

А.А. Рахимов^{1,2}, А.А. Валиев^{1,2}, К.В. Данилко¹, А.Т. Ахметов²
**МИГРАЦИОННАЯ ЯЧЕЙКА ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа

²Институт механики им. Р.Р. Мавлютова УФИЦ РАН, г. Уфа

Важнейшим свойством живых клеток является способность к движению или миграции. Изучение миграции в среде, имитирующей условия *in vivo* с помощью микрожидкостных 3D-устройств, позволит заложить основу для разработки миниатюрного персонализированного диагностического устройства для онкологических заболеваний.

Цель исследования – изучение активного перемещения клеток в разработанной и изготовленной двухуровневой миграционной ячейке.

Материал и методы. Для культивирования клеток линии рака предстательной железы PC-3 использовались стандартные современные методы. Микроканалы изготавливались методом мягкой фотолитографии. Измерение гидродинамических характеристик потока проводилось с помощью оптических методов микроскопии, основанных на анализе изображений показровых съемок изменяющегося потока.

Результаты. Для изучения активного перемещения клеток методом мягкой фотолитографии разработана и изготовлена двухуровневая миграционная ячейка. В нашей работе экспериментально показана способность клеток PC-3 совершать миграции в разработанной ячейке, вычислены скорости миграции клеток в миграционных каналах шириной 15 и 25 мкм. Средняя скорость миграции в канале шириной 15 мкм составила 0,45 мкм/мин., 25 мкм – 0,85 мкм/мин.

Выводы. Уникальность полученных результатов обусловлена использованием нового метода для изучения не только миграционных особенностей клеток, но и их деформации, влияющих на перемещения в тесненных условиях пространства. Разработка относительно простого 3D-устройства для наблюдения за миграцией клеток опухолей является важным шагом на пути улучшения диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: раковая клетка, микрогидродинамика, миграционная ячейка, микроканал, мягкая фотолитография.

A.A. Rakhimov, A.A. Valiev, K.V. Danilko, A.T. Akhmetov
MIGRATION CELL FOR EXPERIMENTAL STUDY OF TUMOR CELL ACTIVITY

The most important property of living cells is the ability to move or migrate. The study of migration in an environment simulating *in vivo* conditions using 3D microfluidic devices will lay the foundation for the development of a miniature personalized diagnostic device for oncological diseases.

The purpose of the research is to study the active movement of cells in a developed and manufactured two-level migration unit.

Material and methods. Standard modern methods for cultivating prostate cancer cells PC-3 were used. Microchannels were fabricated by soft photolithography. Measurement of the hydrodynamic characteristics of the flow was carried out using optical microscopy methods based on the analysis of frame-by-frame images of a changing flow.

Results. To study the active movement of cells by soft photolithography, a two-level migration unit was developed and manufactured. The ability of PC-3 cancer cells to migrate in the developed unit was experimentally demonstrated in the present article, the migration rates of PC-3 cells in migration channels 15 and 25 μm wide were calculated. The average migration rate in a channel 15 μm wide was 0.45 μm/min, 25 μm - 0.85 μm/min.

Conclusions. The uniqueness of the results obtained is due to the use of the developed new method allowing to study not only the migration characteristics of cells, but also their deformation which affects movement in space-constrained conditions. The development of a relatively simple 3D device for monitoring the migration of tumor cells will undoubtedly be an important step towards improving the diagnosis and treatment of cancer.

Key words: cancer cell, microhydrodynamics, migration unit, microchannel, soft photolithography.

Ключевым свойством живых клеток является миграция, которая обеспечивает нормальное развитие организма, иммунный ответ, но в то же время вызывает воспалительные процессы и метастазирование опухолей.

Актуальна оценка миграционного потенциала клеток опухоли и иммунной системы при разработке малоинвазивных высокоинформативных, недорогих и быстрых методов диагностики и прогнозирования онкозаболеваний. Например, применение моноцитов, при раке предстательной железы (РПЖ) различной агрессивности с моделированием микроокружения опухоли в 3D-условиях. В настоящее время различные микрожидкостные 3D-устройства рассматриваются в качестве удобного, экономичного и эффективного инструмента для создания микромоделей целого

органа и изучения механизмов межклеточного взаимодействия на уровне микроокружения опухоли и свойств единичных клеток [1-3]. Изучение способности к миграции клеток в среде, имитирующей условия *in vivo*, позволит заложить основу для разработки миниатюрного персонализированного диагностического устройства, потенциально применимого и для онкологических заболеваний и иных патологических состояний.

