

УДК 616-092 + 576.7

DOI: 10.25557/GM.2018.4.9743

## Клеточные микрофлюидные технологии для биомоделирования патологических процессов

Мыльникова А.Н.<sup>1,2</sup>, Колесов Д.В.<sup>1</sup>, Московцев А.А.<sup>1,3</sup>, Соколовская А.А.<sup>1</sup>, Юркив В.А.<sup>4</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

<sup>3</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

<sup>4</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

Стремительный технический прогресс способствует появлению все новых подходов в клеточной биологии, одним из них является клеточная микрофлюидика. Применение технологий микрофлюидики открыло новые возможности по культивированию, прецизионному анализу и манипулированию как популяциями клеток, так и отдельными клетками. Основой новой технологии является микрофлюидный чип — миниатюрное устройство, содержащее систему микро- и наноканалов, полостей, мембран и других элементов. Возможность прецизионного управления пространственным расположением клеток и их микроокружением предоставляет уникальные и беспрецедентные возможности для биомоделирования *in vitro* функциональных элементов органов и тканей. В данном обзоре приведены примеры построения и применения таких трехмерных микрофлюидных клеточных моделей для анализа протекающих в них физиологических и патологических процессов. Особое внимание уделено влиянию клеточного микроокружения клетки на её функционирование.

**Ключевые слова:** микрофлюидика, биомоделирование, клеточные технологии.

**Для цитирования:** Мыльникова А.Н., Колесов Д.В., Московцев А.А., Соколовская А.А., Юркив В.А., Кубатиев А.А. Клеточные микрофлюидные технологии для биомоделирования патологических процессов. Патогенез. 2017; 15(4): 4–12

**Для корреспонденции:** Колесов Дмитрий Валерьевич, maedros@bk.ru

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ), проект 16-04-01807.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 18.09.2017

## Cellular microfluidic technologies for biomodeling of pathological processes

Mylnikova A.N.<sup>1,2</sup>, Kolesov D.V.<sup>1</sup>, Moskovtsev A.A.<sup>1,3</sup>, Sokolovskaya A.A.<sup>1</sup>, Yurkiv V.A.<sup>4</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya Ploshchad 9, Moscow, 125047, Russian Federation

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

<sup>4</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Novogireevskaya str. 3a, Moscow 111123, Russian Federation

Significant technological progress has brought new approaches to cell biology. Using microfluidic technologies has opened new opportunities for cultivation, analysis, and manipulation of both individual cells and their populations. The basis of the new technology is a microfluidic chip, a miniature device containing a system of micro- and nanochannels, cavities, membranes, and other elements. The precise control of spatial arrangement of cells and their microenvironment opens new prospects for *in vitro* biomodeling of functional elements of organs and tissues. This review shows examples for construction and application of such three-dimensional microfluidic cellular models for analysis of physiological and pathological processes. Particular attention is paid to the influence of cellular microenvironment on cell functioning.

**Key words:** microfluidics, biomodeling, cell technologies.

**For citation:** Mylnikova A.N., Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Sokolovskaya A.A., Yurkiv V.A., Kubatiev A.A. Cell microfluidics technologies for biomodeling of pathological processes. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 4–12 (in Russian)

**For correspondence:** Kolesov Dmitry, maedros@bk.ru

**Funding.** This study was supported by grant of the Russian Foundation for Basic Research, Project 16-04-01807.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 18.09.2017

## Введение

В последние десятилетия в науке и технике большую актуальность приобретают технологии, разрабатываемые с применением эффективной миниатюризации, т.е. уменьшением размеров аналитических и (или) синтетических устройств, сопровождаемым улучшением их рабочих характеристик. Одной из наиболее активно развивающихся в этом направлении областей знания является микрофлюидика — междисциплинарная наука, включающая в себя целый ряд направлений, таких, как гидродинамика, теплофизика, химическая кинетика, биохимия, инженерное дело, электроника. С понятием *микрофлюидика* обычно связывают технологию, позволяющую манипулировать маленькими объемами жидкости (мкл, нл, пл) в искусственно созданных микросистемах — микрофлюидных устройствах (МФУ). Микрофлюидика нашла множество практических приложений в различных отраслях хозяйственной деятельности: микрофлюидные устройства могут выступать в качестве охлаждающих систем в высокопроизводительных микросхемах, микрореакторов для смешивания реагентов; биочипов для экспресс-диагностики с возможностью определения одновременно нескольких веществ с использованием экстремально малых количеств исследуемого вещества и т.п.

Микрофлюидные технологии оказались чрезвычайно востребованными в биомедицине. Применение микрофлюидики дало начало ряду новых направлений исследований [1]. С точки зрения клеточной биологии микрофлюидика — это прежде всего возможность эффективно приближения исследований *in vitro* к реальным процессам, протекающим в организме, а, значит, возможность получать более точные данные об этих процессах при уменьшении затрат на проведение экспериментов.

Многие важные аспекты использования микрофлюидных систем в клеточной биологии уже были рассмотрены в работах иностранных авторов [1, 2]. *Целью данного обзора* является познакомить ученых, работающих в областях нормальной и патологической физиологии с возможностями биомоделирования на основе микрофлюидных клеточных технологий. Кроме того, в обзоре будет уделено особое внимание преимуществам, которые может предоставить микрофлюидный формат при изучении физиологических и патофизиологических процессов.

## Что такое МФУ?

Микрофлюидные устройства представляют собой точные жидкостные системы с размерами структур от единиц до сотен и тысяч микрометров. МФУ содержат множество компонентов, и МФУ по функциональности могут быть сопоставимы с целой лабораторией [3, 4]. Базовым элементом МФУ является стеклянная или полимерная пластина — одноразовый сменный модуль с многоуровневой системой каналов, микрополостей, клапанов и насосов, оперирующая с фемто- и пиколитрами жидкостей. Микрофлюидные биоаналитические системы позволяют реализовать важнейшие методы современной аналитической химии, использовать преимущества ламинарных потоков, оптимизировать соотношение объема к поверхности в микрореакторах и др. [5]. Структура МФУ может быть разработана таким образом, чтобы обеспечить контроль за поведением клеток в пространст-

ве чипа. Также взаимодействия между популяциями клеток могут контролироваться посредством использования различных элементов МФУ — каналов, мембран, клапанов, включенных в эти системы [4].

