

«Клетка» ДЛЯ КЛЕТОК

Ученые из Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Института физики полупроводников им. В.А. Ржанова СО РАН (Новосибирск) разработали новый метод выделения редких популяций клеток из крови и других биологических образцов, основанный на использовании микроканальных кремниевых матриц

Методы, позволяющие быстро и незатратно выделять популяции жизнеспособных клеток из тканей и биологических жидкостей, востребованы в областях клеточной биологии, иммунологии и онкологии. Особый интерес они представляют для малоинвазивной медицинской диагностики, в частности, для выделения из крови таких редких циркулирующих клеток, как клетки опухолей у онкобольных или клетки плода у беременных женщин. Цитогенетический анализ хромосом таких клеток позволяет не только получать информацию о причинах онкотрансформации клеток и детектировать патологии развития плода, но и получать принципиально новые диагностические данные (например, о метастатическом потенциале, генетическом профиле и лекарственной устойчивости раковых клеток).

В обычных клеточных сортерах клетки поодиночке проходят через измерительное окно, где детектируется светорассеяние или флуоресценция, а затем клетки сортируют на основе этих данных. В последнее время для клеточной сепарации все чаще предлагается использовать микрофлюидные устройства. Такие приборы, изготавливающиеся, как правило, способом фотолитографии, представляют собой структуру с системой микроканалов, устройством для подачи и контроля расхода жидкости и клеточным детектором.

Новые технологии обработки кремниевых материалов, применяемые в микроэлектронике, позволяют сегодня получать принципиально новые пористые структуры – микроканальные кремниевые матрицы (МКМ), которые можно использовать как уникальные мембраны в исследованиях в области современной молекулярной и клеточной биологии.

Технология получения МКМ позволяет с высочайшей точностью контролировать пористость, форму и размеры сечения сквозных микроканалов (период ячейки 4–30 мкм), а также их длину (от десятков

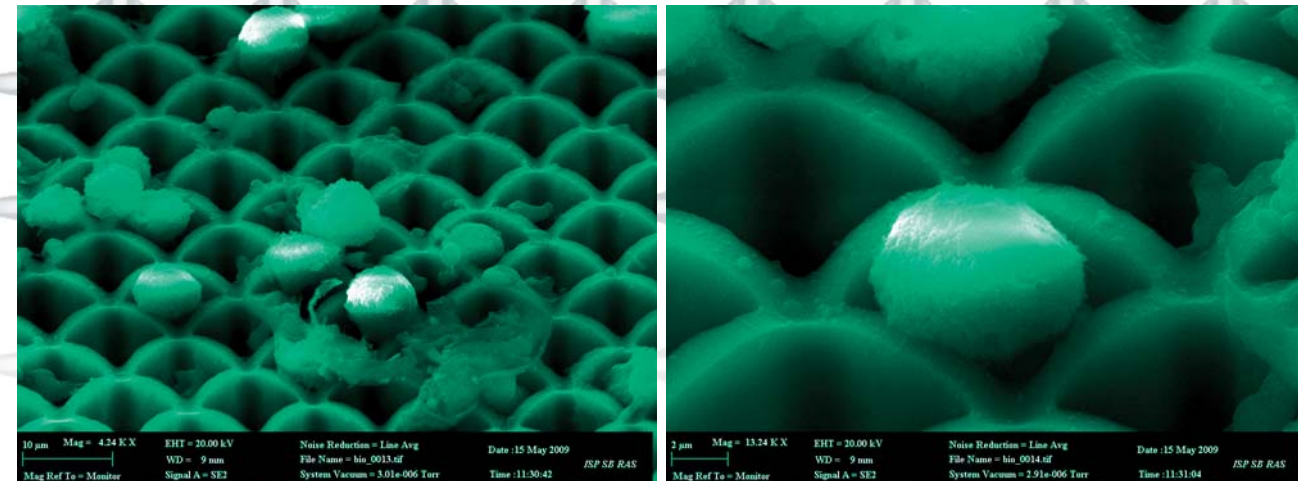
Ключевые слова: клеточная сепарация, минорные популяции клеток, микроканальные кремниевые матрицы
Key words: cell separation, minor cell population, silicon microchannel matrix

до сотен мкм). Поверхность таких матриц, состоящая из окиси кремния, дает возможность иммобилизовать на стенках микроканалов специфические лиганды – вещества, играющие роль своеобразных «якорей». Проточные устройства на основе наборов МКМ с разными структурными характеристиками позволяют выделить из гетерогенных клеточных пулов редкие клетки-мишени, представляющие интерес для исследования или медицинской диагностики.

