



## Использование микрофлюидной технологии в исследовании системы гемостаза

Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), ежегодно в мире на лабораторную диагностику расходуется более 100 млрд долларов. Это обусловлено тем, что лабораторные методы предоставляют врачам-клиницистам около 80% всей диагностической информации. Если в 1970 г. лабораторная диагностика имела в своем арсенале 81 лабораторный тест, а в 2000-м – 170 тестов, то к настоящему времени их количество приближается к 1 тыс. анализов. Сегодня лабораторная диагностика располагает значительным объемом данных о молекулярных механизмах многих происходящих в живом организме процессов. Это заставляет изобретать и развивать новые информативные лабораторные методы диагностики. Одним из таких инновационных методов является микрофлюидная технология.

### Микрофлюидная технология

В конце 80-х гг. XX века профессор А. Manz предложил концепцию создания аналитических систем на микрочиповой платформе или микрофлюидных чипах (МФЧ) [1]. Эти системы представляют собой синтез микрофлюидных аналитических систем и интегральных схем. Их называют «lab-on-a-chip» (лаборатория на чипе) или mTAS «micro Total Analysis Systems» (миниатюризованные системы полного анализа). Термины «lab-on-a-chip» и «mTAS» являются синонимами. В МФЧ основные стадии анализа (загрузка, транспортировка пробы и реагентов, фильтрация и концентрирование пробы, химические реакции, разделение продуктов, детектирование аналита и т.д.) можно реализовать на одной компактной подложке. МФЧ востребованы как современный аналитический инструмент в научных исследованиях, биотехнологии, медицине, криминалистике, экологии и т.д. [2-4]. Одним из первых аналитических методов, реализованных на МФЧ, был метод капиллярного электрофореза [5]. В настоящее время наиболее развиты электрофоретические и электрохроматографические методы разделения пробы на МФЧ, которые применяются для экспресс-анализа ДНК и РНК, секвенирования ДНК [6], анализа белков [7], неорганических и органических веществ [8], иммунного анализа [9]. Создаются интегрированные микрофлюидные системы, в которых совмещено сразу несколько функциональных устройств и модулей. К основным преимуществам mTAS относятся:

- мобильность;
- износостойкость;
- высокая чувствительность;
- снижение расхода реагентов;
- низкое энергопотребление;
- короткое время получения результатов;
- меньшее пространство, занимаемое в лаборатории;
- дешевое серийное производство;
- управляемая диффузия;
- высокоскоростная последовательная обработка результатов.

### Микрофлюидные устройства для мониторинга гемостаза

Чтобы избежать серьезных осложнений, связанных с кровотечением или тромбозом, во многих клинических ситуациях (хирургическое вмешательство, травма, сепсис, применение антикоагулянтной и антитромбоцитарной терапии) необходим быстрый и точный мониторинг системы гемостаза [10-12]. Во всем мире растет число пациентов, нуждающихся в применении экстракорпоральных вспомогательных устройств (гемодиализ, мембранная оксигенация, механическая поддержка кровообращения и др.), для которых требуется точный и персонализированный антикоагулянтный мониторинг в режиме реального времени с возможностью сохранения гемостаза в естественных условиях с целью предотвращения образования сгустков на пути транспорта крови [13,14]. Большинство из этих устройств не способны точно и непрерывно осуществлять дозирование антикоагулянта, что часто приводит к большому кровотечению и в конечном итоге – к смерти [15]. Кроме того, для осуществления мониторинга гемостаза у постели

больного требуется использование небольшого объема крови, что особенно критично у детей с острой коагулопатией (приобретенной или врожденной), так как дети более уязвимы, чем взрослые [16-18].

В течение последних нескольких лет были разработаны различные тесты и анализаторы для оценки свертывания крови и определения функции тромбоцитов *in vitro*. Эти тесты включают такие показатели, как время кровотечения, активированное время свертывания (АВС), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбозластография, агрегометрия тромбоцитов и многие другие. Несмотря на то что применение данных тестов обеспечивает предоставление полезной информации о состоянии коагуляционного статуса или функции тромбоцитов, они имеют существенные ограничения с точки зрения их способности предсказывать тромбоз или риск кровотечения в различных клинических случаях. Это связано с тем, что в указанных тестах отсутствуют многие ключевые для контроля гемостаза показатели, имеющиеся в естественных условиях (*in vivo*). Главный недостаток этих тестов заключается в измерении свертывания крови статически (не в потоке) или в не соответствующих условиях потока крови. При этом не учитывается влияние гемодинамической силы (давление, текучесть, напряжение сдвига) и связанное с этим обстоятельством клеточное взаимодействие, которое, как известно, ведет к образованию тромбов в сосудах [19]. Было показано, что инициация агрегации тромбоцитов при артериальном тромбозе *in vivo* и свертывание в экстракорпоральных устройствах обычно происходят в местах резкого возмущения потока, в точках застоя крови и на стенозированных участках [20,21]. Однако ни один из рутинных тестов для исследования гемостаза не учитывает эти физиологические условия для оценки свертывания крови.

