

УДК 57.085.23

© Н. А. Левдарович, Ю. С. Гречаная, А. С. Иванов, М. О. Грязнова,
Е. А. Скверчинская, И. В. Миндукшев, А. С. Букатин, 2024

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МИКРОФЛЮИДНОГО УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Лабораторные крысы являются преимущественной моделью для изучения многих заболеваний, особенно таких социально значимых, как сердечно-сосудистые заболевания (инсульт и гипертония), диабет, онкологические заболевания. Со стороны эритроцитов патологические процессы приводят к нарушениям их деформируемости, что влечет ухудшение газотранспортной функции и изменение микрореологии крови. В последнее десятилетие для изучения поведения эритроцитов в условиях микроциркуляции *in vitro* стали применяться микрофлюидные устройства, которые позволяют регистрировать, сортировать и изучать здоровые и поврежденные эритроциты человека. Микрофлюидный анализ эритроцитов позволяет увязать в единую картину патологические изменения на молекулярном и мембранном уровне с модификацией формы клеток и поведением в потоке жидкости. С его помощью возможно напрямую моделировать движение эритроцитов в микрокапиллярах в условиях микроциркуляции крови и количественно анализировать влияние лекарственных препаратов на их транспорт в условиях *in vitro*. В настоящей работе проведено исследование влияния топологии и геометрических размеров микроканалов на возможность количественного определения средней скорости движения эритроцитов крыс и человека в микрокапиллярах для оценки степени влияния окислительного стресса на их транспортные и биофизические свойства. На основании полученных результатов был определен оптимальный дизайн микрофлюидного устройства, содержащего 16 параллельных микроканалов размерами $2.2 \times 8 \times 200$ мкм, позволяющих определять скорость движения эритроцитов лабораторных крыс в условиях микроциркуляции и выявлять медленные, поврежденные окислительным стрессом клетки. Разработанный метод моделирования микроциркуляции крови в микрофлюидном устройстве имеет широкие перспективы применения для исследования влияния окислительного стресса на эритроциты лабораторных животных и человека, а также для контроля биофизических и функциональных свойств эритроцитов в доклинических и клинических исследованиях лекарственных препаратов.

Кл. сл.: микрофлюидное устройство, окислительный стресс, эритроциты, микроциркуляция крови, микрокапилляр, лабораторная крыса

ВВЕДЕНИЕ

Большинство доклинических исследований новых лекарственных препаратов и методов лечения проводится на животных. Для лабораторных крыс возможно применение тех же диагностических методов, которые используются у людей, что делает крысиные модели заболеваний исключительно полезными [1]. Использование крыс и мышей составляет 87–96% от общего числа животных, используемых в доклинических исследованиях и отвечает основным требованиям виварного содержания — небольшие размеры, простота обращения и содержания, быстрое размножение, короткая продолжительность жизни и возможность наблюдать несколько поколений за короткий период времени [2, 3]. Крысы являются предпочтительной по сравнению с мышами моделью гемо-

динамических нарушений, таких как инсульт, инфаркт миокарда, ишемия-реперфузия сосудов головного мозга или кишечника [4]. Катетеризация, гемодинамические измерения, эхо-кардиография, гистологические исследования и биохимические процедуры являются обычными инструментами патофизиологических исследований сердца крыс. Белые лабораторные крысы (*Ratus norvegicus*) разводятся в строго контролируемых условиях в течение многих лет без миграции генов и используются в экспериментах уже более ста лет. Крысы являются важной экспериментальной моделью в биологических исследованиях в рамках фундаментальной науки, разработок и определения качества изделий и приборов, используемых в медицине человека и ветеринарии, стоматологии и токсикологических анализах, а также при оценке вредности некоторых химических веществ,

применяемых в быту, промышленности, сельском хозяйстве и при других оценках безопасности (ре-сурс <https://www.physiology.org/career/policy-advocacy/animal-research?SSO=Y>).

Геном крыс совпадает с геномом человека на 95%, и, следовательно, крысы более или менее восприимчивы к заболеваниям, сходным с человеческими, и реагируют на лечение во многом аналогичным образом [5]. В настоящее время существуют многие модели заболеваний человека, воспроизведенные на животных. В первую очередь это такие социально значимые заболевания, как диабет, ишемия-реперфузия, токсикологии, онкологические заболевания [6]. Благодаря созданию машины моделей лейкемии были сформулированы два основных принципа химиотерапии — принцип циклического лечения для предотвращения рецидивов при одновременном снижении токсичности и принцип комбинированной терапии, когда препараты оказывают синергическое действие [7]. До последнего времени абсолютно незаменимыми были животные модели заболеваний мозга, позволяющие тестировать новые лекарства и методы терапии [8].

Оксигенация тканей и экспорт CO_2 являются основными задачами системы кровообращения, где эритроцитам отводится ключевая роль — транспортировка газов и поддержание системного кислотно-щелочного равновесия. Они играют центральную роль в определении реологии крови, а также эффективности тканевой перфузии и газообмена, являясь важными системами межорганный связи [9]. Такие жизнеугрожающие состояния, как инфаркт, инсульт, синдром сдавливания, сопровождаются нарушением реологии крови за счет повышения вязкости плазмы, возрастания агрегации эритроцитов и нарушения их деформируемости [10]. Предполагается, что изменения физических свойств аберрантных эритроцитов при заболеваниях могут провоцировать сосудистую дисфункцию. В кровеносных сосудах эритроциты преимущественно перемещаются в зоне с низким сдвигом в центре канала, тогда как лейкоциты и тромбоциты движутся вблизи стенок канала. Эритроциты с нарушениями (аберрантные эритроциты) испытывают сильное смещение и локализуются у стенок сосудов (маргинализация) из-за изменения размеров (анизоцитоз), формы (пойкилоцитоз) и деформируемости (хрупкость/жесткость) клеток по сравнению с нормальными клетками [11]. Маргинальные аберрантные RBCs (Red Blood Cells) генерируют большие преходящие флуктуации напряжений из-за высоких градиентов скорости, вызванных их пристеночным движением. При этом эндотелиальные клетки сосудов испытывают аномально высокие флуктуации напряжения, что рассматривается как причина воспале-

ния сосудов (васкулиты) и тромбозов [12]. Также усиленное удаление нефункциональных эритроцитов (секвестрация в селезенке) при неадекватном уровне их восполнения, например при подавлении эритропоэза при химиотерапии, приводит к развитию анемии. Таким образом, изучение поведения эритроцитов в потоке при моделировании заболеваний у лабораторных животных входит в область насущных проблем здравоохранения.

Микрофлюидные технологии предоставляют новые возможности для биофизического фенотипирования одиночных клеток в условиях, имитирующих микроциркуляцию [13, 14]. Их главное преимущество — близкое соответствие микрофлюидных устройств (МФУ) биологическим структурам (свойство биомиметиков), хорошие условия для манипуляции потоками и составами растворов, что не могут обеспечить другие методы исследования [15–17]. Микрофлюидный анализ является успешным методом оценки поведения эритроцитов при различных заболеваниях, а оценка нарушений микрореологии крови является актуальной задачей для многих областей медицины — хирургии, хронических заболеваний, медицины катастроф. Для исследования эритроцитов человека разработаны различные топологии МФУ, которые позволяют регистрировать ключевые параметры эритроцитов: форму в потоке и восстановление формы после сдвига, скорость транзита через узкие микроканалы, адгезию к стенкам микрокамеры [18]. Микрофлюидные устройства позволяют напрямую моделировать микроциркуляцию крови *in vitro* с высокой скоростью сбора статистики [13, 19].

Окислительный стресс (ОС) связан с развитием и усугублением большинства патологических состояний — сердечно-сосудистые и неврологические заболевания, онкология, респираторные и ревматоидные заболевания, нефрология и т.д. [20]. Как показали наши предыдущие исследования [14, 21, 22], окислительный стресс, ОС, индуцированный органической *трет*-бутилгидрокси-пероксидом (tBOOH), может служить адекватной моделью поражений эритроцитов человека — нарушается контроль объемной регуляции клеток, происходит снижение активности внутриклеточных эстераз (падение общей жизнеспособности), происходит нарушение липидной асимметрии и усиление адгезивных свойств мембраны, окисленный гемоглобин влияет на жесткость мембраны эритроцитов [14, 23]. В результате нарушения цитологии сказываются на способности эритроцитов человека проходить микроканалы. Сейчас начинают появляться исследования клеток крови животных, выполненные с использованием МФУ, — нейтрофилов [24], реологии цельной крови в петле артерия – вена [25], образование

тромба цельной крови под потоком у генно-модифицированных мышей [26].

Анализа поведения эритроцитов крыс в микропотоке не встречено.

Целью настоящего исследования являлась разработка и оптимизация топологии микроканалов МФУ для количественного анализа транспорта эритроцитов лабораторных крыс в условиях микроциркуляции *in vitro* под действием окислительного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общие принципы

Для более точного подбора размеров микроканалов МФУ в исследовании использовали эритроциты человека и крысы. Кровь человека получали из локтевой вены, сбор проводили в вакуумные пробирки (S-Monovette®, Sarstadt, Nümbrecht, Germany) с цитратом натрия 3.2% в качестве антикоагулянта. Кровь крыс стабилизировали гепарином. Перед сдачей крови все добровольцы подписывали информированное согласие, протокол исследования с использованием крови человека и животных одобрен Этическим комитетом ИЭФБ РАН и основан на соблюдении Хельсинской декларации. Образцы крови крыс получены с применением анестезии, и предоставлены сотрудниками ИЭФБ РАН на правах пилотного исследования. Пробоподготовка включала 2-кратную отмывку осадка эритроцитов от остатков других клеток крови в физиологическом буфере следующего состава, mM: NaCl — 140; KCl — 5; HEPES — 10; MgCl₂ — 2; D-glucose — 5, EGTA — 2, осмоляльность буфера составляла 300 мОсм/кг H₂O (криоскопический осмометр Osmomat 3000, Gonotec, Germany), pH 7.4. ОС индуцировали при инкубации эритроцитов с tBOOH (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия) в конечной концентрации 1.0 mM, 3 ч при 37 °C на термошейкере при 420 об./мин (Erppendorf, Гамбург, Германия). Во всех экспериментах концентрация эритроцитов в инкубационной суспензии поддерживалась на уровне RBC 0.5·10⁹ клеток/мл (кл./мл), что фиксировало постоянный уровень удельной концентрации tBOOH для получения корректных результатов и позволяло сравнивать реакцию эритроцитов на ОС у человека и крыс. Все манипуляции с клетками человека и крыс проводили в одинаковых условиях.

Регистрация окислительного стресса

Развитие ОС оценивали по образованию окисленных форм гемоглобина Hb (переход HbFe²⁺ в HbFe³⁺). Регистрацию спектров поглощения ли-

затов образцов инкубированных с tBOOH эритроцитов проводили на спектрофотометре SPECS SSP-715-M (ООО "Спектроскопические системы", Москва, Россия) в диапазоне 300–700 нм. Содержание форм гемоглобина, где оксигемоглобин (HbFe²⁺), метгемоглобин (HbFe³⁺) и гемихром (Hcr) рассчитывали по оптической плотности характерных пиков при 560, 577, 630 и 700 нм. Расчет содержания форм Hb проводили с использованием миллимолярных коэффициентов экстинкции и выражали в % от всех форм [27]. Нарушения липидной асимметрии мембран эритроцитов оценивали по выходу на наружную сторону мембраны фосфатидилсерина (ФС) при проведении теста с аннексином V-FITC (Biolegend, The Netherlands). Выход ФС является частью запрограммированной клеточной смерти (апоптоза). Для регистрации активности внутриклеточных эстераз использовали тест с кальцеином AM (Molecular Probes, Eugene, USA). Подсчет аннексин-положительных клеток и интенсивность флуоресценции в других тестах производили методом проточной цитометрии (цитофлюориметр CytoFlex, Beckman Coulter, USA; ЦКП ИЭФБ) по ранее использованным протоколам [21] в программном обеспечении CytoFlex. Параметры крови, включая количество эритроцитов (RBC), объем эритроцитов (MCV) и ширину распределения (RDW), контролировали с помощью гематологического анализатора Medonic-M20 (Boule Medical AB, Швеция).

Изготовление МФУ

МФУ были изготовлены из полидиметилсилоксана (ПДМС, PDMS) методом "мягкой" литографии с использованием кремниевой мастер-формы, изготовленной методом фотолитографии и плазмохимического травления или методом фотолитографии фоторезиста SU-8 2005 на кремниевой пластине [28, 29]. Глубина микроканалов на всех мастер-формах составляла 8 мкм. Для подбора оптимальной геометрии каналов на мастер-форме варьировали ширину и длину регистрирующих каналов. Их размеры были измерены с помощью сканирующего электронного микроскопа Supra 25 (Carl Zeiss, Германия) и профилометра высокого разрешения XP-1 (Ambios Technology, Санта-Крус, Калифорния, США). Перед измерениями мастер-форма со структурами SU-8 была покрыта хромовой пленкой толщиной 5 нм методом распыления электронным пучком. Реплики ПДМС получали при отверждении дегазированной смеси основы силиконового эластомера Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, США) и отвердителя, смешанных в пропорции 10:1, которые наливали на помещенные в чашки Петри мастер-формы и выдерживали при 65 °C 4 ч в печи. На отделенных от мастер-формы ПДМС-репликах делали

отверстия биопсийным пробойником диаметром 1 мм. ПДМС-реплики и обезжиренные предметные стекла обрабатывали кислородной плазмой, что обеспечивало их ковалентное сцепление. Завершали изготовление МФУ термической обработкой при 95 °C в течение 1 ч.

