

На правах рукописи



БУКАТИН Антон Сергеевич

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ С  
МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ МИКРО И НАНОРАЗМЕРНЫМИ  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОК

Специальность:

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2013

**Работа выполнена** в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего профессионального образования и науки Санкт-Петербургском Академическом университете – научно-образовательном центре нанотехнологий Российской академии наук (СПб АУ НОЦНТ РАН) и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)

**Научный руководитель:**

кандидат технических наук, доцент, заведующий лабораторией «Информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем» ИАП РАН

Евстрапов  
Анатолий  
Александрович

**Официальные оппоненты:**

доктор физико-математических наук,  
старший научный сотрудник ИАП РАН  
кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник ФТИ им. Иоффе РАН

Горай  
Леонид Иванович  
Нащекин  
Алексей Викторович

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", Химический факультет

**Защита состоится 28 июня 2013 г. в 15.00** на заседании диссертационного совета Д002.034.01 на базе ИАП РАН по адресу 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31/33.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26.

Автореферат разослан

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор физико-математических наук



А.Л. Буляница

### **Актуальность темы**

Микрофлюидные устройства, построенные на платформе «Lab-on-a-Chip», являются наиболее подходящими устройствами для проведения исследований клеток в нативном состоянии, поскольку интеграция различных функциональных элементов в микрофлюидный чип (МФЧ), являющийся ключевым компонентом устройства, позволяет проводить в нем необходимые операции пробоподготовки, сортировки, фиксации, лизиса, электрохимического и оптического детектирования клеток и их компонентов. Исследование клеток обычно проводится в несколько этапов, на которых оцениваются их геометрические размеры, механические свойства, биоэлектрическая активность, содержание и состав белков, нуклеиновых кислот. В МФЧ могут быть реализованы все эти этапы, что обеспечит высокую скорость анализа и воспроизводимость результатов из-за возможности точного управления составом клеточной среды в реакционной камере, где располагаются объекты исследования.

Интеграция микроэлектродов в реакционную камеру МФЧ позволит, во-первых, реализовать методики измерения импеданса и биоэлектрических потенциалов клеток для оценки их подвижности, диэлектрической проницаемости и целостности мембраны, режимов функционирования ионных каналов и межклеточной сигнализации (для нейронов и кардиомиоцитов). А во-вторых, за счет взаимодействия с неоднородным электрическим полем, создаваемым микроэлектродами (явление диэлектрофореза (ДЭ)) возможно управление движением и расположением клеток в реакционной камере, что может быть использовано для проведения исследований отдельных клеток. Однако не решенной проблемой является длительное культивирование клеток в МФЧ в связи с необходимостью обеспечения эффективной доставки питательных веществ и минимизации утечки сигнальных молекул (факторов роста), регулирующих рост клеток.

После выделения и фиксации клеток в МФЧ в некоторых случаях проводится их лизис с целью выделения белков или нуклеиновых кислот, для

детектирования которых могут быть использованы методы флуоресцентного и рамановского анализа. Повышение чувствительности этих методов может быть осуществлено за счет эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в металлических наночастицах. Использование наночастиц разного состава, размеров и формы позволяет настраивать длину волны ППР в зависимости от энергетического спектра анализируемых молекул. При упорядоченном расположении наночастиц их радиационное взаимодействие между собой может приводить к появлению дополнительных эффектов, использование которых позволит расширить возможности ППР для анализа биологических молекул. Такой подход требует проведения теоретических и экспериментальных исследований влияния этих эффектов на спектральное положение области возбуждения ППР.

Таким образом, актуальными остаются как разработка новых принципов и методов исследования клеток в МФЧ, так и повышение чувствительности оптического детектирования биомолекул, входящих в их состав. И то, и другое может быть осуществлено путем внедрения металлических микро- и наноструктур в МФЧ. Для решения этих проблем на основании проведенного анализа литературных данных были сформулированы цель и задачи работы.

### **Цель работы**

Проведение теоретических и экспериментальных исследований для разработки микрофлюидного устройства с металлическими функциональными элементами (микроэлектродами, наночастицами) для изучения клеток в нативном состоянии и анализа их компонентов (белков, нуклеиновых кислот).

### **Основные задачи**

— Численное моделирование процессов конвекционно-диффузионного массопереноса в МФЧ и оптимизация геометрических размеров реакционной камеры для управления составом клеточной среды в реакционной камере МФЧ и обеспечения эффективной доставки питательных веществ и минимизации утечки факторов роста при длительном культивировании и изучении клеток.

- Численное моделирование распределения электрических полей, создаваемых микроэлектродами при реализации ДЭ для позиционирования клеток в реакционной камере МФЧ.
- Теоретическое и экспериментальное исследование особенностей возбуждения ППР в упорядоченных массивах металлических наночастиц для оптического детектирования биомолекул.
- Изготовление экспериментальных образцов МФЧ, создание интегрированного микрофлюидного устройства для проведения экспериментальных исследований.
- Экспериментальные исследования и апробация МФЧ с использованием полимерных микрочастиц и клеток млекопитающих для проверки результатов теоретических исследований и численного моделирования.

#### **Научная новизна**

- В работе впервые предложена и с помощью численного моделирования процессов массопереноса обоснована конфигурация и оптимизированы геометрические размеры реакционной камеры микрофлюидного чипа с двухуровневой системой подводящих микроканалов, позволяющего культивировать адгезионные и суспензионные клетки, а также проводить их исследования методами оптической микроскопии.
- Впервые предложено использовать область диффузионного размытия веществ для оценки влияния состава среды на физиологическую активность клеток в зависимости от концентрации активного вещества (например, глюкозы, гормонов, лекарств)
- С помощью метода связанных диполей впервые исследованы особенности возникновения ППР в упорядоченном массиве металлических наночастиц сфероидальной формы. Адекватность использованного подхода подтверждена корректностью решения для предельного случая сферических наночастиц.
- Впервые экспериментально исследованы спектральные свойства коэффициента отражения двумерных упорядоченных массивов металл-

углеродных нановискеров. Подтверждено, что для возбуждения ППР требуется покрытие нановискеров пленкой металла (золота).