Учитывая большой спектр преимуществ, в сфере биомедицинских исследований микрофлюидика имеет огромный потенциал в моделировании физиологических и патологических состояний в сложных биологических системах [6, 7]. В частности, микрофлюидные устройства используются для решения таких научных задач клеточной биологии, как изучение клеточной адгезии, цитотоксичности, подсчет и сортировка клеток, клеточная миграция, механизмы сигнализации, электрофизиологические изменения и ряд других процессов. Такой широкий спектр решаемых задач может способствовать охвату в формате МФУ всех возможных потребностей в клеточной биологии и созданию полностью интегрированной системы для клеточных исследований, схематично представленной на рис. 1 [7].

## Культивирование клеток в микрофлюидных чипах

Выращивание клеток в микрофлюидных чипах имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным культивированием во флаконах, чашках Петри или многолуночных планшетах. Так, например, жидкость во флаконах для культивирования обычно статична или турбулентно подвижна, в то время как клетки в реальных живых тканях находятся в потоке интерстициальной жидкости, крови или других биологических жидкостей, причем, в частности, для гидродинамики мелких сосудов характерен ламинарный характер тока. Кроме того, клетки в статичной культуре растут в присутствии своих собственных метаболитических «отходов», что приводит к изменениям pH ростовой среды, тогда как в естественных условиях происходит постоянное удаление метаболитов, что поддерживает pH на необходимом уровне [6]. Также немаловажно, что в большинстве традиционных методов мониторинг живых клеток в реальном времени ограничен. Из-за динамической природы биологических процессов часто при таких исследованиях теряется значительная доля информации. МФУ проектируются с широкими возможностями по прижизненному мониторингу клеток, в частности, с ис-

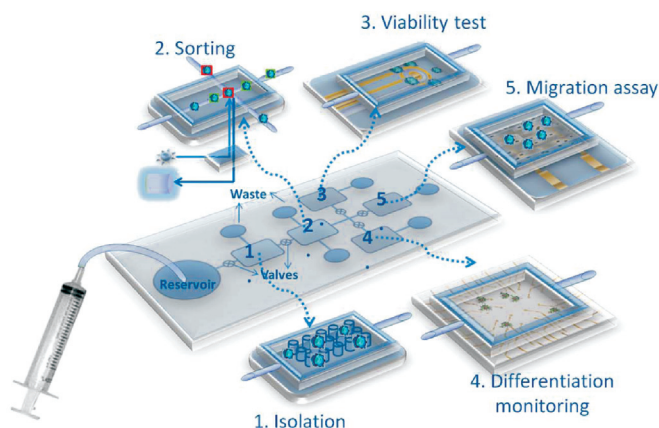


Рис. 1. Пример модульной лаборатории на чипе для исследований стволовых клеток. Несколько микрофлюидных компонентов и модулей интегрированы вместе для комплексного исследования процессов жизнедеятельности клеток [7].

пользованием конфокальной микроскопии. Кроме того, конструкция микрофлюидных чипов весьма разнообразна и может быть специально адаптирована под конкретный вид клеток и проводимых исследований. Культивирование клеток в МФУ предполагает значительно меньший расход реагентов, снижение риска контаминации, больший уровень автоматизации и повышение производительности анализа.

Как было отмечено выше, при культивировании клетки находятся в ростовой среде, состоящей из множества растворимых факторов, необходимых для обеспечения функционирования как внутриклеточных процессов, так и для межклеточных взаимодействий. Эта клеточная среда обладает определенными физико-химическими свойствами (рН, содержание кислорода, температура, осмоляльность) [8]. Так как большинство клеток в организме не циркулирует и зависит от прикрепления к окружающим клеткам и к внеклеточному матриксу (ЕСМ), формирование матрикса в МФУ и его правильная организация имеет первостепенное значение.

Физическое воздействие со стороны внеклеточной среды постоянно передается клеткам, которые, в свою очередь, вырабатывают ответ на это воздействие [9]. Помимо этого клетки испытывают механическое воздействие от соседних клеток, находящихся в непосредственном контакте. Иными словами, каждая отдельная клетка и вся ткань в целом постоянно испытывает динамическое экзогенное механическое воздействие, влияющее на состояние ее жизнедеятельности [8].

Таким образом, все силы, действующие на клетку, в том числе механические воздействия, в сочетании с другими физическими, физико-химическими и биохимическими факторами создают динамичную трехмерную микросреду, параметры которой должны учитываться при моделировании тканей в МФ чипе [8, 10]. Для воспроизведения как можно более точной картины процессов, протекающих в ткани, необходимо оценить потенциальные ключевые механизмы воздействия на клетку в ткани и последующие за ними эффекты, опосредуемые передачей биохимических сигналов, установить сопутствующие изменения в клеточной микросреде, а также провести оценку предполагаемого клеточного ответа. Важнейшие составляющие клеточного микроокружения, которые дол-

жны быть учтены при разработке микрофлюидных устройств, представлены на рис. 2 [10].

Ключевыми компонентами клеточного микроокружения, как уже было отмечено ранее, являются цитокины, факторы роста, гормоны и ряд других биологически активных молекул, которые в совокупности образуют сложный «информационный фон», способный активировать множество сигнальных путей. Эксперименты в клеточной и молекулярной биологии часто направлены на определение биохимических эффектов, а затем уточнение механизмов, с помощью которых определенные растворимые факторы регулируют процессы в клетке. В то время как «сигнальным» свойствам клеточного микроокружения в экспериментальной биологии уделено особо пристальное внимание, влияние изменения его физико-химических свойств на клетки изучено в меньшей степени. В частности, аномальные уровни рН и содержания кислорода связаны с развитием различных патологий, поэтому важно учитывать эти параметры при разработке и использовании искусственно созданного микроокружения для исследуемых клеточных культур [8]. МФУ благодаря используемому проточному принципу позволяют более точно контролировать клеточное микроокружение в режиме реального времени. Это обеспечивает большую эффективность основанным на МФУ методам моделирования патологических состояний, связанных с нарушением физико-химических свойств. Так, исследователям из Техасского Технологического Университета удалось создать прецизионную микрофлюидную клеточную модель повреждений кардиомиоцитов в результате ишемии/реперфузии, индуцируемых контролируемо с высокой точностью гипоксией в течение 4 часов с последующей нормоксией [11].

Парциальное давление кислорода является существенным фактором для процессов клеточного роста, миграции и, соответственно, гомеостаза ткани и ее регенерации. Падение парциального давления может запускать адаптивные процессы в ткани, ангиогенез.