Регистрация данных и их матобработка

Перед началом эксперимента микрочипы заполняли буфером, чтобы предотвратить адгезию эритроцитов к ПДМС и убрать пузырьки воздуха. Подготовленную суспензию эритроцитов человека или крыс (5×10^7 клеток/мл) вводили при постоянном гидростатическом давлении, что позволяло поддерживать одинаковую скорость поступления клеток во все микроканалы, даже если часть из них была закупорена. Для введения клеток в устройства использовались трубки Tubing. Данные для анализа транспорта эритроцитов в микроканалах получали путем записи видео со скоростью 790–810 кадров/с с помощью камеры XIMEA MC023MG-SY (XIMEA Corp., Лейквуд, Калифорния, США) на светодиодном микроскопе Leica DM4000B (Leica Microsystems GmbH, Вецлар, Германия) с объективом N PLAN L 20/0.40 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия). Для записи выбирали область интереса (ROI), содержащую один микроканал. Если чип состоял из множества каналов (32 или 16), то для каждого образца регистрировали не менее 4–7 различных каналов на одном микрочипе. Для получения статистически корректных результатов общее количество проанализированных клеток в каждом эксперименте составило более 1000 шт.

Для расчета скорости движения эритроцитов в микроканалах, имитирующих микрокапилляры кровеносной системы, использовался оригинальный алгоритм, разработанный в программном пакете MATLAB (The MathWorks: <https://zenodo.org/records/6639046>).

Для выделения на изображениях движущихся клеток использовалась функция foregroundDetector, которая преобразовывала изображение в бинарную маску, где 0 — пиксель фона, а 1 — пиксель движущегося объекта. После этого маркеры фиксировали момент времени входа и выхода клетки из канала регистрации. Разработанный алгоритм имеет несколько уровней самопроверок для устранения некорректно определенных проходов клеток.

Полученная таким способом средняя скорость движения клеток в микроканалах нормировалась на скорость течения жидкости, которая была определена по движению клеток в более широких подводящих каналах:

$$V = \frac{V_n}{\langle V_w \rangle} \cdot \frac{S_n}{S_w},$$

где V — нормированное значение скорости клетки; V_n — скорость клетки в узком канале (в пикселях/кадр); $\langle V_w \rangle$ — средняя скорость клеток в широком канале (в пикселях/кадр), равная скорости потока в широком канале; S_n — площадь сечения узкого канала; S_w — площадь сечения широкого канала.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Excel 2016 (Microsoft Corporation), OriginPro 2021b (OriginLab Corporation) и GraphPad Prism 8 (SanDiego, California, USA). Данные выражены как $M \pm SD$ (через среднее и стандартное отклонение); анализ нормальности распределения выполнялся по Shapiro – Wilk тесту; различия между группами оценивались с помощью t-теста Стьюдента с двумя значениями. При сравнении данных между микрочипами разного размера использовался непарный t-тест. Для сравнения данных по воздействию tBOON использовался парный тест. Значимые различия регистрировались при неопределенности $p \leq 0.05$. Количество биологических образцов n , проанализированных в каждом типе МФУ, приведено в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модель воздействия на эритроциты

При разработке МФУ для оценки эритроцитов ключевым параметром является объем клетки (mean cells volume, MCV) и то, как этот объем может изменяться при различных воздействиях. Кроме того, поведение эритроцитов в потоке задается относительной жесткостью эритроцитов, которая зависит от внутриклеточного содержания гемоглобина и свойств мембраны (взаимодействия липидного бислоя и цитоскелета). Циркулирующий пул эритроцитов — это неоднородная по своим биофизическим параметрам популяция (возраст, изношенность); показатель ширины распределения эритроцитов по объему (red blood cells distribution width, RDW) показывает степень нарушений всей популяции клеток. ОС был выбран как состояние, оказывающее сильное действие на цитологические показатели эритроцитов.

Происходящие при ОС изменения объема клеток и жесткости мембран могут изменять биофизические показатели эритроцитов при транзите через микроканалы [14].

Табл. 1. Количество образцов *n*, проанализированных в каждом типе МФУ

Топология МФУ	Размеры, мкм	Человек		Крысы	
		Контроль	tBOOH, 1 мМ	Контроль	tBOOH, 1 мМ
Массив "синусы селезенки"	$(1.5-2) \times (0.7-1.2) \times (10-15)$	$n = 3$	$n = 3$	$n = 3$	$n = 3$
32 параллельных микроканала	$3.0 \times 8 \times 330$	$n = 8$	$n = 8$	$n = 4$	$n = 3$
16 параллельных каналов, прямой ввод	а. $2.2 \times 8 \times 50$	а. $n = 2$	а. $n = 2$	а. $n = 2$	а. $n = 2$
	б. $2.2 \times 8 \times 100$	б. $n = 2$	б. $n = 2$	б. $n = 2$	б. $n = 2$
	в. $2.2 \times 8 \times 200$	в. $n = 2$	в. $n = 2$	в. $n = 2$	в. $n = 2$
16 параллельных каналов, распределенный ввод	а. $1.5 \times 8 \times 200$	а. $n = 2$	а. $n = 2$	а. $n = 2$	а. $n = 2$
	б. $2.2 \times 8 \times 200$	б. $n = 8$	б. $n = 8$	б. $n = 7$	б. $n = 7$
	в. $3.0 \times 8 \times 200$	в. $n = 3$	в. $n = 3$	в. $n = 2$	в. $n = 2$
16 параллельных каналов, распределенный ввод	а. $2.2 \times 8 \times 50$	а. $n = 2$	а. $n = 2$	а. $n = 2$	а. $n = 2$
	б. $2.2 \times 8 \times 100$	б. $n = 2$	б. $n = 2$	б. $n = 2$	б. $n = 2$
	в. $2.2 \times 8 \times 200$	в. $n = 8$	в. $n = 8$	в. $n = 7$	в. $n = 7$
16 параллельных каналов с переменной глубиной	$(2.5-5.0) \times (4.0-8.0) \times 200$	$n = 2$	$n = 2$	$n = 1$	$n = 1$

Для тестирования МФУ в диапазоне возможных отклонений по размеру и жесткости мембран эритроцитов была выбрана модель окислительного стресса и проведены подготовительные эксперименты для оценки трансформации эритроцитов крыс и людей. Сравнительный анализ накопления окисленных форм гемоглобина при инкубации RBC 0.5×10^9 кл./мл, 3 ч, при 37 °С (рис. 1, а) и набухания эритроцитов (рис. 1, б), показал, что у крыс изменения происходят значительно интенсивнее, чем у человека. Накопление окисленных форм гемоглобина является свидетельством изменения жесткости мембран эритроцитов, что было показано прямым методом атомно-силовой микроскопии [14]. В это же время нарушение объемной регуляции за счет снижения общей жизнеспособности эритроцитов (рис. 1, г, тест с кальцеином) приводило к усилению гемолиза (рис. 1, в). Полученные данные показывают, что условия инкубации эритроцитов крыс с tBOOH 1 мМ следует рассматривать как жесткое воздействие, вызывающее

гибель эритроцитов как по апоптотическому (экстернализация фосфатидилсерина, тест с аннексином, рис. 1, д), так и некротическому пути (гемолиз, рис. 1, в). Усиленное образование микрочастиц возможно в обоих вариантах гибели эритроцитов (данные представлены в Приложении на рис. П) [21].

MCV человека до и после инкубации с tBOOH 1 мМ составлял 87.5 ± 1.1 фл против 106.4 ± 8.1 фл (с неопределенностью $p < 0.001$); у крысы — 48.1 ± 1.2 фл против 61.4 ± 3.9 фл, $p < 0.001$. Хотя условия воздействия были одинаковыми, стартовая величина MCV крыс и человека отличается в 1.81 раза, что очевидным образом могло сказываться на удельной концентрации окислителя в расчете на объем клетки.

При разработке МФУ были учтены размеры эритроцитов в нормальном состоянии (рис. 1, е) и предельные MCV при набухании при индукции ОС (рис. 1, б).

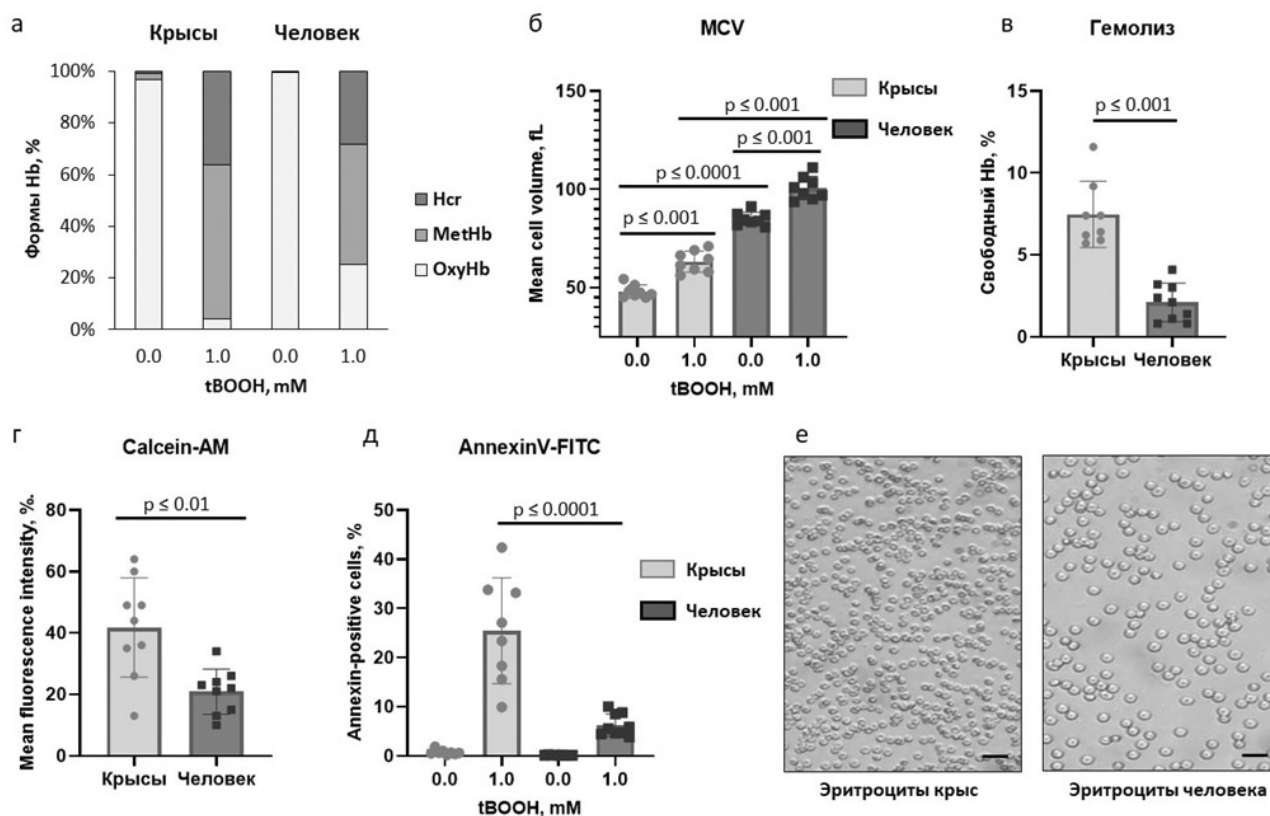


Рис. 1. Цито-морфологические изменения эритроцитов человека ($n = 9$) и крыс ($n = 7$) под действием окислительного стресса, индуцированного tBOOH 1 mM, 3 ч.

Воздействие вызывает: а — накопление нефункциональных форм гемоглобина (метгемоглобина, MetHb, и гемихрома, Hcr); б — набухание эритроцитов (MCV); в — значительное усиление гемолиза; г — снижение активности внутриклеточных эстераз (тест на жизнеспособность с Calcein-AM); д — выход фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны (тест с Annexin V-FITC); е — относительные размеры эритроцитов крысы и человека можно представить по микрофотографии, шкала 20 мкм.

Методы: а, б — спектрофотометрия; в — гематологический анализ; г, д — проточная цитометрия.

р — вероятность ошибочности сравнительного утверждения (неопределенность) по t-тесту Стьюдента

Разработка МФУ включала два направления дизайна — создание топологии, имитирующей синус селезенки и создание топологии, имитирующей капиллярную сеть.

В табл. 2 представлены характеристики разработанных МФУ.

Имитация синусов селезенки в микрофлюидном устройстве

Селезенка является крупнейшим лимфатическим органом, защищает организм от патогенных микроорганизмов, попадающих в кровоток, а также служит фильтром, который может удалять эритроциты из кровообращения вследствие их

физиологического старения или патологических изменений [30]. Результаты компьютерного моделирования показывают, что селезенка выбирает эритроциты для продолжения кровообращения на основе их геометрии, что обеспечивает критические границы, связывающие площадь поверхности и объем здоровых эритроцитов, за пределами которых эритроциты не соответствуют "тесту на физическую пригодность" и не проходят через щели синусов селезенки [31]. При помощи такого "фитнес-теста" организм избавляется от эритроцитов с нарушениями. Для имитации синусов селезенки (см. рис. 2, а) в МФУ был разработан дизайн микроканалов, представленный на рис. 2, б.

Табл. 2. Топология и размерная характеристика МФУ

	Топология	Размер, мкм	Достоинства	Недостатки
1	Массив "синусы селезенки"	$(1.5-2) \times (0.7-1.2) \times (10-15)$	Имитация биологической структуры синуса селезенки	Невозможность подсчета скорости движения клеток, ручной подсчет окклюзий
2	32 параллельных микроканала	$3 \times 8 \times 330$	Множество микроканалов имитирует капиллярную сеть	Неравномерный поток клеток (рекурсии), ручной подсчет скорости и окклюзий
3	16 параллельных каналов, прямой ввод	а. $2 \times 8 \times 50$, б. $2 \times 8 \times 100$, в. $2 \times 8 \times 200$	Имитирует капиллярную сеть. Высокая пропускная способность. Удобная регистрация. Расчет линейной скорости	а. Короткий канал, ошибки регистрации движения.* б. Недостаточно длинный канал, ошибки регистрации движения.* в. Из-за прямого входа может быть неравномерная подача в микроканалы
4	16 параллельных каналов, распределенный ввод	а. $1.5 \times 8 \times 50$, б. $2.2 \times 8 \times 100$, в. $3 \times 8 \times 200$	Равномерный поток суспензии. Высокая пропускная способность. Расчет линейной скорости	—
5	16 параллельных каналов с переменной глубиной	$2.5 \times 8 \times 100$ со ступенькой 4 мкм	Имитация сужения канала	Происходит окклюзия клеток из-за перепада глубины в канале

Примечание: * — при использовании высокоскоростных камер (примерно, от 1000 fps) чувствительность микроканалов к нарушениям движения может быть выше.

