // *Chemosphere.* 2021. **270**. 129003.
20. **Okotrub K. A., Okotrub S. V., Mokrousova V. I. et al.** Lipid phase transitions in cat oocytes supplemented with deuterated fatty acids // *Biophys. Journ.* 2021. **120**, N 24. P. 5619–5630.
21. **Okotrub K. A., Shamaeva D. V., Surovtsev N. V.** Raman spectra of deuterated hydrocarbons for labeling applications // *Journ. Raman Spectrosc.* 2022. **53**, N 2. P. 297–309.

Поступила в редакцию 13.07.2023

После доработки 04.09.2023

Принята к публикации 14.09.2023