При выращивании клеток с использованием традиционных методов («статического» культивирования) в клеточном микроокружении поддерживается высокий уровень кислорода, соответствующий его содержанию в воздухе (21%). Между тем, в микроциркуляторном звене сосудистого русла уровень кислорода редко превышает 10%. Клетки, содержащиеся при высоких уровнях кислорода, могут иметь окислительные повреждения ДНК и экспрессировать маркеры фенотипа клеточного старения. При исследовании *in vitro* функций эндотелия или патологий, связанных с окислительным стрессом (например, атеросклероза), следует стремиться к приближению уровня кислорода к естественным условиям [12], что может эффективно достигаться построением соответствующих МФУ.

Градиенты концентраций играют ключевую роль в жизнедеятельности клеток в организме человека, определяя такие процессы, как миграция, пролиферация и дифференцировка в онтогенезе, заживление ран, воспаление и онкогенез [13].

Важно заметить, что понятие «градиент» применимо не только к химическим веществам, но также и к механическим свойствам ЕСМ или лигандов, связанных с поверхностью. Химические градиенты концентраций, как правило, образуются в результате диффузии, в то время как

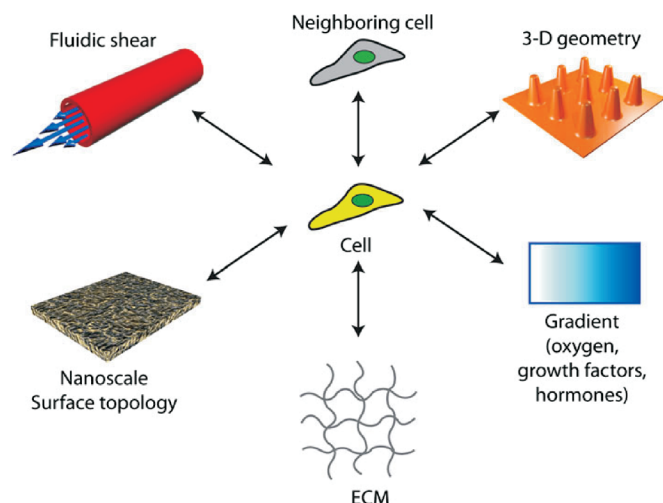


Рис. 2. Важнейшие факторы клеточного микроокружения [10].



механические градиенты образуются в результате неоднородности окружающей матрицы. Микрофлюидные технологии являются идеальным инструментом для воссоздания различных градиентов концентраций, которые могут подчиняться линейным, логарифмическим законам или их комбинациям. В простейшем случае потоки от двух отдельных источников могут быть объединены вместе в одном микроканале, и, в связи с ламинарным характером потока, их смешивание почти полностью определяется диффузией.

В микрофлюидных устройствах с каналами специальной формы могут быть воспроизведены химические градиенты концентраций факторов роста при непрерывном потоке, индуцирующие ответ, сопоставимый с традиционными клеточными культурами. МФУ могут быть использованы для создания градиентов растворенных газов — в частности, кислорода, путем контролируемого добавления поглотителя кислорода в среду для культивирования [13].

В МФУ также возможна интеграция нескольких градиентов, однако, такие интегрированные системы имеют ряд проблем, которые затрудняют их практическое использование в биологических исследованиях. Прежде всего — это сложная конструкция таких устройств, в особенности в случае, когда необходимо создавать одновременно разнородные градиенты, например, газов и растворенных твердых веществ.

Потоки жидкостей в организме человека обеспечивают активный массоперенос, который облегчает связи между всеми компонентами организма. Одним из естественных преимуществ микрофлюидики является контроль за поведением жидкости и точное управление потоком. В МФУ для достижения высокоинтенсивного механического воздействия потоком на клетки могут использоваться небольшие объемы проб. Возникающая при действии потока на клетки сдвиговая деформация, играющая важную роль в функционировании эндотелия, может исследоваться с использованием и более простых традиционных систем, таких, как проточные камеры — в них можно исследовать характеристики потока, но управление потоком в пространстве и времени при этом будет сильно ограничено простой геометрией устройства. Геометрия МФУ контролируется с несопоставимой гибкостью, при этом элементы МФУ могут создаваться в широчайшем диапазоне размеров, охватывающем 7 порядков.

Ключевым способом управления физико-химическими условиями в МФУ является контроль проходящего через МФУ потока жидкости. В отличие от жестко задаваемой на этапе проектирования геометрии МФУ, потоком можно управлять динамически с использованием помп, имеющих различный принцип действия — таких, как шприцевые или перистальтические. В микрофлюидных экспериментах часто применяются многоканальные помпы, управляемые с помощью компьютера. Прецизионное управление потоком позволяет создавать необходимые физические и химические градиенты, с помощью которых становится возможным изучение широчайшего спектра процессов в организме — от неинвазивного мониторинга формирования сердечной ткани до анализа субклеточных структур и направленной миграции аксонов нервных клеток [14]. Более того, могут использоваться замкнутые контуры циркуляции жидкости, обратные связи по потоку и даже устройства «поточковой» логики.

МФУ предоставляют широкие возможности для изучения действия механических сил и физических полей на клетки. Некоторые типы клеток, такие, как, например, остециты и фибробласты, являются механочувствительными и способны формировать специфические ответы на механические воздействия. Деформация в результате механического сжатия может распространяться по цитоскелету клеток и приводить к развитию в том числе и аномальных ответов у разных клеточных типов. Патологически измененные клетки часто демонстрируют модифицированную способность к деформации при сжатии. В соответствии с этим были разработаны специальные микрофлюидные устройства-цитометры, направленные на выявление потенциально опухолевых клеток на основе их ответов на деформацию [10].

Другим интересным примером исследования влияния деформации на функционирование клеток является модель повреждения легких при искусственной вентиляции за счет циклического растяжения и сжатия альвеолярных эпителиальных клеток. Для изучения подобных явлений могут быть использованы микрофлюидные устройства на основе гидрогелей [15]. Пример такого устройства показан на рис. 3. Созданная в этом исследовании модель «легких-на-чипе» была также использована для систематического изучения воздействия бактериальной инфекции и наночастиц на ткань легких. Использование такого устройства выявило корреляцию между циклической механической деформацией и воспалительными реакциями в тканях легочного эпителия. В связи с этим следует отметить немаловажный этический аспект, что при использовании подобных микрофлюидных моделей объем проводимых экспериментов на животных может быть существенно сокращен.