Дизайн данного МФУ предусматривал небольшое углубление перед входом в микроканал (камера перед входом в синус), ширина микроканала составляла 1.5–2 мкм; высота 2.7–3.2 мкм, длина 10–15 мкм. Эти параметры были выбраны исходя из значения верхней границы высоты щели селезеночного синуса из экспериментов по определению

ультраструктурных характеристик с помощью просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа [32]. Фактическая форма щелей в селезенке не является прямоугольной, а представляет собой вытянутый эллипс, однако изготовить отверстия такого сечения методом мягкой литографии невозможно, а методом 3D-печати

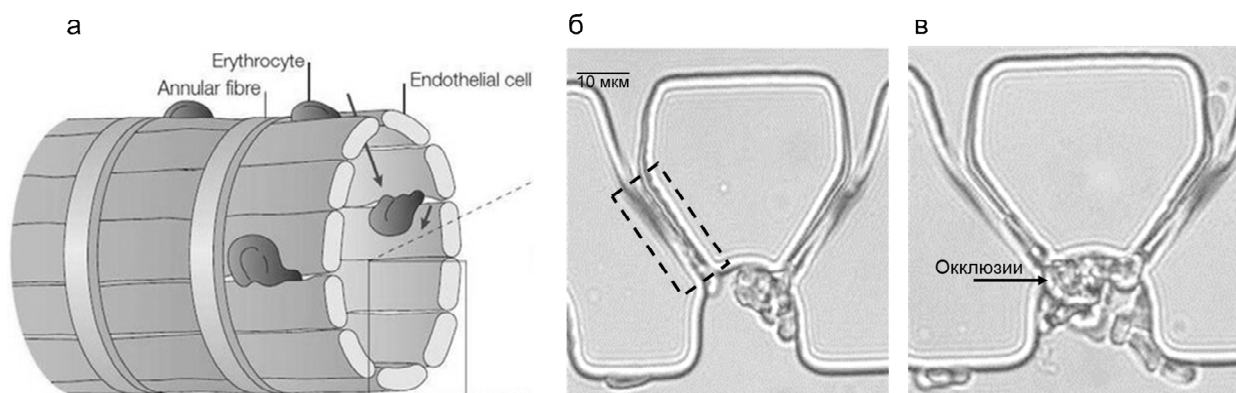


Рис. 2. Принципиальная схема синуса селезенки (а) и изображения микроканалов МФУ, имитирующих синусы селезенки (б, в).

Рамка на схеме (а) выделяет щель синуса, данный участок на микрочипе (б) обозначен штриховым прямоугольником, перед входом в щель выполнен элемент каверны. Нормальные эритроциты скапливались перед микроканалами, но могли их проходить (в). Эритроциты, обработанные tBOOH 1.0 mM, 1 ч, становились жесткими, их скопление вызывало окклюзию каналов. Схема синуса селезенки дана по [34]

можно sobлюсти форму, но невозможно добиться таких размеров.

Эффективная жесткость эндотелиальных клеток, выстилающих щель, примерно в 100 раз выше, чем у эритроцитов [33], жесткость ПДМС также выше жесткости клеток (100 кПа ÷ 3 МПа, в зависимости от способа приготовления), что отчасти соответствовало условиям модели синуса селезенки. Результаты тестирования показали, что здоровые эритроциты крыс могут проходить такие узкие микроканалы, но только по одной клетке за раз.

Для тестирования способности эритроцитов проходить микроканалы МФУ, имитирующие синусы селезенки, была выбрана модель окислительного стресса. Ранее мы показали, что RBC, подвергнутые действию органической перекиси трет-бутилгидроксипероксида (tBOOH) в определенных концентрациях, сферизуются и набухают [21]. Индуцированное окислительным стрессом повышение объема эритроцитов может затруднять их проход по микроканалам. Тестирование поведения потока эритроцитов показало, что обработка даже низкими концентрациями гидроперекиси tBOOH 0.3–0.5 mM, 3 ч, вызывает практически полную остановку транзита и закупоривание микроканалов. В этом полученные данные согласуются с данными литературы о секвестрации эритроцитов с нарушением деформируемости. Плохо деформируемые и аномальные эритроциты не могут протиснуться в узкие межэндотелиальные щели и вернуться в циркуляцию. Они остаются в пространстве пульпы и утилизируются посредством фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками [31].

Полученные результаты показывают, что благодаря близкому соответствию разработанного МФУ биологической структуре синусов селезенки такой микрочип может использоваться для оценки действия на эритроциты ксенобиотиков (лекарств, токсинов). Дополнительно функциональность таких чипов может быть повышена, например, внесением в проточный буфер макрофагов. Сосредоточенные в области каверны макрофаги будут атаковать эритроциты с нарушениями, выбрасывающими сигналы "съешь меня", — экстернализация фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны и образование новых сайтов узнавания за счет трансформации белка полосы 3 (AE1).

Однако у данной топологии МФУ были значительные недостатки — микрочип можно было использовать только для качественной оценки способности эритроцитов проходить через микроканалы и вероятности их окклюзии. Даже ручной подсчет движения клеток был затруднен, т.к. в камере перед входом могли скапливаться несколько эритроцитов. В связи с этим было сделано заключение о том, что, несмотря на близкое соответствие биологическому прототипу, данная топология МФУ является малоприменимой для количественной оценки движения эритроцитов в микрокапиллярах.

Имитация капиллярной сети в микрофлюидном устройстве с массивом микроканалов

Основной газообмен между красными клетками крови и тканями организма происходит при движении эритроцитов по микрокапиллярам, размеры

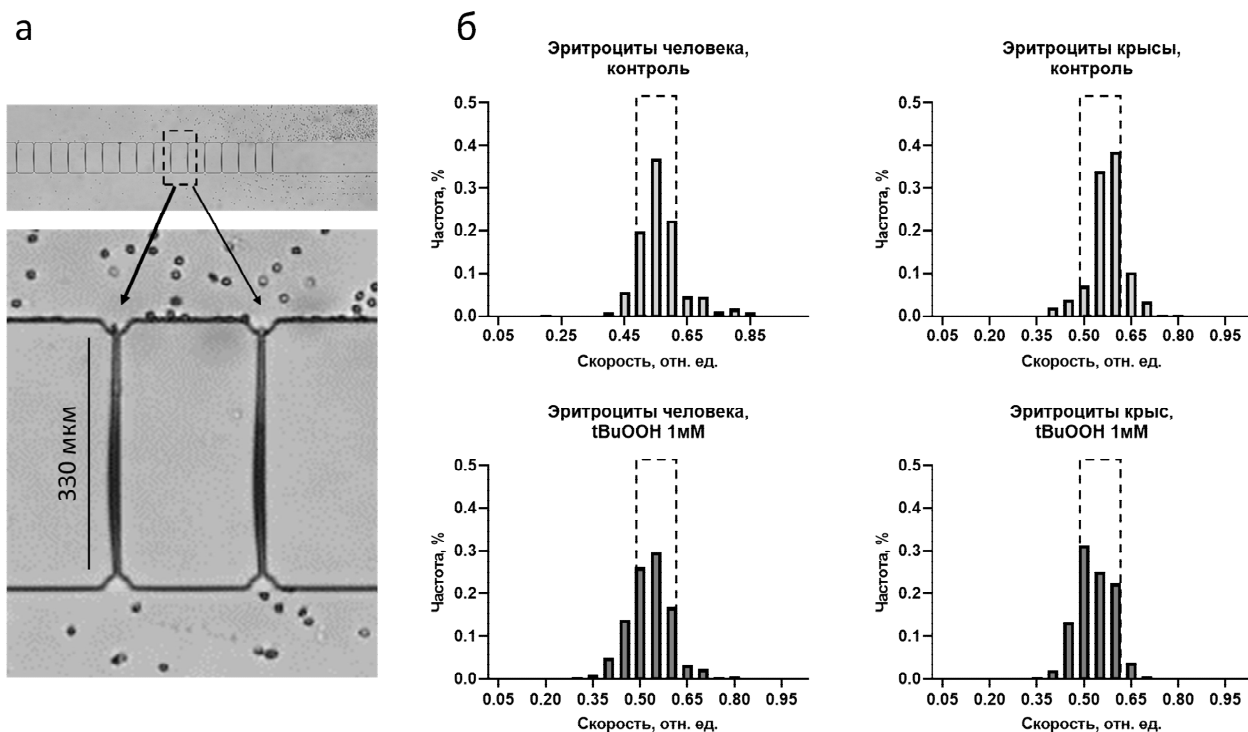


Рис. 3. Микрофлюидный чип с параллельным расположением 32 микроканалов.

а — общий вид фрагмента микрочипа, внизу зона регистрации движения эритроцитов ($3.0 \times 8.0 \times 330$ мкм). б — гистограммы распределения средней скорости движения по микроканалам эритроцитов человека и крыс, в норме и после воздействия органической перекиси *трет*-бутила (tBOOH).

Изображения микрочипа получены с помощью оптического микроскопа Leica DM4000 BLED с объективами 5x (сверху) и 20x (зона регистрации)

которых сопоставимы или меньше размеров клеток. Для этого они должны обладать способностью деформироваться, сохранять эластичность мембраны и цитоскелета. Под действием окислительного стресса происходит увеличение объема клеток, их сферизация и увеличение жесткости мембраны и цитоскелета, что может приводить к снижению способности эритроцитов перемещаться по микрокапиллярам кровеносной системы. Для исследования влияния ОС на эритроциты были разработаны две топологии МФУ, получившие название "капиллярная сеть". На рис. 3, а, представлен фрагмент МФУ, имеющего 32 параллельных канала размерами $3.0 \times 8.0 \times 330$ мкм, перед каждым из которых была выполнена небольшая улавливающая камера для направления клеток в канал.

Данное МФУ показало достаточную чувствительность к нарушениям цитологических параметров эритроцитов. Выявлено снижение скорости

прохода эритроцитов после действия tBOOH 1mM у человека ($p < 0.027$), но не у крыс ($p < 0.054$). Характеристика распределения эритроцитов по скоростям показана на рис. 3, б. Полученные результаты показали, что данное МФУ обладает следующими недостатками: 1 — неравномерная подача суспензии эритроцитов к каналам регистрации (возникновение зон с рекурсивным движением суспензии); 2 — невозможность программной обработки видеофайлов, необходим ручной подсчет большого массива кадров. В дальнейших экспериментах этот вариант МФУ не использовался.

Имитация капиллярной сети в микрофлюидном устройстве с параллельными микроканалами с выравнивающей камерой

После анализа результатов экспериментов в МФУ с 32 параллельными микроканалами длиной 330 мкм было предложено к каждому микроканалу,

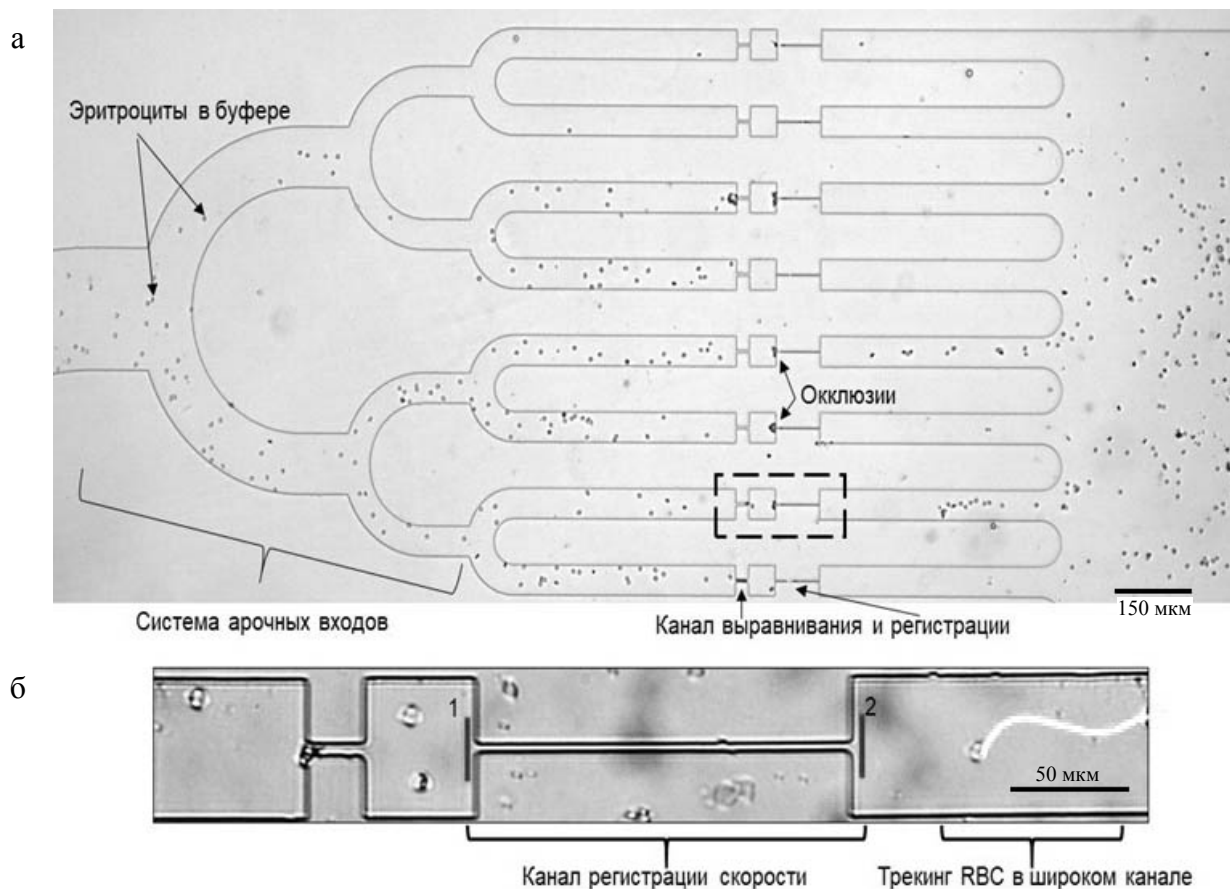


Рис. 4. Общий вид МФУ с распределенной системой подачи суспензии клеток, выравнивающей камерой и 16 параллельными микроканалами.