С этой целью были разработаны микрофлюидные устройства с камерами параллельного потока, имитирующими атеросклероз сосудов и воссоздающими физиологическую скорость сдвига, и градиенты с использованием цельной крови человека в комбинации с покрывающим поверхность внеклеточным матриксом (коллагеном) [22, 23]. В ходе исследования подтвердилось, что гемостаз индуцируется при контакте крови с матрицей в зависимости от скорости локального потока. К сожалению, результаты, полученные в процессе научных исследований, не были внедрены в клиническую практику, и прежде всего потому, что подобные устройства не предназначены для использования у постели больного и требуют специализированных приборов и точной обработки изображения [24-27].

В работе А. Jain и соавт. [28] описано простое микрофлюидное устройство для мониторинга гемостаза и функции тромбоцитов в режиме реального времени. Оно позволяет быстро определить время свертывания нативной цельной крови путем перфузии через сеть каналов и имитирует локальные физиологически значимые изменения в гемодинамическом потоке при стенозе артерий. Важным в разработке этого микрофлюидного устройства является то, что каналы включают многочисленные области престеноза и постстеноза, что, в свою очередь, генерирует

патофизиологический сдвиг скорости и градиента, которые действуют как гемодинамические активаторы в случае свертывания крови внутри устройства. Для точной оценки образования сгустка в автоматическом режиме производится изменение давления жидкости в случае увеличения окклюзии канала, что отслеживается устройством в режиме реального времени, а физиологическое «микрофлюидное» время свертывания выводится на экран монитора в виде количественной конечной точки с использованием новой математической модели. Такое устройство может быть напрямую интегрировано в сосуд, чтобы производить мониторинг гемостаза нативной крови в режиме реального времени.

### Мониторинг гемостаза с использованием микроустройства

При перфузии цельной крови через микрофлюидное устройство, содержащее микроканалы, имитируется стеноз артерий (например, сужение из-за атеросклеротических бляшек). В первой области микроканалов создается внезапное ускорение жидкости (престеноз), следующая область – однородный сдвиг (область стеноза), после которой следует область микроканалов с внезапным замедлением (постстеноз) (рис. 1).

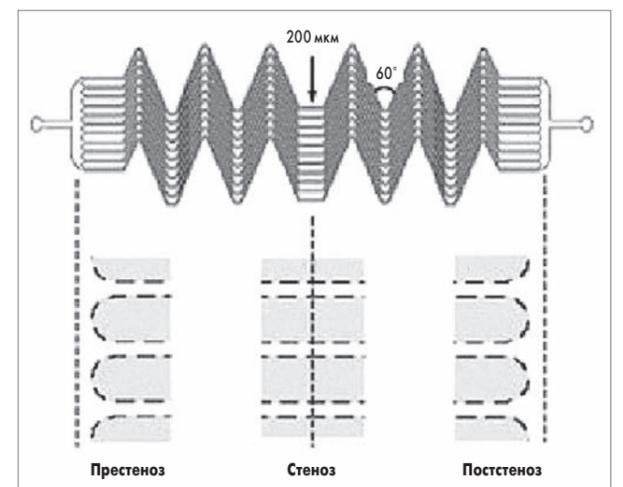


Рис. 1. Схема устройства с областями микроканалов (престеноз, стеноз, постстеноз). Центральная стенозированная область содержит 12 параллельных каналов (ширина 200 мкм, высота 75 мкм). Каналы (престеноз и постстеноз) многократно повернуты несколько раз под углом 60°

Вначале исследуемую цельную кровь вводят в специальный резервуар, после чего она распределяется по 12 параллельным каналам с последующим сходом потока через выходное отверстие. Общая ширина и длина устройства разработаны таким образом, чтобы соответствовать стандартному стеклянному слайду для проведения микроскопии изображения в режиме реального времени с использованием объектива с низким увеличением (рис. 2).

