



eНано

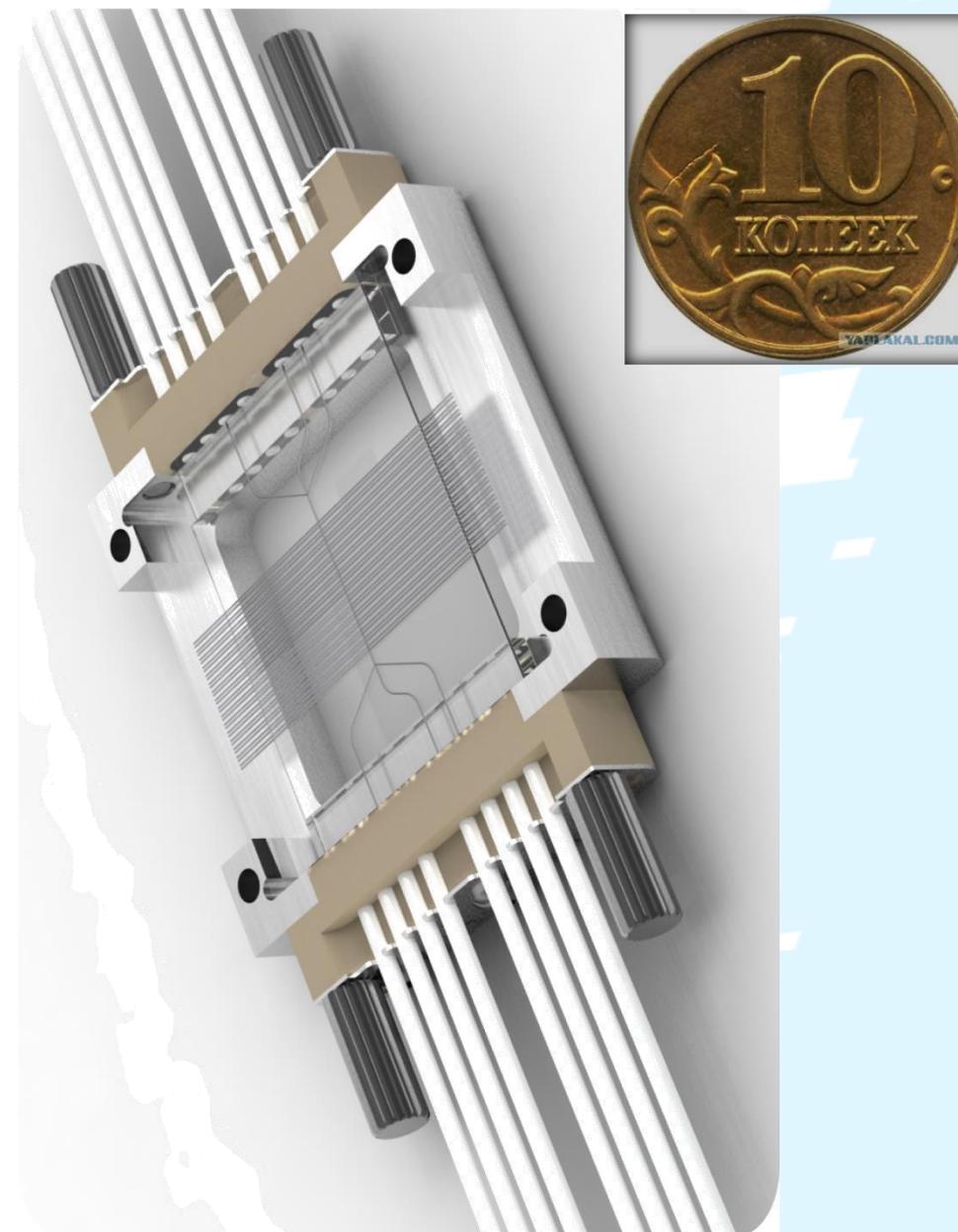
Новые технологии: современная медицина на ЧИПе

Юрий Маркович Тонконогов



Микрофлюидика

- Достоверное моделирование природных процессов
- Эффективное замещение традиционных реакторных технологий
- Идеальные смешение, вытеснение и теплообмен
- Площадь контакта 500 раз (и более) выше, чем в стандартных аппаратах
- Работа при высоких давлениях и в сверхкритических условиях - безопасность
- Работа при низких и высоких температурах
- Короткое время реакций
- Синтез без образования побочных и промежуточных продуктов
- Быстрое и точное изменение параметров процесса
- Аналитика в режиме реального времени
- Проведение сложного многоступенчатого синтеза, недоступного стандартным объёмным методам



Области применения микрофлюидных технологий

Нефте-Газо переработка:

- Разработка катализаторов
- Переработка газа (в т.ч. попутного нефтяного газа) в синтезгаз и синтетическое топливо (бензин, дизельное топливо) и метанол.
- Получение исходного сырья для полимеров: этилен-пропилен, бутадиен, ароматические соединения.
- Производство полимеров: полиэтилен, полипропилен, ПВХ, каучук и пр.
- Топливные микрофлюидные процессоры: получение водорода из УВ топлива

Технологические Жидкости :

- Буровые растворы с уникальными свойствами + Жидкости ГРП
- Уникальные неорганические и органические химические соединения
- Лубриканты, включая автомобильные масла
- Жидкое ракетное топливо
- Наноматериалы

Медико-биологическое направление :

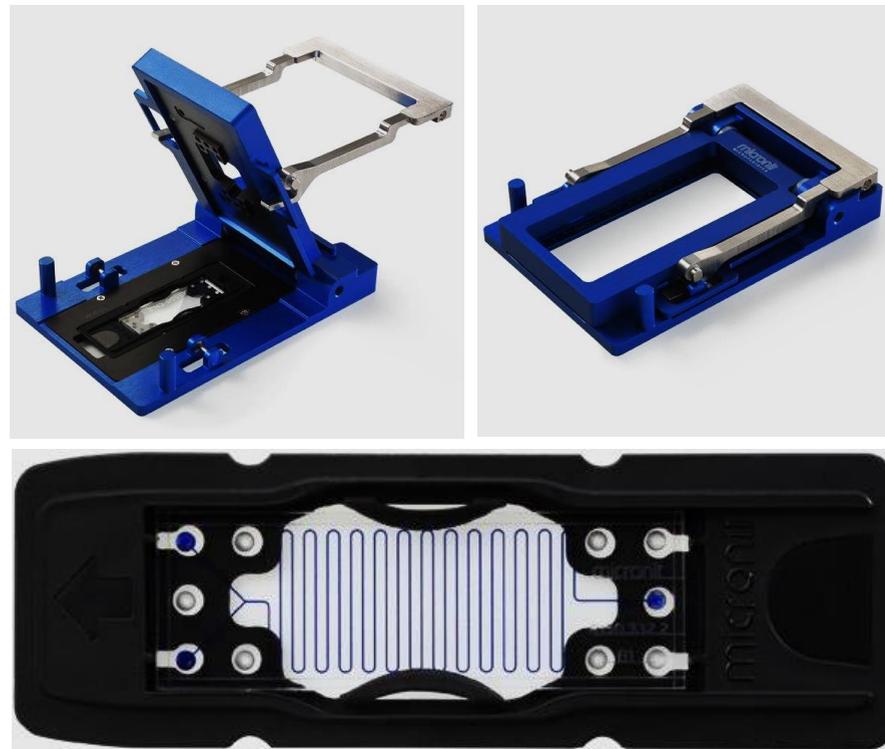
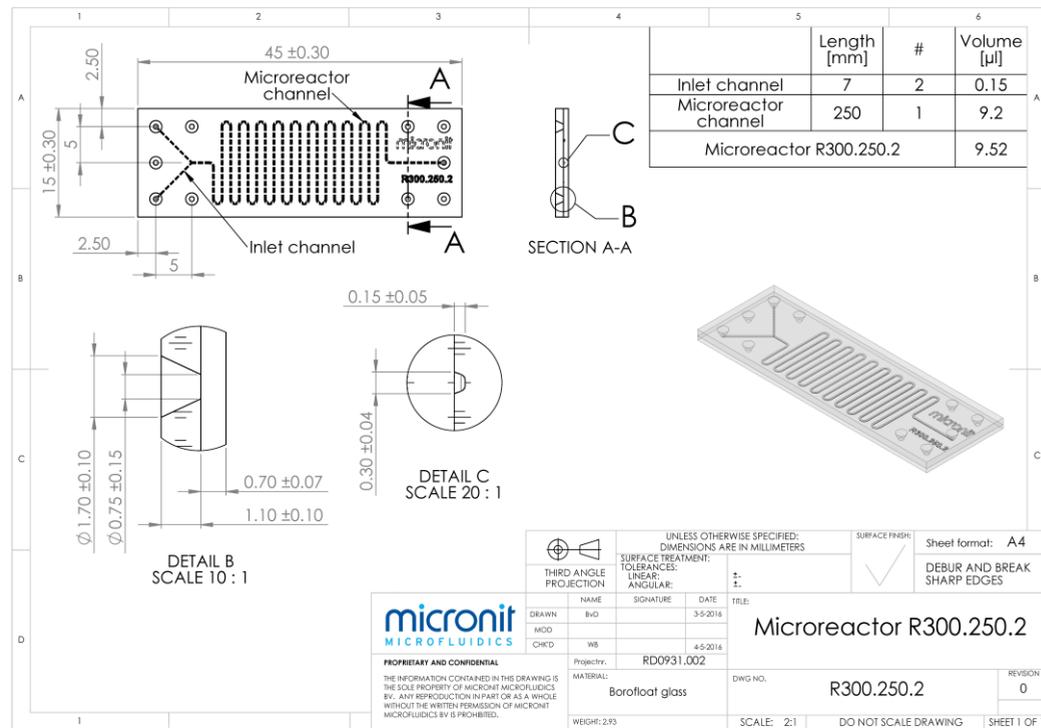
- Моделирование человеческих органов и человеческого организма на ЧИПЕ
- Микрофлюидная цитометрия: выделение и анализ малочисленных клеток из крови (опухолевые и эмбриональные клетки, и пр.)
- Разработка уникальных субстанций
- Разработка интеллектуальных лекарственных форм с таргетным воздействием на область заболевания
- Моделирование репродуктивной системы женщины и Микрофлюидное ЭКО

Нефтегазовый комплекс

- Петрофизика: Моделирование горной породы и гидродинамических процессов
- Повышение нефтеотдачи пласта – моделирование процессов вытеснения в микрокапиллярном реакторе
- Исследование термодинамических свойств пластовых флюидов (PVT) и АСПО

Микрокапиллярные технологии

МикроЧИП

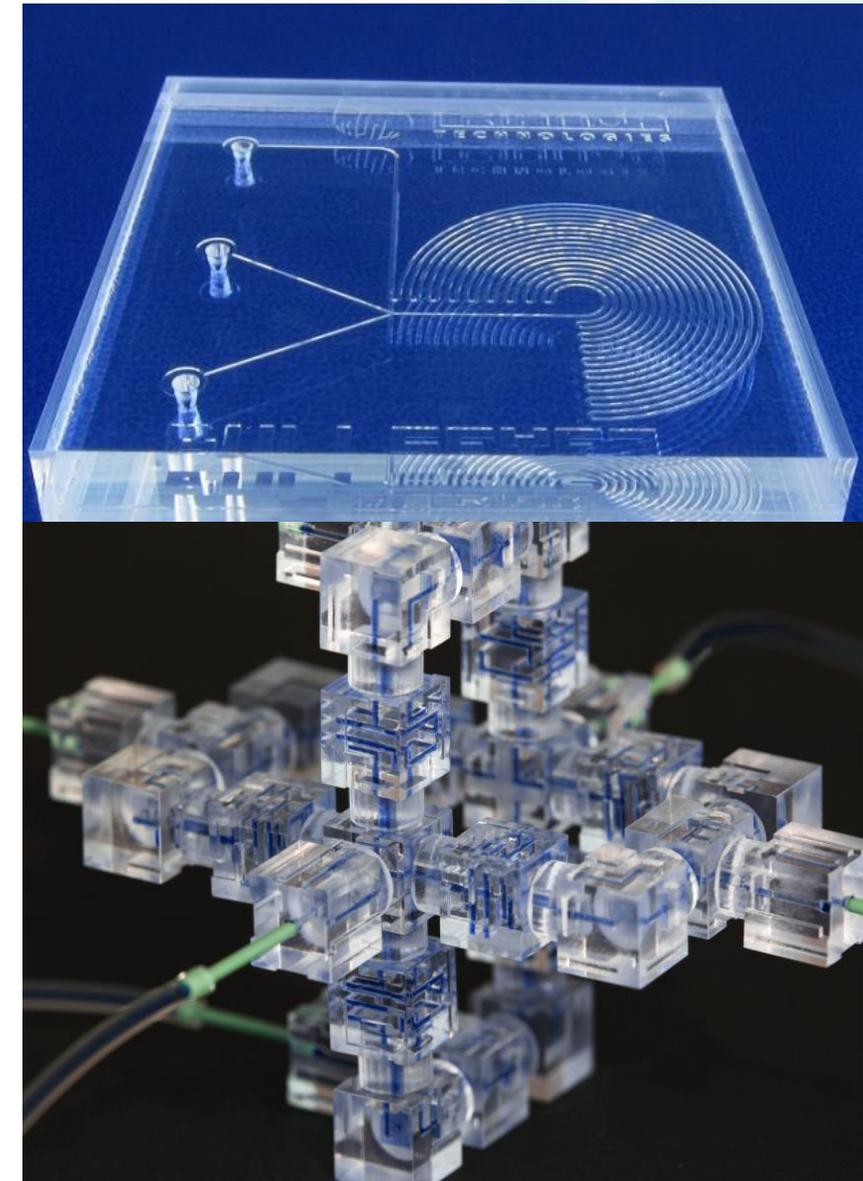


Спецификация Чипхолдера	
Размеры, мм	128 x 85,4 x 20
Материал	Алюминий
Уплотняющий механизм	Load 'n Seal
Рабочая температура, Max	80°C
Рабочее давление Max	4-5 Бар
Уплотнитель	Perlast (FFKM)
Толщина Микрочипа	1.8мм