На изображении сверху (а) приведена половина каналов МФУ; снизу (б) — канал регистрации движения эритроцитов с размерами $2.2 \times 8 \times 200$ мкм, где 1 — программный маркер определения времени входа клетки в микроканал, 2 — программный маркер определения времени выхода клетки из микроканала; светлая линия — траектория движения клетки в широком канале для расчета скорости течения жидкости в каналах МФУ. Изображения получены с помощью оптического микроскопа с объективами 5х (а) и 20х (б)

имитирующему капилляр кровеносной системы, сделать отдельный подводящий канал. Это позволит более равномерно подводить клетки к каждому микроканалу и тем самым обеспечить возможность компьютерной обработки получаемых видеофайлов с движением клеток. Первоначально данная топология МФУ была разработана для исследования движения эритроцитов человека в микрокапиллярах (см. рис. 4) и включала две модификации ввода суспензии клеток: с прямым и распределенным вводом, а также три варианта длин регистрирующего канала (см. табл. 2). Предварительное тестирование показало, что распределенный ввод суспензии клеток обеспечивает их равномерный подвод ко всем 16 измерительным микроканалам. Длина измерительных каналов была выбрана 200 мкм, т.к. в таких каналах возможно

надежно определять среднюю скорость клеток с помощью видеокамеры с частотой съемки до 1000 кадр/с. Также каналы такой длины не создают слишком большого гидравлического сопротивления, что позволяет использовать гидростатическое давление для организации движения жидкостей в МФУ. Перед измерительным микроканалом был добавлен выравнивающий микроканал для снижения разброса скорости движения эритроцитов [36]. Таким образом, все дальнейшие эксперименты для определения оптимальной ширины микроканалов для исследования движения эритроцитов крыс под действием ОС были проведены в МФУ с такой топологией.

Анализ видео движения эритроцитов в микроканалах $1.5 \times 8 \times 200$ мкм показал, что при данной ширине возможны окклюзии даже нормальными

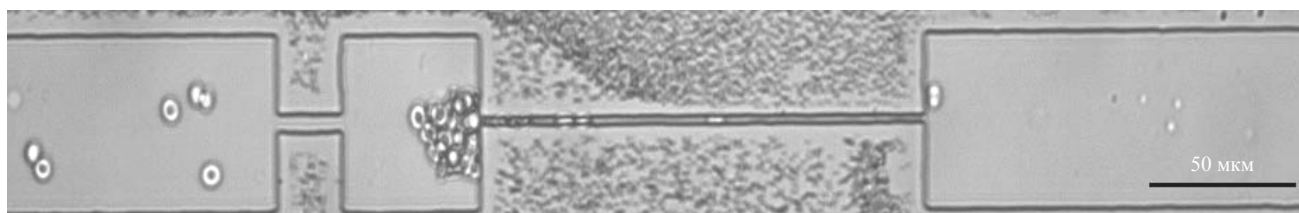


Рис. 5. Изображение окклюзии микроканала с размерами $1.5 \times 8 \times 200$ мкм эритроцитами крыс, вызванное несоответствием ширины микроканала размерам клеток.

Изображение получено с помощью оптического микроскопа Leica DM4000 BLED с объективом 20х, показан один из 16 регистрирующих микроканалов

эритроцитами крыс. Индукция ОС обработкой клеток tBOOH 1 mM, 3 ч, приводила к повышению объема эритроцитов, что вызывало множественные окклюзии и делало каналы плохо проходимыми для эритроцитов крыс. По результатам был сделан вывод о том, что такие размеры микроканалов не подходят для количественной регистрации нарушений микрореологии, а возможен только качественный анализ способности эритроцитов крыс проходить через микрокапилляры такого размера и вероятности возникновения окклюзий (см. рис. 5).

Анализ данных по движению эритроцитов в микроканалах с размерами $3 \times 8 \times 200$ мкм показал, что в таких микроканалах возможна регистрация нарушений микрореологии эритроцитов человека, но они имеют малую чувствительность к нарушениям эритроцитов крыс, т.к. они имеют меньшие размеры и объем (MCV). В Приложении на рис. П показаны графики распределения средней скорости эритроцитов человека и крыс, обработанных tBOOH 1 mM, 3 ч, в микроканалах с размерами $3 \times 8 \times 200$ мкм.

Анализ движения эритроцитов в микроканалах с шириной $2.2 \times 8 \times 200$ мкм показал, что такой микрочип достаточно хорошо регистрирует нарушения микрореологии как эритроцитов человека, так и крыс. Выбор размеров микроканалов обусловлен тем, чтобы нормальные эритроциты могли свободно проходить через них, а сферизованные в результате различных повреждений имели сниженную скорость за счет трения о стенки. Так как при ОС, вызванном tBOOH 1 mM, 3 ч, диапазон значений MCV человека составил 101–112 фл, в то время как для крыс 58.4–63.8 фл, очевидно, что эритроциты крыс даже в набухшем и сферизованном состоянии будут иметь значительно меньший объем, чем здоровые эритроциты человека. Можно предположить, что снижение скорости транзита эритроцитов крыс в микроканалах было обусловлено не только влиянием объема клеток, но также изменением их жесткости под действием ОС.

Известно, что жесткость эритроцитов возрастает при структурных изменениях белков цитоскелета, при сферизации клеток за счет потери части мембраны, кластеризации трансмембранных белков [37, 38]. То есть что снижение скорости транзита эритроцитов крыс в микроканалах могло быть обусловлено не только влиянием объема клеток, но также изменением деформируемости клеток. Полученные данные по движению в микроканалах эритроцитов крыс предполагают, что исследование цитологического ответа на ОС крыс резонно продолжить более углубленно. Это даст возможность сопоставить морфологическую и цитологическую трансформации мембран и биофизические параметры эритроцитов крыс и человека и более полно использовать микрофлюидное тестирование.

Исследование МФУ с параллельными каналами переменной глубины

На уровне капиллярной сети кровеносной системы животных и человека диаметр микрососудов может изменяться. Для моделирования условий, возникающих при изменении диаметра микрокапилляров, а также снижения гидравлического сопротивления подводящих микроканалов было разработано МФУ с перепадом высоты микроканалов 8–4 мкм (см. рис. 6). Из-за ограничений технологии изготовления кремниевых мастер-форм для "мягкой" литографии МФУ из ПДМС изменить глубину каналов возможно только ступенчато. Тестирование полученных МФУ показало, что ступенчатый перепад глубин микроканалов служит местом накопления эритроцитов, создавая заторы и окклюзии. В связи с этим в дальнейших экспериментах этот вариант МФУ не использовался и был сделан вывод о том, что для моделирования капилляров с переменным поперечным сечением требуется применение других технологий изготовления МФУ, например, высокоразрешающей 3D печати.

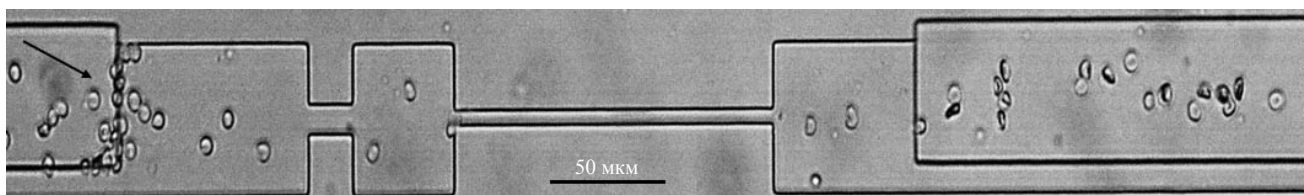


Рис. 6. Изображение МФУ с каналами со ступенчатым изменением высоты.

На границе изменения глубин происходит затор и окклюзии эритроцитов, препятствующий их дальнейшему движению в измерительный микроканал. Стрелкой указано скопление эритроцитов на перепаде высот микроканала. Изображения получены с помощью оптического микроскопа Leica3 с объективом 20х

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эритроциты, являясь самыми многочисленными клетками организма, выполняют свою основную функцию газообмена и газопереноса, двигаясь по микрокапиллярам кровеносной системы, размеры которых сопоставимы или меньше размеров клеток. Основные факторы, которые определяют деформируемость эритроцитов, позволяя им проходить через такие мелкие капилляры и доставлять кислород к периферическим сосудам, органам и тканям, — это высокое соотношение поверхности мембраны к объему (морфология), внутренняя вязкость клетки и вязкоупругие свойства мембраны [38–42]. Использование микрофлюидных технологий позволяет напрямую моделировать движение эритроцитов в микрокапиллярах в условиях микроциркуляции крови и количественно анализировать влияние лекарственных препаратов на него в условиях *in vitro* [43]. В связи с тем, что у человека и животных моделей, используемых в доклинических исследованиях, разные размеры и объем эритроцитов, топологию и конкретные размеры микроканалов МФУ требуется оптимизировать под конкретный организм [44].

Проведенные исследования показали, что геометрия и размеры микроканалов МФУ должны выбираться с учетом характеристик не только здоровых, но и поврежденных клеток для обеспечения возможности регистрации изменения биофизических параметров эритроцитов под действием окислительного стресса. Наиболее критическим размером микроканала, влияющим на чувствительность измерения скорости движения эритроцитов в нем, является его ширина. Скрининг девяти различных вариантов топологий МФУ позволил определить, что микрофлюидный канал с размерами $2.2 \times 8 \times 200$ мкм является оптимальным для измерения изменений биофизических характеристик эритроцитов как человека, так и крыс, вызванных окислительным стрессом, индуцированным инкубацией клеток в течение 3 ч с *трет*-бутилпероксидом в концентрации 1 мМ. Увеличение ширины канала с оптимальной 2.2 мкм до 3 мкм приводило к тому, что МФУ становились

полностью нечувствительными к изменениям биофизических свойств эритроцитов лабораторных крыс, а также становились менее чувствительными к изменениям свойств эритроцитов человека. Напротив, уменьшение оптимальной ширины микроканалов приводило к появлению их множественных окклюзий здоровыми клетками крови как человека, так и крыс, что делало невозможным использование таких МФУ для количественных исследований. Длина измерительных микроканалов также является важным параметром, т.к. предъявляет требования к видеокамере, на которую осуществляется регистрация движения клеток. При использовании камер с частотой съемки до 1000 кадров в секунду длина микроканалов должна быть не менее 200 мкм. Если МФУ содержит массив микроканалов, то наиболее хорошо показала себя распределенная система подвода клеток крови к измерительным микроканалам, основанная на их последовательном разделении на 2 канала. Ее использование позволило более равномерно подавать клетки на вход измерительных микроканалов, контролировать их скорость и количество для обеспечения регистрации скорости движения единичных клеток.

Таким образом, в ходе проведенного исследования была определена оптимальная топология микрофлюидного устройства и размеры измерительных каналов для *in vitro* моделирования движения эритроцитов лабораторных крыс и человека в микрокапиллярах кровеносной системы в условиях окислительного стресса. Оптимальное МФУ содержало 16 микроканалов с размерами $2.2 \times 8 \times 200$ мкм с распределенной системой подвода клеток к ним, что обеспечивало измерение скорости движения эритроцитов с точностью, достаточной для выявления субпопуляции поврежденных медленных эритроцитов крыс и человека *in vitro*. Появление такой субпопуляции свидетельствует о токсическом действии окислителя и превышении возможностей встроенной антиоксидантной системы по защите клеток от окислительного стресса, что приводит к потере их функции [14]. Разработанные МФУ имеют широкие перспективы использования для дальнейшего исследования влияния

окислительного стресса на эритроциты человека и лабораторных животных, а также для контроля биофизических и функциональных свойств эритро-

цитов в доклинических и клинических исследованиях лекарственных препаратов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

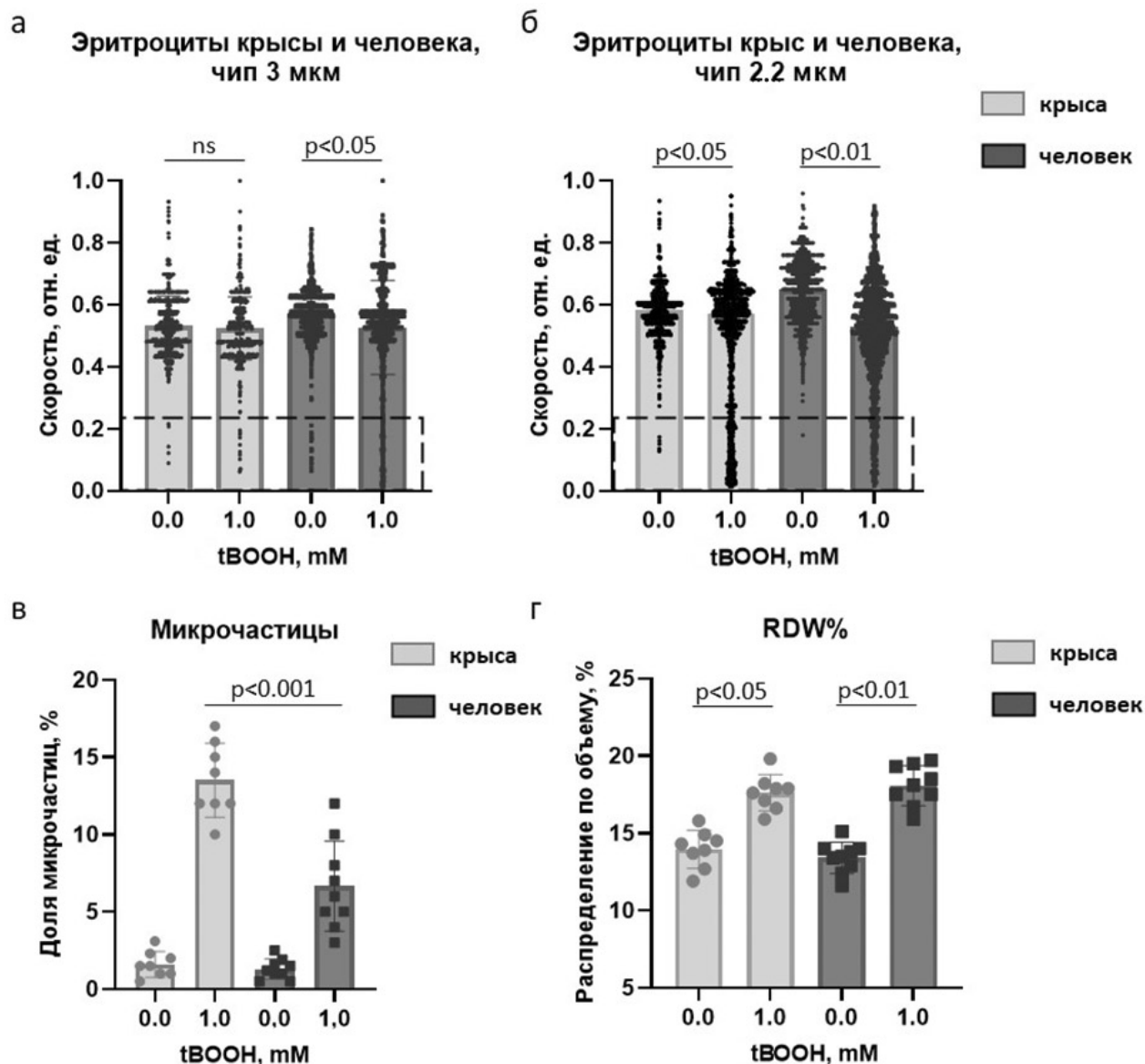


Рис. II. Анализ относительных скоростей образования микрочастиц и усиления гетерогенности популяции по объему эритроцитов при окислительном стрессе, индуцированном *трет*-бутилпероксидом, 1 мМ, 3 ч.