- Предложена конструкция микрофлюидного устройства для анализа клеток, впервые совместившая потенциометрическую сенсорную систему на основе мультиэлектродной матрицы (МЭМ) и микрофлюидную систему жизнеобеспечения, значительно расширяющего возможности исследования клеток в нативном состоянии.

### **Практическая значимость**

- Предложенные конструкции МФЧ с планарной и трехмерной реакционной камерой предназначены для изучения физиологической активности клеток в зависимости от состава клеточной среды и концентрации активных веществ.
- Разработаны и созданы прототипы микрофлюидного устройства, содержащего МЭМ и МФЧ для исследования принципов функционирования нейрональных культур и построения нейроаниматов.
- Интегрирование ДЭ ловушек в МФЧ позволяет упорядочить расположение клеток в реакционной камере и перейти к анализу отдельных клеток, необходимому для более детального их исследования и разработки новых методов лечения и лекарственных препаратов.
- Использование упорядоченного массива сфероидальных металлических наночастиц позволяет изменять длину волны возбуждения ППР в зависимости от поляризации падающего излучения, что применяется для проведения мультифлуоресцентного анализа смеси биомолекул.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Обоснование отношения глубины к диаметру реакционной камеры микрофлюидного чипа порядка 1, оптимального для культивирования клеток с точки зрения эффективности доставки питательных веществ и минимизации утечки факторов роста.
2. Эффект появления дополнительных резонансных длин волн возбуждения поверхностного плазмонного резонанса в упорядоченных массивах

металлических сфероидальных наночастиц, связанный с распространением по массиву плазмонной волны.

3. Применимость метода жидкостного травления и «взрывной» литографии для изготовления трехмерных микроэлектродов конической формы высотой 1.5 – 2.5 мкм с диаметром нижнего основания 4 – 16 мкм, интегрированных в стеклянный МФЧ для исследования биоэлектрических потенциалов клеток.
4. Эффект фиксации группы клеток (< 20 штук) в микрофлюидном чипе с диэлектрофоретической ловушкой с квадрупольной конфигурацией электродов, расстояние между которыми составляет 50 мкм, при приложении последовательности прямоугольных импульсов амплитудой 9В и длительностью 4 мкс в фосфатно-солевом буферном растворе.

#### **Апробация работы**

Основные результаты докладывались и обсуждались на следующих конференциях, симпозиумах и семинарах: 3rd International Conference on Bio-Sensing (Sitges, Spain, 2013); 3rd European Conference on Microfluidics (Heidelberg, Germany, 2012); Международная зимняя школа по физике полупроводников (Санкт-Петербург – Зеленоград, 2012); 4 Всероссийская конференция «Аналитические приборы» (Санкт-Петербург, 2012); International Conference on Materials for Advanced Technologies (Singapore, 2011); European Materials Research Society (Nice, France, 2011), IX Международная конференция «Прикладная оптика» (Санкт-Петербург, 2010)

#### **Публикации**

Основные результаты работы изложены в 12 печатных работах, из них 6 опубликованы в журналах, входящих в перечень ВАК.

#### **Структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы из 123 наименований. Текст диссертации изложен на 144 страницах, содержит 50 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснованы актуальность темы диссертации, ее практическое значение, сформулированы цель и задачи исследования, изложена научная новизна работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** представляет собой аналитический обзор исследований и разработок микрофлюидных устройств для изучения клеток. Рассмотрены основные теоретические положения и методы моделирования в микро- и нанофлюидике, проведен анализ материалов и методов изготовления МФЧ.

Перспективным способом выделения, сортировки и фиксации клеток в МФЧ является использование метода ДЭ, заключающегося в перемещении клеток в неоднородном электрическом поле, создаваемом планарными или трехмерными электродами, интегрированными в микрочип. При исследовании подвижности и скорости деления клеток может использоваться регистрация их импеданса с помощью планарных электродов, интегрированных в МФЧ. Микроэлектроды также могут применяться для измерения электрического потенциала клеточной мембраны, что используется при исследовании электрической активности нейрональных культур и кардиомиоцитов.

Одним из высокочувствительных методов регистрации белков и нуклеиновых кислот после лизиса клеток является оптическое детектирование с использованием флуоресцентных красителей или рамановского рассеяния. Метод ППР позволяет значительно усилить чувствительность такого детектирования. Подбирая состав, размеры и форму наночастиц можно настраивать ППР на определенный тип биомолекул.

Для исследования процессов массопереноса в МФЧ используются дискретные и непрерывные методы теоретического анализа и компьютерного моделирования. Если характерные размеры элементов превышают 300 нм, то выполняется условие применимости гипотезы сплошной среды (критерий Кнудсена), и численные расчеты могут быть выполнены путем решения системы уравнений Навье-Стокса и конвекции-диффузии методом конечных элементов.



Создание МФЧ для исследования клеток требует применения биосовместимых материалов и использования технологий интеграции микроэлектродов, металлических наночастиц и других функциональных элементов. Стекло и кварц являются основными материалами для изготовления микрочипов, т.к. к ним применимы основные методы микроэлектроники для формирования микро и наноструктур. Полимерные материалы, например, полидиметилсилоксан (ПДМС), в настоящее время находят широкое применение при создании МФЧ, однако при этом используются другие технологические операции, такие как литье и импринтинг.