Целью нашего исследования было изучение активного перемещения клеток рака предстательной железы в разработанной и изготовленной двухуровневой миграционной ячейке.

Материал и методы

На первом этапе была разработана двухуровневая миграционная ячейка (рис. 1)

для изучения миграции клеток, ее прототипом была микрофлюидная ячейка, описанная в работе [4]. Она состояла из каналов, подводящих жидкость, двух камер («градиентной» и «накопительной») высотой 50 мкм, которые сообщались через «миграционные» каналы высотой 10 мкм и цилиндрические отверстия в полидиметилсилоксане (ПДМС) глубиной 5 мм и диаметром 3 мм, диаметр выходного отверстия равен 6 мм. К «градиентной» камере ячейки гидростатическими насосами подавались растворы хемоаттрактанта и питательная среда.

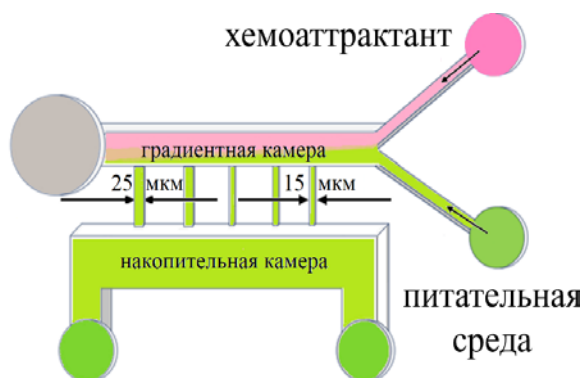


Рис. 1. Схематическое изображение миграционной ячейки

За счет диффузии происходит массообмен между двумя ламинарными потоками хемоаттрактанта и питательной среды, формируется градиент концентрации хемоаттрактанта, перпендикулярный направлению течения, стимулирующий движение клеток, расположенных в накопительной камере. Между камерами расположены миграционные микроканалы высотой 10 мкм, различной ширины от 10 до 50 мкм и длиной 200 мкм, через которые мигрируют клетки.

Двухуровневая миграционная камера изготавливалась с помощью 2-х масок. На одной маске находились «миграционные каналы» высотой 10 мкм и различной ширины, а на другой маске – подводящие каналы с градиентной и накопительной камерами высотой 50 мкм. Для изготовления маски был разработан векторный рисунок для распечатывания на принтере высокого разрешения. Рисунок маски миграционной камеры, используемый в прошлых экспериментах [5], был несколько изменен. Особенности данной модели по сравнению с ранее изготовленным устройством является снижение количества каналов, подводящих хемоаттрактант и питательную среду до 2-х шириной 50 мкм (вместо 3-х шириной 33 мкм) для уменьшения погрешностей в изготовлении каналов, влиянии пузырьков и возникновении эффекта динамического запирания [6]. Были добавлены плавные переходы

ды-расширения отверстий. Все отверстия (лунки) имеют плавное расширение, а место соединения двух подводящих каналов закруглено. В середине накопительной камеры было сделано расширение – емкость для задержки клеток. Для удобства совмещения масок были нанесены метки, хорошо видимые под микроскопом.

Миграционные камеры изготовлены методом мягкой фотолитографии аналогично работе [5]. В микрожидкостных устройствах стекло и ПДМС с репликой каналов прозрачные, что позволяет использовать микроскопические методы визуализации.

Для усиления адгезии клеток стенки каналов покрывались коллагеном, служащим внеклеточным матриксом.

Миграция клеток в ячейке изучалась на термостатирующем столике инвертированного микроскопа при температуре 37°C, при таких условиях подаваемая жидкость из входных и выходных емкостей испарялась в течение 3 часов. Попытка изготовления камер для ячейки даже с термопакетом из поликарбоната не увенчалась успехом, поскольку на верхней поверхности конденсировалась жидкость. Поэтому использовались наконечники-конусы от дозатора с объемом 0,3 мл, в один из которых заливали культуральную среду с хемоаттрактантом, а в другой – только среду, в выходное отверстие тоже закреплялся конус. Для уменьшения испарения конус покрывался пленкой parafilm, в которой проделывались микроскопические отверстия для выравнивания давления с атмосферным.