а — в микроканалах $3 \times 8 \times 200$ мкм популяции эритроцитов человека ($n = 3$) и крыс ($n = 2$); б — в микроканалах $2.2 \times 8 \times 200$ мкм эритроцитов человека ($n = 9$) и крыс ($n = 8$); штриховая рамка — субпопуляция медленных клеток, появление эритроцитов с нарушенной способностью проходить узкие микроканалы; в — усиление потери части мембраны в результате образования микрочастиц эритроцитов; г — уширение распределения клеток по объему (RDW). Данные представлены как $M \pm SD$ с указанием по t-тесту Стьюдента значений p (ns — различия отсутствуют)

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ
в рамках научного проекта № 22-24-00998

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ciuffreda M.C., Tolva V., Casana R., Gneccchi M., et al. Rat experimental model of myocardial ischemia/reperfusion injury: an ethical approach to set up the analgesic management of acute post-surgical pain // PLoS One. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0095913
2. O'Connell K.E., Mikkola A.M., Stepanek A.M., Vernet A., et al. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research // Comp Med. 2015. Vol. 65, no. 2. P. 96–113. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408895>
3. Delwatta Sh.L., Gunatilake M., Baumans V., Seneviratne M.D., et al. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka // Animal Model Exp Med. 2018. Vol. 1, no. 4. P. 250–254. DOI: 10.1002/ame2.12041
4. Wang J., Zhang W., Wu G. Intestinal ischemic reperfusion injury: Recommended rats model and comprehensive review for protective strategies // Biomed Pharmacother. 2021. Vol. 138. Id. 111482. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111482
5. Blais E., Rawls K., Dougherty B., et al. Reconciled rat and human metabolic networks for comparative toxicogenomics and biomarker predictions // Nature Communications. 2017. Vol. 8. Id. 14250. DOI: 10.1038/ncomms14250
6. Romanova, E.V., Sweedler J.V. Animal Model Systems in Neuroscience // ACS Chem Neurosci. 2018. Vol. 9, iss. 8. P. 1869–1870. DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00380
7. Kohnken R., Porcu P., Mishra A. Overview of the Use of Murine Models in Leukemia and Lymphoma Research // Front Oncol. 2017. Vol. 7. DOI: 10.3389/fonc.2017.00022
8. Soares R.O.S., Losada D.M., Jordani M.C., et al. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, iss. 20. Id. 5034. DOI: 10.3390/ijms20205034
9. Kuhn V., Diederich L., Kramer Ch.M., et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia // Antioxid Redox Signal. 2017. Vol. 26, iss. 13. P. 718–742. DOI: 10.1089/ars.2016.6954
10. Nader E., Skinner S., Romana M., Fort R., et al. Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sick Cell Disease and Effects of Exercise // Front Physiol. 2019. Vol. 10. Id. 1329. DOI: 10.3389/fphys.2019.01329
11. Chen Y., Li D., Li Y. et al. Margination of Stiffened Red Blood Cells Regulated By Vessel Geometry // Sci Rep. 2017. Vol. 7. Id. 15253. DOI: 10.1038/s41598-017-15524-0
12. Cheng X., Caruso Ch., Lam W.A., Graham M.D. Marginated aberrant red blood cells induce pathologic vascular stress fluctuations in a computational model of hematologic disorders // bioRxiv. 2023. DOI: 10.1101/2023.05.16.541016
13. Sebastian B., Dittrich P.S. Microfluidics to Mimic Blood Flow in Health and Disease // Annual Review of Fluid Mechanics. 2018. Vol. 50, iss. 1. P. 483–504.
14. Besedina N.A., Skverchinskaya E.A., Shmakov S.V. et al. Persistent red blood cells retain their ability to move in microcapillaries under high levels of oxidative stress // Commun Biol. 2022. Vol. 5. Id. 659. DOI: 10.1038/s42003-022-03620-5
15. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Altman S. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. Vol. 114, iss. 10. P. 2550–2555. DOI: 10.1073/pnas.1621226114
16. Gladkov A., Pigareva Y., Kutyina D. et al. Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels // Sci Rep. 2017. Vol. 7. Id. 15625. DOI: 10.1038/s41598-017-15506-2
17. Nejad A.E., Najafgholian S., Rostami A., Sistani A., Shojaeifar S. et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment // Cancer Cell Int. 2021. Vol. 21. Id. 62. DOI: 10.1186/s12935-020-01719-5
18. Barshtein G., Pajic-Lijakovic I., Gural A. Deformability of Stored Red Blood Cells // Front Physiol. 2021. Vol. 12. Id. 722896. DOI: 10.3389/fphys.2021.722896
19. Urbanska M., Muñoz H.E., Shaw Bagnall J. et al. A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements // Nat Methods. 2020. Vol. 17. P. 587–593. DOI: 10.1038/s41592-020-0818-8
20. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health // Oxid Med Cell Longev. 2017. Vol. 2017. Id. 8416763. DOI: 10.1155/2017/8416763
21. Sudnitsyna J., Skverchinskaya E., Dobrylk I., Nikitina E. et al. Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes // Antioxidants (Basel). 2020. Vol. 9, no. 10. DOI:10.3390/antiox9100929
22. Скверчинская Е.А., Тапинова О.Д., Филатов Н.А., Беседина Н.А., Миндукшеев И.В., Букатин А.С. Исследование транспорта эритроцитов через микроканалы при индукции окислительного стресса трет-бутилпероксидом // Журнал технической физики, 2020. Т. 90, № 9. С. 1553–1559. DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49689.403-19
23. Arashiki N., Otsuka Y., Ito D., Yang M., Komatsu T., Sato K., Inaba M. The Covalent Modification of Spectrin in Red Cell Membranes by the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal // Biochem Biophys Res Commun. 2010. Vol. 391, iss. 3. P. 1543–1547. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.121
24. Jones C.N., Hoang A.N., Martel J.M., Dimisko L., et al. Microfluidic Assay for Precise Measurements of Mouse, Rat, and Human Neutrophil Chemotaxis in Whole-Blood Droplets // J. Leukoc Biol. 2016. Vol. 100, no. 1. P. 241–247. DOI: 10.1189/jlb.5TA0715-310RR
25. Yeom E., Kim H.M., Park J.H., Choi W., Doh J., Lee S.J. Microfluidic system for monitoring temporal variations of hemorheological properties and platelet adhesion in LPS-injected rats // Sci Rep. 2017. Vol. 7. Id. 1801. DOI: 10.1038/s41598-017-01985-w

26. Nagy M., van Geffen J.P., Stegner D., Adams D.J., et al. Comparative Analysis of Microfluidics Thrombus Formation in Multiple Genetically Modified Mice: Link to Thrombosis and Hemostasis // *Front Cardiovasc Med*. 2019. Vol. 6. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00099
27. Kanas T., Acker J.P. Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in desiccated red blood cells // *Free Radic. Biol. Med*. 2010. Vol. 49, iss. 4. P. 539–547. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.024
28. Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning // *Nat Protoc*. 2010. Vol. 5. P. 491–502. DOI: 10.1038/nprot.2009.234
29. Bukatin A.S., Mukhin I.S., Malyshev E.I., Kukhtevich I.V., Evstrapov A.A., Dubina M.V. Fabrication of High Aspect-Ratio Microstructures in Polymer Microfluid Chips for in Vitro Single-Cell Analysis // *Tech. Phys*. 2016. Vol. 61. P. 1566–1571. DOI: 10.1134/S106378421610008X
30. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen // *Nat Rev Immunol*. 2005. Vol. 5, iss. 8. P. 606–616. DOI: 10.1038/nri1669
31. Pivkin I.V., Peng Z., Karniadakis G.E., Buffet P.A., Dao M., Suresh S. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016. Vol. 113, iss. 28. P. 7804–7809. DOI: 10.1073/pnas.1606751113
32. Deplaine G., Safeukui I., Jeddi F., Lacoste F., et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro // *Blood*. 2011. Vol. 117, iss. 8. P. e88–e95. DOI: 10.1182/blood-2010-10-312801
33. Hochmuth R.M. Micropipette aspiration of living cells // *J Biomech*. 2000. Vol. 33, iss. 1. P. 15–22. DOI: 10.1016/S0021-9290(99)00175-X
34. Asaro R.J., Zhu Q., MacDonald I.C. Tethering, evagination, and vesiculation via cell-cell interactions in microvascular flow // *Biomech Model Mechanobiol*. 2021. Vol. 20. P. 31–53. DOI: 10.1007/s10237-020-01366-9
35. Klei T.R., Meinders S.M., van den Berg T.K., van Bruggen R. From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis // *Front Immunol*. 2017. Vol. 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00073
36. Dylan Tsai C.H., Sakuma S., Arai F., Taniguchi T., Ohtani T., Sakata Y., Kaneko M. Geometrical alignment for improving cell evaluation in a microchannel with application on multiple myeloma red blood cells // *RSC Advances*. 2014. Iss. 85. DOI: 10.1039/c4ra08276a
37. Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., van Wijk R. Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability // *Front Physiol*. 2018. Vol. 9. DOI: 10.3389/fphys.2018.00656
38. Namvar A., Blanch A.J., Dixon M.W., Carmo O.M.S., et al. Surface area-to-volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal through small channels // *Cell Microbiol*. 2021. Vol. 1. Id. e13270. DOI: 10.1111/cmi.13270
39. Mohandas N., Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects // *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1994. Vol. 23. P. 787–818. DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.004035
40. Diez-Silva M., Dao M., Han J., Lim C.T., Suresh S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease // *MRS Bull*. 2010. Vol. 35, iss. 5. P. 382–388. DOI: 10.1557/mrs2010.571
41. Renoux C., Faivre M., Bessaa A. et al. Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9. Id. 6771. DOI: 10.1038/s41598-019-43200-y
42. Alexy T., Detterich J., Connes P., Toth K., Nader E., et al. Physical Properties of Blood and their Relationship to Clinical Conditions // *Front Physiol*. 2022. Vol. 13. DOI: 10.3389/fphys.2022.906768
43. Skverchinskaya E., Levdarovich N., Ivanov A., Mindukshev I., Bukatin A. Anticancer Drugs Paclitaxel, Carboplatin, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Alter the Biophysical Characteristics of Red Blood Cells, In Vitro // *Biology (Basel)*. 2023. Vol. 12, iss. 2. Id. 230. DOI: 10.3390/biology12020230
44. Besedina N.A., Skverchinskaya E.A., Ivanov A.S., Kotlyar K.P., Morozov I.A., Filatov N.A., Mindukshev I.V., Bukatin A.S. Microfluidic Characterization of Red Blood Cells Microcirculation under Oxidative Stress // *Cells*. 2021. Vol. 10, iss. 12. Id. 3552. DOI: 10.3390/cells10123552

Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург (Левдарович Н.А., Букакин А.С.)

Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург (Гречаная Ю.С., Иванов А.С.)

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург (Грязнова М.О., Скверчинская Е.А., Миндукиев И.В.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Букакин А.С.)

Контакты: Букакин Антон Сергеевич,
antbuk.fiztek@gmail.com

Материал поступил в редакцию 11.12.2023

MICROFLUIDIC DEVICE FOR ANALYSIS OF RED BLOOD CELLS OF LABORATORY ANIMALS

N. A. Levdarovich¹, Yu. S. Grechanaya², A. S. Ivanov², M. O. Gryaznova³,
E. A. Skverchinskaya³, I. V. Mindukshev³, A. S. Bukatin^{1,4}

¹*Alferov National Research Academic University of the RAS, Saint Petersburg, Russia*

²*Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Higher School of Biomedical Systems and Technologies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

³*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, Saint Petersburg, Russia*

⁴*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia*

Laboratory rats are the preferred model for studying many socially significant diseases, such as cardiovascular diseases (heart attack and hypertension), diabetes, and cancer. Pathological processes in red blood cells (RBCs) lead to violations of their deformability, which entails a deterioration in the gas transport function and a change in the micro-rheology of the blood. Recently, microfluidic devices have begun to be used to study the behavior of human RBCs in microcirculation conditions *in vitro*, which makes it possible to record, sort and study healthy and damaged cells. By microfluidic analysis, pathological changes at the molecular and membrane levels were linked with modifications of cell shape and motion in fluid flow. In such devices, it is possible to directly simulate the transport of RBCs in microcapillaries under blood microcirculation conditions and quantitatively analyze how different drugs affect it. In this work, we investigated how the topology and geometrical dimensions of the channels of a microfluidic device affect the possibility of determining the average velocity of rat and human RBCs. This allowed us to quantitatively estimate the influence of oxidative stress on RBC transport and biophysical properties. The results obtained showed that the optimal design of a microfluidic device contained 16 parallel microchannels with dimensions of $2.2 \times 8 \times 200$ microns. In such microchannels, we accurately determined the speed of the single RBC of laboratory rats and humans, which moved under the microcirculation conditions, and identified the number of slow cells damaged by induced oxidative stress. The proposed method of simulation of blood microcirculation conditions in a microfluidic device has a broad range of applications and is aimed at studying the effects of oxidative stress on red blood cells in laboratory animals and humans, as well as monitoring the biophysical and functional properties of these cells in preclinical and clinical trials.

