

УДК 542.816:616–074

МИКРОДИАЛИЗ И МИКРОФЛЮИДИКА – СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Бервинова А.В., Кулешова Л.М., Завалиева Д.П., Власова А.А.

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ, Волгоград, e-mail: larisa.kuleshova28@yandex.ru*

Инновации и развитие технологий в области биологии и медицины не стоят на месте. Одним из векторов этого движения, является разработка компактных и многофункциональных систем исследования, к которым, в частности, относятся микродиализ и микрофлюидика. Данные системы, основанные на изучении химического состава ткани и жидкости, являются высокочувствительными и требуют малый объем образцов. Микродиализ это метод исследования химического состава внеклеточного пространства живой ткани, позволяющий получить непосредственное представление о процессах, происходящих в живом организме. Данный метод является важнейшим прорывом в области нейрофизиологии. С его помощью изучаются нейромедиаторные и метаболические процессы в головном мозге – как в нормальных условиях, так и при воздействии различных фармакологических и токсикологических агентов. Другой многообещающей и быстро развивающейся междисциплинарной областью исследований химии, биологии и медицины, является микрофлюидика. Микрофлюидика лежит в основе так называемых лабораторий на чипе, что дает возможность проводить традиционные и оригинальные исследования в миниатюрном формате. Данный метод широко используется в экспериментальной и аналитической эмбриологии, а так же является распространенным вариантом при секвенировании и амплификации нуклеиновых кислот. В статье раскрывается актуальность и сущность данных методов, описаны области применения, а также их преимущества.

Ключевые слова: микродиализ, микрофлюидика, биотехнология

MICRODIALYSIS AND MICROFLUIDICS – MODERN METHODS IN BIOMEDICAL RESEARCH

Bervinova A.V., Kuleshova L.M., Zavalieva D.P., Vlasova A.A.

*Volgograd State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Volgograd,
e-mail: larisa.kuleshova28@yandex.ru*

Innovations and the development of technologies in the field of biology and medicine are not standing still. One of the vectors of this movement is the development of compact and multifunctional research systems, which, in particular, include microdialysis and microfluidics. These systems, based on the study of the chemical composition of tissue and fluid, are highly sensitive and require a small volume of samples. Microdialysis is a method of studying the chemical composition of the extracellular space of living tissue, which allows to get a direct idea of the processes occurring in a living organism. This method is the most important breakthrough in the field of neurophysiology. It is used to study neurotransmitter and metabolic processes in the brain, both under normal conditions and when exposed to various pharmacological and toxicological agents. Microfluidic is another promising and rapidly growing interdisciplinary field of research in chemistry, biology and medicine. Microfluidics underlies the so-called laboratories on a chip, which makes it possible to conduct traditional and original research in a miniature format. This method is widely used in experimental and analytical embryology, as well as a common option for sequencing and amplifying nucleic acids. The article reveals the relevance and nature of these methods, describes the scope, as well as their advantages.

Keywords: microdialysis, microfluidics, biotechnology

Микродиализ

Микродиализ это метод исследования химического состава внеклеточного пространства живой ткани. Данный метод позволяет непосредственно получить представление о процессах, происходящих в ткани, до того как они появятся в виде системных изменениях. Основа метода заключается в пассивной диффузии веществ, находящихся в интерстициальной жидкости.

Для проведения микродиализа используют специальные зонды, имплантируемые в ткань, один конец из которого представлен полупроницаемой мембраной. После имплантации зонда, к его внутреннему каналу подключают специализированный инфузионный насос, в котором находится раствор

схожий по электролитному составу с тканевой жидкостью.

В районе мембраны, куда доходит раствор, происходит уравнивание химических составов физиологического раствора и внеклеточной жидкости, так что содержание компонентов в перфузате становится пропорциональным их содержанию во внеклеточной жидкости. Анализ перфузата позволяет получить представление о химическом составе изучаемой ткани. Зонд для микродиализа устроен как система концентрических трубок; перфузионная жидкость подается через внутреннюю трубку, доходит до ее дистального конца, где поступает в пространство между внутренней трубкой и внешней диализной мембраной. Направление потока жидкости меняется

на противоположное; перфузионная жидкость вытекает через выводной шланг и собирается для последующего анализа. Когда перфузионная жидкость находится между внутренней трубкой и диализной мембраной, происходит процесс диализа.