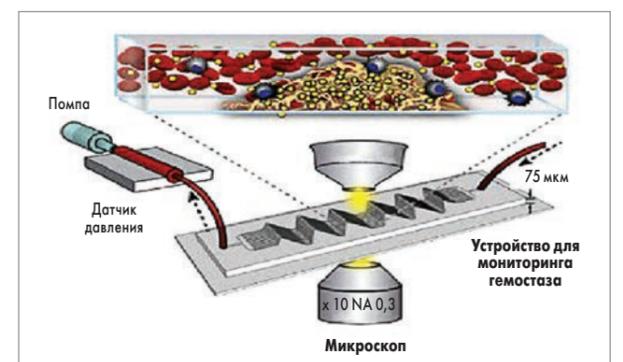


Рис. 2. Схема устройства для мониторинга гемостаза. Цельная кровь подается с помощью шприца через датчик давления, который подключен к устройству и используется для определения времени свертывания крови. Возможно применение флуоресцентного микроскопа для мониторинга процесса образования тромба

Каждый канал содержит несколько секций под углом 60° и прямыми участками для достижения максимально возможной области поверхностного контакта в процессе образования сгустка (производится три параллельных измерения на стеклянном слайде устройства) (рис. 3).

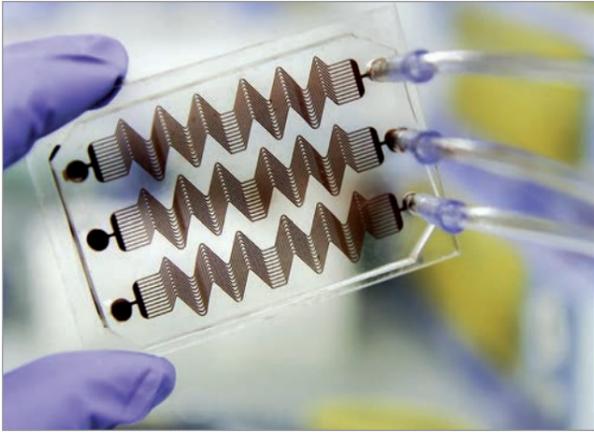


Рис. 3. Устройство для мониторинга гемостаза, состоящее из одного модуля (материал – полидиметилсилоксан) на верхней части стандартного предметного стекла (75x50 мм)

Неньютоновский компьютерный анализ крови, протекающей через устройство, подтверждает, что скорость сдвига быстро меняется при престенозе и постстенозе на дистанции 300 мкм и остается в основном однородной на прямом участке (рис. 4).

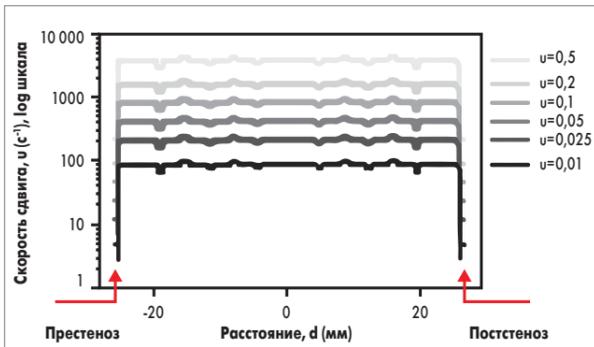


Рис. 4. Результаты компьютерного моделирования кровотока через устройство. Указана скорость сдвига по всей длине устройства (престеноз, стеноз и постстеноз) для различных входных скоростей потока ( $u=0,01-0,5 \text{ c}^{-1}$ )

Существует линейная зависимость между скоростью сдвига ( $u$ ) на прямом участке (определяется скоростью потока) и максимальным градиентом скорости ( $u^*$ ). При этом ускорение потока и торможение имеет следующую зависимость:  $u^* \sim -3,5$ . На основе этого рассчитывается разность сдвига стенозированной области. Установлено, что эта разность соответствует изменениям, эквивалентным тем, которые получают, когда диаметр артериол уменьшается с 275 до 125 мкм или соответствует 55% стеноза, что типично для пациентов с атеросклерозом (рис. 5).