**Вторая глава** посвящена теоретическому анализу и компьютерному моделированию процессов массопереноса и электрических полей в МФЧ, а также исследованию особенностей возбуждения ППР в упорядоченных массивах сфероидальных наночастиц методом связанных диполей в квазистатическом приближении.

Во вводной части второй главы приведены основные стадии проведения исследований клеток в МФЧ. На первом этапе происходит ввод клеточной суспензии в МФЧ. Далее осуществляется выделение клеток, их гидродинамическое фокусирование и фиксация в реакционной камере МФЧ за счет сил адгезии или ДЭ. После этого, физиологическая активность клеток исследуется методами оптической микроскопии и с помощью микроэлектродов МЭМ. Затем происходит лизис клеток и выделение белков или нуклеиновых кислот. На заключительном этапе исследования происходит оптическое детектирование биомолекул в массиве металлических наночастиц.

С помощью численного решения уравнения Навье-Стокса и конвекции - диффузии методом конечных элементов в 3D модели МФЧ с реакционной камерой и 4-мя микроканалами показано, что течение водоподобной жидкости при расходе 1 мкл/мин происходит при числах Рейнольдса  $Re < 10^{-3}$  (минимальное сечение каналов 200x50 мкм) и является ламинарным. Конвективные процессы массопереноса доминируют над диффузионными, число Пекле  $Pe \sim 10^2$  для малых ионов с коэффициентами диффузии  $D \sim 10^{-5}$

см<sup>2</sup>/с (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>). Поэтому в реакционной камере МФЧ возможно создание стабильных концентрационных профилей веществ (см. рис. 1). Ширина области диффузионного перемешивания определяется скоростью течения жидкости. Заполняемость камеры при вводе веществ через противоположные каналы (рис. 1а), а также ширина области гидродинамического фокусирования (рис. 1б) зависят от соотношения между расходами жидкостей степенным образом ( $\sim x^\alpha$ ),  $\alpha = 0.37 \pm 0.01$  и  $\alpha = 0.46 \pm 0.01$  соответственно. В главе показано, что максимальное расхождение расчетной ширины области гидродинамического фокусирования, полученной на основе 2D и 3D моделирования, составляет 32%

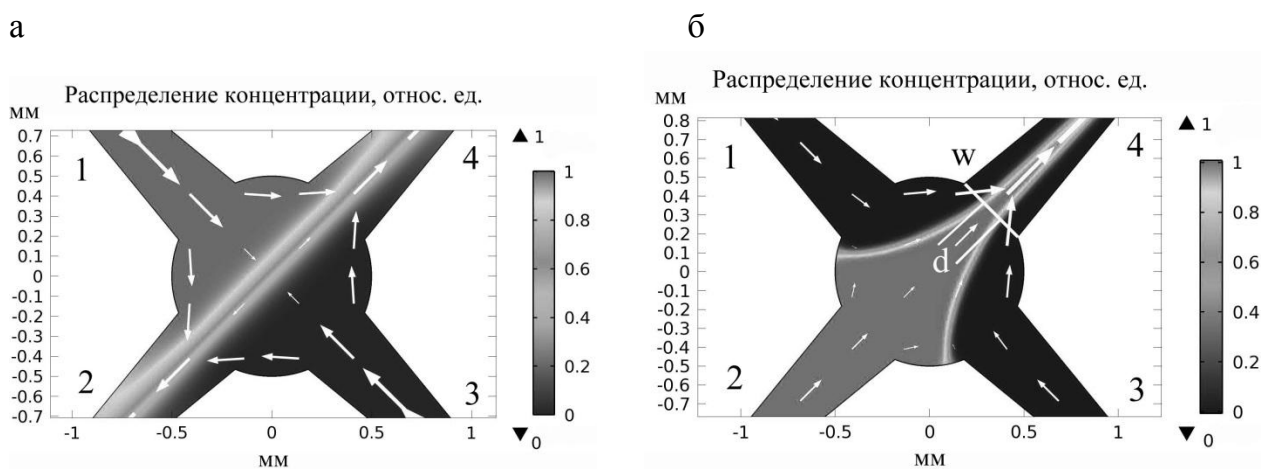


Рисунок 1. Распределение концентрации вещества с  $D=10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с в МФЧ: а) при оппозитной подаче веществ с расходами 0.1 мкл/мин, б) в режиме гидродинамического фокусирования, расходы веществ 5.1 мкл/мин.

В процессе жизнедеятельности клетки выделяют особые пептидные или гормональные сигнальные молекулы (факторы роста), стимулирующие рост, деление и/или дифференцировку живых клеток. В связи с тем, что коэффициент диффузии у факторов роста ( $\sim 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с) больше, чем у питательных веществ (смеси солей, аминокислот и витаминов) в  $\sim 100$  раз, глубину реакционной камеры можно оптимизировать для накопления факторов роста у дна камеры и диффузионной доставки к клеткам питательных веществ. Результаты моделирования показали, что при отношении глубины реакционной камеры к ее диаметру  $\sim 1$  (диаметр 1 мм) концентрация питательных веществ в центре камеры на границе монослоя клеток толщиной 20 мкм уменьшается на 5%, а время снижения концентрации факторов роста в 2 раза уменьшается на 10%

при расходе питательной среды 1 мкл/мин (точка экстремума произведения функций). На основании этих результатов предложена конструкция МФЧ с трехмерной реакционной (3D) камерой и двухуровневой системой каналов для длительного культивирования клеток и управления клеточной средой (см. рис. 2). Канал 2 используется для поставки в МФЧ питательной среды в процессе культивирования клеток, а канал 1 для ввода активных веществ.