Так как молекулярный обмен через диализную мембрану происходит в двух направлениях, микродиализный зонд может использоваться для одновременного отбора эндогенных компонентов и доставки химических веществ (например, лекарств) непосредственно в ткань. Градиент отдельного компонента зависит не только от разницы между концентрациями данного вещества в перфузате и внеклеточной жидкости, но и от скорости потока жидкости в зонде.

Основы постановки микродиализного эксперимента

Существуют параметры и условия, которые необходимо учитывать при микродиализе:

1. Предел отсечения мембраны зонда.
2. Длина мембраны (чем длиннее мембрана, тем выше выход исследуемых веществ).
3. Скорость потока перфузионной жидкости (использование высоких скоростей позволит удалить/доставить большее количество молекул в единицу времени).
4. Состав перфузионной жидкости (состав перфузионной жидкости должен быть максимально приближен к химическому составу внеклеточной жидкости).
5. Тип зонда (жесткий зонд, для стереотаксических экспериментов в мозге; гибкий зонд – для периферических органов).
6. Время, необходимое для достижения равновесного состояния.
7. Контрольный эксперимент.
8. Эксперименты «доза-ответ».

Целевые органы в микродиализе

Микродиализные методы широко используются для отбора проб внеклеточной жидкости в живых органах. Первой целью применения данного метода, была центральная нервная система (ЦНС) экспериментальных животных. Основная цель исследований – исследование функции мозга, изменение уровней эндогенных соединений (нейротрансмиттеры, метаболиты). В исследованиях ЦНС обратный микродиализ (ретродиализ) также может широко использоваться для исследования эффектов различных фармакологических и токсикологических агентов (антидепрессанты, антипсихотические средства, антипаркинсоновые молекулы, алкоголь, галлюциногены и экспериментальные препараты) [1, 2, 3].

Таким образом, методы микродиализа в значительной степени способствовали не только выяснению физиологической роли серотонинергических, дофаминергических, глутаматергических, нейронных систем, но и разработке терапевтических стратегий для лечения ряда нейропсихиатрических расстройств [4].

Исследования взаимодействия носителей с использованием микродиализа

Существует много разных способов анализа образцов микродиализа для исследуемых молекул. Образцы могут анализироваться автономно или напрямую с помощью датчиков. Для анализа в автономном режиме определенный объем выборки (обычно 1–20 мкл) собирается во флаконах или пробирках для последующего анализа. Временное разрешение, которое может быть получено в этих экспериментах, обычно определяется скоростью потока микродиализа, восстановлением аналита и чувствительностью аналитического метода. Он-лайн-анализ образцов предлагает несколько потенциальных преимуществ перед автономным анализом. В онлайн-системе этапы сбора, манипулирования, инъекции и анализа образцов интегрированы в плоское устройство непрерывным, оптимизированным способом. Поэтому проблемы, связанные с обработкой объемов субмикролитера образца (потеря образца, неправильная маркировка, испарение и поверхностное натяжение), а также деградация образца, которая может возникать при воздействии образца на воздух (например, аскорбиновая кислота и катехоламины) можно избежать. Такие системы обычно способны манипулировать и анализировать объемы проб субмикролитера, которые позволяют проводить анализ высокого временного разрешения и близкие к данным в реальном времени данные, которые обеспечивают немедленную обратную связь с исследуемым биологическим процессом.