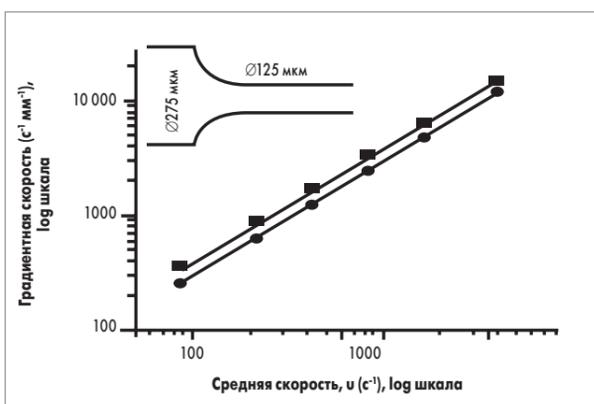


Рис. 5. Градиенты сдвига при престенозе и постстенозе в зависимости от сдвига средней скорости стеноза (линия линейной регрессии; средний наклон –  $3,49 \text{ мм}^{-1}$ ). Эта линейная зависимость соответствует кровеносному сосуду, который включает в себя 55% стеноза

#### Микрофлюидный анализ времени свертывания крови

Для оценки возможности практического применения микрофлюидных систем в конкретных клинических ситуациях было проведено измерение времени свертывания на основе регрессионной модели. Для этого прежде всего исследовали чувствительность гепарина в диапазоне концентраций от 0 до 1 IU/мл. Обнаружено, что время свертывания крови линейно

возрастало по мере повышения концентрации гепарина от 0 до 1 IU/мл как при низком  $1,225 \text{ c}^{-1} \text{ мм}^{-1}$ , так и при высоком  $4,375 \text{ c}^{-1} \text{ мм}^{-1}$  уровнях сдвига градиента (рис. 6).

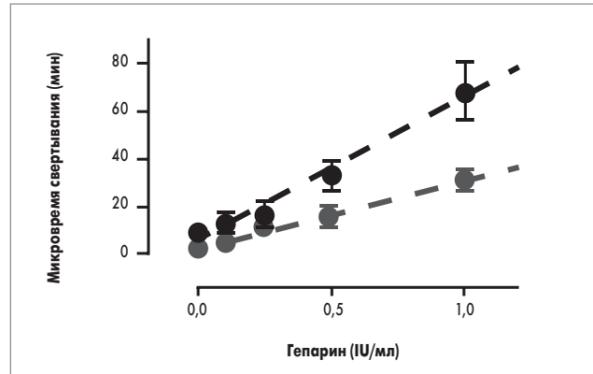


Рис. 6. График эмпирической валидации микровремени свертывания крови, полученный из феноменологической аналитической модели путем варьирования концентрации гепарина в диапазоне 0-1 IU/мл перфузии крови при сдвиге градиентов скорости  $1,225$  и  $4,375 \text{ c}^{-1} \text{ мм}^{-1}$  (черные и серые кружки соответственно)

Полученные данные свидетельствуют, что устройство может быть использовано для надежной терапии гепарином в клинических условиях *in vitro*.

#### Быстрый тест определения функции тромбоцитов при стенозированной потоке *in vitro*

Доказано, что агрегация тромбоцитов служит основной причиной возникновения сосудистой окклюзии, поэтому данное устройство использовали для определения функции агрегации тромбоцитов при стенозированном потоке [29]. Это имеет ряд преимуществ. Во-первых, для проведения исследования, которое длится всего несколько минут, требуется небольшой объем цельной крови (<1 мл). Во-вторых, при покрытии микроканалов коллагеном, который, как известно, является агонистом тромбоцитов, наблюдается большое количество фибрина и агрегированных тромбоцитов в постстенозных областях. Это согласуется с тем, что градиент скорости сдвига в области замедления потока может вносить главный вклад в гемостатический ответ (рис. 7).

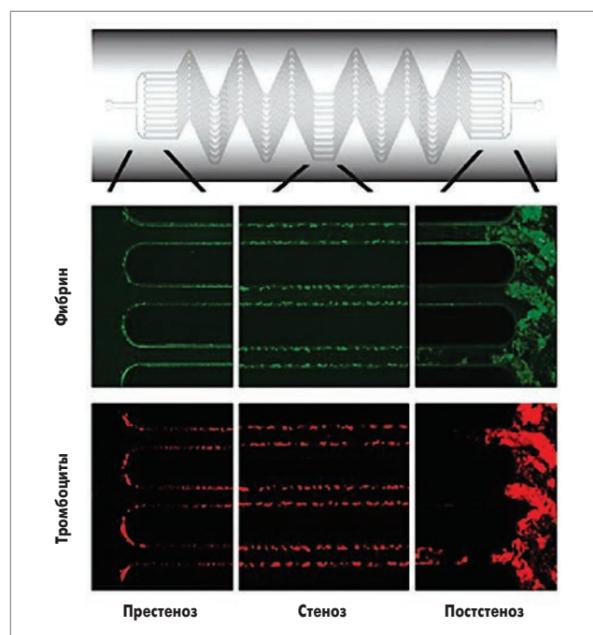


Рис. 7. Флуоресцентная микрофотография престеноза, стеноза и постстеноза одного и того же микрофлюидного устройства с коллагеновым покрытием (градиент сдвига  $4375 \text{ c}^{-1} \text{ мм}^{-1}$ ). Показаны фибрин (зеленый цвет) и агрегированные тромбоциты (красный цвет) после воздействия окклюзии при перфузии рекальцифицированной цитратной крови в течение 20 мин