Перечисляя области применения МФУ для исследования физических воздействий на живые системы, нельзя не отметить, что одной из методик сложных областей патофизиологии является мониторинг в режиме реального времени гомеостаза ткани при ее механическом повреждении. Помимо необходимости соблюдения временных параметров, выбранное воздействие должно быть

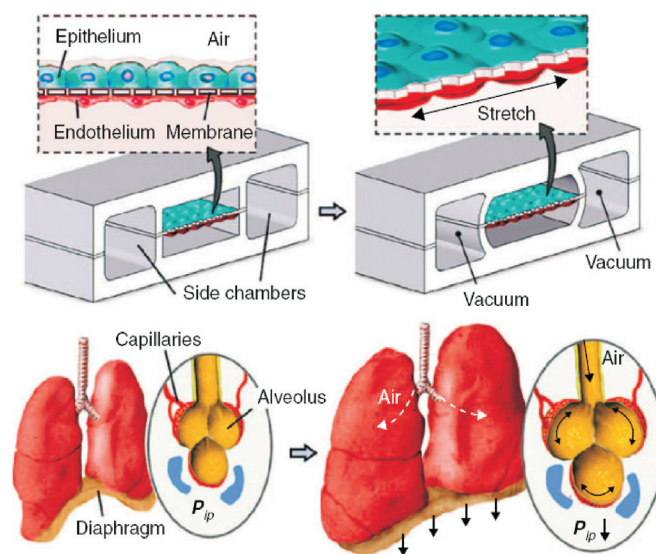


Рис. 3. Микрофлюидная альвеолярная модель с тонкой мембраной для стимуляции деформации присоединенных на ней эпителиальных клеток [15].

точным в чрезвычайно малом диапазоне сил. Классические методы нанесения травмы часто не отличаются достаточной точностью и не дают хорошо воспроизводимую картину. Для решения этой проблемы было создано специальное микрофлюидное устройство для контролируемого повреждения ткани. Его использование способствовало уточнению посттравматических механизмов регенерации, роста и транспорта первичных нейронов гиппокампа [16].

Важным для ряда специализированных типов клеток механическим воздействием является сдвиговая деформация. Механическое воздействие со стороны потока крови является ключевым фактором в нормальном функционировании эндотелиоцитов. Величина действующей на эндотелиоцит сдвиговой деформации зависит от гидродинамики, во многом определяемой геометрией сосудистого русла, которая часто бывает очень сложной из-за наличия многочисленных ветвлений и обилия нелинейных извитых участков. Использование МФУ для моделирования сосудистой системы является чрезвычайно эффективным и весьма распространенным подходом в связи с фундаментальным принципом микрофлюидики — использования активного массопереноса в системе микроканалов. Ту же задачу решает и кровеносная система, пронизывая различные ткани и органы и обеспечивая основу процессов жизнедеятельности [17].

Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, непрерывно подвергаются действию напряжения сдвига и в ответ на него секретируют вещества, которые ингибируют свертывание крови, регулируют просвет кровеносных сосудов [18]. Напряжение сдвига также модулирует клеточную адгезию, проницаемость мембран и миграцию клеток [10]. Развитие экспериментальных методов исследования клеточных культур с использованием различных профилей напряжения сдвига имеет высокую фундаментальную значимость как для биомедицины в целом, так и для ангиологии и фармакотерапии [18].

Эндотелиальная дисфункция — ключевой патофизиологический механизм, который может вызывать тромбоз, атеросклероз и воспаление [19]. Предпринималось несколько попыток выяснить механизмы возникновения эндотелиальной дисфункции и обусловленных ей заболеваний на микрофлюидных моделях сосудов, однако из-за значительного числа факторов, вовлеченных в этот сложный процесс, пока не удалось этого сделать в полной мере [20—22]. Тем не менее, с использованием сосудов-на-чипе ряд исследователей определил, что воспалительная эндотелиальная активация, опосредованная фактором некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и нарушенным потоком [23, 24], приводит к росту проницаемости эндотелия и протромботическим состояниям [25]. Ким и др. путем анализа транспорта наночастиц через монослой эндотелия в МФУ также подтвердил, что повышенная его проницаемость обусловлена воспалительной активацией [26]. Другие исследования с использованием МФУ продемонстрировали, что атеросклеротические поражения или образование тромбов происходят на участках эндотелия, экспрессирующих маркеры воспаления [27].

Важным аспектом исследования сосудистой системы и связанных с ней патологий является изучение процессов васкуляризации. Сосуды в основном формируются

в результате двух процессов: васкулогенеза и ангиогенеза. В первом, клетки эндотелиальных предшественников путем дифференцировки и ассоциации образуют новый сосуд [28], при ангиогенезе наблюдается разрастание существующих кровеносных сосудов [29]. Существует три основных фактора, индуцирующих рост сосудов: механический, химический и биологический [30, 31]. Недавние эксперименты по изучению ангиогенеза в микрофлюидных устройствах показали, что напряжения сдвига, создаваемые потоком жидкости, ослабляют ангиогенез в присутствии VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста) и кроме того, продемонстрировали, что интерстициальный поток регулирует морфологию сосудистых клеток в зависимости от направления градиента VEGF [32].

Исследования механизмов развития онкологических заболеваний — еще одна область, для которой *in vitro* моделирование сосудистых сетей имеет решающее значение. В этой связи можно рассмотреть два ключевых аспекта: ангиогенез в опухоли и метастазирование.

В ходе своего развития опухоль воздействует на близлежащие сосуды, изменяя их микроокружение путем механического воздействия и химических факторов. Так как опухолевые клетки снабжаются кислородом и другими питательными веществами преимущественно через кровеносные сосуды [33], понимание ангиогенеза в опухоли имеет важное значение для лечения онкологических заболеваний. В ряде исследований микрофлюидные устройства использовались для изучения ангиогенеза в опухолях путем совместного культивирования опухолевых клеток и эндотелия [34]. Так, Буканан и соавторы изучали корреляцию между напряжением сдвига и уровнем ангиогенных факторов, продуцируемых опухолью в трехмерной микрофлюидной модели [35]. Так как изменение pH является одним из признаков опухолевого роста в связи с переключениями метаболизма, измерялась также миграция эндотелиоцитов в МФУ при различных значениях pH в коллагеновом геле, содержащем несколько различных комбинаций клеток [36].