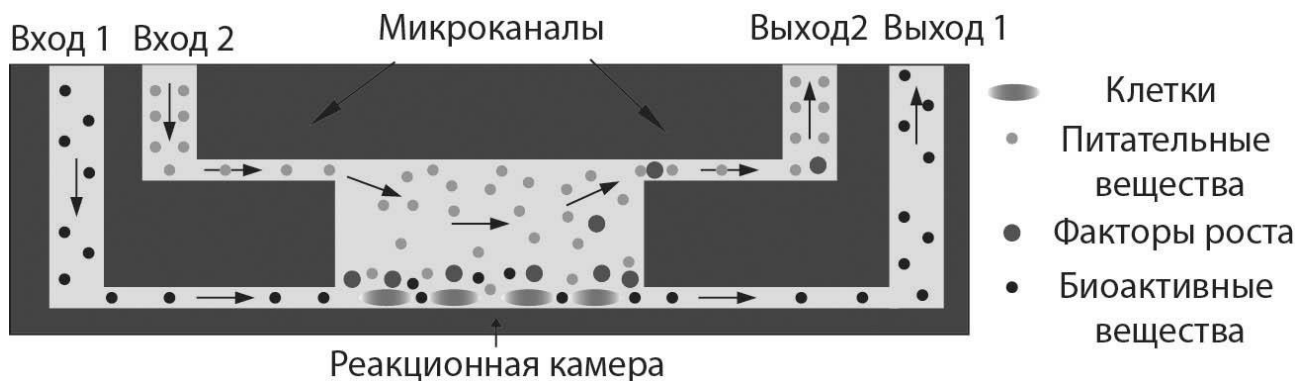


Рисунок 2. Конструкция МФЧ с трехмерной реакционной камерой и двухуровневой системой каналов для длительного исследования клеток в нативном состоянии

Для фиксации индивидуальных клеток методом ДЭ в камере МФЧ исследовано распределение электрических полей в ловушке с квадрупольной конфигурацией микроэлектродов (см. рис. 3).

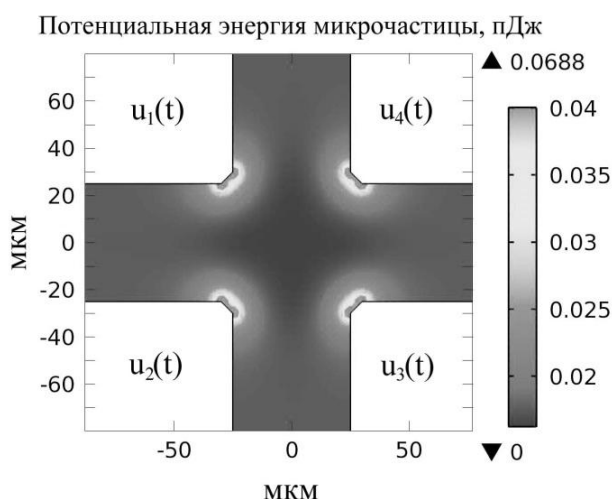


Рисунок 3. Усредненная по периоду потенциальная энергия частицы в ДЭ ловушке. Расчет выполнен для следующих параметров системы:  $u_1(t) = A\cos(\omega t)$ ,  $u_2(t) = A\cos(\omega t + \pi/2)$ ,  $u_3(t) = A\cos(\omega t + \pi)$ ,  $u_4(t) = A\cos(\omega t + 3\pi/2)$ ,  $\epsilon_1 = 78\epsilon_0$ ,  $\epsilon_2 = 2.75\epsilon_0$ ,  $a = 1$  мкм,  $A=7В$ ,  $\omega = 10^5 c^{-1}$

Компьютерное моделирование, основанное на решении уравнения Лапласа методом конечных элементов, показало, что при подаче на микроэлектроды синусоидальных напряжений со сдвигом фаз  $\pi/2$ , в центре

между электродами образуется потенциальная яма, в которой и будет происходить фиксация клеток.

При исследовании особенностей возбуждения ППР в упорядоченных массивах серебряных сфероидальных наночастиц был проведен расчет коэффициента экстинкции системы методом связанных диполей в квазистатическом приближении (см. рис. 4), которое применимо, если размеры частиц много меньше длины волны падающего излучения. Если поляризация падающего света направлена вдоль оси массива, то взаимодействие наночастиц происходит за счет ближнего поля осциллирующих дипольных моментов, в остальных случаях – за счет дальнего поля. В связи с анизотропией наночастиц, условие возбуждения ППР зависит от поляризации падающего излучения. Кроме того, при совпадении расстояния между частицами с длиной волны возбуждения ППР по массиву распространяется плазмонная волна, что выражается в появлении дополнительных резонансных пиков в коэффициенте экстинкции, сдвинутых в длинноволновую область (см. рис. 4б, в).

В заключительной части второй главы проводится обсуждение результатов проведенных теоретических исследований.