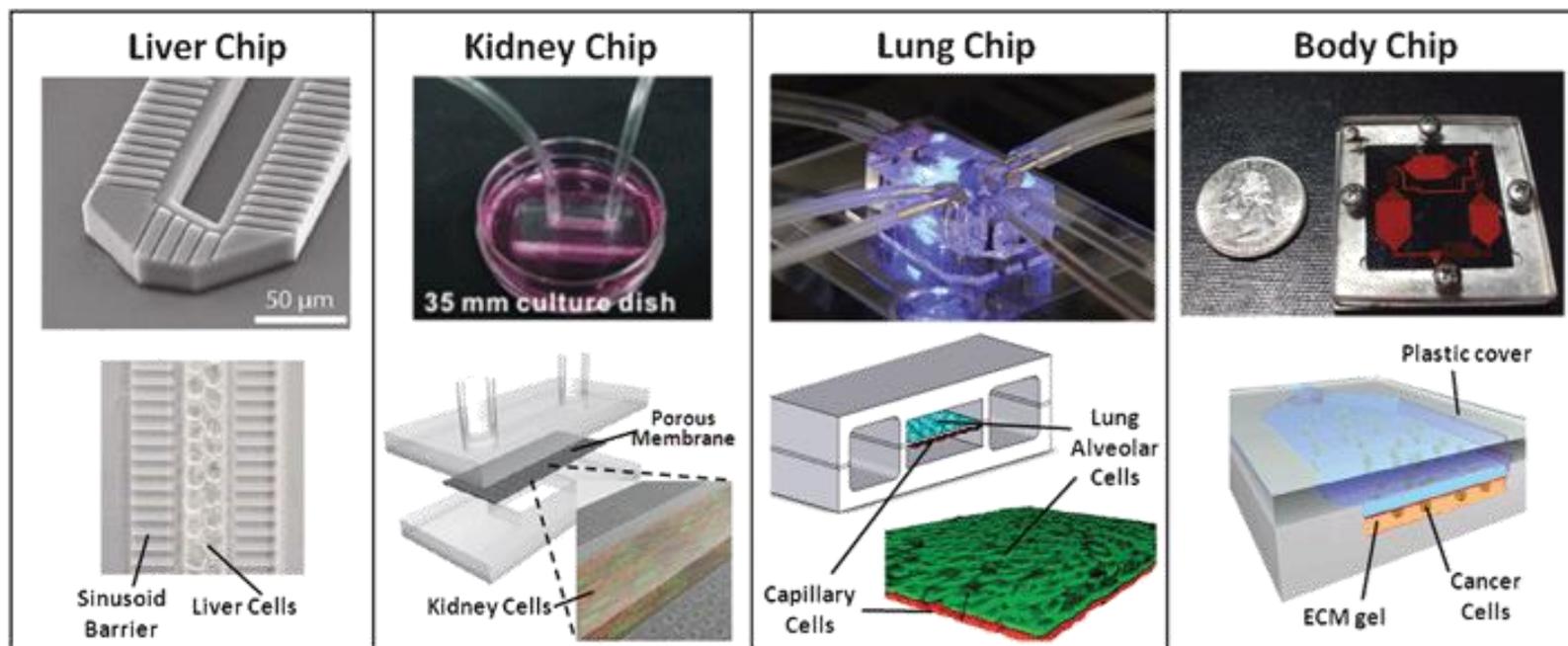
Области применения технологии микрофлюидного моделирования

**Моделирование динамических потоковых
процессов:**

- Химия и Нефтехимия
- Биология
- Цитология
- Генетика-Молекулярная Биология
- Патология
- Фармацевтика
- Петрофизика-ПНП



Основа модели – проточный микрокапиллярный реактор

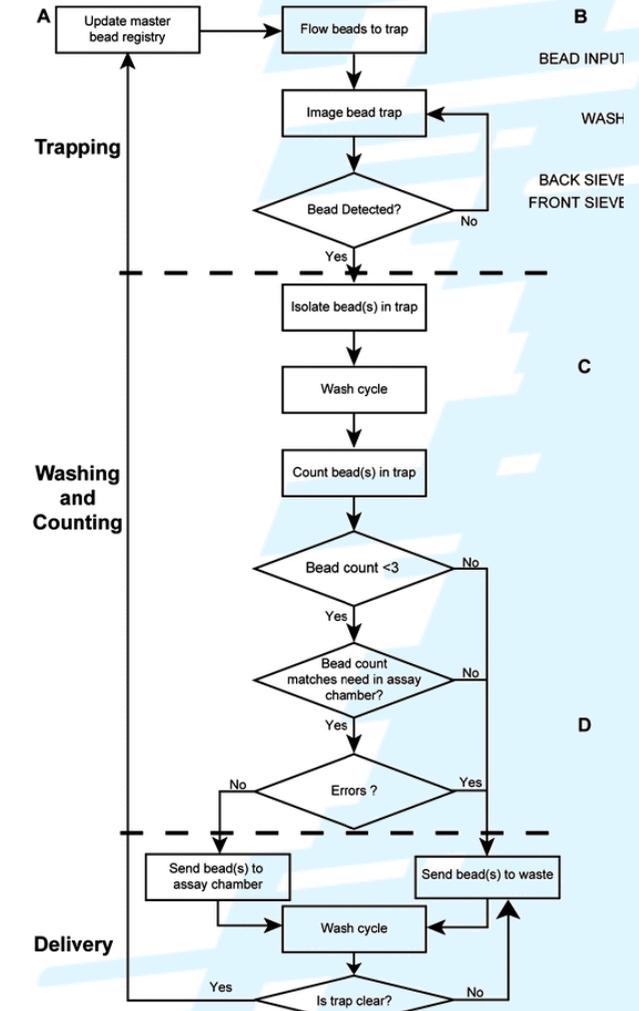


От элементарного процесса до интегрированных систем

- Process on Chip
- Lab on Chip
- Plant on Chip
- Cell on Chip
- Organ on Chip
- Body on Chip

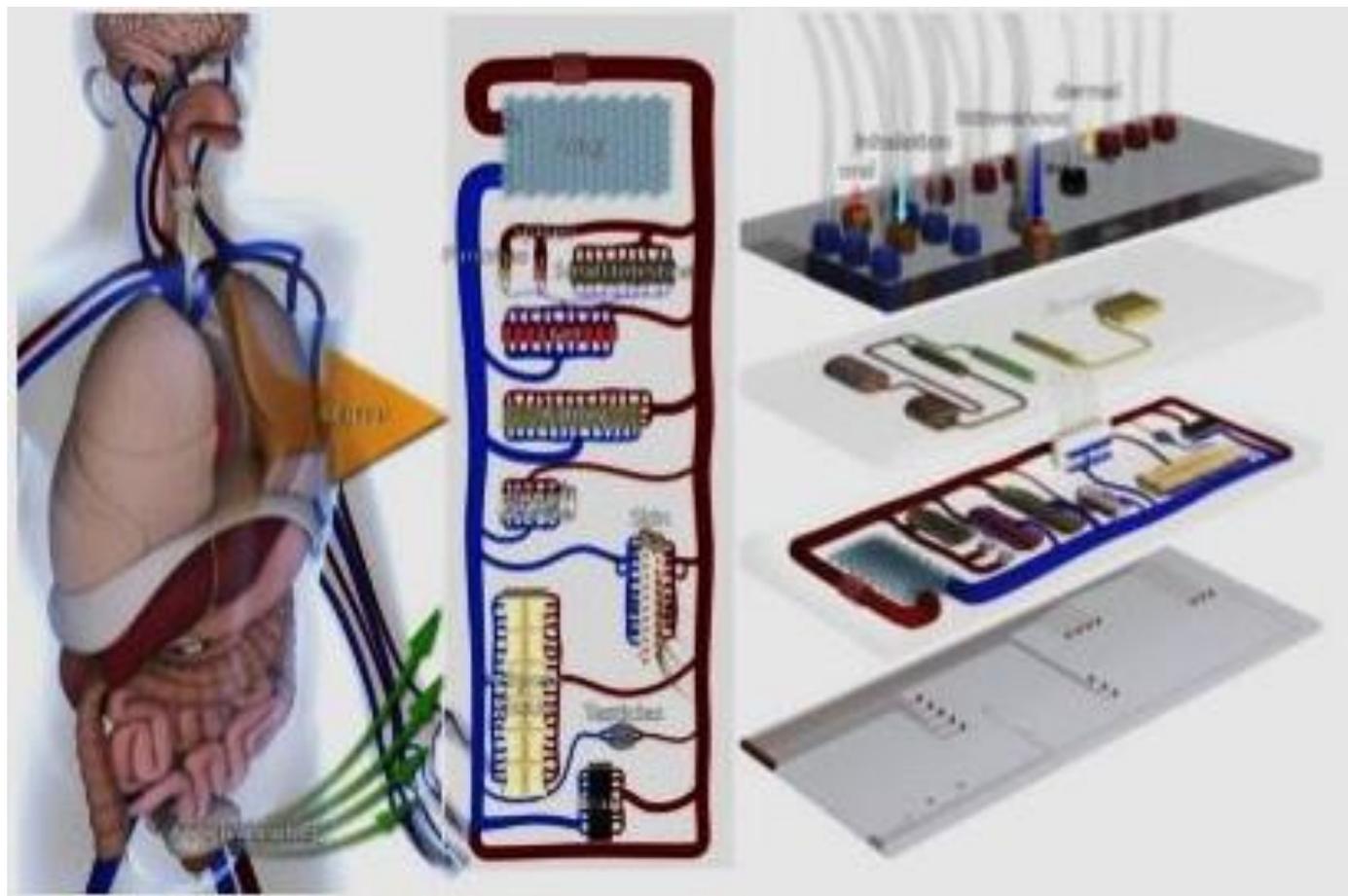
Построение микрофлюидной системы

1. Выбор Объекта => Детальное Описание => Формализация Процесса
2. Построение Графической Микроканальной Схемы
3. CFD
4. Проектирование Микроканального Чипа
5. Изготовление Чипа
6. Разработка гидравлической схемы
7. Разработка и реализация алгоритма управления



Микрофлюїдика в медицине

Микрофлюидное моделирование человеческих органов



Микрофлюидное моделирование человеческих органов

Конструкция Системы:

- Сборка из двух закрывающихся стеклянных и мембраной клеточной культуры, установленной между ними
- Две отдельные проточные камеры для организации потока двух различных жидкостей или газов по обе стороны мембраны

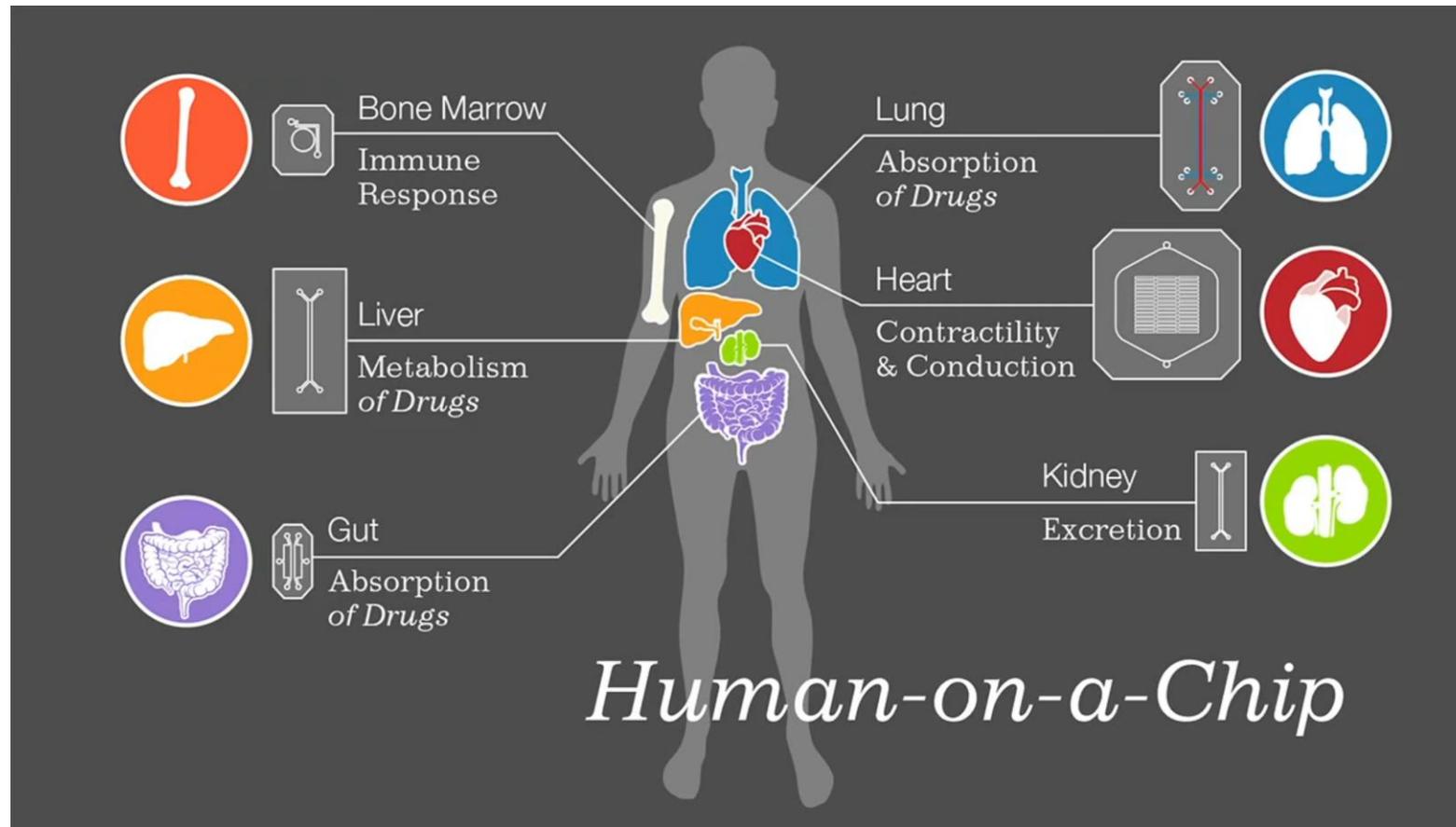
Преимущества:

- Достоверное моделирование живой системы
- Точный контроль процесса культивирования клеток и тканей

Радикальное отличие от традиционных методов статического культивирования, использующими вкладыши тканевой культуры в чашках Петри и микропланшетах



Микрофлюидное моделирование человеческих органов



Микрочипы, которые повторяют микроархитектуру и функции живых человеческих органов, включая сердце, легкие, кишечник, почки, кожу, костный мозг и гематоэнцефалический барьер.