Процесс метастазирования опухолей является одним из ключевых событий опухолевого роста ввиду того, что около 90% смертности от рака приходится на последствия образования метастаз [37]. Полиорганный микрофлюидный чип, разработанный Ксу и коллегами, успешно воспроизводил инвазивный рост, метастазирование и пролиферацию клеток рака легких в целевом модельном органе [38]. Повреждение этих органов экстравазировавшими клетками рака легкого подтверждали по уровням соответствующих белков-маркеров. Берсини и соавторы имитировали процесс метастазирования рака молочной железы в костную и костномозговую ткань путем воспроизведения микроокружения с помощью мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека (BM-hMSC) [39]. Была показана более высокая скорость метастазирования для таких условий, что подтверждает важность микроокружения для развития метастатических сайтов. Кроме того, воспроизведение трехмерных микрососудистых сетей в микроокружении, имитирующем кости или мышцы, позволило *in vitro* провести исследование органоспецифического метастазирования опухолевых клеток [40].

Кровеносная система не является единственной сосудистой системой в организме. Важную роль играет также лимфатическая система, и ее нарушение может быть свя-

зано с различными заболеваниями, такими, как воспаление или метастазирующий рак. Ким и др. контролировали прорастание лимфатических эндотелиальных клеток в матрицу из фибрина путем управления рядом ростовых факторов и интерстициальным потоком в микрофлюидном устройстве, которое содержало фибробласты, помещенные в фибриновый гель [41].

Важным применением культивирования клеток в микрофлюидном формате является разработка и тестирование лекарственных препаратов [42]. С одной стороны, микрофлюидика предоставляет перспективные модели целевых тканей и органов для фармакотерапии, с другой, имеет огромный потенциал для автоматизации, создания градиентов концентраций и повышения производительности анализа [43]. Разработаны микрофлюидные чипы как для кратковременного культивирования клеток в присутствии фармакологических препаратов, так и для длительных исследований их действия на клетки.

#### Анализ единичных клеток

Применение микрофлюидных технологий внесло существенный вклад в такую перспективную область, как анализ отдельных клеток. Уже хорошо известно, что гетерогенность на уровне отдельных клеток является универсальным свойством живых организмов. В пределах одной ткани присутствуют клетки, по отдельности экспрессирующие разные маркеры данной ткани [44]. Традиционные «объемные» методы исследования предоставляют усредненные характеристики популяции, что может приводить к выпадению из внимания уникальных индивидуальных клеточных событий или даже неверным выводам. Так, например, некий средний уровень экспрессии определенного белка клетками может свидетельствовать как о приблизительно равном уровне экспрессии всеми клетками популяции, так и о существовании двух или более субпопуляций со значительно отличающимися уровнями экспрессии. Существует ряд методов, таких как проточная цитометрия, различные виды микроскопии, пэтч-клямп, метод оптического или магнитного пинцета, которые могут предоставить информацию о некоторых аспектах состояния отдельных клеток. Однако получение генетической информации о единичных клетках было сильно затруднено. Новая микрофлюидная технология позволяет упаковывать клетки в индивидуальные микрокапсулы, взвешенные в масле и помечать их специальным молекулярным «штрихкодом». После этого можно лизировать клетки и проводить ПЦР, частичное или полногеномное секвенирование или другие манипуляции [45].

Отличительной особенностью микрофлюидного подхода к изучению отдельных клеток является высокая производительность. Такая методика открывает новые возможности как для изучения клеточной гетерогенности в норме, так и механизмов, связанные с развитием различных заболеваний. Так, например, секвенирование ДНК отдельных клеток выявило заметную гетерогенность внутри каждой опухоли, что способствовало значительному пересмотру модели клональной эволюции [46], тогда как секвенирование РНК пролило новый свет на роль микроокружения опухоли в прогрессировании заболевания и лекарственной устойчивости [47].

#### Выводы

Применение микрофлюидных чипов для исследований в области биологии и медицины является чрезвычайно перспективным. Основными преимуществами микрофлюидного формата являются возможность управления пространственным расположением клеток и прецизионный контроль параметров клеточного микроокружения. В обзоре приведен ряд примеров успешного трехмерного клеточного биомоделирования физиологических и патологических процессов *in vitro* с применением микрофлюидных чипов, позволивших выявить новые закономерности в исследуемых явлениях. Кроме того, использование микрофлюидных чипов открывает такие новые направления, как генетический анализ единичных клеток. Помимо фундаментальных преимуществ, микрофлюидный формат позволяет достигнуть высокой производительности, автоматизации и существенно снизить расход реагентов. Авторы считают, что внедрение микрофлюидики в биомедицинские исследования в дальнейшем будет только расширяться.

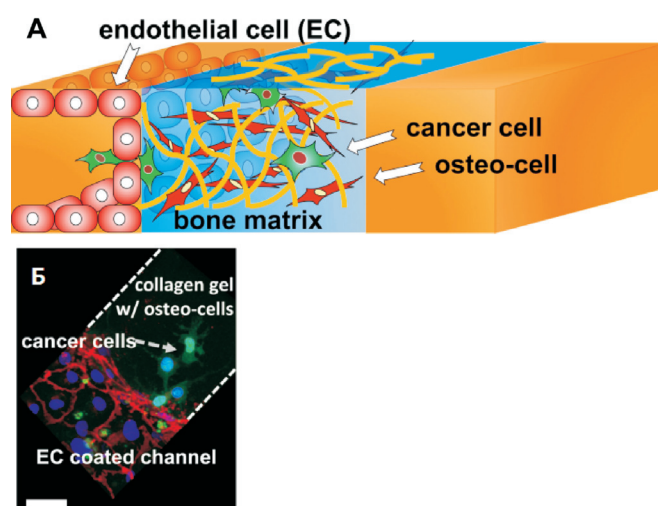


Рис. 4. Модель микрофлюидного чипа для изучения проникновения клеток рака груди в кость (А); трехмерная конфокальная реконструкция внедрения опухолевых клеток MDA-MB-231 через монослой эндотелиальных клеток в колагеновый гель, содержащий остеодифференцированные стволовые клетки (BM-hMSC) (Б) [39].

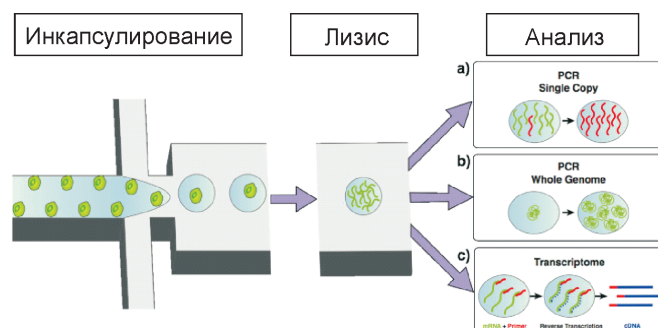


Рис. 5. Стадии анализа отдельных клеток с помощью технологии инкапсулирования в микрофлюидном чипе [45].