Большинство приложений требуют разделения аналита в образцах диализата до обнаружения. Наиболее часто используемыми методами разделения являются жидкостная хроматография, и электрофорез (в капиллярном или в формате микрочипа). Также могут быть использованы различные методы обнаружения, включая ультрафиолетовое, флуоресцентное, электрохимическое и масс-спектрометрическое обнаружение. Жидкостная хроматография (ЖХ) является наиболее часто используемым аналитическим методом для разделения аналитов, присутствующих в образцах микродиализа. Метод обнаружения, используемый

для ЖХ-анализа, зависит от интересующего аналита. Ультрафиолетовое обнаружение популярно для обнаружения лекарств во время фармакокинетических исследований [5]. Электрохимическое обнаружение используется для обнаружения катехоламинов и других окислительно-активных соединений, представляющих биологический интерес, таких как тиолы и ароматические амины. Обнаружение флуоресценции также было популярным, но обычно требует дериватизации аналитов перед анализом. Наконец, масс-спектрометрия (МС) становится все более популярной для внелинейного анализа образцов микродиализа после жидкостного хроматографического разделения.

Капиллярный электрофорез особенно привлекателен для анализа образцов микродиализа, поскольку он имеет очень низкие требования к объему образцов (нанолитры для пиколитов) и может выполнять чрезвычайно быстрое разделение. Могут использоваться различные детекторы, в том числе ультрафиолетовые, лазерные; индуцированная флуоресценция, электрохимическая (амперометрическая и проводимость).

За последнее десятилетие электрофорез в микрочипе превратился в привлекательную аналитическую платформу для онлайн-анализа образцов микродиализа. Например, у устройств Microchip есть как минимум два основных преимущества: очень быстрое разделение на кристалле для мониторинга быстрых биохимических процессов и миниатюризации системы в экспериментах на животных.

Помимо аналитических подходов, основанных на разделении, существуют также несепарационные методы для биоанализа образцов микродиализата. Биосенсоры представляют собой аналитические устройства с элементом биологического распознавания, которые генерируют электрический сигнал в ответ на биологические изменения. Идеальный биосенсор должен быть способен выполнять непрерывный и надежный мониторинг аналита из сложных жидкостей организма в течение значительного периода времени. Существует много типов биосенсоров. Большинство из них основаны на ферментах и используют либо электрохимическое, либо оптическое детектирование.

Другим аналитическим подходом «без разделения» является иммунологический анализ. Иммуноанализы используются после отбора образцов микродиализа для измерения пептидов и некоторых лекарственных веществ в данных образцах.

Микродиализ обнаруживает преимущества окончательной идентификации аналита на основе молекулярной массы, а также

чувствительности к обнаружению низких концентраций аналита (ов), часто присутствующих в образцах микродиализа. Например: нейропептиды присутствуют при наномолярно-пикомолярных концентрациях во внеклеточной жидкости головного мозга. Кроме того, восстановление пептидов через диализную мембрану, как правило, значительно ниже, чем восстановление более мелкого молекулярного веса нейромедиатора, генерируя чрезвычайно разбавленные образцы аналита.

Восстановление анализа является очень важным параметром при отборе и биоанализе микродиализа. При типичных расходах, используемых при отборе образца (от 1 до 5 мкмоль/л), недостаточно времени для полного уравнивания между перфузатом и окружающей средой, и поэтому концентрация аналита в перфузате отражает только процент от общего количества, присутствующего во внеклеточном пространстве или образце.

Восстановление определяется как отношение концентрации диализата к фактической концентрации в тканях. Для соединений, которые присутствуют при очень низких концентрациях во внеклеточной жидкости, одним из способов уменьшить зависимость анализа от чувствительности аналитического метода является увеличение выздоровления.

Это может быть достигнуто за счет уменьшения расхода или путем добавления вещества (бета-циклодекстрина, бычьего сывороточного альбумина и т. д.) к перфузату, который имеет сильное сродство к представляющему интерес соединению.

Микрофлюидика

Микрофлюидика – многообещающая и быстро развивающаяся междисциплинарная область исследований, изучающая течение жидкости в микроканалах. Она особенно востребована в химии и биомедицинских исследованиях, где возникает необходимость провести химический синтез малых доз вещества или выполнить разделение частиц биоматериала.