В ИФП СО РАН созданы микрофлюидные системы на основе микроканальных кремниевых матриц и подобраны оптимальные гидродинамические условия сепарации клеток. МКМ изготавливаются по разработанной в институте уникальной технологии, основанной на анодном травлении пластин из монокристаллического кремния. Такой способ изготовления позволяет получать по всей площади матрицы сквозные каналы одинакового сечения и с параллельными стенками, имеющими высокий класс чистоты поверхности. Матрицы отличаются высокой степенью пористости, а в силу особенностей процесса изготовления каналы расширяются по направлению к входной поверхности, что дополнительно увеличивает ее пористость и уменьшает сопротивление потоку жидкости.

По оценочным данным при скорости потока до 20 мл/мин (через матрицу диаметром 8 мм) в каналах МКМ формируется ламинарный неравномерный поток, благодаря чему клетки испытывают минимальный «стресс». С другой стороны, при такой скорости потока клетки размером 2 мкм по крайней мере один раз сталкиваются со стенками канала и могут взаимодействовать с адсорбированными там лигандами к клеточным рецепторам.

Экспериментальная оценка гидродинамических условий протекания клеточной суспензии через МКМ показала, что основное сопротивление потоку оказывает не сама матрица, а капилляры, через которые подаются клетки. Выяснилось, что перепад давления в 30 мм водного столба оптимален для их размер-селективного разделения, т.е. клетки, диаметр которых не намного больше эффективного радиуса канала, не продавлива-



Онкотрансформированные клетки *HeLa* на поверхности микроканальной матрицы с периодом ячейки 10×10 мкм. Сканирующая электронная микроскопия. ЦКП «Наноструктуры» при ИФП СО РАН им. В.А. Ржанова

ются через матрицу, а остаются над ней. Такие условия сепарации не влияют на целостность клеточных мембран и общую жизнеспособность клеток.

Удивительной особенностью МКМ оказалась их способность «фильтровать» цельную кровь, представляющую собой необычный «раствор», наполовину состоящий из клеточного материала, который крайне трудно продавить даже через поры, намного превышающие размер обычного эритроцита диаметром около 7 мкм. Таким образом, параллельность и «гладкость» стенок, а также высокая пористость поверхности МКМ делают эти структуры уникальными клеточными фильтрами.

С помощью многоканальных матриц клетки можно разделять по двум характерным признакам: размеру и строению поверхности. Например, раковые клетки эпителиального происхождения, как правило, больше по размеру клеток крови. Кроме того, эти клетки и циркулирующие в материнской крови мелкие плодные клетки несут на своей поверхности специфические белки-рецепторы, отсутствующие на поверхности нормальных клеток крови. Зафиксировав на поверхности каналов МКМ специфические антитела к таким рецепторам, можно «заякорить» нужные клетки в каналах матрицы, и, после отмывки, собрать их.

Чтобы присоединить антитела к матрице, ее поверхность нужно функционализировать – ввести химически активные или маркер-специфичные группировки. В ИХБФМ СО РАН были разработаны методы функционализации поверхности МКМ, а также определены условия ковалентного присоединения антител к поверхности матрицы.

Для оценки эффективности работы подобных структур было проведено исследование по выделению цир-

кулирующих раковых клеток из крови больных раком молочной железы (наличие их является признаком возможного метастазирования), а также эмбриональных клеток из крови матери. С помощью МКМ из крови 5 из 7 больных раком молочной железы на поздней стадии были выделены циркулирующие клетки опухолей. В крови беременных (на 6–7 месяце) плодные клетки были обнаружены лишь в 3-х образцах из 8. Вероятно, что высокая эффективность выделения раковых клеток связана с тем, что они «фиксировались» на матрице не только при помощи антител, но и за счет большого размера, а эффективность выделения мелких плодных клеток определялась только качеством используемых коммерческих антител.

Тем не менее, эти результаты демонстрируют, что устройства на основе МКМ могут быть использованы для клеточной сепарации. Этот метод, не требующий специального дорогостоящего оборудования, в перспективе должен найти применение в практической медицинской диагностике.

Литература

Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S. et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology // *Nature*. 2007. V. 450. P. 1235–1239.

Романов С.И., Пышный Д.В., Вандышева Н.В. и др. Кремниевая микроканальная матрица для биочиповых технологий // *Нано- и микросистемная техника*. 2007. № 9. С. 55–61.

К.б.н. П.П. Лактионов, к.х.н. Д.В. Пышный (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), к.ф.-м.н. С.И. Романов (ИФП СО РАН, Новосибирск)