## Список литературы

1. Xiong B., Ren K., Shu Y., Chen Y., Shen B., Wu H. Recent developments in microfluidics for cell studies. *Adv. Mater.* 2014; 26(31): 5525-32. DOI: 10.1002/adma.201305348
2. Halldorsson S., Lucumi E., Gomez-Sjoberg R., Fleming R.M. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 218-31. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029
3. Erickson D., Li D. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta.* 2004; 507: 11-26
4. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011; 22: 681-9. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.05.512
5. Рубцов Н.Б., Попик В.М., Пельгек С.Е., Колчанов Н.А. *Микрофлюидные устройства в биологии и конструирование биосенсоров.* Новосибирск: 2004.
6. Webster A., Greenman J., Haswella S.J. Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. *Chem. Technol. Biotechnol.* 2011; 86: 10-7. DOI: 10.1002/jctb.2482
7. Primiceri E., Chiriaco M.S., Rinaldi R., Maruccio G. Cell chips as new tools for cell biology — results, perspectives and opportunities. *Lab. on a Chip.* 2013. DOI: 10.1039/c3lc50550b
8. Young E.W., Beebe D.J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39(3): 1036-48. DOI: 10.1039/b909900j
9. Московцев А.А., Колесов Д.В., Мильникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: Механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 112-25.
10. Sung J.H., Shuler M.L. Microtechnology for Mimicking In Vivo Tissue Environment. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40(6): 1289-300. DOI: 10.1007/s10439-011-0491-2
11. Khanal G., Chung K., Solis-Wever X., Johnson B., Pappas D. Ischemia/Reperfusion Injury of Primary Porcine Cardiomyocytes in a Low-Shear Microfluidic Culture and Analysis Device. *Analyst.* 2011; 136(17): 3519-26. DOI: 10.1039/c0an00845a
12. Keith H.K., Wong J., Chan M., Kamm R.D., Tien J. Microfluidic Models of Vascular Functions. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2012; 14: 205-30.
13. Chang C.W., Cheng Y.J., Tu M., Chen Y.H., Peng C.C., Liao W.H., Tung Y.C. A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies. *Lab. Chip.* 2014; 14: 3762-72. DOI: 10.1039/c4lc00732h
14. Bhatia S.N., Ingber D.E. *Microfluidic organs-on-chips.* Nature biotechnology; 2014.
15. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010; 328:1662-8. DOI: 10.1126/science.1188302
16. Taylor A.M., Blurton-Jones M., Rhee S.W., Cribbs D.H., Cotman C.W., Jeon N. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods.* 2005; 2(8): 599-605. DOI: 10.1038/nmeth777
17. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473: 298-307. DOI: 10.1038/nature10144
18. Hattori K., Munechira Y., Kobayashi H., Satoh T., Sugiura Sh., Kanamori T. Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function. *J. Biosci. Bioeng.* 2014; 118 (3): 327-32. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.006
19. Barakat A.I. Blood flow and arterial endothelial dysfunction: Mechanisms and implications. *C. R. Phys.* 2013, 14, 479-96.
20. Hansen R.R., Wufsus A.R., Barton S.T., Onasoga A.A., Johnson-Paben R.M., Neeves K.B. High content evaluation of shear dependent platelet function in a microfluidic flow assay. *Ann. Biomed. Eng.* 2013; 41: 250-62.
21. Shen F., Kastrup C.J., Liu Y.; Ismagilov R.F. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 2035-41.
22. Kim S.K., Moon W.K., Park J.Y., Jung H. Inflammatory mimetic microfluidic chip by immobilization of cell adhesion molecules for T cell adhesion. *Analyst.* 2012; 137: 4062-8. DOI: 10.1039/c2an35424a
23. Tsai M., Kita A., Leach J., Rounsevell R., Huang J.N., Moake J., Ware R.E., Fletcher D.A., Lam W.A. *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology. *J. Clin. Investig.* 2012; 122: 408-18.
24. Thomas A., Daniel Ou-Yang H., Lowe-Krentz L., Muzykanov V.R., Liu Y. Biomimetic channel modeling local vascular dynamics of pro-inflammatory endothelial changes. *Biomicrofluidics.* 2016; 10: 014101
25. Zheng Y., Chen J., Craven M., Choi N.W., Totorica S., Diaz-Santana A., Kermani P., Hempstead B., Fischbach-Teschl C., Lopez J.A., Stroock A.D. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109: 9342-7. DOI: 10.1073/pnas.1201240109
26. Kim Y., Lobatto M.E., Kawahara T., Lee Chung B., Mieszkowska A.J., Sanchez-Gaytan B.L., Fay F., Senders M.L., Calcagno C., Becraft J., Tun Saung M., Gordon R.E., Stroes E.S., Ma M., Farokhzad O.C., Fayad Z.A., Mulder W.J., Langer R. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1078-83. DOI: 10.1073/pnas.1322725111
27. Estrada R., Giridharan G.A., Nguyen, M.D., Prabhu, S.D., Sethu P. Microfluidic endothelial cell culture model to replicate disturbed flow conditions seen in atherosclerosis susceptible regions. *Biomicrofluidics.* 2015.
28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-96. DOI: 10.1038/74651
29. Adams R.H., Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 464-78. DOI: 10.1038/nrm2183
30. Abaci H.E., Drazer G., Gerecht S. Recapitulating the vascular microenvironment in microfluidic platforms. *Nano LIFE.* 2013; 3: 1340001
31. Resnick N., Yahav H., Shay-Salit A., Shushy M., Schubert S., Zilberman L.C.M., Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: For better and for worse. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003; 81: 177-99.
32. Young E.W. Advances in Microfluidic Cell Culture Systems for Studying Angiogenesis. *J. Lab. Automation.* 2013; 18(6): 427-37. DOI: 10.1177/2211068213495206
33. Gimbrone M.A., Cotran R.S., Leapman S.B., Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 52: 413-27.
34. Cross V.L., Zheng Y., Won Choi N., Verbridge S.S., Suter-master B.A., Bonassar L.J., Fischbach C., Stroock A.D. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis *in vitro.* *Biomaterials.* 2010; 31: 8596-607. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.072
35. Buchanan C.F., Verbridge S.S., Vlachos P.P., Rylander M.N. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhes. Migr.* 2014; 8: 517-24. DOI:10.4161/19336918.2014.970001.
36. Chung S., Sudo R., Mack P.J., Wan C.-R., Vickerman V., Kamm R.D. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab. Chip.* 2009; 9: 269-75.
37. Weigelt B., Peterse J.L., Van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5: 591-602. DOI: 10.1039/b807585a
38. Xu Z., Li E., Guo Z., Yu R., Hao H., Xu Y., Sun Z., Li X., Lyu J., Wang Q. Design and construction of a multi-organ microfluidic chip mimicking the in vivo microenvironment of lung cancer metastasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016; 8: 25840-7. DOI: 10.1021/acsami.6b08746
39. Bersini S., Jeon, J.S., Dubini, G., Arrigoni C., Chung S., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials.* 2014; 35: 2454-61. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050.
40. Jeon J.S., Bersini S., Gilardi M., Dubini G., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112: 214-9. DOI: 10.1073/pnas.1417115112.
41. Kim S., Chung M., Jeon N.L. Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro. *Biomaterials.* 2016; 78: 115-28. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.019