Микрофлюидика лежит в основе так называемых лабораторий на чипе – миниатюрных приборов, позволяющих осуществлять многостадийные химические процессы, включающие химические реакции, перемешивание, концентрирование и сепарацию на одном чипе размером с маленькую монетку. Такие системы перспективны не только в качестве микрореакторов в синтетической химии, но и в качестве портативных аналитических устройств, например, для диагностики онкологических и инфекционных

заболеваний. Лаборатория на чипе является одним из самых востребованных методов микрофлюидики [6].

Микрофлюидная система (МФС) представляет собой многослойную конструкцию, состоящую из нескольких материалов, например ПММА – ПДМС. Топология и конструкция микрочипа для исследования биологических объектов определяются теми операциями, которые планируется реализовать на чипе. В простейшем случае микрофлюидный чип представляет собой конструкцию из двух герметично соединённых пластин: на одной пластине формируются микроканалы, реакторы, клапаны, электрод и другие функциональные элементы, другая пластина – защитная.

Важным моментом в обеспечении работы микрофлюидного устройства является организация движения потоков жидкости по микроканалам. В общем случае способы и методы управления движением частиц и потоков в микрофлюидных устройствах можно классифицировать, исходя из природы воздействующего поля, побуждающего движение потоков частиц: силовые поля (давление, разрежение, гравитация, центробежные силы и др.); электрические постоянные (электроосмос, электрофорез) и переменные поля (диэлектрофорез, электроротации и т.д.); электромагнитные поля (фотофорез, оптофорез, электромагнитофорез, оптический пинцет); магнитные поля (магнитофорез и т.д.); ультразвуковые поля.

Традиционными материалами для микрочиповых устройств являются кремний, кварц и стекло. Оптические характеристики и электропроводность кремния несколько ограничивают его применение в микрофлюидных чипах. Кварц и стекло являются оптически прозрачными в широкой области спектра, что позволяет применять оптические методы детектирования. В последнее время наметилась устойчивая тенденция использования полимерных материалов, таких как полидиметилсилоксан, поликарбонат, полиметилметакрилат, полиэтилентерефталат, полиимид, полимер SU-8 и т.д.. Полимеры получили широкое распространение благодаря низкой себестоимости и относительно низкой стоимости при массовом производстве. Более простыми являются и способы герметизации полимерных пластин. Но тем не менее кремний и стеклянные материалы остаются востребованными при создании микроаналитических систем, в отношении которых предъявляются повышенные требования к метрологическим характеристикам.

Жидкости, заключенные в микрожидкостную среду, взаимодействуют с несколь-

кими физическими эффектами, которые приводят к вариантам физических свойств жидкостей, движущихся по большим каналам. Микрофлюидикам удалось использовать различия, существующие между жидкостями, текущими в макромасштабе и движущимися через микроканалы, что позволяет выполнять методы и эксперименты, которые невозможны в макромасштабе.

В типичном низком режиме Рейнольдса с микрофлюидикой вязкие силы перегружают инерционные силы и жидкости, принимая ламинарный поток. Этот факт имеет важные последствия и составляет основу многих технологий на основе микрофлюидики.

Перемешивание жидкости в микрожидкостном режиме происходит через диффузию, что приводит к длительному времени смешивания.

Применение метода микрофлюидики

Микрофлюидика как метод нашла своё применение и экспериментальной и аналитической эмбриологии.

Микрофлюидные устройства предоставляют возможность выполнять эксперименты, которые практически невыполнимы другими подходами. Такие устройства позволяют автоматизировано, быстро, надёжно и правильно размещать много живых эмбрионов на подложке для параллельного конфокального сканирования, отсортировать их, или инъецировать их различными агентами. Такие устройства позволяют, в частности, создавать контролируемые градиенты параметров микроокружения вдоль ряда развивающихся эмбрионов или, даже, скачок параметров в пределах микроокружения одного эмбриона, так что головная половина находится в других условиях по сравнению с хвостовой (при непрерывном сканировании). Такие подходы находят применение как в академических исследованиях функций генных ансамблей контроля раннего развития включая проблемы устойчивости ранних паттернов к возмущениям, так и в тест-системах для скрининга химических агентов на развивающихся эмбрионах [7].