«Органы на чипах» - альтернатива традиционным экспериментам на животных

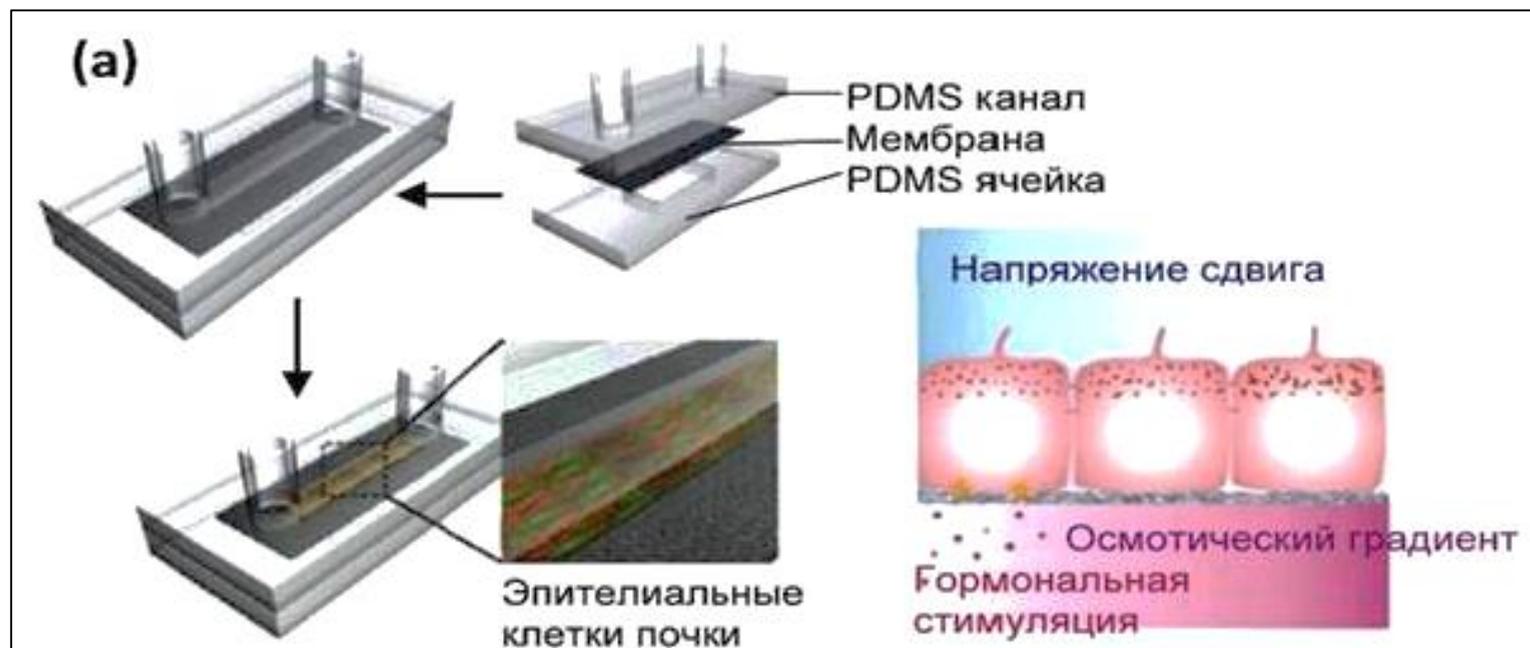
Микрофлюидное моделирование человеческих органов

- Орган на ЧИПе изготавливается из прозрачного гибкого полимера с микрокапиллярными каналами, содержащими живые человеческие клетки, и оснащен с искусственной сосудистой системой
- Имитируется физическая нагрузка живых органов: сокращение сердца, дыхательные движения легких, перистальтические деформации кишечника
- Прозрачность Микрочипа обеспечивает окно для мониторинга работы человеческих органов. Проведение экспериментов под микроскопом с высоким разрешением
- Органы, на ЧИПах представляют идеальную микросреду для имитации специфических для человека патофизиологий и позволяют проводить молекулярный и клеточный анализ и идентифицировать новые терапевтические мишени в органосохраняющих клетках

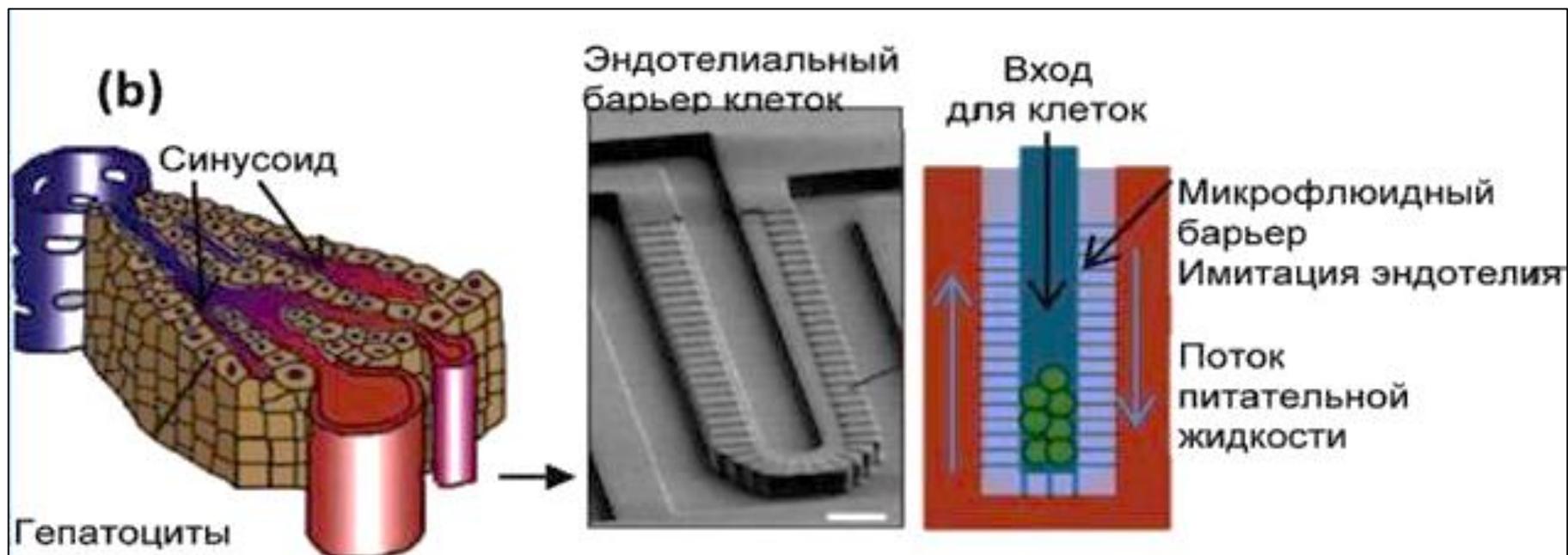
Микрофлюидное моделирование человеческих органов

- Имитация терапевтически релевантных интерфейсов, таких как гематоэнцефалический барьер с целью открытия новых платформ доставки лекарств
- Культивирование живого микробиома в течение длительного времени в прямом контакте с живыми человеческими кишечными клетками для получения представление о влиянии микробов на здоровье
- Моделирование инфекций с клинически значимыми вирусами для выявления вирусных стратегий и уязвимостей.
- Изучение влияния факторов окружающей среды (сигаретный дым, например) на здоровье и физиологию тканей (функции легких человека)

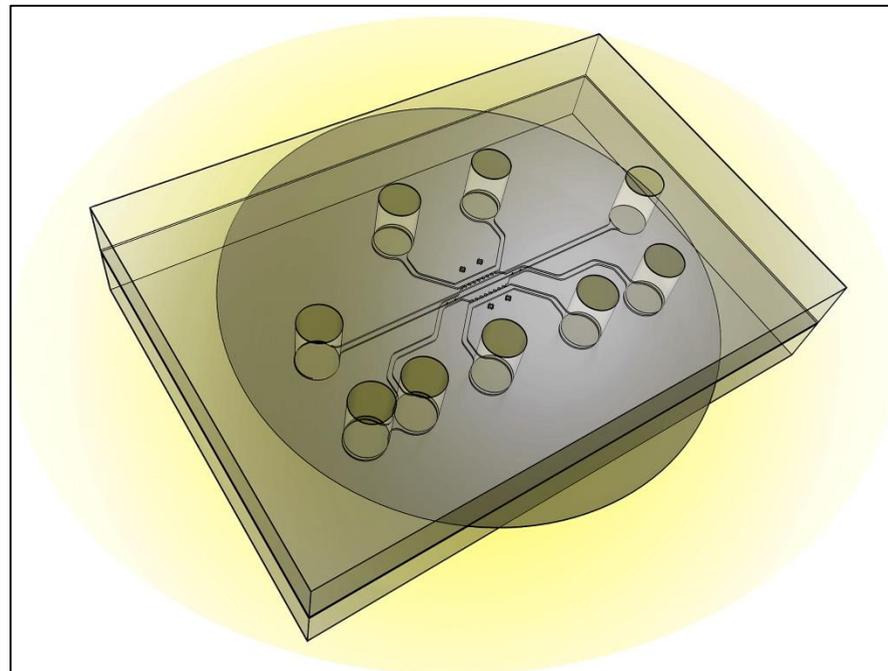
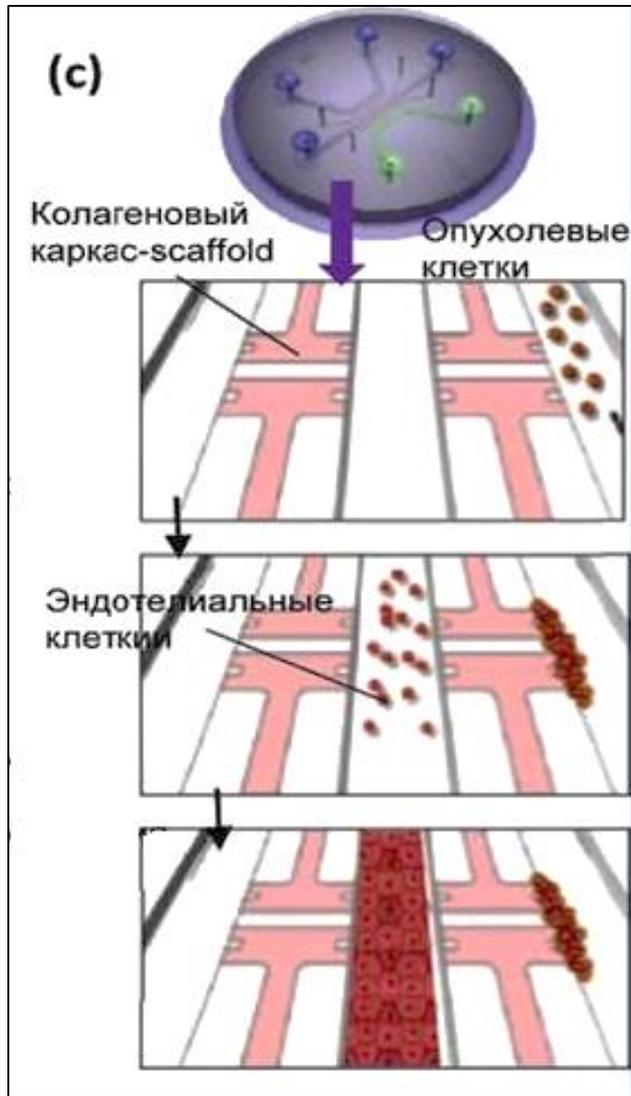
Моделирование почек



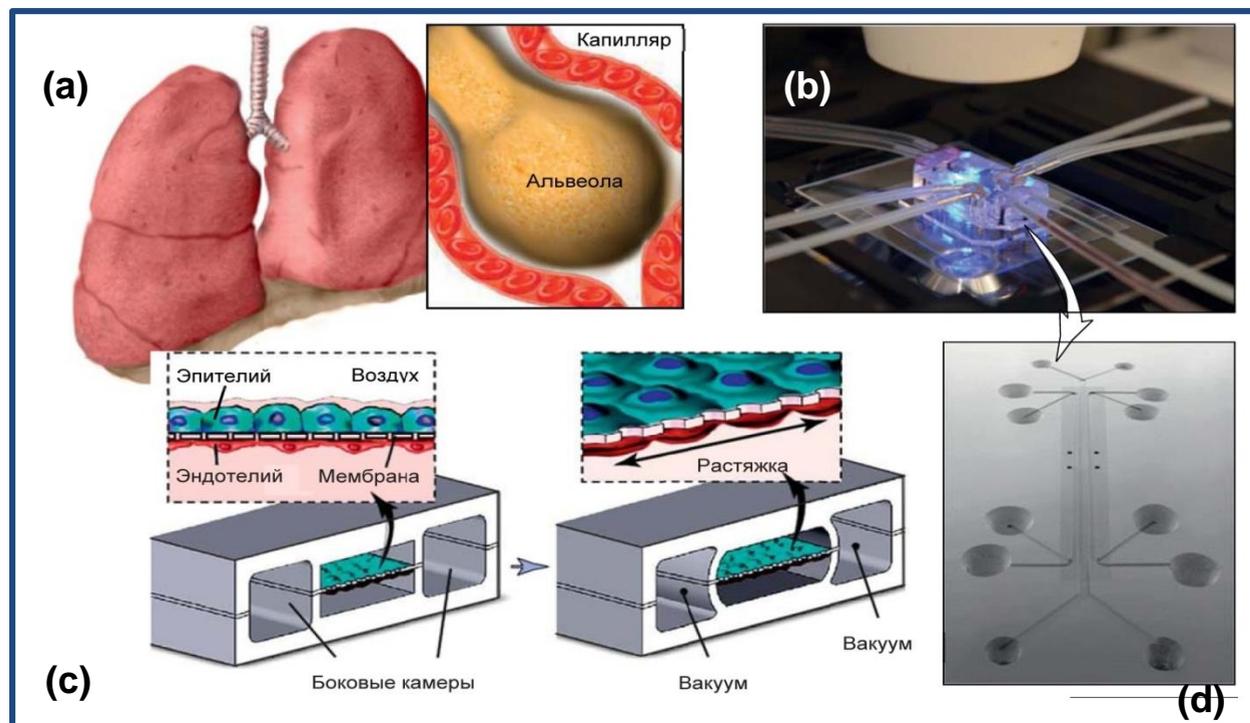
Моделирование печени



Моделирование раковых процессов



Моделирование лёгкого



Модель альвеолярно-капиллярного интерфейса расположенного внутри прозрачного гибкого ЧИПА.