42. Wu M.H., Huang S.B., Lee G.B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab. Chip.* 2010; 10: 939-56. DOI: 10.1039/b921695b

43. Hung P.J., Lee P.J., Sabounchi P., Lin R., Lee L.P. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 89: 1-8. DOI: 10.1002/bit.20289

44. Walling M.A., Shepard J.R.E. Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40:4049-76. DOI: 10.1039/c0cs00212g

45. Reece A., Xia B., Jiang Z., Noren B., McBride R., Oakey J. Microfluidic Techniques for High Throughput Single Cell Analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 40: 90-6. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.015

46. Wang Y., Waters J., Leung M.L., Unruh A., Roh W., Shi X., Chen K., Scheet P., Vattathil S., Liang H., Multani A., Zhang H., Zhao R., Michor F., Meric-Bernstam F., Navin N.E. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature.* 2014; 512: 155-60. DOI: 10.1038/nature13600

47. Tirosh I., Izar B., Prakadan S.M., Wadsworth M.H. 2nd, Treacy D., Trombetta J.J., Rotem A., Rodman C., Lian C., Murphy G., Fallahi-Sichani M., Dutton-Regester K., Lin J.R., Cohen O., Shah P., Lu D., Genshaft A.S., Hughes T.K., Ziegler C.G., Kazer S.W., Gaillard A., Kolb K.E., Villani A.C., Johannessen C.M., Andreev A.Y., Van Allen E.M., Bertagnolli M., Sorger P.K., Sullivan R.J., Flaherty K.T., Frederick D.T., Jane-Valbuena J., Yoon C.H., Rozenblatt-Rosen O., Shalek A.K., Regev A., Garraway L.A. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016; 352:189-96. DOI: 10.1126/science.aad0501

## References

1. Xiong B., Ren K., Shu Y., Chen Y., Shen B., Wu H. Recent developments in microfluidics for cell studies. *Adv. Mater.* 2014; 26(31): 5525-32. DOI: 10.1002/adma.201305348

2. Halldorsson S., Lucumi E., Gomez-Sjoberg R., Fleming R.M. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 218-31. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029

3. Erickson D., Li D. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta.* 2004; 507: 11-26. DOI: 10.1016/j.aca.2003.09.019

4. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011; 22: 681-9. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.05.512

5. Rubtsov N.B., Popik V.M., Pel'tek S.Ye., Kolchanov N.A. [Microfluidic devices in biology and design of biosensors]. Novosibirsk; 2004. (in Russian)

6. Webster A., Greenman J., Haswella S.J. Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. *Chem. Technol. Biotechnol.* 2011; 86(1): 10-7. DOI: 10.1002/jctb.2482

7. Primiceri E., Chiriaco M.S., Rinaldi R., Maruccio G. Cell chips as new tools for cell biology — results, perspectives and opportunities. *Lab. on a Chip.* 2013. DOI: 10.1039/c3lc50550b

8. Young E.W., Beebe D.J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39(3): 1036-48. DOI: 10.1039/b909900j

9. Moskovtsev A.A., Kolesov D.V., Myl'nikova A.N., Zaychenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kubat'yev A.A. [Endothelial cell responses to shear strain: Mechanotransduction, cellular stress and adaptation]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2017; 61(4): 112-25. (in Russian)

10. Sung J.H., Shuler M.L. Microtechnology for Mimicking In Vivo Tissue Environment. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40(6): 1289-300. DOI: 10.1007/s10439-011-0491-2

11. Khanal G., Chung K., Solis-Wever X., Johnson B., Pappas D. Ischemia/Reperfusion Injury of Primary Porcine Cardiomyocytes in a Low-Shear Microfluidic Culture and Analysis Device. *Analyst.* 2011; 136(17): 3519-26. DOI: 10.1039/c0an00845a

12. Keith H.K., Wong J., Chan M., Kamm R.D., Tien J. Microfluidic Models of Vascular Functions. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2012; 14: 205-30.

13. Chang C.W., Cheng Y.J., Tu M., Chen Y.H., Peng C.C., Liao W.H., Tung Y.C. A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies. *Lab. Chip.* 2014; 14: 3762-72. DOI: 10.1039/c4lc00732h

14. Bhatia S.N., Ingber D.E. *Microfluidic organs-on-chips*. Nature biotechnology; 2014.

15. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010; 328:1662-8. DOI: 10.1126/science.1188302

16. Taylor A.M., Blurton-Jones M., Rhee S.W., Cribbs D.H., Cotman C.W., Jeon Li N. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods.* 2005; 2(8): 599-605. DOI: 10.1038/nmeth777

17. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473: 298-307. DOI: 10.1038/nature10144

18. Hattori K., Munehira Y., Kobayashi H., Satoh T., Sugiura Sh., Kanamori T. Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function. *J. Biosci. Bioeng.* 2014; 118 (3): 327-32. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.006

19. Barakat A.I. Blood flow and arterial endothelial dysfunction: Mechanisms and implications. *C. R. Phys.* 2013, 14, 479-96.

20. Hansen R.R., Wufsus A.R., Barton S.T., Onasoga A.A., Johnson-Paben R.M., Neeves K.B. High content evaluation of shear dependent platelet function in a microfluidic flow assay. *Ann. Biomed. Eng.* 2013; 41: 250-62.