После заполнения емкостей «накопительной камеры» клетками они заливались питательным раствором, емкость с клетками герметизировалась пленкой parafilm, прижатой стеклянной пластиной. Поскольку между температурами жидкостей в конусах (25°C) и в микроканалах ячейки (37°C) присутствует довольно значительная разница, то при нагревании в микроканалах выделялись пузырьки газа. Для того чтобы избежать их выделения, входные жидкости дегазировались.

Методика подготовки миграционной ячейки к проведению эксперимента по миграции клеток была аналогичной представленной ранее в работе [5]. Использовали клеточную линию рака предстательной железы PC-3 и хемоаттрактанты: IL8 (интерлейкин 8; – interleukin 8) и HGF (фактор роста гепатоцитов; – hepatocyte growth factor). Предварительные эксперименты по миграции клеток линии PC-3 в присутствии цитокинов IL8 и HGF в камере Бойдена [5] показали, что более активная

миграция происходит в присутствии HGF в концентрации 20 нг/мл. Все каналы микрофлюидной миграционной системы до начала эксперимента промывали фосфатно-солевым буфером. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ – до достижения монослоя, затем с помощью 0,25% трипсина снимали с подложки и отмывали от остатков сыворотки фосфатно-солевым буфером. После этого разводили средой DMEM с 1 г/л глюкозы до получения суспензии в концентрации 2×10^6 клеток на 1 мл, 100 мкл суспензии клеток помещали в шприц объемом 1 мл и заполняли накопительный канал для клеток микрофлюидной миграционной системы. Клетки выдерживали в инкубаторе при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ в течение 2-х часов для оседания. Затем в верхнюю лунку для создания градиента концентрации химического агента

добавляли раствор HGF в среде DMEM (20 нг/мл).

Клетки в микрофлюидной миграционной системе наблюдали с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver D1 (Zeiss, Германия) с объективами A-Plan $\times 20$ и $\times 10$ с использованием метода фазового контраста. Микрофотосъемку осуществляли с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 (Zeiss, Германия) с программным обеспечением ZEN (Zeiss, Германия). Для описания характера движений клеток производилась покадровая съемка в течение 2-х-8-ми часов с интервалом 5 минут с объективами $\times 10$ или $\times 20$.

Результаты и обсуждение

Изучение движения клеток линии рака предстательной железы PC-3 в микроканалах миграционной ячейки продемонстрировало следующее: до начала эксперимента клетки расположены у входа в миграционные каналы. На рис.2 показано смещение одной из клеток PC-3 в зависимости от времени.

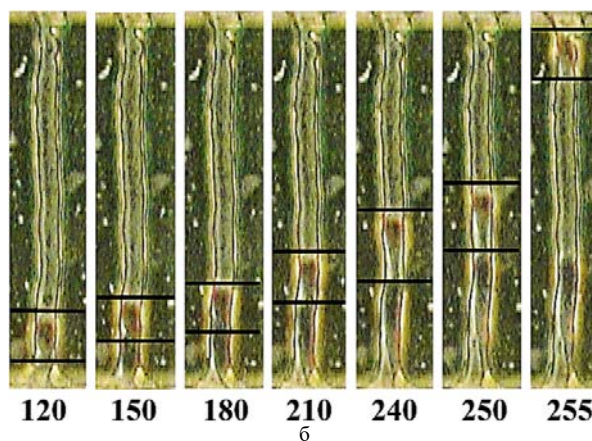
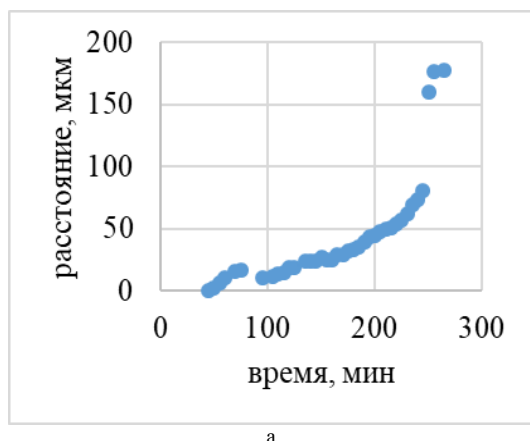