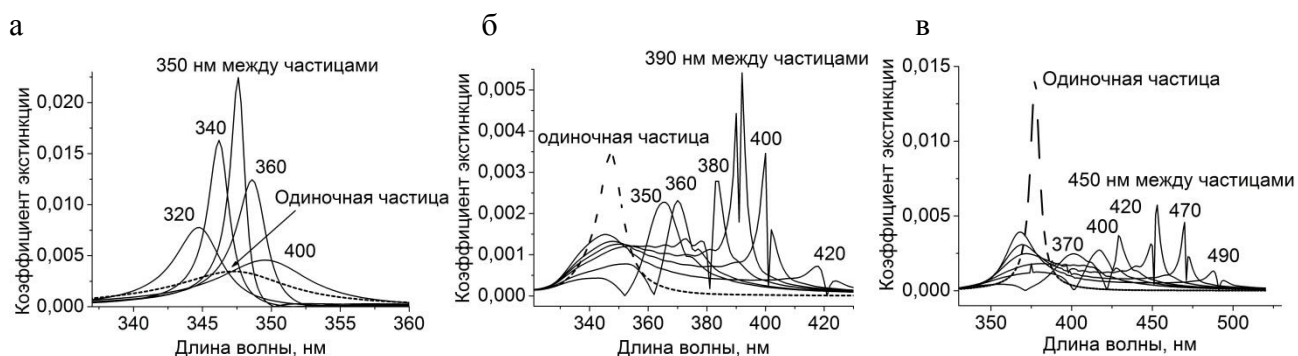


Рисунок 4. Спектральная зависимость коэффициента экстинкции массива из 50 серебряных наночастиц сфероидальной формы с размерами полуосей  $a_1 = a_2 = 22$  нм,  $a_3 = 66$  нм от расстояния между частицами, при поляризации падающего излучения а) параллельном оси массива, б) перпендикулярном оси массива, вдоль оси  $a_2$  сфероида, в) перпендикулярном оси массива, вдоль оси  $a_3$  сфероида.

**Третья глава** посвящена адаптации методов кремниевой микроэлектроники для изготовления стеклянных МФЧ и микрофлюидных устройств.

МФЧ с планарной реакционной камерой и 4-мя микроканалами (см. рис. 5а) был изготовлен на подложке из оптического стекла марки К8 методом фотолитографии и жидкостного травления в буферном растворе плавиковой кислоты (ЗАО «Светлана-полупроводники», СПб). Глубина каналов 50 мкм, ширина 200 мкм, увеличивающаяся до 400 мкм у приемных резервуаров и реакционной камеры, диаметры которых 1 мм. Изготовление МФЧ с ДЭ ловушкой также производилось методом фотолитографии.

Изготовление МЭМ на стеклянных подложках осуществлялось методом «взрывной» литографии. Материал электродов - золото толщиной 100 нм с подслоем хрома толщиной 10 нм, нанесенном для повышения адгезии к стеклу. Диэлектрическое покрытие, закрывающее контактные дорожки –  $\text{SiO}_2$ . Для увеличения площади контакта электрода с клетками предложено использование МЭМ с 3D электродами, при формировании которых проводилось предварительное травление стекла в буферном растворе плавиковой кислоты. Диаметр нижнего основания электродов составил 4, 8 и 16 мкм, высота – 1.5 мкм. Исследование процесса травления показало, что электроды имеют форму многогранных усеченных пирамид (см. рис. 5б). Если радиус нижнего основания меньше глубины травления, то электроды имеют форму неусеченных пирамид.

В кремниевых МЭМ с высокой плотностью электродов сформировано 144 (12x12) микроэлектрода диаметром 2.1 мкм (см. рис. 5в), расстояние между которыми составляет 15 мкм (ОАО «НИИМЭ и Микрон», Зеленоград). Материал электродов – нитрид ниобия, материал диэлектрика –  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .

Для создания массива металлических наночастиц сенсорного элемента на основе ППР в реакционной камере МФЧ использовался метод осаждения металл-углеродных нановискеров под действием сфокусированного электронного пучка в камере растрового электронного микроскопа с применением кристаллических рельефных наноструктур для их характеристики, разработанных в рамках ГК №16.523.12.3005. Этим методом был получен упорядоченный массив нановискеров диаметром ~ 80 нм, высотой

~ 250 нм (см. рис. 5г). Расстояние между ними составляло 200 нм, а общие размеры массива – 15x15 мкм. Для повышения проводимости нановискеров они были дополнительно покрыты слоем золота толщиной 15 нм.

Для герметичного соединения МФЧ со стеклянными защитными пластинами и МЭМ применялось их склеивание с использованием слоя ПДМС толщиной 4.5 мкм, наносимого методом центрифугирования (см. рис. 5а). Перенос слоя на поверхность МФЧ осуществлялся методом «оттиска», что предотвращало попадание клеящего вещества в реакционную камеру и на микроэлектроды. Соединение МЭМ и МФЧ с измерительной электроникой и внешними перистальтическими насосами проводилось с помощью многоконтактного корпуса и микрофлюидного коннектора.

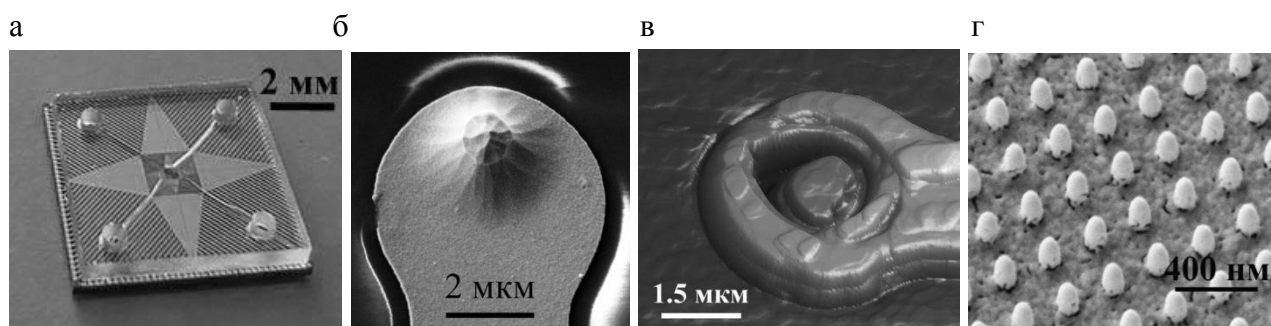


Рисунок 5. Изображения а) МФЧ, соединенного с кремниевой МЭМ слоем ПДМС, б) 3D электрод стеклянной МЭМ, в) электрод кремниевой МЭМ, г) массив металл-углеродных нановискеров.