21. Shen F., Kastrop C.J., Liu Y.; Ismagilov R.F. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 2035-41.

22. Kim S.K., Moon W.K., Park J.Y., Jung H. Inflammatory mimetic microfluidic chip by immobilization of cell adhesion molecules for T cell adhesion. *Analyst.* 2012; 137: 4062-8. DOI: 10.1039/c2an35424a

23. Tsai M., Kita A., Leach J., Rounsevell R., Huang J.N., Moake J., Ware R.E., Fletcher D.A., Lam W.A. *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology. *J. Clin. Investig.* 2012; 122: 408-18.

24. Thomas A., Daniel Ou-Yang H., Lowe-Krentz L., Muzykantov V.R., Liu Y. Biomimetic channel modeling local vascular dynamics of pro-inflammatory endothelial changes. *Biomicrofluidics.* 2016; 10: 014101

25. Zheng Y., Chen J., Craven M., Choi N.W., Totorica S., Diaz-Santana A., Kermani P., Hempstead B., Fischbach-Teschl C., Lopez J.A., Stroock A.D. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109: 9342-7. DOI: 10.1073/pnas.1201240109

26. Kim Y., Lobatto M.E., Kawahara T., Lee Chung B., Mieszawska A.J., Sanchez-Gaytan B.L., Fay F., Senders M.L., Calcagno C., Becraft J., Tun Saung M., Gordon R.E., Stroes E.S., Ma M., Farokhzad O.C., Fayad Z.A., Mulder W.J., Langer R. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1078-83. DOI: 10.1073/pnas.1322725111

27. Estrada R., Giridharan G.A., Nguyen, M.D., Prabhu, S.D., Sethu P. Microfluidic endothelial cell culture model to replicate disturbed flow conditions seen in atherosclerosis susceptible regions. *Biomicrofluidics.* 2015.

28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-96. DOI: 10.1038/74651

29. Adams R.H., Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 464-78. DOI: 10.1038/nrm2183

30. Abaci H.E., Drazer G., Gerecht S. Recapitulating the vascular microenvironment in microfluidic platforms. *Nano LIFE.* 2013; 3: 1340001

31. Resnick N., Yahav H., Shay-Salit A., Shushy M., Schubert S., Zilberman L.C.M., Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: For better and for worse. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003; 81: 177-99.

32. Young E.W. Advances in Microfluidic Cell Culture Systems for Studying Angiogenesis. *J. Lab. Automation.* 2013; 18(6): 427-37. DOI: 10.1177/2211068213495206

33. Gimbrone M.A., Cotran R.S., Leapman S.B., Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 52: 413-27.

34. Cross V.L., Zheng Y., Won Choi N., Verbridge S.S., Suter-master B.A., Bonassar L.J., Fischbach C., Stroock A.D. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis *in vitro*. *Biomaterials.* 2010; 31: 8596-607. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.072



35. Buchanan C.F., Verbrige S.S., Vlachos P.P., Rylander M.N. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhes. Migr.* 2014; 8: 517-24. DOI:10.4161/19336918.2014.970001.
36. Chung S., Sudo R., Mack P.J., Wan C.-R., Vickerman V., Kamm R.D. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab. Chip.* 2009; 9: 269-75.
37. Weigelt B., Peterse J.L., Van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5: 591-602. DOI: 10.1039/b807585a
38. Xu Z., Li E., Guo Z., Yu R., Hao H., Xu Y., Sun Z., Li X., Lyu J., Wang Q. Design and construction of a multi-organ microfluidic chip mimicking the in vivo microenvironment of lung cancer metastasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016; 8: 25840-7. DOI: 10.1021/acsami.6b08746
39. Bersini S., Jeon, J.S., Dubini, G., Arrigoni C., Chung S., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials.* 2014; 35: 2454-61. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050.
40. Jeon J.S., Bersini S., Gilardi M., Dubini G., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112: 214-9. DOI: 10.1073/pnas.1417115112.
41. Kim S., Chung M., Jeon N.L. Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro. *Biomaterials.* 2016; 78: 115-28. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.019
42. Wu M.H., Huang S.B., Lee G.B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab. Chip.* 2010; 10: 939-56. DOI: 10.1039/b921695b
43. Hung P.J., Lee P.J., Sabounchi P., Lin R., Lee L.P. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 89: 1-8. DOI: 10.1002/bit.20289
44. Walling M.A., Shepard J.R.E. Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40:4049-76. DOI: 10.1039/c0cs00212g
45. Reece A., Xia B., Jiang Z., Noren B., McBride R., Oakey J. Microfluidic Techniques for High Throughput Single Cell Analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 40: 90-6. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.015
46. Wang Y., Waters J., Leung M.L., Unruh A., Roh W., Shi X., Chen K., Scheet P., Vattathil S., Liang H., Multani A., Zhang H., Zhao R., Michor F., Meric-Bernstam F., Navin N.E. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature.* 2014; 512: 155-60. DOI: 10.1038/nature13600
47. Tirosh I., Izar B., Prakadan S.M., Wadsworth M.H. 2nd, Treacy D., Trombetta J.J., Rotem A., Rodman C., Lian C., Murphy G., Fallahi-Sichani M., Dutton-Regester K., Lin J.R., Cohen O., Shah P., Lu D., Genshaft A.S., Hughes T.K., Ziegler C.G., Kazer S.W., Gailard A., Kolb K.E., Villani A.C., Johannessen C.M., Andreev A.Y., Van Allen E.M., Bertagnolli M., Sorger P.K., Sullivan R.J., Flaherty K.T., Frederick D.T., Jane-Valbuena J., Yoon C.H., Rozenblatt-Rosen O., Shalek A.K., Regev A., Garraway L.A. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016; 352:189-96. DOI: 10.1126/science.aad0501

#### **Сведения об авторах:**

*Мыльникова Алёна Николаевна — аспирант<sup>2</sup>.*

*Колесов Дмитрий Валерьевич — научный сотрудник лаборатории функциональной ангиопротеомии и метаболомики<sup>1</sup>.*

*Московцев Алексей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови<sup>1</sup>, доцент кафедры общей патологии и патофизиологии<sup>3</sup>.*

*Соколовская Алиса Анатольевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови<sup>1</sup>.*

*Юркин Василий Андреевич — доктор медицинских наук, академик РАН, главный научный сотрудник<sup>4</sup>*

*Кубатиев Аслан Амирханович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель<sup>1</sup>, заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии<sup>3</sup>.*