Имитация клеточной, биохимической и механической функции живого лёгкого.

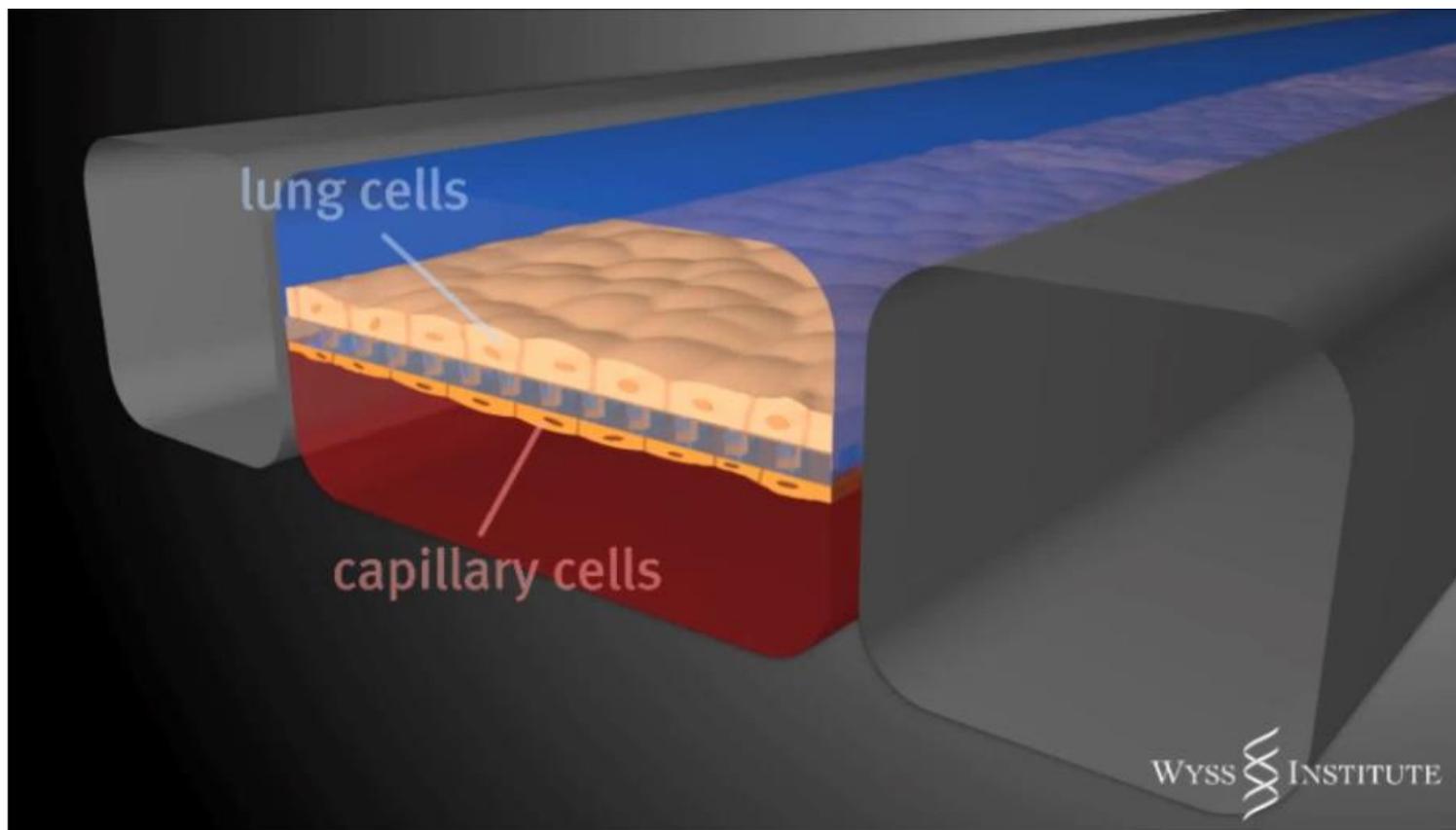
Рис. (a) ткань-ткань интерфейс альвеолы воспроизведен на ЧИПЕ путем совместного культивирования эпителиальных клеток альвеол и пульмональных капиллярных эндотелиальных клеток на противоположных сторонах тонкой, гибкой, пористой мембраны

Рис. (b) изображение чипа при флуоресцентном освещении.

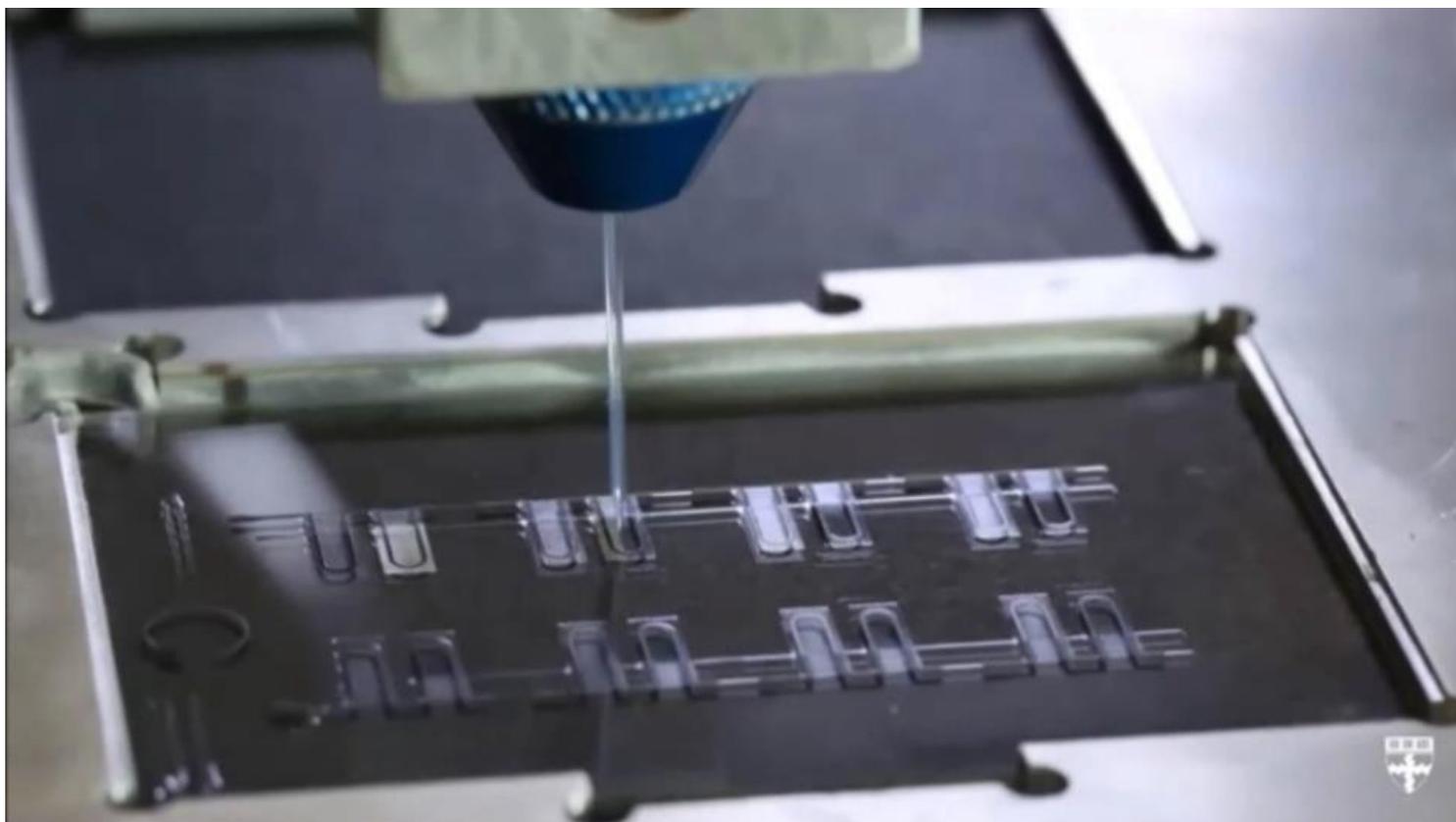
Рис. (c). Имитация дыхания, осуществляется циклическим изменением давления воздуха в двух боковых камерах: циклическое растяжение-сжатие мембраны.

Рис. (d) фото чипа.

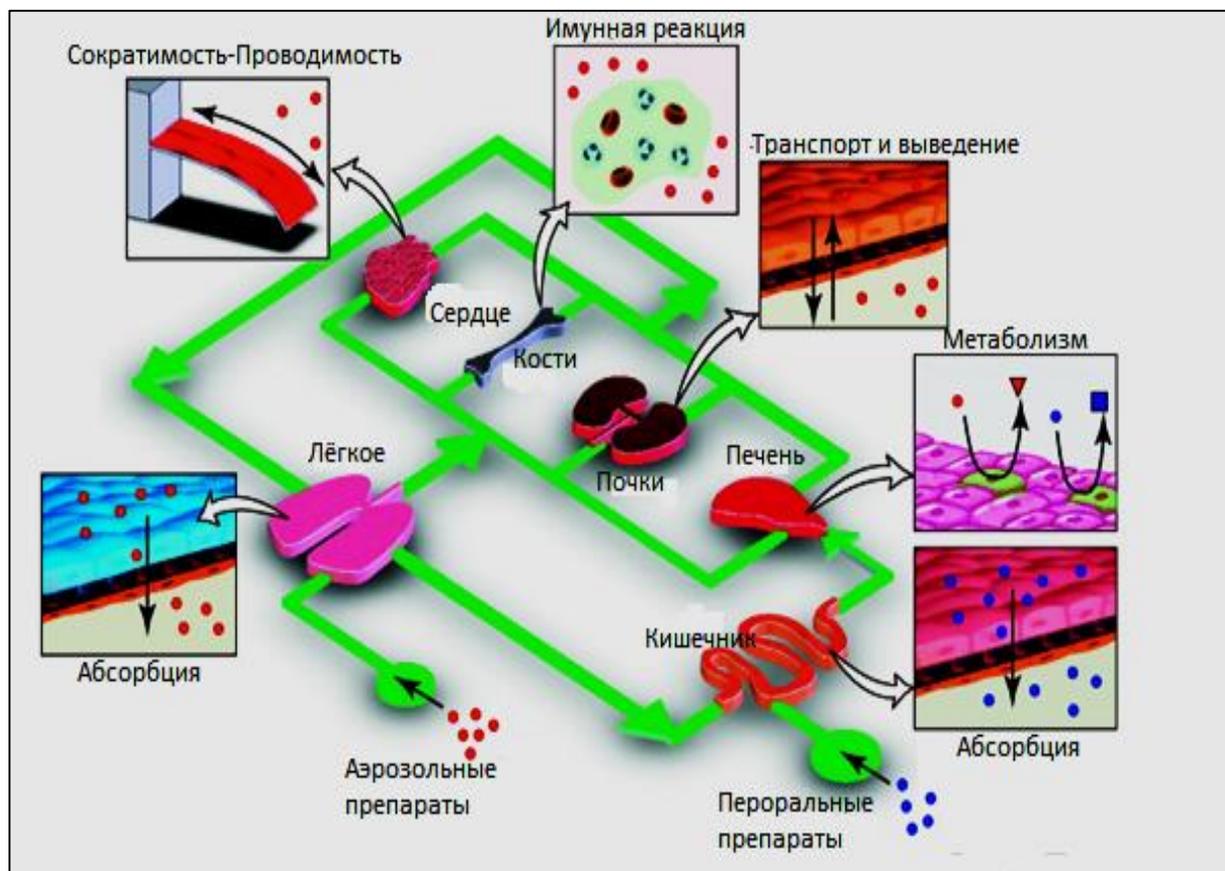
Лёгкое на ЧИПЕ



Первая в мире 3D модель сердца на ЧИПЕ



Моделирование организма



Человек-на-Чипе

Биоимитированные микросистемы представляющие различные органы могут быть интегрированы в одно микроустройство, связанное микрофлюидной физиологически релевантной циркулярной системой так, чтобы моделировать комплексные динамические процессы всасывания лекарственных препаратов, распределения, метаболизма и выведения для надежной оценки эффективности и токсичности лекарственных препаратов.