В заключительной части третьей главы проводится обсуждение результатов проведенных технологических исследований.

**Четвертая глава** посвящена проведению экспериментальных исследований и апробации МФЧ.

Для визуализации потоков жидкости в МФЧ с планарной реакционной камерой использовался раствор флуоресцеина в боратном буферном растворе с концентрацией  $10^{-6}$  М и рН = 9.18 (длина волны возбуждения флуоресценции – 488 нм) и конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (КЛСМ) Leica TCS SL (Германия). Экспериментальные результаты профилей течения жидкостей в МФЧ и гидродинамического фокусирования флуоресцеина хорошо согласуются с результатами компьютерного моделирования (см. рис. 1 и б).

При малых расходах красителя уменьшение ширины области гидродинамического фокусирования происходит быстрее по сравнению с теоретическими расчетами, что может быть связано с особенностями работы перистальтического насоса и сглаживающего пульсации элемента. По ширине области диффузионного размытия красителя была произведена оценка его коэффициента диффузии:  $D \sim 7 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ , что согласуется с литературными данными ( $6.4 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ , P. Galambos et.al, 1998).

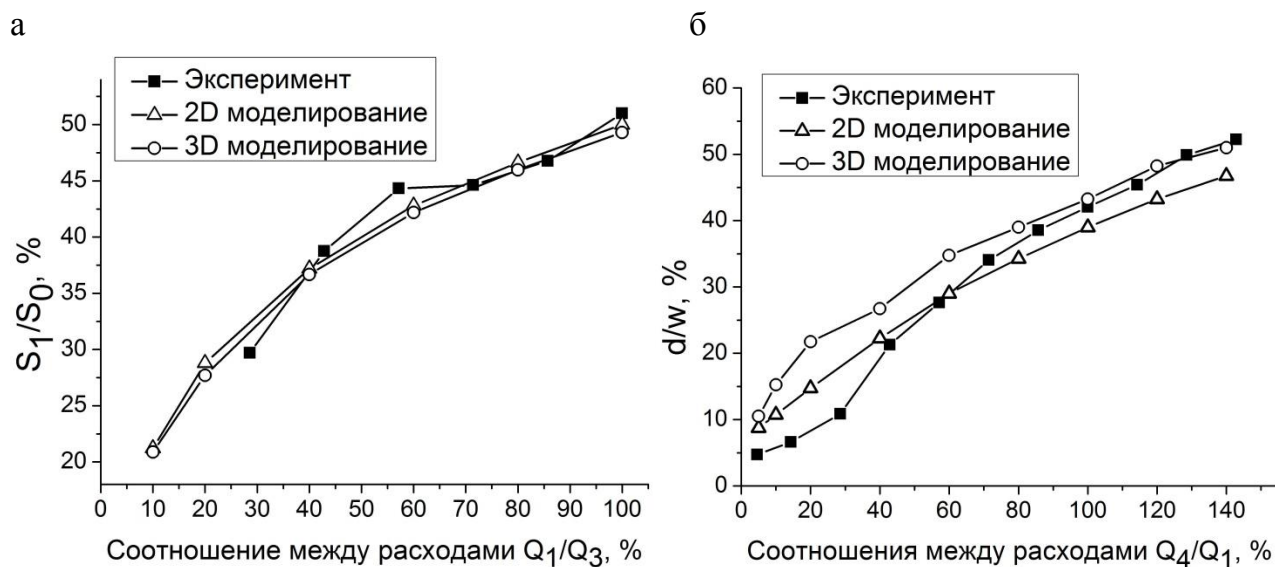


Рисунок 6. а) зависимость площади флуоресцеина  $S_1$  в реакционной камере микрочипа от соотношения между расходами в каналах 1 и 3 (см. рис. 1а). б) зависимость ширины области гидродинамического фокусирования  $d$  в 4-ом канале от соотношения между расходами в каналах 4 и 1, 3 (см. рис. 1а). Данные получены при постоянном потоке буферного раствора 5.1 мкл/мин, визуализация потоков осуществлялась с помощью раствора флуоресцеина на КЛСМ Leica TCS SL.

Апробация МФЧ с планарной реакционной камерой на биологических объектах проводилась с использованием суспензионных клеток K562 хронической миелоидной лейкемии человека. Экспериментальные исследования показали, что силы адгезии клеток K562 к чистому стеклу и стеклу, покрытому полилизинном (poly-L-lysine, Thermo Scientific), недостаточно для их удержания в реакционной камере МФЧ при скоростях жидкости более 0.1 мм/с и при расходах выше 0.1 мкл/мин. Таким образом, для проведения длительных исследований клеток требуется использовать МФЧ с 3D камерой,

поскольку в этом случае скорость течения жидкости у монослоя клеток близка к нулю.

Экспериментальные исследования перемещения микрочастиц в ДЭ ловушках с квадрупольной конфигурацией электродов, интегрированных в МФЧ, проводились с латексными полистирольными частицами диаметром 6 мкм в 0,5% растворе КОН с концентрацией ~500 шт/мкл и с клетками K562 в натрий-фосфатном буферном растворе с проводимостью 1 См/м. На электроды подавались гармонические колебания напряжения амплитудой 10В и частотой 100 кГц со сдвигом фаз  $\pi/2$  друг относительно друга, а также последовательные серии прямоугольных импульсов длительностью 4 мкс и амплитудой 9В. Наличие минимума потенциальной энергии в центре ловушки позволяет фиксировать группы клеток и микрочастиц. Из-за эффекта отрицательного ДЭ клетки, находящиеся в ловушке, отталкиваются от электродов и располагаются над поверхностью микрочипа. Таким образом, клетки на электродах не попадают в фокальную плоскость объектива и неотчетливо отображены на рис. 7а (приведены на вставке). Через некоторое время после снятия сигналов с электродов (~ 5 мин.) упорядоченное расположение клеток в ловушке нарушается (см. рис. 7б).