Keywords: microfluidic device, oxidative stress, red blood cells, blood microcirculation, microcapillar, laboratory rat

REFERENCES

1. Ciuffreda M.C., Tolva V., Casana R., Gnechchi M., et al. Rat experimental model of myocardial ischemia/reperfusion injury: an ethical approach to set up the analgesic management of acute post-surgical pain. *PLoS One*, 2014, Id. 95913. DOI: 10.1371/journal.pone.0095913
2. O'Connell K.E., Mikkola A.M., Stepanek A.M., Vernet A., et al. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comp Med.*, 2015, vol. 65, no. 2, pp. 96–113. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408895>
3. Delwatta Sh.L., Gunatilake M., Baumans V., Seneviratne M.D., et al. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. *Animal Model Exp Med*, 2018, vol. 1, no. 4, pp. 250–254. DOI: 10.1002/ame2.12041
4. Wang J., Zhang W., Wu G. Intestinal ischemic reperfusion injury: Recommended rats model and comprehensive review for protective strategies. *Biomed Pharmacother*, 2021, vol. 138, Id. 111482. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111482
5. Blais E., Rawls K., Dougherty B., et al. Reconciled rat and human metabolic networks for comparative toxicogenomics and biomarker predictions. *Nature Communications*, 2017, vol. 8, Id. 14250. DOI: 10.1038/ncomms14250
6. Romanova, E.V., Sweedler J.V. Animal Model Systems in Neuroscience. *ACS Chem Neurosci*, 2018, vol. 9, iss. 8, pp. 1869–1870. DOI: 10.1021/acscchemneuro.8b00380
7. Kohnken R., Porcu P., Mishra A. Overview of the Use of Murine Models in Leukemia and Lymphoma Research. *Front Oncol*, 2017, vol. 7, Id. 22. DOI: 10.3389/fonc.2017.00022
8. Soares R.O.S., Losada D.M., Jordani M.C., et al. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, iss. 20, Id. 5034. DOI: 10.3390/ijms20205034

9. Kuhn V., Diederich L., Kramer Ch.M., et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal*, 2017, vol. 26, iss. 13, pp. 718–742. DOI: 10.1089/ars.2016.6954
10. Nader E., Skinner S., Romana M., Fort R., et al. Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sick Cell Disease and Effects of Exercise. *Front Physiol*, 2019, vol. 10, Id. 1329. DOI: 10.3389/fphys.2019.01329
11. Chen Y., Li D., Li Y., et al. Margination of Stiffened Red Blood Cells Regulated By Vessel Geometry. *Sci Rep.*, 2017, vol. 7, Id. 15253. DOI: 10.1038/s41598-017-15524-0
12. Cheng X., Caruso Ch., Lam W.A., Graham M.D. Marginated aberrant red blood cells induce pathologic vascular stress fluctuations in a computational model of hematologic disorders. *bioRxiv*, 2023, Id 541016. DOI: 10.1101/2023.05.16.541016
13. Sebastian B., Dittrich P.S. Microfluidics to Mimic Blood Flow in Health and Disease. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 2018, vol. 50, iss. 1, pp. 483–504. DOI: 10.1146/annurev-fluid-010816-060246
14. Besedina N.A., Skverchinskaya E.A., Shmakov S.V., et al. Persistent red blood cells retain their ability to move in microcapillaries under high levels of oxidative stress. *Commun Biol.*, 2022, vol. 5, Id. 659. DOI: 10.1038/s42003-022-03620-5
15. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Altman S. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, iss. 10, pp. 2550–2555. DOI: 10.1073/pnas.1621226114
16. Gladkov A., Pigareva Y., Kutyina D. et al. Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels. *Sci Rep.*, 2017, vol. 7, Id. 15625. DOI: 10.1038/s41598-017-15506-2
17. Nejad A.E., Najafgholian S., Rostami A., Sistani A., Shojaeifar S. et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.*, 2021, vol. 21, Id. 62. DOI: 10.1186/s12935-020-01719-5
18. Barshtein G., Pajic-Lijakovic I., Gural A. Deformability of Stored Red Blood Cells. *Front Physiol.*, 2021, vol. 12, Id. 722896. DOI: 10.3389/fphys.2021.722896
19. Urbanska M., Muñoz H.E., Shaw Bagnall J., et al. A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements. *Nat Methods*, 2020, vol. 17, pp. 587–593. DOI: 10.1038/s41592-020-0818-8
20. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.*, 2017, vol. 2017, Id. 8416763. DOI: 10.1155/2017/8416763
21. Sudnitsyna J., Skverchinskaya E., Dobrylk I., Nikitina E., et al. Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 10, Id. 929. DOI: 10.3390/antiox9100929
22. Skverchinskaya E.A., Mindukshev I.V., Tapinova O.D., Filatov N.A., Besedina N.A., Bukatin A.S. [Investigation of Erythrocyte Transport through Microchannels After the Induction of Oxidative Stress with Tert-Butyl Peroxide]. *Zhurnal tekhnicheskoi fiziki* [Technical Physics], 2020, vol. 90, no. 9, pp. 1553–1559. (In Russ.). DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49689.403-19
23. Arashiki N., Otsuka Y., Ito D., Yang M., Komatsu T., Sato K., Inaba M. The Covalent Modification of Spectrin in Red Cell Membranes by the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2010, vol. 391, iss. 3, pp. 1543–1547. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.121
24. Jones C.N., Hoang A.N., Martel J.M., Dimisko L., et al. Microfluidic Assay for Precise Measurements of Mouse, Rat, and Human Neutrophil Chemotaxis in Whole-Blood Droplets. *J. Leukoc Biol.*, 2016, vol. 100, no. 1, pp. 241–247. DOI: 10.1189/jlb.5TA0715-310RR
25. Yeom E., Kim H.M., Park J.H., Choi W., Doh J., Lee S.J. Microfluidic system for monitoring temporal variations of hemorheological properties and platelet adhesion in LPS-injected rats. *Sci Rep.*, 2017, vol. 7, Id. 1801. DOI: 10.1038/s41598-017-01985-w
26. Nagy M., van Geffen J.P., Stegner D., Adams D.J., et al. Comparative Analysis of Microfluidics Thrombus Formation in Multiple Genetically Modified Mice: Link to Thrombosis and Hemostasis. *Front Cardiovasc Med.*, 2019, vol. 6, Id. 99. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00099
27. Kanas T., Acker J.P. Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in desiccated red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, vol. 49, iss. 4, pp. 539–547. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.024
28. Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat Protoc.*, 2010, vol. 5, pp. 491–502. DOI: 10.1038/nprot.2009.234
29. Bukatin A.S., Mukhin I.S., Malyshev E.I., Kukhtevich I.V., Evstrapov A.A., Dubina M.V. Fabrication of High Aspect-Ratio Microstructures in Polymer Microfluid Chips for in Vitro Single-Cell Analysis. *Tech. Phys.*, 2016, vol. 61, pp. 1566–1571. DOI: 10.1134/S106378421610008X
30. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.*, 2005, vol. 5, iss. 8, pp. 606–616. DOI: 10.1038/nri1669
31. Pivkin I.V., Peng Z., Karniadakis G.E., Buffet P.A., Dao M., Suresh S. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, vol. 113, iss. 28, pp. 7804–7809. DOI: 10.1073/pnas.1606751113
32. Deplaine G., Safeukui I., Jeddi F., Lacoste F., et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*, 2011, vol. 117, iss. 8, pp. e88–e95. DOI: 10.1182/blood-2010-10-312801
33. Hochmuth R.M. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech.*, 2000, vol. 33, iss. 1, pp. 15–22. DOI: 10.1016/s0021-9290(99)00175-x
34. Asaro R.J., Zhu Q., MacDonald I.C. Tethering, evagination, and vesiculation via cell-cell interactions in microvascular flow. *Biomech Model Mechanobiol.*, 2021, vol. 20, pp. 31–53. DOI: 10.1007/s10237-020-01366-9

35. Klei T.R., Meinderts S.M., van den Berg T.K., van Bruggen R. From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol.*, 2017, vol. 8, Id 73. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00073
36. Dylan Tsai C.-H., Sakuma S., Arai F., Taniguchi T., Oh-tani T., Sakata Y., Kaneko M. Geometrical alignment for improving cell evaluation in a microchannel with application on multiple myeloma red blood cells. *RSC Advances*, 2014, Iss. 85. DOI: 10.1039/c4ra08276a
37. Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., van Wijk R. Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol.*, 2018, vol. 9, Id. 656. DOI: 10.3389/fphys.2018.00656
38. Namvar A., Blanch A.J., Dixon M.W., Carmo O.M.S., et al. Surface area-to-volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal through small channels. *Cell Microbiol.*, 2021, vol. 23, iss. 1, Id. e13270. DOI: 10.1111/cmi.13270
39. Mohandas N., Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 1994, vol. 23, pp. 787–818. DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.004035
40. Diez-Silva M., Dao M., Han J., Lim C.T., Suresh S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.*, 2010, vol. 35, iss. 5, pp. 382–388. DOI: 10.1557/mrs2010.571
41. Renoux C., Faivre M., Bessaa A. et al. Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Sci Rep.*, 2019, vol. 9, Id. 6771. DOI: 10.1038/s41598-019-43200-y
42. Alexy T., Detterich J., Connes P., Toth K., Nader E., et al. Physical Properties of Blood and their Relationship to Clinical Conditions. *Front Physiol.*, 2022, vol. 13, Id 906768. DOI: 10.3389/fphys.2022.906768
43. Skverchinskaya E., Levdarovich N., Ivanov A., Mindukshev I., Bukatin A. Anticancer Drugs Paclitaxel, Carboplatin, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Alter the Biophysical Characteristics of Red Blood Cells, In Vitro. *Biology (Basel)*, 2023, vol. 12, iss. 2, Id. 230. DOI: 10.3390/biology12020230
44. Besedina N.A., Skverchinskaya E.A., Ivanov A.S., Kotlyar K.P., Morozov I.A., Filatov N.A., Mindukshev I.V., Bukatin A.S. Microfluidic Characterization of Red Blood Cells Microcirculation under Oxidative Stress. *Cells*, 2021, vol. 10, iss. 12, Id. 3552. DOI: 10.3390/cells10123552

Contacts: *Bukatin Anton Sergeevich*,
antbuk.fiztek@gmail.com

Article received by the editorial office on 11.12.2023

INTRODUCTION

Most preclinical studies of new drugs and therapies are conducted on animals. For laboratory rats, it is possible to use the same diagnostic methods that are used in humans, which makes rat extremely useful models of diseases [1]. The use of rats and mice accounts for 87–96% of the total number of animals used in preclinical studies and meets the basic requirements of vivarium content — small size, ease of handling and maintenance, fast reproduction, short life expectancy, and the ability to observe several generations in a short period of time [2, 3]. Rats, compared to mice, are the preferred model for hemodynamic disorders, such as stroke, myocardial infarction, cerebral or intestinal ischemia-reperfusion [4]. Catheterization, hemodynamic measurements, echo cardiography, histological examinations, and biochemical procedures are common tools in pathophysiological studies of the rat heart. White laboratory rats (*Ratus norvegicus*) have been bred under strictly controlled conditions for many years without gene migration and have been used in experiments for over a hundred years. Rats are an important experimental model in biological research within the framework of fundamental science, development, and determination of the quality of products and devices used in human and veterinary medicine, dentistry, and toxicological tests, as well as in assessing the harmfulness of certain chemicals changed in everyday life, industry, agriculture, and other safety assessments (resource <https://www.physiology.org/career/policy-advocacy/animal-research?SSO=Y>).

Rat genome matches human genome 95%, and, therefore, rats are more or less susceptible to diseases similar to human ones, and respond to treatment in much the same way [5]. Currently, many animal models of human disease exist. First of all, these are such socially significant diseases as diabetes, ischemia-reperfusion, toxicology, and cancer [6]. Thanks to the creation of mouse models of leukemia, two basic principles of chemotherapy were formulated — the principle of cyclic treatment to prevent relapses while reducing toxicity, and the principle of combination therapy, when drugs have a synergistic effect [7]. Until recently, animal models of brain diseases were absolutely indispensable, allowing testing new drugs and methods of therapy [8].

Tissue oxygenation and CO₂ export are the main tasks of the circulatory system, where red blood cells play a key role — transporting gases and maintaining systemic acid-base balance. They play a central role in

determining blood rheology, as well as the effectiveness of tissue perfusion and gas exchange, and are important systems of inter-organ communication [9]. Life-threatening conditions such as heart attack, stroke, compression syndrome are accompanied by a violation of blood rheology due to an increase in plasma viscosity, an increase in red blood cell aggregation, and a violation of their deformability [10]. It is assumed that changes in the physical properties of aberrant red blood cells during disease can provoke vascular dysfunction. In blood vessels, red blood cells preferentially move in a low-shear zone in the center of the channel, whereas white blood cells and platelets move near the walls of the canal. Erythrocytes with abnormalities (aberrant erythrocytes) experience severe displacement and are localized near vascular walls (marginalization) due to changes in size (aniscytosis), shape (poikilocytosis), and deformability (fragility/stiffness) of cells compared to normal cells [11]. Marginal aberrant RBCs (Red Blood Cells) generate large transient stress fluctuations due to high velocity gradients caused by their wall motion. At the same time, vascular endothelial cells experience abnormally high stress fluctuations, which are considered as the cause of vascular inflammation (vasculitis) and thrombosis [12]. Also, enhanced removal of non-functional erythrocytes (sequestration in the spleen) with an inadequate level of their replenishment, for example, when erythropoiesis is suppressed during chemotherapy, leads to the development of anemia. Thus, the study of the behavior of erythrocytes in a flow when modeling diseases in laboratory animals is included in the area of pressing health problems.