Микрофлюидное моделирование репродуктивной системы

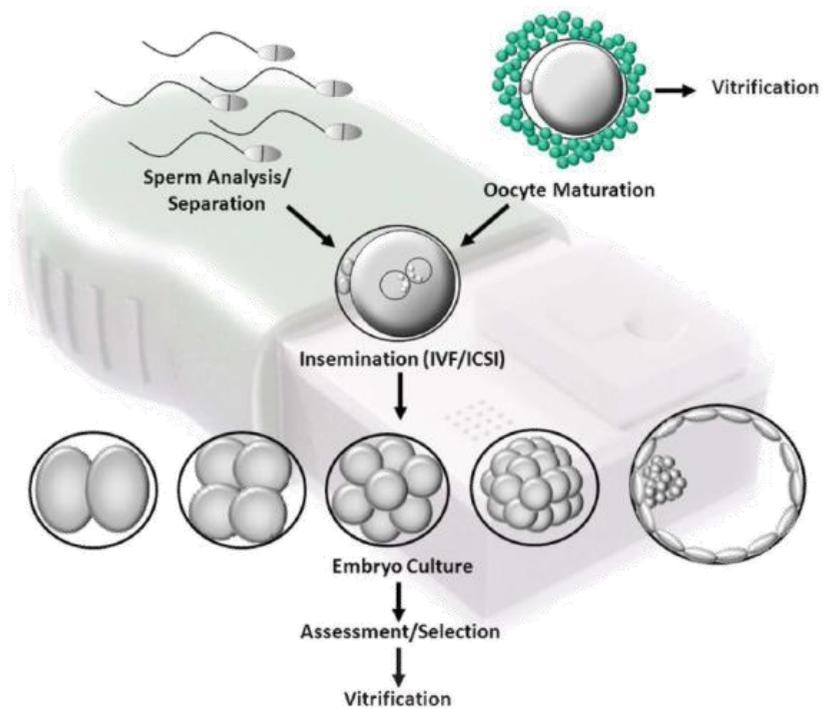
Сегодня



Завтра



Микрофлюидные технологии экстракорпорального оплодотворения



Революционная, не инвазивная технология моделирования репродуктивных процессов

Рождение живого (не обязательно здорового) ребенка < 30% при традиционном ЭКО!!!

ЭКО на ЧИПЕ: полная имитация репродуктивной системы женщины с вероятностью рождения здорового ребенка близкой к единице

Микрофлюидные технологии экстракорпорального оплодотворения

Микрофлюидное ЭКО реализует в ЧИПЕ следующие процедуры без вмешательства человека:

- Отбор лучших сперматозоидов в условиях аналогичных естественным
- Культивирование ооцита. Использование незрелой яйцеклетки
- Культивирование эмбрионов и эндометрия
- Оплодотворение яйцеклетки
- Мониторинг (неразрушающий) динамики всех процессов: движение сперматозоидов, оплодотворение, созревание яйцеклетки совместно с эндометрием, оплодотворения, созревания эмбриона
- Манипуляции в Естественной Среде
- Генетический контроль и выбраковка эмбрионов в процессе созревания

Технология выделения мотильных сперматозоидов



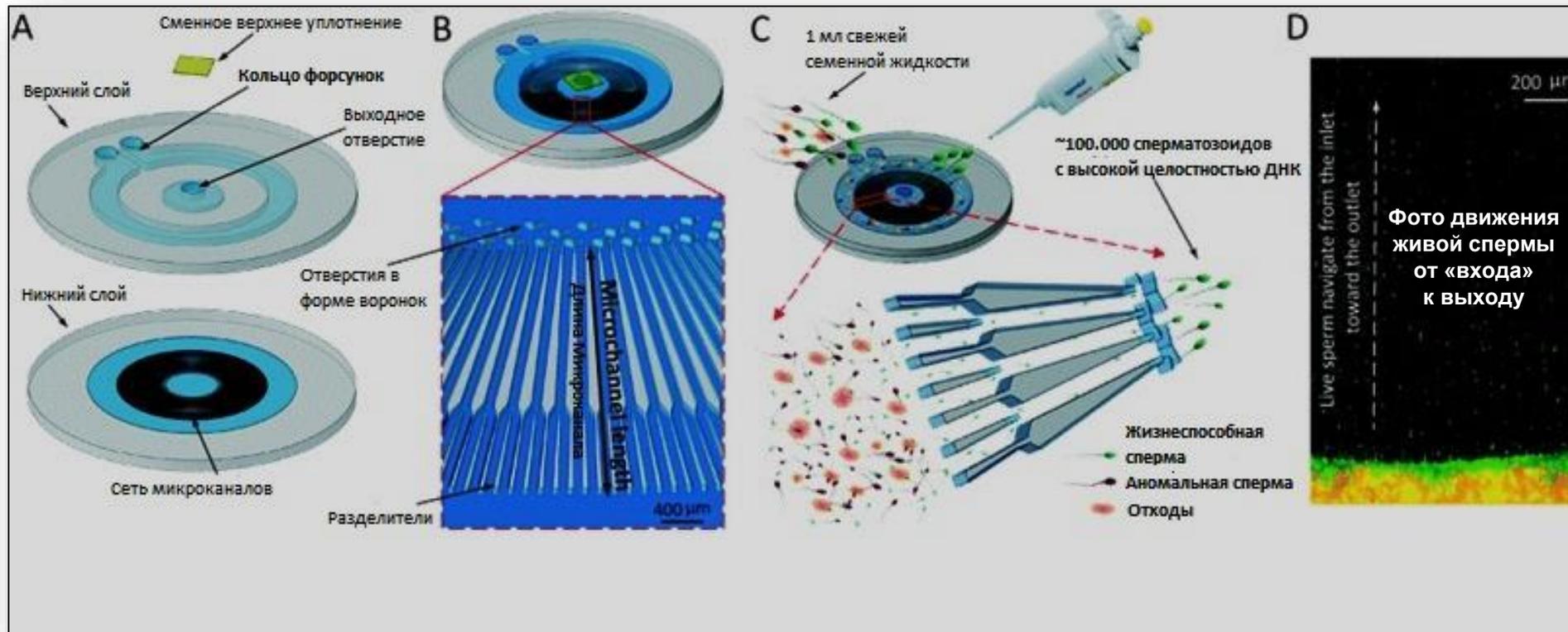
а) Микрофотография микрочипа сортировки спермы

б) Принцип сортировки спермы в микрочипе. Сперма вводится во входное отверстие. Наиболее подвижные и здоровые сперматозоиды переплывают через мембранный фильтр с размером пор 3, 5 или 8 мкм.

с) SEM изображение: сперма проходит через нанопоровые мембраны I) 3 мкм, II) 5 мкм, и в) 8 мкм

Технология выделения мотильных сперматозоидов

«Кольцевое» исполнение МИКРОЧИПА для сортировки спермы



Мониторинг движения сперматозоидов

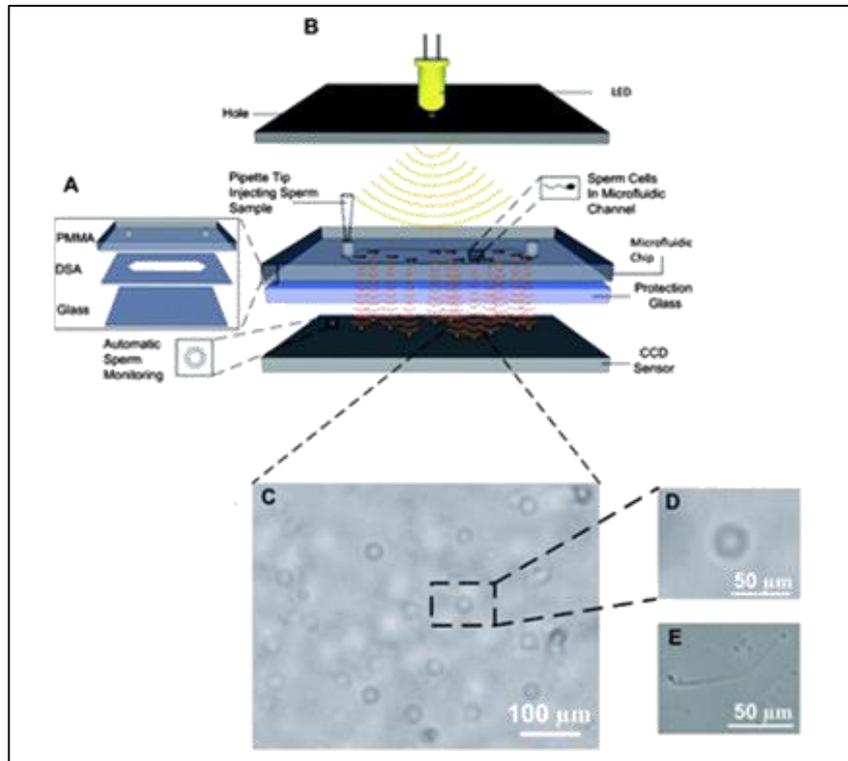


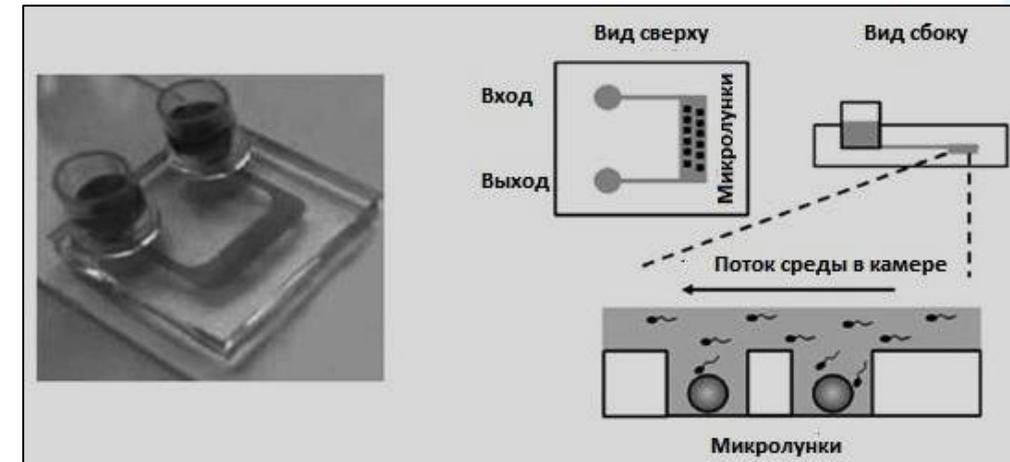
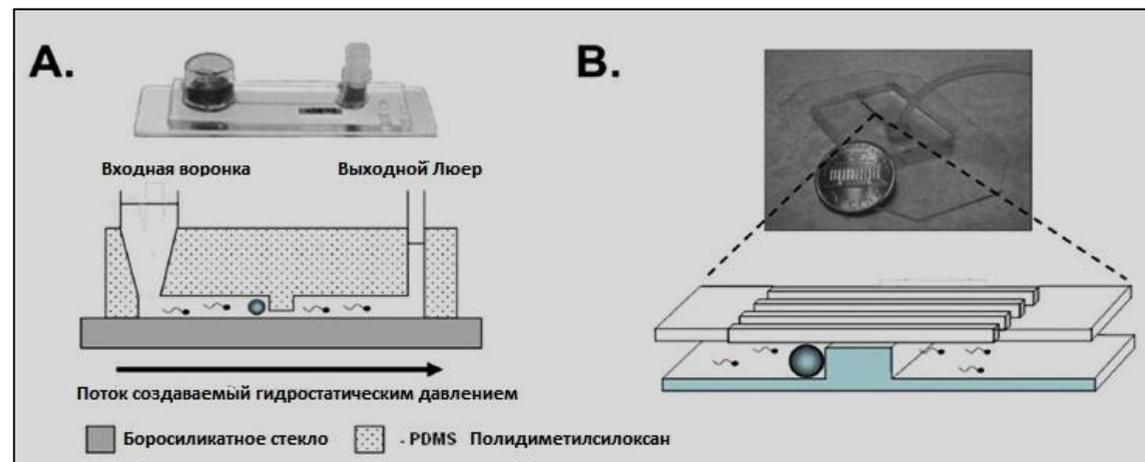
Схема CCD (ПЗС) безлинзовой системы визуализации спермы в микроканалах:

- Сборка микрочипов с использованием PDMS и покровное стекло.
- Безлинзовая система ПЗС в сочетании с микрочипом для отслеживания спермы.
- Теневое изображение сперматозоидов в микрочипе с использованием системы безлинзовой CCD. Шкала - 100 мкм.
- Увеличенное теневое изображение в сперматозоидах (C) . Шкала – 50 мкм.
- Микроскопическое изображение спермы на 10x цели. Шкала - 50 мкм

ПЗС-матрица (сокр. от «прибор с зарядовой связью»), или **CCD-матрица** (сокр. от [англ. CCD](#), «*charge-coupled device*») — специализированная [аналоговая интегральная микросхема](#), состоящая из светочувствительных [фотодиодов](#), выполненная на основе [кремния](#), использующая технологию [ПЗС](#) — приборов с зарядовой связью

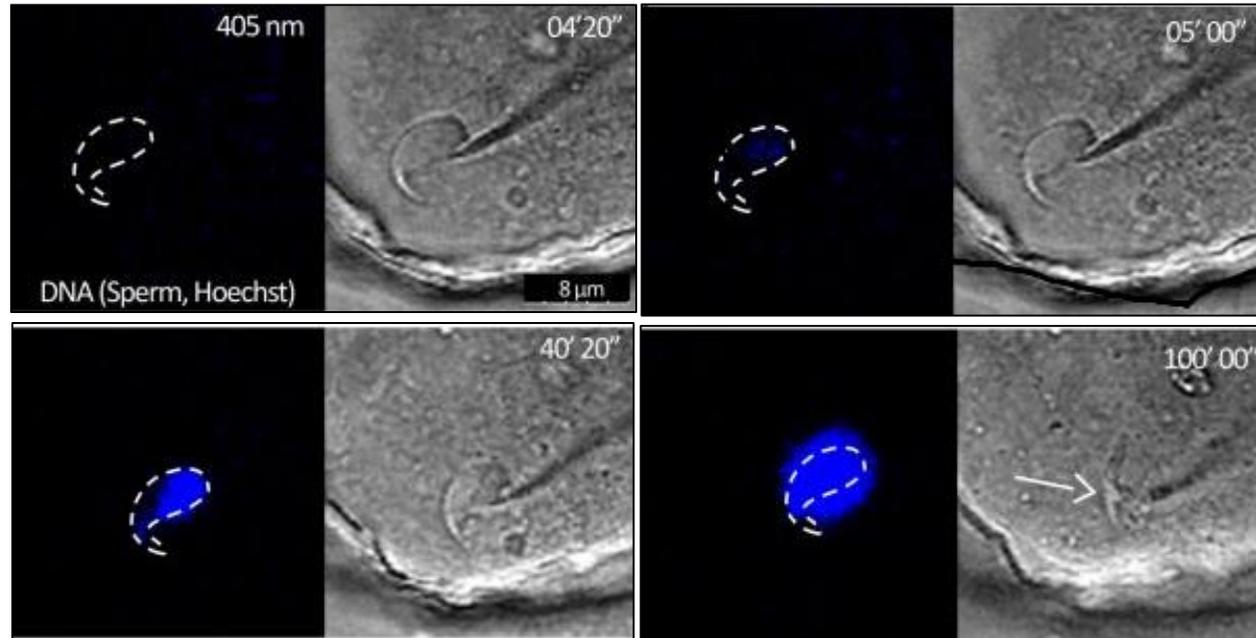
Процесс оплодотворения в микрокапиллярной системе