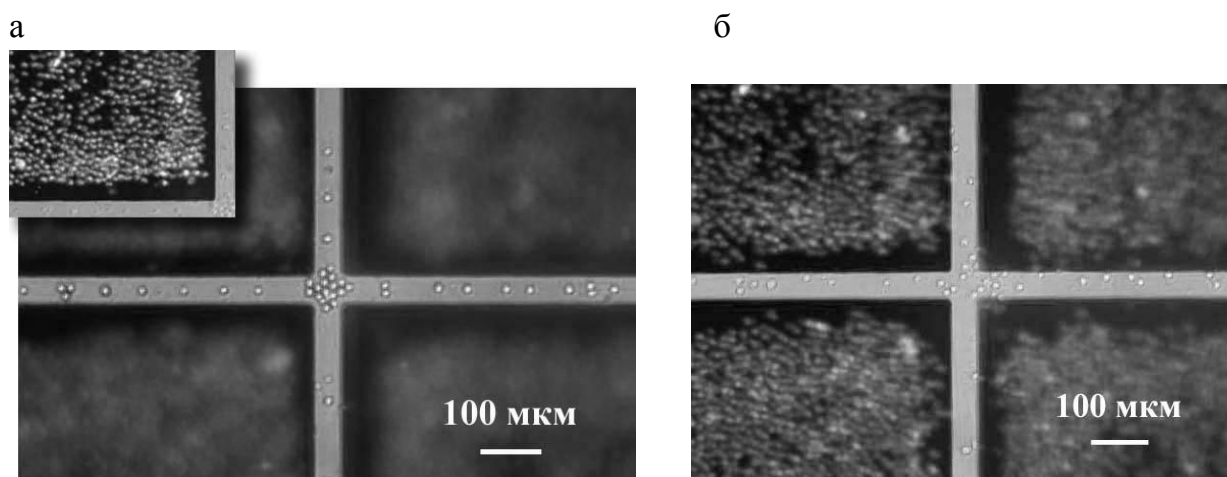


Рисунок 7. Изображения клеток K562 в микрофлюидном чипе вблизи диэлектрофоретической ловушки а) при приложении электрических потенциалов к электродам, б) через 5 мин. после снятия потенциалов с электродов.

Исследование биосовместимости кремниевых МЭМ осуществлялось с помощью адгезионных клеток HeLa карциномы шейки матки человека, которые



высаживались на МЭМ и инкубировались в течение 12 часов. Последующее изучение морфологии клеток показало изменение их формы и образование межклеточных контактов, что свидетельствует о биосовместимости материалов кремниевой МЭМ.

Изучение спектров отражения от двумерного упорядоченного массива наночастиц при различных углах падения света осуществлялось при помощи экспериментальной спектроскопической установки, в качестве источника излучения использовалась кварцевая галогеновая лампа, а регистрация спектров отражения осуществлялась на акустооптическом спектрометре РАОС (НТЦ УП, Россия). Т.к. концентрации свободных электронов в Pt-C нановискерах недостаточно для возбуждения поверхностного плазмонного резонанса, было осуществлено покрытие массива пленкой золота толщиной 15 нм, что привело к появлению особенностей в спектрах отражения, которые на качественном уровне согласуются с результатами компьютерного моделирования одномерных массивов упорядоченных сфероидальных наночастиц (см. рис. 4 и 8). Отсутствие количественного совпадения результатов связано с тем, что моделирование проводилось в приближении сфероидальной формы и однородности состава нановискеров, поскольку их состав и диэлектрическая проницаемость недостаточно изучены.

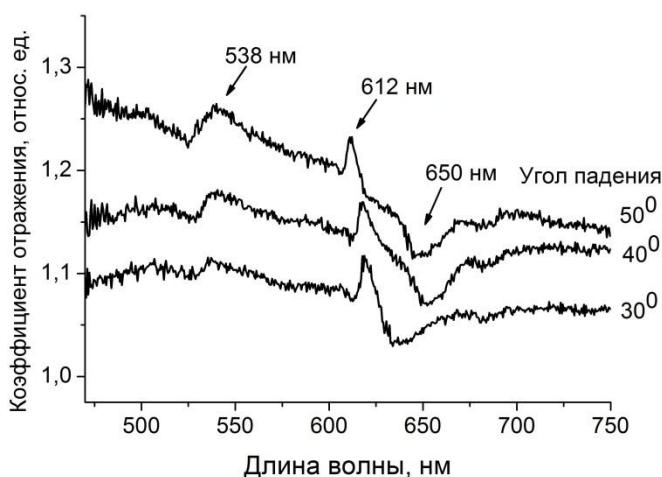


Рисунок 8. Спектр отражения от массива Pt-C нановискеров диаметром 80 нм, высотой 240 нм, выращенных в реакционной камере стеклянного микрофлюидного чипа с золотым напылением толщиной 20 нм и покрытых слоем золота толщиной 15 нм, нормированного на спектр отражения МФЧ без массива нановискеров.

В **заключении** приведены основные результаты работы и выводы:

- Показана возможность создания стабильных концентрационных профилей веществ в реакционной камере МФЧ, область диффузионного размытия

которых определяется скоростью течения жидкостей, что может быть использовано для исследования воздействия активных веществ на физиологическую активность биологических объектов.