Две особенности типичного микроустройства для работы с эмбрионами – это его интеграция с системой микроскопирования (обычно как компонента автоматизированного микроскопного столика) и технические решения, обеспечивающие успешное манипулирование именно с такими необычными микрообъектами как живые эмбрионы (обеспечение их кислородом, прежде всего).

Микрофлюидные устройства были разработаны для управления микросредой,

в которую помещен эмбрион, для того, чтобы локальными возмущениями в пространстве (локализованные изменения микроокружения эмбриона) и/или пульсами во времени воздействовать на индивидуальное развитие. Перспективная цель подобных разработок – масштабные автоматизированные эксперименты со многими развивающимися эмбрионами параллельно (и так чтобы эмбрионы были на близких этапах развития).

Также распространенным вариантом применения микрофлюидики является секвенирование и амплификация нуклеиновых кислот. Например, когда имеется ограниченное количество ДНК, особенно когда анализируется биологический материал из образцов человека. Это справедливо, и тогда, когда, например, будут рассмотрены циркулирующая бесклеточная фетальная ДНК в материнской крови или мутантная ДНК в редких циркулирующих опухолевых клетках. Подобные ограничения также обнаруживаются в судебных приложениях из-за небольшого количества биологического материала, который может быть извлечен из некоторых образцов места преступления. В этой перспективе были предприняты усилия по разработке более чувствительных методов обнаружения нуклеиновых кислот, способных непосредственно трансдуцировать процессы гибридизации из ограниченных биологических образцов. Именно по этой причине ключевым этапом в протоколах обнаружения нуклеиновых кислот является амплификация последовательности – мишени. Усиление генерирует большое количество целевых копий, что значительно повышает чувствительность к анализу. Наиболее широко применяемые процедуры амплификации используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на основе полимеразной активности для направленной на праймер амплификации. Однако, несмотря на многочисленные

преимущества, ПЦР имеет и недостатки, которые привели к разработке альтернативных методов амплификации. По сравнению с методами ПЦР методы изотермической амплификации, не требуют какого-либо термоциклирования, легче работают и требуют меньше энергии, чем ПЦР-методы, которые вместо этого требуют быстрых ступеней нагрева и охлаждения. Эти функции значительно упрощают реализацию изотермического усиления в диагностических устройствах с точки зрения ухода. Кроме того, использование полностью закрытых микроструктурированных устройств, в которых выполняется изотермическая амплификация, снижает риск загрязнения образца и подразумевает низкое потребление проб, мультиплексный анализ ДНК, интеграцию и портативные устройства.

Список литературы

1. Изучение влияния острой алкогольной интоксикации на поведенческую активность крыс в тесте «Открытое поле» / А.А. Лунев, Д.В. Степанникова, З.А. Ахмедова, С.А. Харин, М.В. Букатин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 1. – С. 116.
2. Nesbitt K.M., Jaquins-Gerstl A., Skoda E.M., Wipf P., Michael A.C. Pharmacological Mitigation of Tissue Damage during Brain Microdialysis // Anal Chem. – 2013. – № 85. – P. 17.
3. Шумейко В.К. Влияние слабоалкогольных энерготоников на репродуктивное поведение грызунов / Шумейко В.К., Качурин А.С., Букатин М.В. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 1. – С. 118–119.
4. Петриков С.С., Голубев Б.А., Солодов А.А., Титова Ю.В. Использование тканевого микродиализа в нейрохирургии // Нейрохирургия. – 2012. – № 3. – С. 50–51.
5. Уайтсайде Г.М. Истоки и будущее микрофлюидики / Природа, 2006. – С. 48.
6. Занавескин М.Л., Миронова А.А., Попов А.М. Микрофлюидика и ее перспективы в медицине // Молекулярная медицина. – 2012. – № 5. – С. 9–16.
7. Дмитриенко Д.В. Микрофлюидика dolomite для решения биотехнологических задач. // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни»: материалы конференции, 2014. – С. 15–17.