Microfluidic technologies provide new opportunities for biophysical phenotyping of single cells under conditions that mimic microcirculation [13, 14]. Their main advantage is the close correspondence of microfluidic devices (MFDs) to biological structures (a property of biomimetics), good conditions for manipulating the flows and compositions of solutions, which cannot be ensured by other research methods [15–17]. Microfluidic analysis is a successful method for assessing the behavior of red blood cells in various diseases, and the assessment of blood microrheology disorders is an urgent task for many areas of medicine — surgery, chronic diseases, disaster medicine. For the study of human red blood cells, various MFD topologies have been developed that allow recording key parameters of red blood cells: shape in the stream and shape recovery after shear, rate of transit through narrow microchannels, adhesion to microchamber

walls [18]. Microfluidic devices make it possible to directly simulate blood microcirculation *in vitro* at a high rate of statistical collection [13, 19].

Oxidative stress (OS) is associated with the development and aggravation of most pathological conditions — cardiovascular and neurological diseases, oncology, respiratory and rheumatoid diseases, nephrology, etc. [20]. As shown by our previous studies [14, 21, 22], oxidative stress, OS induced by organic *tert*-butylhydroperoxide (tBOOH), can serve as an adequate model of human erythrocyte lesions — control of cell volume regulation is impaired, activity of intracellular esterases decreases (drop in overall viability), lipid asymmetry is disrupted, and the adhesive properties of the membrane are enhanced, oxidized hemoglobin affects the stiffness of the erythrocyte membrane [14, 23]. As a result, cytology disorders affect the ability of human red blood cells to pass microchannels. Studies of animal blood cells performed using MFDs — neutrophils [24], rheology of whole blood in the artery–vein loop [25], formation of whole blood thrombus under the flow in genetically modified mice [26] are now beginning to appear.

No analysis of the behavior of rat red blood cells in microflow was found.

The objective of this study was to develop and optimize the MFD microchannel topology for quantitative analysis of erythrocyte transport in laboratory rats under *in vitro* microcirculation with oxidative stress.

STUDY MATERIALS AND METHODS

General principles

Human and rat red blood cells were used in the study to better match the MFD microchannel sizes. Human blood was obtained from the ulnar vein and collected in vacuum tubes (S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with 3.2% sodium citrate as an anti-coagulant. Rat blood was stabilized with heparin. Prior to blood donation, all volunteers signed informed consent; study protocol using human blood and animals is approved by the Ethical Committee of the IEPHB RAS and is based on compliance with the Declaration of Helsinki. Rat blood samples were obtained with anesthesia, and provided by employees of the IEPHB RAS for a pilot study. Sample preparation included 2-fold washing of erythrocyte sediment from residues of other blood cells in physiological buffer of the following composition, mM: NaCl — 140; KCl — 5; HEPES — 10; MgCl₂ — 2; D-glucose — 5, EGTA — 2, buffer osmolality was 300 mOsm/kg H₂O

(Osmomat 3000 cryoscopic osmometer, Gonotec, Germany), pH 7.4. OS was induced by incubation of erythrocytes with tBOOH (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) at a final concentration of 1.0 mM, 3 h and 37 °C on a thermal shaker at 420 rpm (Eppendorf, Hamburg, Germany). In all experiments, the concentration of erythrocytes in the incubation suspension was maintained at the RBC level of $0.5 \cdot 10^9$ cells/mL, which fixed a constant level of specific concentration of tBOOH to obtain correct results and allowed comparison of erythrocyte responses to OS for humans and rats. All manipulations with human and rat cells were tested under the same conditions.

Recording oxidative stress

The development of OS was assessed by the formation of oxidized forms of Hb hemoglobin (HbFe²⁺ transition into HbFe³⁺). The absorption spectra of lysates of samples of erythrocytes incubated with tBOOH were recorded using a SPECS SSP-715-M spectrophotometer (Spectroscopic Systems LLC, Moscow, Russia) in the range of 300–700 nm. The content of hemoglobin forms, oxyhemoglobin (HbFe²⁺), methemoglobin (HbFe³⁺) and hemichrome (Hcr) was calculated from the absorbance of characteristic peaks at 560, 577, 630 and 700 nm. The content of Hb forms was calculated using millimolar extinction coefficients and expressed as % of all forms [27]. Violations of lipid asymmetry of erythrocyte membranes were assessed by the release of phosphatidylserine (PS) to the outer side of the membrane during a test with the annexin V-FITC test (Biolegend, The Netherlands). PS yield is part of programmed cell death (apoptosis). The calcein AM assay (Molecular Probes, Eugene, USA) was used to record intracellular esterase activity. Annexin-positive cell count and fluorescence intensity in other tests were measured by flow cytometry (CytoFlex cytofluorimeter, Beckman Coulter, USA; Shared research facility of IEPHB RAS) using previously used protocols [21] in CytoFlex software. Blood parameters, including red blood cell count (RBC), red blood cell volume (MCV) and distribution width (RDW) were monitored using a hematology Medonic-M20 analyzer (Boule Medical AB, Sweden).

MFD manufacturing

MFDs were made of polydimethylsiloxane (PDMS) by soft lithography using a silicon master mold manufactured by photolithography and plasma etching or photolithography of SU-8 2005 photoresist

on a silicon wafer [28, 29]. The depth of the microchannels on all master molds was 8 μm . To select the optimal geometry of the channels, the width and length of the recording channels were varied on the master form. Their dimensions were measured using a Supra 25 scanning electron microscope (Carl Zeiss, Germany) and a high resolution XP-1 profilometer (Ambios Technology, Santa Cruz, CA, USA). Before measurements, the master form with SU-8 structures was coated with a 5 nm thick chromium film by electron beam spraying. PDMS replicas were produced by curing a degassed mixture of a base of silicone elastomer Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, USA) and a hardener mixed in a ratio of 10: 1, which was poured onto master forms placed in Petri dishes and kept at 65 °C for 4 hours in the oven. Holes were made on the PDMS replicas separated from the master mold using a biopsy punch with a diameter of 1 mm. PDMS replicas and degassed slides were treated with oxygen plasma, which ensured their covalent adhesion. The MFD was finished by heat treatment at 95 °C for 1 hour.

Data recording and mathematical processing

Before starting the experiment, microchips were filled with buffer to prevent erythrocyte adhesion to PDMS and to remove air bubbles. The prepared human or rat erythrocyte suspension (5×10^7 cells/mL) was injected under constant hydrostatic pressure to maintain the same rate of cell entry into all microchannels, even if a portion of them were plugged. Tubing tubes were used to introduce cells into the devices. Data for the analysis of erythrocyte transport in microchannels were obtained by recording video at a speed of 790–810 frames/s using a XIMEA MC023MG-SY camera (XIMEA Corp., Lakewood, California, USA) on a Leica DM4000B LED microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) with an N PLAN L 20/0.40 lens (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A region of interest (ROI) containing one microchannel was selected for recording. If the chip consisted of many channels (32 or 16), then for each sample at least 4–7 different channels were recorded on one microchip. To obtain statistically correct results, the total number of cells analyzed in each experiment was more than 1000.

To calculate the speed of movement of red blood cells in microchannels simulating microcapillaries of the circulatory system, an original algorithm developed in the MATLAB software package was used (The MathWorks: <https://zenodo.org/records/6639046>).

To highlight moving cells in images, the foregroundDetector function was used, which converted the image into a binary mask, where 0 is the background pixel and 1 is the moving object pixel. After that, the markers recorded the time of entry and exit of the cell from the registration channel. The developed algorithm has several levels of self-tests to eliminate incorrectly defined cell passages.

The average rate of cell movement in the microchannels thus obtained was normalized to the rate of fluid flow, which was determined by cell movement in wider supply channels:

$$V = \frac{V_n}{\langle V_w \rangle} \cdot \frac{S_n}{S_w},$$

where V — normalized value of cell velocity; V_n — cell velocity in a narrow channel (in pixels/frame); $\langle V_w \rangle$ — average cell velocity in a wide channel (in pixels/frame), equal to the flow velocity in a wide channel; S_n — the cross-sectional area of the narrow channel; S_w — the cross-sectional area of the wide channel.

Statistical analysis was performed using Excel 2016 software (Microsoft Corporation), OriginPro 2021b (Origin Lab Corporation), and GraphPad Prism 8 (SanDiego, California, USA). Data are expressed as $M \pm SD$ (in terms of mean and standard deviation); analysis of normality of distribution was performed using the Shapiro-Wilk test; differences between groups were assessed using Student's t-test with two values. An unpaired t test was used when comparing data between microarrays of different sizes. A paired test was used to compare tBOOH exposure data. Significant differences were recorded at uncertainty $p \leq 0.05$. The number of biological samples n analyzed in each MFD type is shown in Tab. 1.

Tab. 1. Number n of samples analyzed with each MFD type

RESULTS AND DISCUSSION

Model of effect on erythrocytes

When developing MFPs for assessing red blood cells, a key parameter is the mean cell volume (MCV) and how this volume can change under different influences. In addition, the behavior of erythrocytes in a flow is set by their relative rigidity, which depends

on the intracellular hemoglobin content and the properties of the membrane (the interaction of the lipid bilayer and the cytoskeleton). The circulating pool of erythrocytes is a population that is heterogeneous in its biophysical parameters (age, wear); the red blood cell distribution width (RDW) indicator shows the degree of disturbance of the entire cell population. OS was selected as a condition that has a strong effect on cytological indicators of erythrocytes.

Changes in cell volume and membrane stiffness occurring during OS can change the biophysical parameters of erythrocytes during transit through microchannels [14].

To test MFDs in the range of possible deviations in the size and rigidity of erythrocyte membranes, an oxidative stress model was selected, and preparatory experiments were carried out to assess the transformation of rat and human erythrocytes. Comparative analysis of the accumulation of oxidized forms of hemoglobin during RBC incubation at 0.5×10^9 cells/mL, 3 hours, at 37 °C (Fig. 1, a) and red blood cell swelling (Fig. 1, б), showed that changes in rats occur much more intensively than in humans. The accumulation of oxidized forms of hemoglobin is evidence of a change in the stiffness of erythrocyte membranes, which was shown by direct atomic force microscopy [14]. Disruption of volume regulation due to a decrease in the overall viability of erythrocytes (Fig. 1, r, calcein test) led to increased hemolysis (Fig. 1, в). The findings indicate that incubation conditions of rat erythrocytes with tBOOH 1 mM should be considered as a severe effect causing the death of red blood cells both by apoptotic (externalization of phosphatidylserine, annexin test, Fig. 1, д) and necrotic pathways (hemolysis, Fig. 1, в). Enhanced microparticle formation is possible in both variants of red blood cell death (data presented in Appendix Fig. II) [21].

Fig. 1. Cytomorphological changes in human ($n = 9$) and rat ($n = 7$) erythrocytes by tBOOH 1 mM induced oxidative stress, 3h.

Exposure causes: а — accumulation of non-functional forms of hemoglobin (methemoglobin, MetHb, and hemichrome, Hcr); б — red blood cell swelling (MCV); в — significant increase in hemolysis; r — decreased activity of intracellular esterases (Calcein-AM viability test); д — phosphatidylserine output on the outer side of the membrane (Annexin V-FITC test); e — relative sizes of rat and human red blood cells can be represented by a microphotograph, scale 20 μ m.

Methods: а, б — spectrophotometry; в — hematological analysis; r, д — flow cytometry.
p — probability of error of comparative statement (uncertainty) by Student's t-test

Pre- and post-incubation human MCV with tBOOH 1 mM was 87.5 ± 1.1 vs. 106.4 ± 8.1 fL (with uncertainty $p < 0.001$); for rats — 48.1 ± 1.2 vs. 61.4 ± 3.9 fL, $p < 0.001$. Although the exposure conditions were similar, the starting MCV value of rats and humans differs by 1.81 times, which obviously could affect the specific concentration of oxidant per cell volume.

When developing the MFD, the size of erythrocytes in a normal state (Fig. 1, e) and limit MCVs at swelling during OS induction (Fig. 1, б) were taken into account.

The development of the MFD included two design directions — creating a topology that simulates the sinus of the spleen and creating a topology that simulates the capillary network.

Tab. 2 presents the characteristics of the developed MFDs.

Tab. 2. MFD topology and dimensional characteristics

Simulated spleen sinuses in a microfluidic device

The spleen is the largest lymphatic organ, protects the body from pathogens entering the bloodstream, and also serves as a filter that can remove red blood cells from the circulation due to their physiological aging or pathological changes [30]. Computer simulation results show that the spleen selects red blood cells to continue blood circulation based on their geometry, which provides critical boundaries linking surface area and volume of healthy red blood cells beyond which red blood cells do not meet "the test for physical fitness" and do not pass through the slits of the spleen sinuses [31]. With the help of such a "fitness test," the body gets rid of erythrocytes with disorders. To simulate spleen sinuses (see Fig. 2, a), the MFD was equipped with a microchannel design presented in Fig. 2, б.