- Определено оптимальное аспектное соотношение ( $\sim 1$ ) реакционной камеры МФЧ для культивирования клеток в течение длительного времени, при котором обеспечивается возможность эффективной доставки питательных веществ и минимизируется утечка факторов роста.
- Продемонстрировано наличие минимума потенциальной энергии в центре ДЭ ловушки с квадрупольной конфигурацией электродов при изменении их потенциалов путем приложения гармонических колебаний напряжения со сдвигом фаз  $\pi/2$  или прямоугольных импульсов, что позволило зафиксировать отдельные полимерные микрочастицы и группу клеток K562 для проведения исследований индивидуальных объектов.
- Продемонстрировано, что методами фотолитографии, жидкостного травления и «взрывной» литографии возможно создание стеклянных мультиэлектродных матриц с планарными и трехмерными электродами в форме усеченных и неусеченных многогранных пирамид с диаметром нижнего основания 4 – 16 мкм и высотой 1.5 мкм, которые могут использоваться в качестве потенциометрического сенсорного элемента для изучения клеток.
- Подтверждена эффективность использования метода «оттиска» при склеивании стеклянных МФЧ со стеклянными защитными пластинами и кремниевыми МЭМ с помощью тонкого слоя ПДМС, позволяющего осуществлять их герметичное соединение и не допускать попадания клеящего вещества в реакционную камеру и на микроэлектроды, что используется для создания интегрированных микрофлюидных устройств.
- Результаты экспериментальных исследований показали, что кремниевые МЭМ с электродами из нитрида ниобия и диэлектрическим покрытием из  $\text{Si}_3\text{N}_4$  являются биосовместимыми для клеток HeLa, что позволяет использовать их для регистрации их биоэлектрических потенциалов.

— Обнаружен эффект возбуждения плазмонной волны в упорядоченном массиве сфероидальных наночастиц при совпадении длины волны возбуждения ППР с расстоянием между ними, что выражается в появлении дополнительных пиков в коэффициенте экстинкции. Положение области возбуждения ППР изменяется в диапазоне 0 - 150 нм в зависимости от поляризации падающего излучения и расстояния между частицами (для серебряных сфероидальных наночастиц с аспектным соотношением 1.5), что приводит к возможности реализации мультифлуоресцентных схем детектирования смеси биологических молекул.

### **Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. A.A. Evstrapov, I.S. Mukhin, **A.S. Bukatin**, I.V. Kukhtevich Ion and electron beam assisted fabrication of nanostructures integrated in microfluidic chips // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 2012, 282, p.145–148
2. И.В. Кухтевич, **А.С. Букатин**, И.С. Мухин, А.А. Евстапов Микрофлюидные чипы для исследования биологических объектов методами микроскопии высокого разрешения // Научно-технический вестник ИТМО, 2012, №01 (77), с. 111-115.
3. А.А. Евстапов, И.С. Мухин, И.В. Кухтевич, **А.С. Букатин**. Метод сфокусированного ионного пучка при формировании наноразмерных структур в микрофлюидных чипах // Письма в ЖТФ, 2011, т. 37, №. 20, с. 32 - 40.
4. И. В. Кухтевич, **А. С. Букатин**, И. С. Мухин, А. А. Евстапов Микрофлюидные чипы с интегрированными наноразмерными структурами для фиксации биологических объектов // Научное Приборостроение, 2011, т. 21, № 3, с. 17–22
5. И.В. Кухтевич, **А.С. Букатин**, А.А. Евстапов, Мухин И.С. Создание аналитической установки для биологических исследований на основе оптического микроскопа Axio Observer D1 и микрочиповых технологий. Ч. 1 // Научное приборостроение, 2010, т. 20. № 3. с. 3-8.

6. А.А. Евстрапов, И.С. Мухин, И.В. Кухтевич, **А.С. Букатин** Применение ионной литографии для формирования наноразмерных каналов микрофлюидных чипов в стеклянных подложках // Научно-технический вестник ИТМО, 2010, №4(68), с.59 – 63.
7. **A.S.Bukatin**, I.S.Mukhin, I.V. Kukhtevich, S.G. Yastrebov, A.A. Evstrapov Surface Plasmon Resonance In Regular Arrays Of Metal Nanorods For Biosensing Applications // Proceedings of 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology (Sitges, Spain, 12 – 15 May 2013), p. 269
8. I.V. Kukhtevich, **A.S. Bukatin**, V.I. Chubinskiy-Nadezhdin, I.S. Mukhin, A.A. Evstrapov. Microfluidic chips with traps for single cell analysis // Proceedings of Microfluidics 2012 (Heidelberg, Germany, 25-27 July 2012). - p. 153.
9. **А.С. Букатин**, И.В. Кухтевич, А.А. Евстрапов Микрофлюидное устройство для исследования биологических объектов в нативном состоянии // сборник трудов Международной зимней школы по физике полупроводников 2012, с. 25. (Санкт-Петербург – Зеленогорск 24 – 27 февраля 2012 г.)
10. А.А. Евстрапов, А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, Н.А. Есикова, А.Н. Тупик, И.В. Кухтевич, **А.С. Букатин** Аналитические приборы для исследований биологических проб на основе микрофлюидных платформ // сборник тезисов докладов 4 Всероссийской конференции «Аналитические приборы» 2012, с. 102 (26 – 30 июня 2012 г.)
11. **A.S. Bukatin**, I.S. Mukhin, I.V. Kukhtevich, A.A. Evstrapov. Focused ion beam lithography for creating microfluidic chips with integrated functional nanostructures // Abstract ICMAT 2011, H: Nanodevices and nanofabrication, p.35 (Suntec, Singapore, 26 Jun – 1 Jul 2011)
12. **А.С. Букатин**, И.В. Кухтевич, А.А. Евстрапов, И.С. Мухин. Создание аналитической установки для исследований биологических объектов на основе микрофлюидных чипов и оптического микроскопа Axio Observer D1// Сборник трудов конференции «Прикладная Оптика 2010» (Санкт-Петербург, 18-22 октября 2010 г.). с. 166-170.