Рис. 2. Движение клетки PC-3 в канале 15 мкм: а – график зависимости расстояния от времени; б – фотоснимки перемещения вверх и вниз рассматриваемой клетки выделены черными линиями, под снимками указано время в минутах от начала записи эксперимента

На графике перемещения (рис. 2а) видно, что клетка движется с разными скоростями, причем она ускоряется ближе к выходу из миграционного канала. После попадания в узкий (15 мкм) канал клетка умеренно деформируется за счет расплывания, скорость на временном участке 120-180 минут (рис. 2б) составила 16 мкм/ч. Затем на участке 180-240 минут скорость клетки составила 30 мкм/ч. На последнем участке 250-255 минут скорость составила 950 мкм/ч. Средняя скорость на участке 120-255 минут составила около 70 мкм/ч. Разные клетки в каналах одной ширины движутся с неодинаковыми скоростями, причем также ускоряются ближе к выходу из миграционного канала, что, скорее всего, связано с большим количеством хемоаттрактанта на вы-

ходе. Средняя скорость в канале 15 мкм для 10 разных клеток составила около 0,45 мкм/мин.

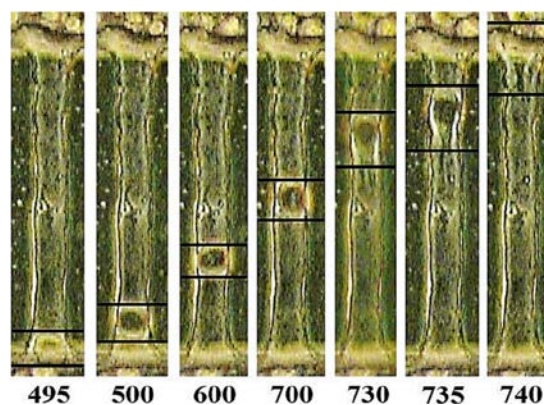


Рис. 3. Снимки перемещения клетки PC-3 в микроканале шириной 25 мкм, верх и низ рассматриваемой клетки выделены черными линиями, под снимками показано время в минутах от начала записи эксперимента

В более широком канале (25 мкм) форма клетки сначала была округлой, а к концу перемещения она принимает каплеобразную форму (рис. 3).

Попав в канал на участке 495-500 минут (рис. 3) скорость клетки составляет около 190 мкм/ч. На участке 500-700 минут скорость клетки меньше и становится – около 13 мкм/ч, на 730-й минуте клетка приобрела вытянутую форму и прошла участок 730-740 минут со скоростью 300 мкм/ч. Средняя скорость на участке 495-740 минут составила около 40 мкм/ч.

Таким образом, движение клетки также неравномерное и ускоряется ближе к выходу. Скорость зависит от концентрации, попадающего в микроканалы хемоаттрактанта. Средняя скорость в канале 25 мкм для 10 разных клеток составила около 0,85 мкм/мин.

Заключение

В работе использован микрогидродинамический метод изучения активной миграции клеток. Для изучения миграционного потенциала клеток разработана и изготовлена двухуровневая миграционная ячейка методом мягкой фотолитографии. По сравнению с ранее созданным нами устройством [5] данное устройство было улучшено за счет создания плавных переходов на стыках каналов и в переходных зонах для предотвращения эффекта динамического запыления, связанного со скоплением в сужении микропузырьков или

клеток. Для уменьшения влияния перепада давления при заполнении накопительной камеры клетками емкости камеры после заполнения клетками герметизировались пленкой parafilm, прижатой стеклянной пластиной. Для предотвращения попадания хемоаттрактанта в другие емкости и уменьшения влияния капиллярных сил во входные и выходное отверстие были вставлены наконечники-конусы, для уменьшения испарения конус покрывался пленкой parafilm, в которой проделывались микроскопические отверстия для выравнивания давления с атмосферным. Для проведения экспериментов все жидкости дегазировались, что позволило избавиться от выделения пузырьков при увеличении температуры, связанной с нагревом втекающей жидкости на термостолике. Для адгезии клеток внутренние стенки ячейки покрывались коллагеном.

Скорость миграции зависит от концентрации попадающего в микроканалы хемоаттрактанта. Она прямо пропорциональна ширине канала.