Fig. 2. Schematic diagram of spleen sinus (a) and MFD microchannels simulating spleen sinuses (б, в). The frame on the diagram (a) highlights the sinus slit, this section on the microchip (б) is indicated by a dashed rectangle, a cavity element is made in front of the entrance to the slit. Normal red blood cells accumulated in front of the microchannels, but could pass them (в). Erythrocytes treated with tBOOH 1.0 mM, 1 h, became rigid, their accumulation caused channel occlusion. Diagram of spleen sinus is given in [34]

The design of this MFD provided a small depression in front of the entrance to the microchannel (chamber in front of the sinus entrance), the width of the microchannel was 1.5–2 μm ; height 2.7–3.2 μm , length 10–15 μm . These parameters were selected according to the value of the upper limit of the height of the splenic sinus slit based on experiments for determining ultrastructural characteristics using a transilluminating electron microscope [32]. The actual shape of the slits in the spleen is not rectangular, but is an elongated ellipse. It is impossible to make holes with such a cross section by soft lithography, and by 3D printing it is possible to keep the shape, but it is impossible to achieve such dimensions.

The effective stiffness of the endothelial cells lining the gap is about 100 times higher than that of erythrocytes [33], PDMS stiffness is also higher than cell stiffness (100 kPa ÷ 3 MPa, depending on the method of preparation), which partly corresponds to the conditions of the spleen sinus model. Test results showed that healthy rat red blood cells can pass through such narrow microchannels, but only one cell at a time.

To test the ability of red blood cells to pass MFD microchannels that mimic spleen sinuses, an oxidative stress model was chosen. We have previously shown that RBCs exposed to the organic peroxide tert-butylhydroperoxide (tBOOH) in certain concentrations, spherize and swell [21]. Oxidative stress-induced increase in red blood cell volume can impede their passage through microchannels. Testing of erythrocyte flow behavior showed that treatment with even low concentrations of tBOOH 0.3–0.5 mM hydroperoxide, 3 h, causes almost complete stopping of transit and clogging of microchannels. In this case, the data obtained are consistent with the literature data on erythrocyte sequestration with deformability disorders. Poorly deformed and abnormal red blood cells cannot squeeze into narrow interendothelial slits and return to circulation. They remain in pulp space and are utilized through phagocytosis by macrophages or dendritic cells [31].

The results obtained show that, due to the close correspondence of the developed MFD to the biological structure of the splenic sinuses, such a microchip can be used to assess the effect of xenobiotics (drugs, toxins) on erythrocytes. Additionally, the functionality of such chips can be enhanced, for example, by introducing macrophages into the flow buffer. Macrophages concentrated in the cavern region will attack red blood cells with disorders that emit "eat me" signals — externalization of phosphatidylserine to the outer side of the membrane and the formation of new recognition sites due to the transformation of the band 3 protein (AE1).

However, this MFD topology had significant drawbacks — the microchip could only be used to qualitatively assess the ability of red blood cells to pass through microchannels and the likelihood of their occlusion. Even manual counting of cell movement was difficult, since several red blood cells could accumulate in the chamber in front of the entrance. In this regard, it was concluded that, despite the close correspondence to the biological prototype, this MFD topology is of little use for quantitative assessment of the movement of red blood cells in microcapillaries.

Capillary network simulation in a microfluidic device with microchannel array

The main gas exchange between red blood cells and body tissues occurs when red blood cells move along microcapillaries, the sizes of which are comparable or smaller than the size of the cells. To do this, they must be able to deform, maintain the elasticity of the membrane and cytoskeleton. Under the influence of oxidative stress, there is an increase in the volume of cells, their sphericization, and an increase in the rigidity of the membrane and cytoskeleton, which can lead to decreased red blood cell capacity to navigate the microcapillaries of the circulatory system. To study the effect of OS on red blood cells, two MFD topologies were developed, called the "capillary network." Fig. 3, a, shows a fragment of an MFD with 32 parallel channels with dimensions of $3.0 \times 8.0 \times 330 \mu\text{m}$, before each of which a small catching chamber was made to direct cells into the channel.

Fig. 3. Microfluidic chip with a parallel arrangement of 32 microchannels.

a — general view of a fragment of the microchip, below is the area for recording the movement of red blood cells ($3.0 \times 8.0 \times 330 \mu\text{m}$).

б — histograms of the distribution of the average speed of movement along the microchannels of human and rat erythrocytes, normally and after exposure to organic t-butylperoxide (tBOOH).

Microchip images were taken using a Leica DM4000 BLED optical microscope with 5x (top) and 20x lenses (recording area)

This MFD showed sufficient sensitivity to abnormalities in erythrocyte cytology parameters. A decrease in the rate of erythrocyte passage was detected after exposure to tBOOH 1 mM in humans ($p < 0.027$), but not in rats ($p < 0.054$). The distribution of red blood cells by rate is shown in Fig. 3, б. The results showed that this MFD has the following disad-

vantages: 1 — uneven supply of erythrocyte suspension to recording channels (occurrence of zones with recursive movement of suspension); 2 — impossibility of software processing of video files, manual counting of a large array of frames is required. In further experiments, this version of the MFD was not used.

Capillary network simulation in a microfluidic device with parallel microchannels and leveling chamber

After analysis of experimental results in an MFD with 32 parallel 330 μm microchannels, it was proposed to make a separate supply channel to each microchannel simulating a capillary of the circulatory system. This makes it possible to more evenly bring cells to each microchannel and thereby provide the possibility of computer processing of the resulting video files with cell movement. Initially, this MFD topology was developed for human erythrocyte movement studies in microcapillaries (see Fig. 4), and included two modifications of cell suspension injection: direct and distributed input, as well as three variants of recording channel lengths (see Tab. 2).

Fig. 4. General view of MFD with a distributed cell suspension supply system, an alignment chamber and 16 parallel microchannels

The image above (a) shows half of the MFD channels; from below (б) — a channel for recording the movement of erythrocytes with dimensions $2.2 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$, where 1 — a software marker for determining the time of cell entry into the microchannel, 2 — a software marker for determining the time of cell exit from the microchannel; bright line — the trajectory of the cell in a wide channel to calculate the fluid flow rate in the MFD channels.

Images taken with 5x (a) and 20x (б) optical microscope

Preliminary testing showed that the distributed injection of cell suspension ensures their uniform supply to all 16 measuring microchannels. The length of the measuring channels was chosen to be 200 μm , since in such channels it is possible to reliably determine the average cell speed using a video camera with a recording frequency up to 1000 fps. Also, channels of this length do not create too much hydraulic resistance, which makes it possible to use hydrostatic pressure to organize the movement of liquids in the MFD. A leveling microchannel was added in front of the measuring microchannel to reduce the scatter in the speed of erythrocyte movement [36]. Thus, all further

experiments to determine the optimal width of microchannels for studying the movement of rat erythrocytes under the influence of OS were carried out in an MFD with this topology.

Analysis of the video of the movement of red blood cells in microchannels $1.5 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$ showed that at this width occlusions are possible even by normal red blood cells of rats. Induction of OS by treatment of 1 mM tBOOH cells, 3 h, led to an increase in the volume of red blood cells, which caused multiple occlusions and made the channels poorly passable for rat red blood cells. Based on the results, it was concluded that such sizes of microchannels are not suitable for quantitative recording of microrheology disorders, and only a qualitative analysis of the ability of rat red blood cells to pass through microcapillaries of this size and the likelihood of occlusions is possible (see Fig. 5).

Fig. 5. Image of $1.5 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$ microchannel occlusion by rat erythrocytes caused by mismatch of microchannel width to cell size. Image taken with a Leica DM4000 BLED optical microscope with a 20x lens, one of 16 recording microchannels is shown

Red blood cell movement data analysis in microchannels with sizes of $3 \times 8 \times 200$ microns showed that in such microchannels it is possible to record violations of the microrheology of human erythrocytes, but they have low sensitivity to disorders of rat red blood cells because they are smaller in size and volume (MCV). In the Appendix, Fig. II shows plots of the mean speed distribution of human and rat red blood cells treated with tBOOH 1 mM, 3 h, in microchannels with dimensions of $3 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$.

Analysis of the movement of erythrocytes in microchannels with a width of $2.2 \times 8 \times 200$ microns showed that such a microchip quite well records violations of the microrheology of both human and rat erythrocytes. The choice of sizes of microchannels is due to the fact that normal red blood cells can freely pass through them, and spherified ones, as a result of various damages, have a reduced speed due to friction against the walls.

Since under OS caused by tBOOH 1 mM, 3 h, the range of human MCV values was 101–112 fL, while for rats 58.4–63.8 fL, it is obvious that rat red blood cells, even in a swollen and spherified state, will have a significantly lower volume than healthy human red blood cells. It can be assumed that the decrease in the

rate of transit of rat erythrocytes in microchannels was due not only to the influence of cell volume, but also to a change in their rigidity under the influence of OS.

It is known that erythrocyte stiffness increases during structural changes in cytoskeletal proteins, cell spherization due to the loss of part of the membrane, and clustering of transmembrane proteins [37, 38]. That is, the decrease in the rate of transit of rat erythrocytes in the microchannels could be due not only to the influence of cell volume, but also to a change in cell deformability. The obtained data on the movement of rat erythrocytes in microchannels suggest that it is reasonable to continue the study of the cytological response to OS in rats in more depth. This will make it possible to compare the morphological and cytological transformation of membranes and biophysical parameters of rat and human red blood cells and more fully use microfluidic testing.

Study of MFD with parallel channels of variable depth

At the level of the capillary network of the circulatory system of animals and humans, the diameter of microvessels can change. To simulate the conditions that arise when the diameter of the microcapillaries changes, as well as to reduce the hydraulic resistance of the supply microchannels, an MFD with a microchannel height difference of 8–4 μm (see Fig. 6) was developed.

Fig. 6. Image of MFD with channels with stepped height change.

At the boundary of the depth change, congestion and occlusion of red blood cells occurs, preventing their further movement into the measuring microchannel. The arrow indicates the accumulation of erythrocytes at the height difference of the microchannel. Images taken with Leica3 optical microscope with 20x lens

Due to the limitations of the technology for making silicon master molds for soft lithography of MFDs from PDMS, it is possible to change the depth of the channels only step by step. Testing of the obtained MFDs showed that the stepwise difference in the depths of the microchannels serves as a place for the accumulation of red blood cells, creating congestion and occlusion. In this regard, in further experiments, this version of the MFD was not used and it was concluded that the use of other technologies for the manufacture of MFDs, for example, high-resolution

3D printing, is required to simulate capillaries with a variable cross section.

CONCLUSION

Red blood cells, being the most numerous cells in the body, perform their main function of gas exchange and gas transfer, moving along the microcapillaries of the circulatory system, the sizes of which are comparable or smaller than the size of the cells. The main factors that determine the deformability of red blood cells, allowing them to pass through such small capillaries and deliver oxygen to peripheral vessels, organs, and tissues, are the high ratio of membrane surface to volume (morphology), the intrinsic viscosity of the cell, and the viscoelastic properties of the membrane [38–42]. The use of microfluidic technologies makes it possible to directly simulate the movement of erythrocytes in microcapillaries under conditions of blood microcirculation and quantitatively analyze the effect of drugs on it *in vitro* [43]. Due to the fact that humans and animal models used in preclinical studies have different sizes and volumes of red blood cells, the topology and specific sizes of MFD microchannels need to be optimized for a specific organism. [44].

Studies have shown that the geometry and dimensions of MFD microchannels should be selected taking into account the characteristics of not only healthy, but also damaged cells to ensure the possibility of recording changes in the biophysical parameters of red blood cells under the influence of oxidative stress. The most critical size of a microchannel, affecting the sensitivity of measuring the speed of movement of red blood cells in it, is its width. Screening of nine different MFD topologies determined that a microfluidic channel of $2.2 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$ was optimal for measuring changes in the biophysical characteristics of both human and rat erythrocytes, caused by oxidative stress, induced by incubation of the cells for 3 hours with *tert*-butyl hydroperoxide at a concentration of 1 mM. An increase in channel width from the optimal 2.2 μm up to 3 μm led to the fact that MFPs became completely insensitive to changes in the biophysical properties of red blood cells in laboratory rats, and also became less sensitive to changes in the properties of human red blood cells. In contrast, decreasing the optimal width of microchannels resulted in their multiple occlusions by healthy blood cells of both humans and rats, making it impossible to use such MFDs for quantitative studies. The length of the measuring microchannels is also an important parameter, since it im-

poses requirements on the video camera recording the cell movement. When using cameras with a shooting frequency of up to 1000 frames per second, the length of the microchannels must be at least 200 microns. If the MFD contains an array of microchannels, then the distributed system for supplying blood cells to measuring microchannels, based on their sequential separation into 2 channels, has shown itself most well. Its use made it possible to more evenly feed cells to the input of measuring microchannels, control their speed and an amount for recording the movement of the unit cells.

Thus, in the course of the study, the optimal topology of the microfluidic device and the size of the measuring channels for *in vitro* modeling of the movement of red blood cells of laboratory rats and humans in microcapillaries of the circulatory system

under conditions of oxidative stress were determined. The optimal MFD contained 16 microchannels with dimensions of $2.2 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$ and a distributed cell delivery system to them, which provided a measurement of erythrocyte velocity with an accuracy sufficient to detect a subpopulation of damaged rat and human slow erythrocytes *in vitro*. The appearance of such a subpopulation indicates the toxic effect of the oxidizing agent and the excess of the capabilities of the built-in antioxidant system to protect cells from oxidative stress, which leads to the loss of their function [14]. Developed MFDs have broad prospects for further study of the effect of oxidative stress on human and laboratory animal red blood cells, as well as for monitoring the biophysical and functional properties of erythrocytes in preclinical and clinical studies of drugs.

APPENDIX

Fig. II. Analysis of relative rates of microparticle formation, and population heterogeneity enhancement by erythrocyte volume under tert-butylperoxide-induced oxidative stress, 1 mM, 3 h. а — microchannels $3 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$: a population of red blood cells of humans ($n = 3$) and rats ($n = 2$); б — in microchannels $2.2 \times 8 \times 200 \mu\text{m}$: erythrocytes of humans ($n = 9$) and rats ($n = 8$); dashed box — a subpopulation of slow cells, the appearance of red blood cells with impaired ability to pass narrow microchannels; в — increased loss of part of the membrane as a result of the formation of red blood cell microparticles; г — cell expansion by volume (RDW). Data are presented as $M \pm SD$ with p-values indicated by Student's t-test (ns — no differences)