#### Мониторинг антиагрегантной терапии

При введении абциксимаба (ReoPro®) в образцы крови здоровых людей в клинической дозе (от 0,5 до 20 мкг/мл) наблюдали дозозависимый эффект микрофлюидного времени свертывания. Увеличение времени свертывания было зафиксировано также у пациентов, которые проходили лечение двойной антиагрегантной терапией (аспирин и клопидогрель) по сравнению со здоровыми пациентами.

#### Синдром Германского-Пудлака

Данное устройство с коллагеновым покрытием применили для изучения образцов крови у пациентов с синдромом Германского-Пудлака. Это редкое

заболевание, при котором возникает кровотечение из-за недостатка плотных гранул в тромбоцитах. Важно отметить, что при использовании традиционного метода агрегации тромбоцитов (а именно анализатора PFA-100) у пациентов с синдромом Германского-Пудлака дефекта тромбоцитов не было обнаружено. Когда же в устройство была перфузирована кровь двух пациентов с синдромом Германского-Пудлака, то при применении высокого градиента скорости сдвига  $8,750 \text{ c}^{-1} \text{ мм}^{-1}$  образования сгустка не наблюдалось. Это показывает, что сдвиг активированного градиента является высокочувствительным при определении дефектов тромбоцитов у таких пациентов и может эффективно использоваться для диагностики заболевания.

Все эти данные доказывают правильность концепции анализа времени свертывания, суть которой заключается в том, что микрофлюидное устройство чувствительно при адгезии тромбоцитов к коллагену и модулирует активацию тромбоцитов, мишенью которых являются рецепторы P2Y<sub>12</sub>,  $\alpha_{11b}\beta_3$ , циклооксигеназный путь.

#### Выводы

Биометрическое устройство для мониторинга гемостаза обладает несколькими потенциальными преимуществами по сравнению с другими аналитическими системами:

1. Благодаря наличию полного кровотока и стенозированной скорости сдвига в устройстве образование сгустков происходит при практически физиологических условиях и включает комплексную реологию крови, что имеет решающее значение для тромбоза. Хотя устройство изготовлено для создания фиксированного 55% стеноза в каждом канале и не может изменяться (как это происходит в условиях *in vivo*), тем не менее существует возможность применить скорость градиента сдвига для имитации у каждого конкретного пациента в зависимости от его состояния. Например, при анализе крови пациентов с атеросклерозом, имеющих более высокую степень стеноза, документированную клинически, это можно осуществить с помощью более высоких градиентов сдвига, больше соответствующих тяжести заболевания.

2. Образование сгустка может быть зафиксировано количественно в режиме реального времени с использованием помпы, сенсорного датчика давления и монитора, которые составляют часть устройств, применяющихся в экстракорпоральных системах и широко используемых сегодня в медицинской практике [30, 31].

3. Одним из важных преимуществ устройства является использование в нем параллельных стенозных каналов. Они лучше имитируют свертывание в естественных сосудах, чем один очень длинный канал. Применение многочисленных параллельных каналов в сочетании с математической обработкой данных позволяет использовать их как цифровой фильтр. Это способствует преодолению сложностей при расшифровке ответа, которые могут возникать в единичных каналах (например, прохождение частиц, пузырьков воздуха или других локальных возмущений).

4. Устройство позволяет эффективно мониторировать функцию тромбоцитов в цельной крови при анализе риска кровоточивости у трудно диагностируемых пациентов. Являясь глобальным тестом мониторинга гемостаза, это устройство предполагает анализ потенциальных комплексных коагулопатий, таких как сепсис и серповидно-клеточная анемия, где бактерии и серповидные эритроциты способствуют изменениям в системе гемостаза.

5. Устройство может быть функционально интегрировано в экстракорпоральные медицинские изделия, что обеспечит более простой и надежный способ мониторинга коагулопатий и анализ проявления действия антитромботической терапии в течение долгого времени в отделениях реанимации, интенсивной терапии или непосредственно у постели больного.

Таким образом, микрофлюидное устройство для исследования гемостаза является новым удобным методом глобального анализа функции тромбоцитов, мониторинга антитромботической терапии и оценки состояния здоровья пациентов с нарушениями свертываемости крови.