Разработка относительно простого 3D-устройства для наблюдения за миграцией клеток – важный шаг на пути улучшения диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00531, <https://rscf.ru/project/22-25-00531/>.

Сведения об авторах статьи:

Рахимов Артур Ашотович – к.ф.-м.н., ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, науч. сотр. лаборатории «Экспериментальная гидродинамика» Института механики им. Р.Р. Мавлютова УФИЦ РАН. Адрес: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71. E-mail: ragar83@mail.ru.

Валиев Азат Ахматович – науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, мл. науч. сотр. лаборатории «Экспериментальная гидродинамика» Института механики им. Р.Р. Мавлютова УФИЦ РАН. Адрес: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71. E-mail: azatphysic@mail.ru.

Данилко Ксения Владимировна – к.б.н., доцент, ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: kse-danilko@yandex.ru.

Ахметов Альфир Тимирязевич – к.ф.-м.н., вед. науч. сотр. лаборатории «Экспериментальная гидродинамика» Института механики им. Р.Р. Мавлютова УФИЦ РАН. Адрес: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71. E-mail: alfir@anrb.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coughlin, M. F. The Use of Microfluidic Platforms to Probe the Mechanism of Cancer Cell Extravasation / M. F. Coughlin, R. D. Kamm // Adv. Healthcare Mater. – 2020. – Vol. 9(8). – e1901410. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901410>
2. Yu, J. Reconfigurable open microfluidics for studying the spatiotemporal dynamics of paracrine signaling / J. Yu, E. Berthier, A. Craig [et al.] // Nat. Biomed. Eng. – 2019. – Vol. 3. – P. 830-841. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0421-4>
3. Urbanska, M. A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements / M. Urbanska, H.E. Mucoz, J. Shaw Bagnall [et al.] // Nat Methods. – 2020. – Vol. 17. – P. 587-593. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0818-8>
4. Tong, Z. Chemotaxis of Cell Populations through Confined Spaces at Single-Cell Resolution / Z. Tong, E. M. Balzer, M. R. Dallas, W. Hung, K. J. Stebe, K. Konstantopoulos // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7(1) – e29211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029211>
5. К вопросу о механизме клеточной миграции / А.А. Рахимов [и др.] // Многофазные системы. – 2019. – Т.14, №1. – С. 17-26. <https://doi.org/10.21662/mfs2019.1.003>
6. Эффект динамического запыления инвертно- эмульсионных растворов на основе эмульгатора-стабилизатора обратных эмульсий СЭТ-1 / А.Т. Ахметов [и др.] // Нефтегазовое дело. – 2013. – Т.11, №2. – С. 64-70.

REFERENCES

1. Coughlin M. F., Kamm R. D. 2020. The Use of Microfluidic Platforms to Probe the Mechanism of Cancer Cell Extravasation. Adv. Healthcare Mater 9 1901410. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901410> (in Engl.)
2. Yu J., Berthier E., Craig A. et al. 2019. Reconfigurable open microfluidics for studying the spatiotemporal dynamics of paracrine signaling. Nat. Biomed. Eng. 3. 830-841. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0421-4> (in Engl.)

3. Urbanska M., Mucoz H.E., Shaw Bagnall J. et al. 2020. A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements. *Nat Methods* 17 587-593. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0818-8> (in Engl.)
4. Tong Z., Balzer E. M., Dallas M. R., Hung W., Stebe K. J., Konstantopoulos K. 2012. Chemotaxis of Cell Populations through Confined Spaces at Single-Cell Resolution. *PLoS ONE* 7(1) e29211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029211> (in Engl.)
5. Rakhimov A. A., Akhmetov A. T., Valiev A. A., Danilko K. V., Sametov S. P., Khismatullin D. B. 2019. To the issue of the mechanism of cell migration. *Multiphase Systems* 14(1) 17-26. <https://doi.org/10.21662/mfs2019.1.003> 9 (in Russ.)
6. Akhmetov A. T., Sametov S. P., Rakhimov A. A., Latypova D. R., Khanova M. D., Dokichev V. A. 2013. Dynamic blocking phenomenon of water-in-oil emulsion solutions based on emulsifier-stabilizer for water-in-oil emulsions SET-1. *Petroleum engineering* 11(2) 64-70. (in Russ.)