Технологическая схема микрокапиллярной системы оплодотворения ооцита

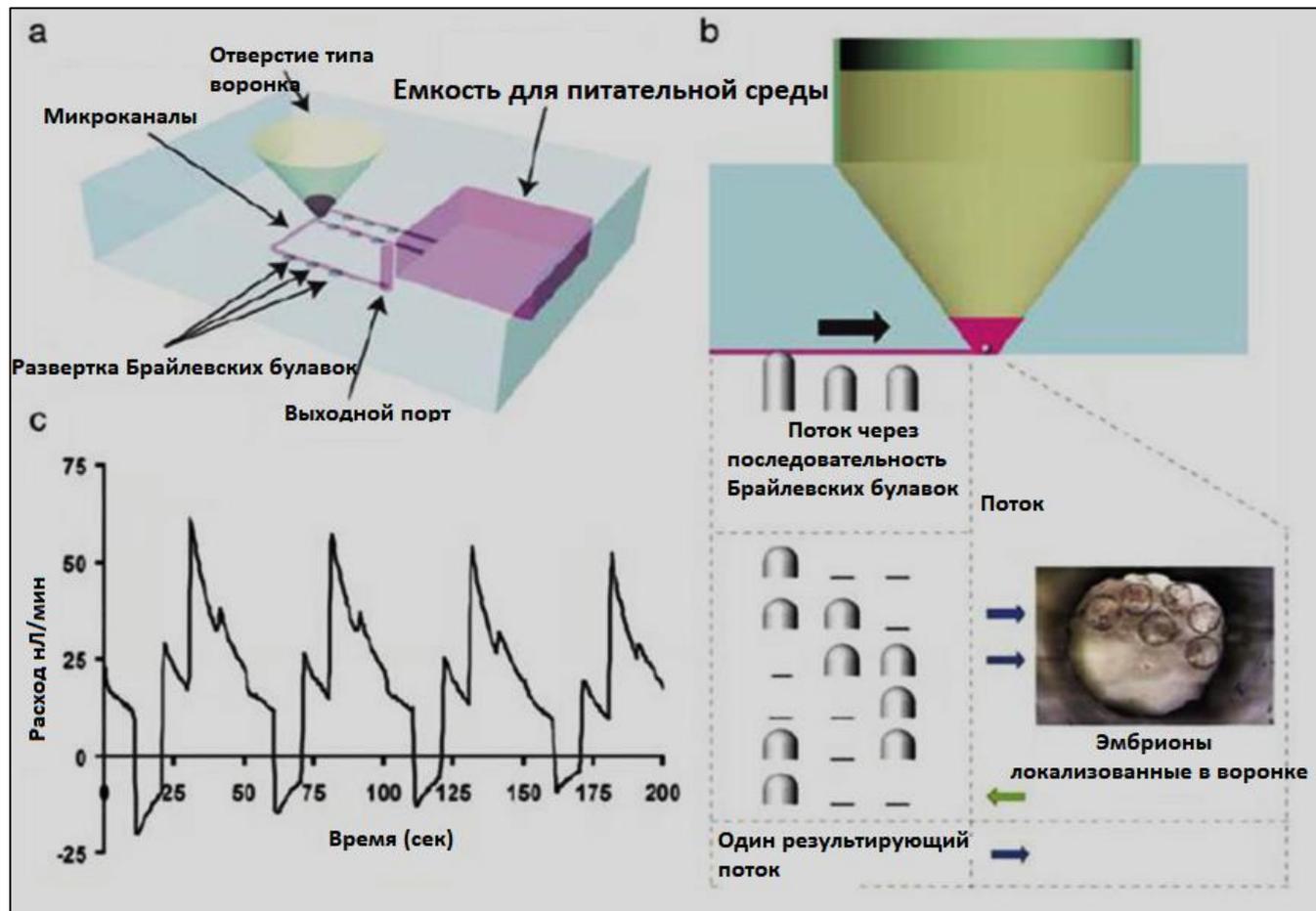


Процесс оплодотворения в микрокапиллярной системе

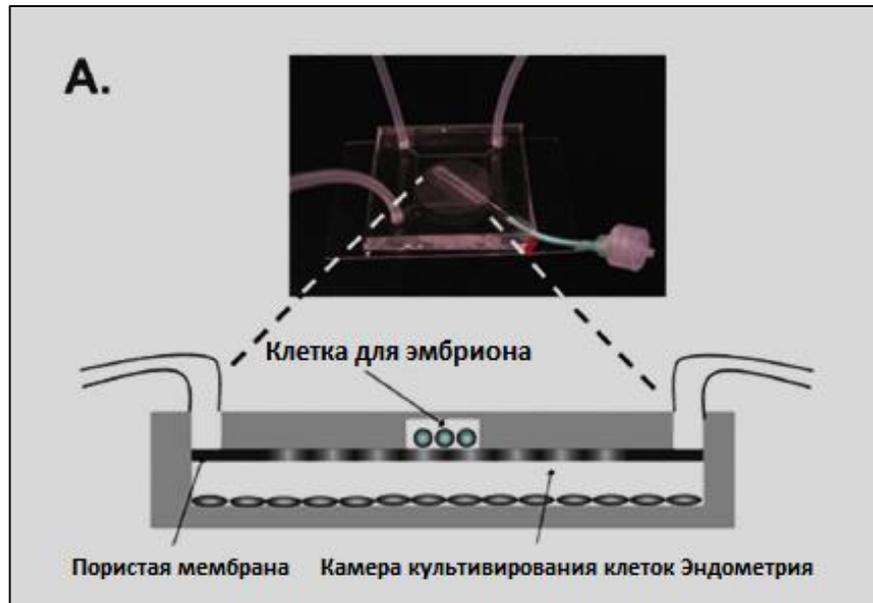
Оптический мониторинг процесса оплодотворения яйцеклетки в микрочипе



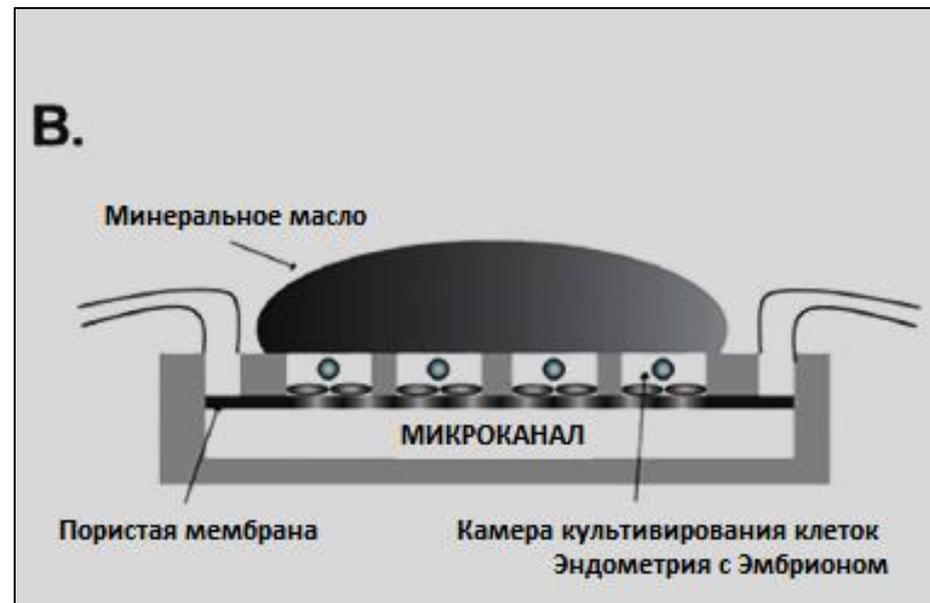
Управление потоком питательной среды



Технология культивирования эмбриона в микрокапиллярной системе



Раздельное выращивание эмбрионов и клеток эндометрия

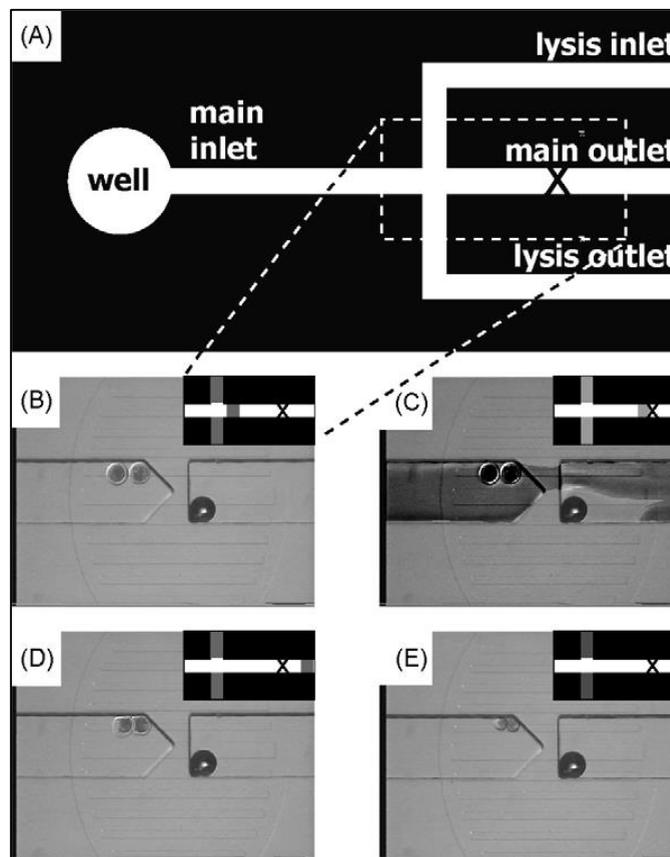


Совместное выращивание эмбрионов и клеток эндометрия

«Промывка-удаление» Zona Pellucida ооцита

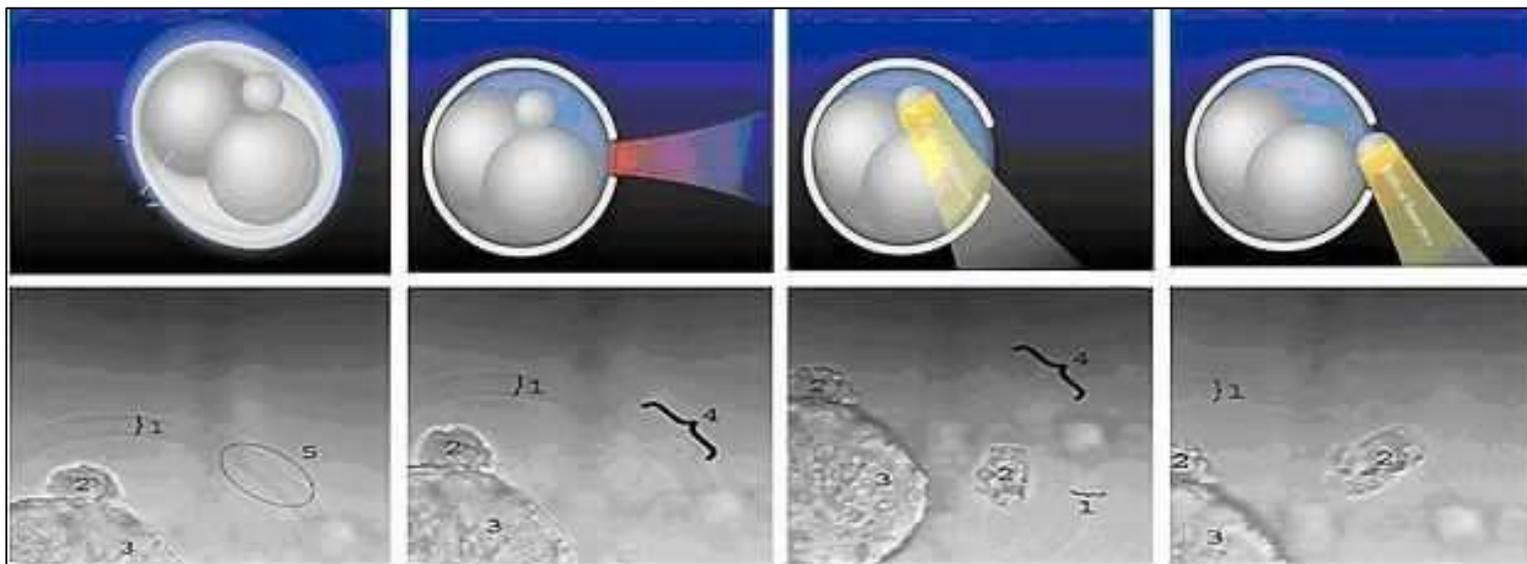


МикроЧИП реализующий удаление
Zona Pellucida Ооцита



Покадровая фотосъемка на микроскопе
процесса промывки Zona Pellucida Ооцита

Отбор генетического материала в МФ устройстве



Операция биопсии бластоциста с применением фемтосекундной лазерной ТЕХНОЛОГИИ



- Генетические исследования NGS+qPCR клетки
- Выявление наследственных заболеваний
- Отбраковывание / Одобрение эмбриона