УДК 617.735-007.281

© Коллектив авторов, 2022

А.С. Дзинтер^{1,2}, К.С. Мочалов¹, Т.И. Дибеев^{1,2}, Т.Р. Мухамедеев^{1,2}
**ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА
 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАЗВУКОВОГО
 И ПНЕВМАТИЧЕСКОГО ГИЛЬОТИННОГО МЕТОДОВ ФРАГМЕНТАЦИИ**

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

²ЗАО «Оптимедсервис», г. Уфа

Цель. Изучить и сравнить параметры хемилюминесценции аспирата стекловидного тела при микроинвазивной ультразвуковой витрэктомии 25G и пневматической гильотинной витрэктомии 25G.

Материал и методы. Исследование было выполнено методом хемилюминесценции в хемилюминометре «ХЛМ-003» (Уфимский государственный авиационный технический университет, Россия) с последующим анализом параметров хемилюминесценции – светосуммы (S) и максимальной амплитуды медленной вспышки (Imax) на интактном стекловидном теле и на аспирате стекловидного тела 16 глаз кроликов породы шиншилла, оперированных методами микроинвазивной ультразвуковой витрэктомии 25G (основная группа, n=8) и пневматической гильотинной витрэктомии 25G (контрольная группа, n=8).

Результаты. Добавление образцов аспирата в модельную систему увеличивало уровни светосуммы и максимальной светимости. Разница светосуммы с интактным стекловидным телом в основной группе составляла 16,7±6,2%, в контрольной группе – 14,2±9,3%. Выявленные в результате исследования тенденции к увеличению светосуммы и максимальной светимости были сопоставимы в обеих группах, p>0,05.

Выводы. Значимых различий параметров хемилюминесценции аспирата стекловидного тела при микроинвазивной ультразвуковой и пневматической гильотинной витрэктомии 25G не обнаружено.

Ключевые слова: хемилюминесценция, ультразвуковая витрэктомия, свободнорадикальное окисление.

A.S. Dzinter, K.S. Mochalov, T.I. Dibaev, T.R. Mukhamadeev
**PARAMETERS OF VITREOUS CHEMILUMINESCENCE UNDER THE INFLUENCE
 OF ULTRASONIC AND PNEUMATIC GUILLotine VITRECTOMY**

Purpose. To study and compare the chemiluminescence parameters of the vitreous body aspirate during microinvasive ultrasonic 25G vitrectomy and pneumatic guillotine 25G vitrectomy.

Material and methods. The study was performed by chemiluminescence in the chemiluminometer "KhLM-003" (Ufa State Aviation Technical University, Russia) with subsequent analysis of chemiluminescence parameters - light sum (S) and the maximum amplitude of the slow flash (Imax) on the intact vitreous body and on the vitreous aspirate of 16 Chinchilla rabbits eyes operated on by microinvasive ultrasonic 25G vitrectomy (main group, n=8) and pneumatic guillotine 25G vitrectomy (control group, n=8).

Results. The addition of aspirate samples to the model system increased the level of the light sum and the maximum luminosity. The difference in the light sum in case of the intact vitreous body in the main group was 16.7±6.2%, in the control group it was 14.2±9.3%. The tendencies towards an increase in the light sum and maximum luminosity revealed as a result of the study were comparable in the two groups, p>0.05.

Conclusion. There were no significant differences in parameters of vitreous aspirate chemiluminescence during microinvasive ultrasonic and pneumatic guillotine 25G vitrectomy.

Key words: chemiluminescence, ultrasonic vitrectomy, free radical oxidation.

На сегодняшний день высокоскоростная пневматическая витрэктомия является высокотехнологичным методом лечения большого спектра витреоретинальных заболеваний: патологии витреомакулярного интерфейса, регматогенных отслоек сетчатки и диабетической пролиферативной ретинопатии [1-3].

Важным стимулом для дальнейшего усовершенствования витрэктомии является поиск альтернативных способов разрушения стекловидного тела (СТ) для минимизации

травматического его воздействия на сетчатку. Первые клинические исследования в поиске немеханического способа удаления стекловидного тела из витреальной полости методом ультразвука были выполнены L.G. Girard, N. Leitgeb et al., Л.В. Коссовским и Г.Е. Столяренко в 1970-1980 гг. [4,5].

На данный момент существуют работы, посвященные безопасности использования высокочастотного ультразвука в полости стекловидного тела и вблизи сетчатки, про-