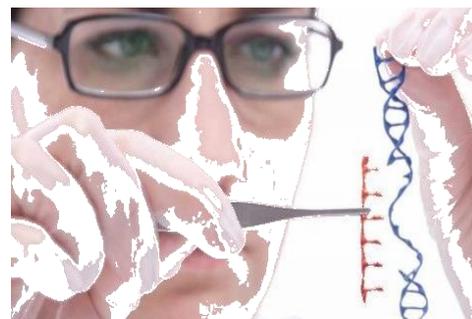
Прорыв в ЭКО-технологиях



ЭКО на ЧИПЕ



PGS

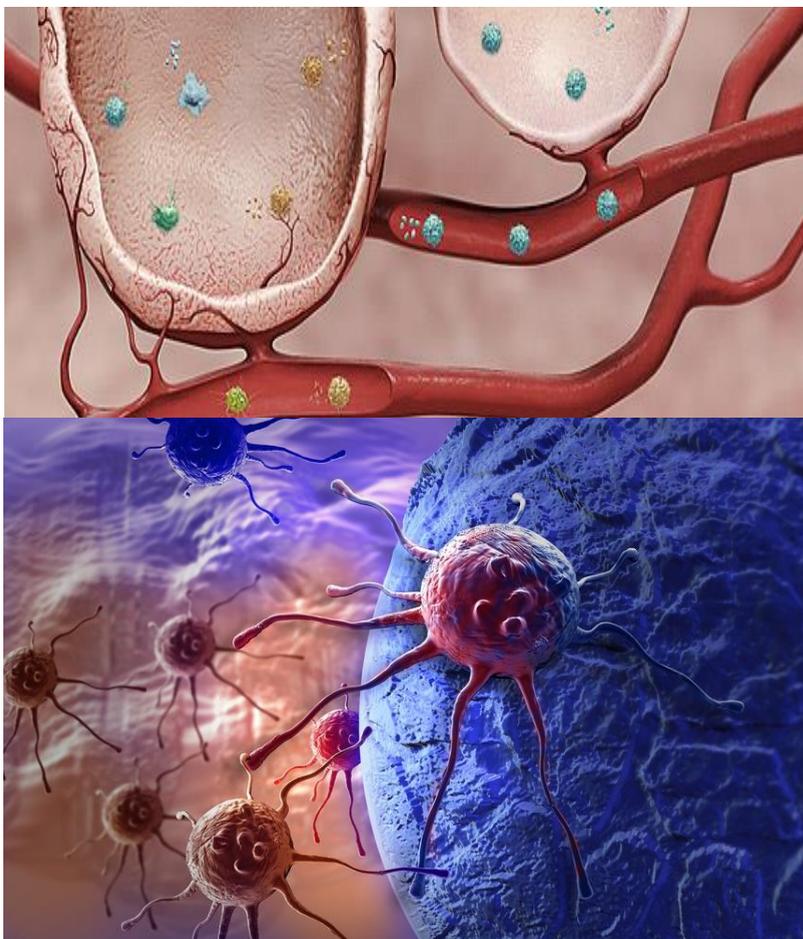


Редактирование генома



Здоровый ребенок

Диагностика и мониторинг раковых заболеваний



Жидкостная биопсия

Жидкостная Биопсия (ЖБ) - новое направление в диагностике раковых заболеваний и мониторинга применяемой терапии на основе не инвазивных анализов крови для выявления биомаркеров у больных онкологическими заболеваниями.

Основа исследований:

Жидкостная биопсия проводится на основе анализа пробы крови объемом 7.5 мл и выделении Циркулирующих Опухолевых Клеток - ЦОК

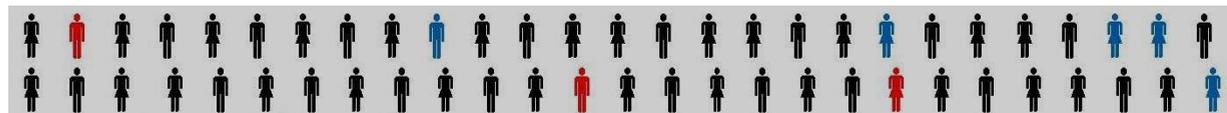
Типы маркеров используемые для идентификации опухоли:

- cfDNA (бесклеточная ДНК)
- Экзосомы
- **СТС (ЦОК) (свободно циркулирующие опухолевые клетки)**



Мотивация для жидкостной биопсии:

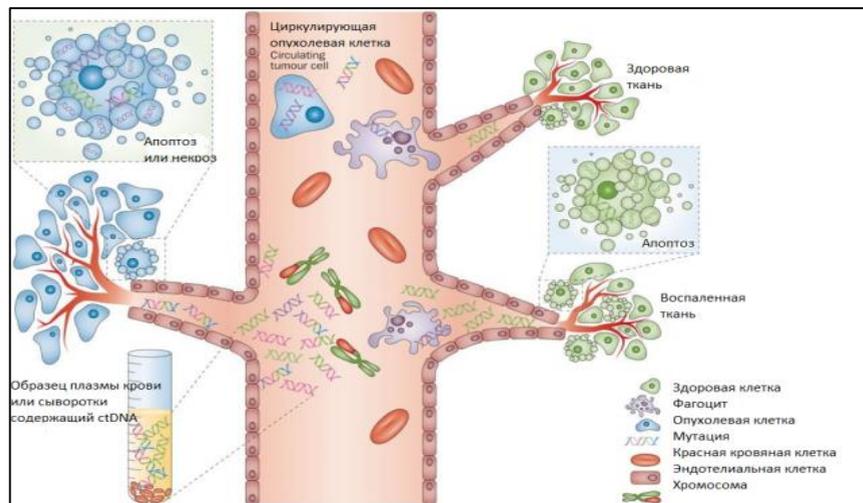
- Своевременное обнаружение опухоли
- Регулярный мониторинг проводимой противораковой терапии
- Экономия затрат и времени.
- Персонализированный подход к каждому больному.
Индивидуальный подбор лекарств и методов лечения.



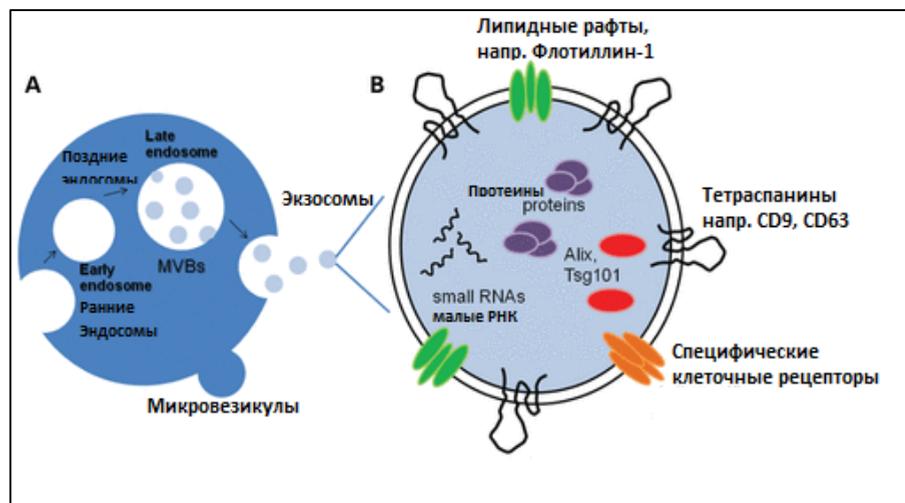
Терапия – 1/Терапия – 2/Терапия – 3

Целевая и индивидуальная терапия на основе молекулярных анализов.

Методики диагностики рака на основе специфических маркеров



CfDNA = бесклеточная ДНК

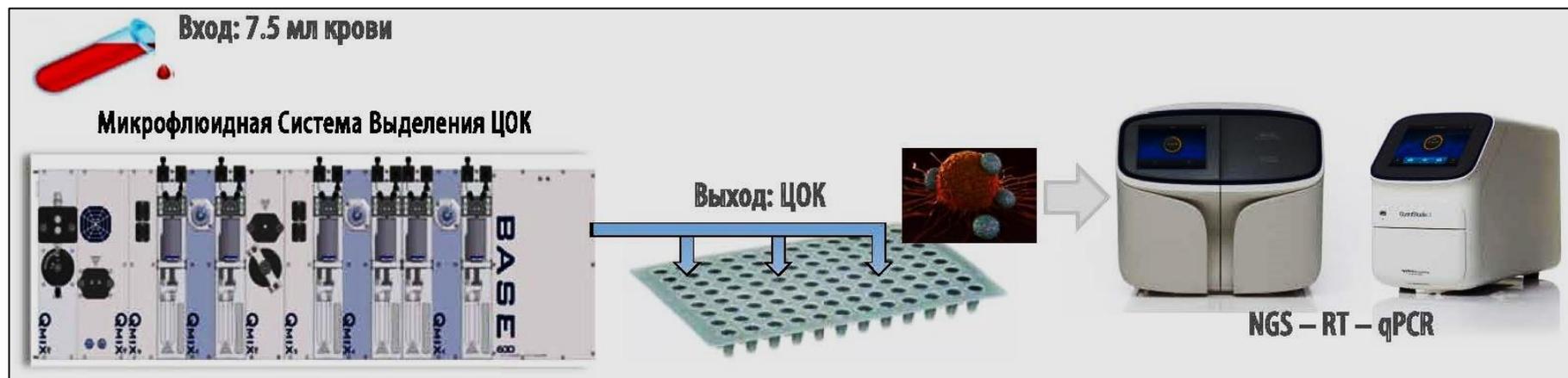


Экзосомы

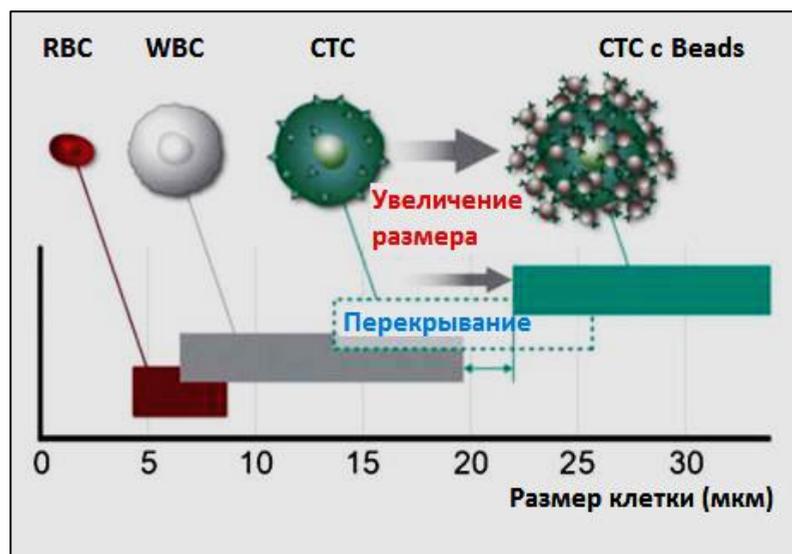


Циркулирующие опухолевые клетки

Общая схема микрофлюидной биопсии



Трудности при реализации технологии жидкостной биопсии



Первая проблема - крайне низкое содержание ЦОК в кровеносной системе человека:

- Содержание ЦОК в крови: 1-10 ЦОК / мл крови
- Содержание ЦОК в образце крови (ЭДТА) объемом 7.5 мл: примерно **7-75** ЦОК

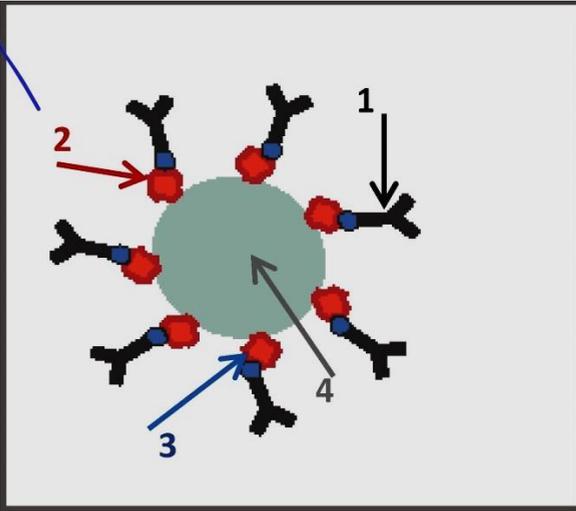
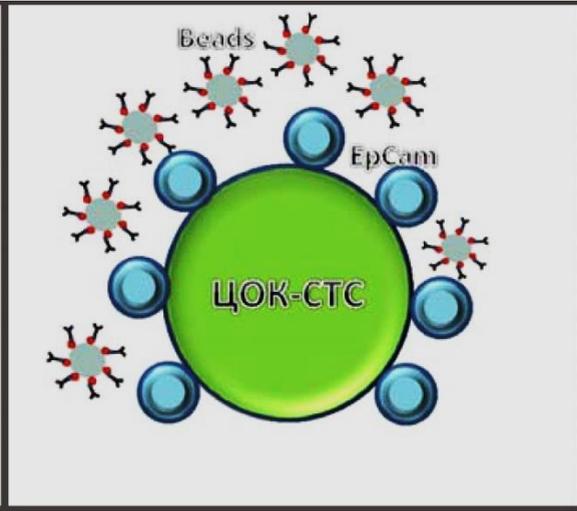
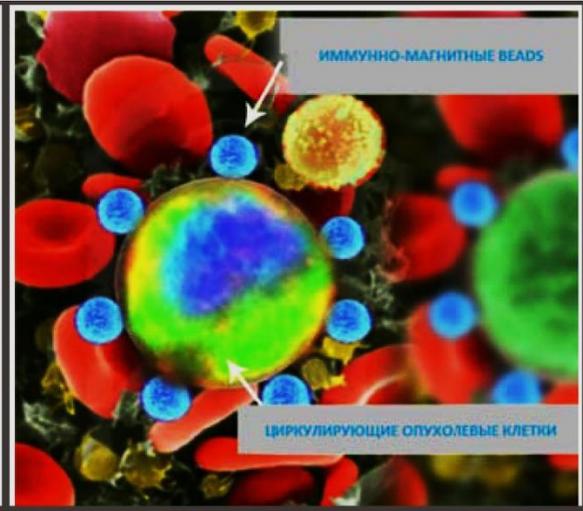
В тоже время в 7.5 мл крови содержится:

~ $3,5 \times 10^{10}$ эритроцитов RBC-~ $2,8-4,9 \times 10^7$ лейкоцитов WBC
~ $2,1-2,8 \times 10^9$ тромбоцитов - Суммарно: ~ **$3,7 \times 10^{10}$** "клеток"

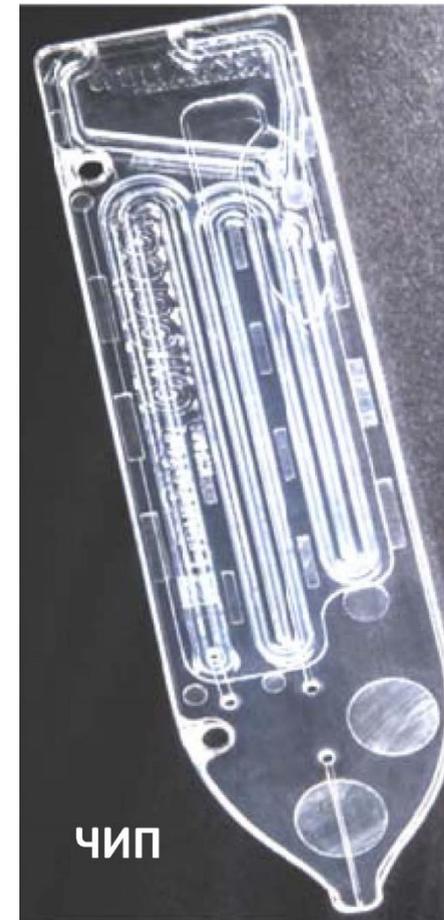
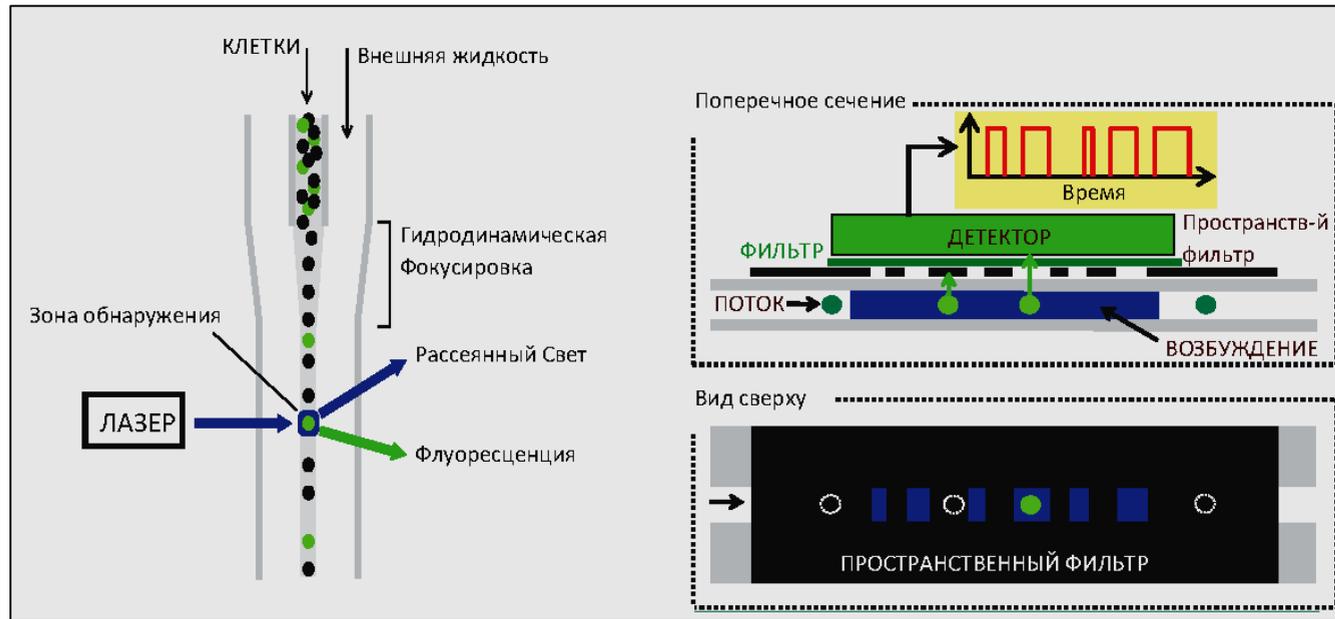
Вторая проблема заключена в размере ЦОК.

- Опухолевые клетки очень разнообразны:
- Размер клеток варьируется от 15 до 35 мкм
- Различные опухолевые клетки обладают различными свойствами поверхности

Обогащение ЦОК при помощи BEAD

		
<p>Beads - Активные антитела с флуоресцентно-магнитной присадкой</p> <p>1 (черный) – Антитело для EpCam</p> <p>2 (красный)– Fc-рецептор – белок, который переносит на себе инактивированные антитела</p> <p>3 (синий) – магнитно-флуорисцентная присадка</p> <p>4 (серый) – клетка переносчик антител</p>	<p>Процесс «шипования» - обогащения опухолевой клетки при помощи Beads. Процесс обогащения заключается в «сочленении» специфицированных антител с антигеном EpCam.</p> <p>EpCAM - адгезивная молекула эпителиальных клеток) - специфичный для опухолевых клеток маркер.</p>	<p>SEM фотография опухолевой клетки «шипованной» Beads.</p> <p>После обогащения: Beads закрепились на ЦОК</p> <p>Размер ЦОК существенно больше размера эритроцитов и лейкоцитов</p> <p>ЦОК приобрела флуоресцирующие и магнитные свойства</p> <p>Опухолевая клетка готова для дальнейшей идентификации</p>

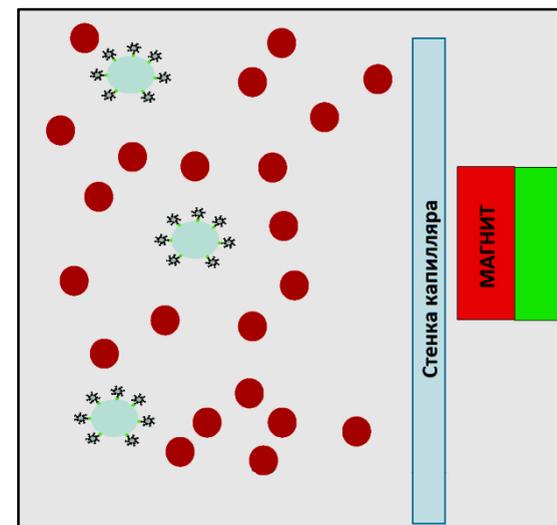
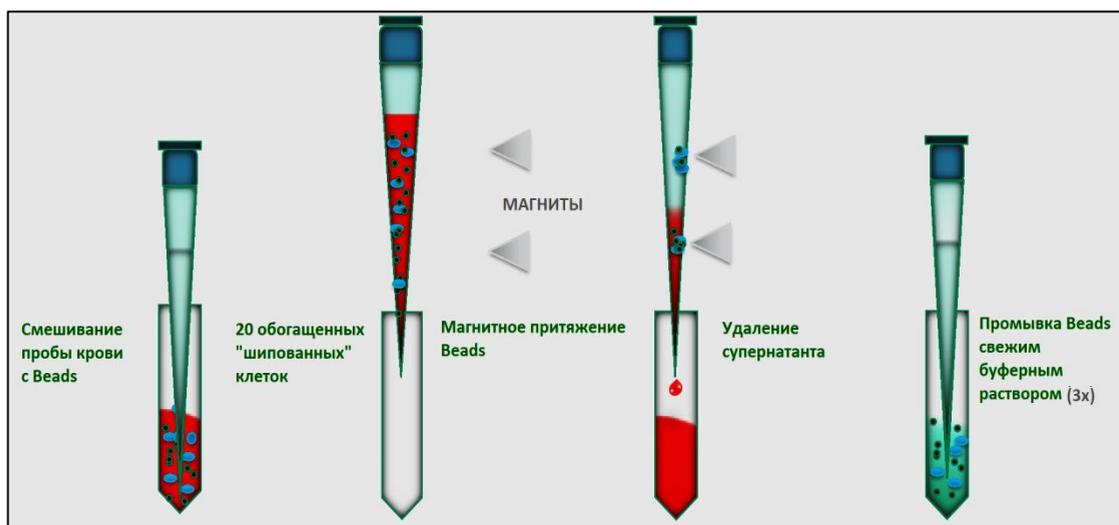
Технология МФ цитометрии с фильтром-транспаратором пространственных частот - ФТЧП



Образец крови с обогащенными ЦОК поступает в микро канал
В микроканале «внешней жидкостью» образуется еще один канал с регулируемой шириной.
Лазер - ниже по потоку, где клетки двигаются одна за другой.
Флуоресцентный оптический сигнал поступает на детектор через ФТЧП. Формируется 3 окна соответствующих частицам определенного размера:

- **«Красное»** - крупные и быстрые клетки
- **«Зеленое»** - мертвые
- **«Синее»** - «Мусор»

Магнитная сепарация, промывка и подготовка ЦОК к выгрузке

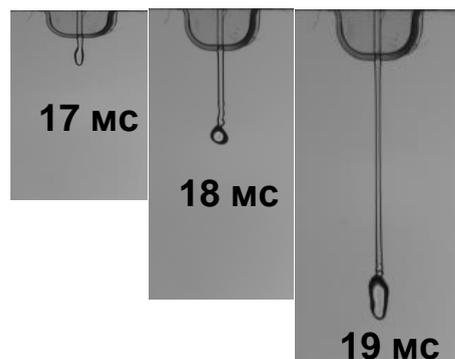


Изоляция и выгрузка клеток

- После обработки флуоресцентного сигнала клетки в зоне обнаружения происходит ее распознавание
- После распознавания за определенное время клетка перемещается в зону изоляции микрочипа
- Запускается диспенсер (дозатор) для выгрузки единичной клетки в отдельную лунку картриджа
- Выдается сигнал о наличии клетки в лунке картриджа

Механизм выгрузки единичной клетки

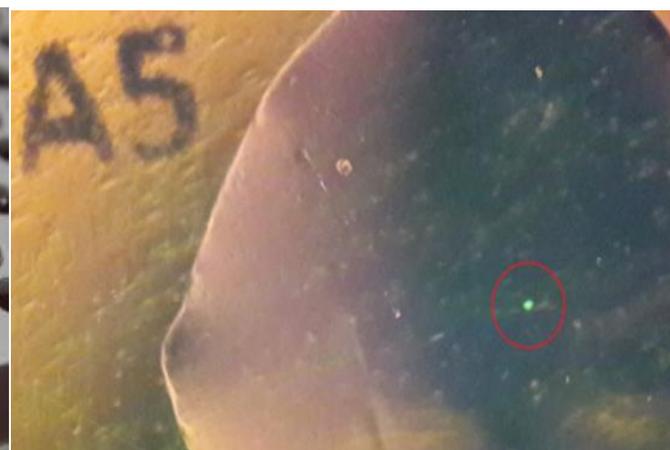
- Выгрузка единичной клетки в лунку приемного картриджа :
- Реальный размер капли, содержащей клетку: $0.3 \mu\text{l} - 3 \mu\text{l}$
- Система управления всегда направляет каплю с клеткой в отдельную лунку картриджа
- Средний уровень выделения ЦОК из одной пробы крови в микрофлюидной системе составляет 89%
- Процесс выделения единичной клетки занимает 60 мин.



Фотография выгрузки единичной клетки



Выгрузка ЦОК производится в ячейку A5



Фотография клетки в ячейке A5

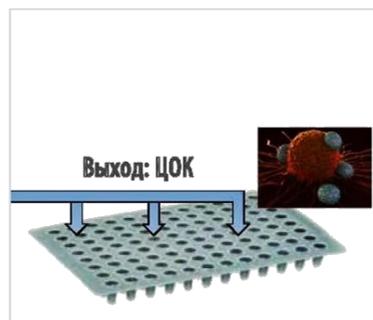
Определение места расположения и характера опухоли



- Генетические исследования NGS + qPCR выделенной клетки
- Локализация опухоли
- Определение типа онкологического заболевания

Революционный подход диагностики и лечения рака

1. Своевременное обнаружение опухоли – жидкостная биопсия - выделение ЦОК
2. Полное генетическое исследование опухолевой клетки, локализация и изучение природы опухоли
3. Фармакогенетика – подбор персонализированной терапии
4. КТ - ЯМР
5. Моделирование опухоли в МикроЧИПЕ
 - исследование поведения опухоли в различных условиях
 - изучение влияния различных препаратов на развитие опухоли
4. «Упаковка» **оптимального** для конкретного человека медицинского препарата в «интеллектуальные микрокапсулы»
5. Химиотерапия на основе целевой доставки препарата непосредственно в опухоль
6. Мониторинг эффективности химиотерапии. Жидкостная биопсия – выделение ЦОК



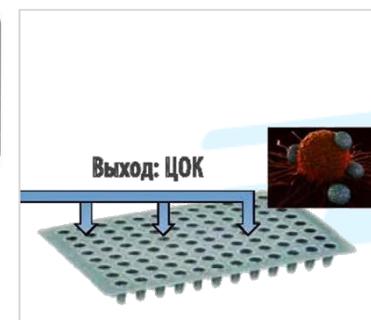
Выделение ЦОК
Диагностика



Генетические исследования
Диагностика



Фармакогенетика
Интеллектуальная химиотерапия



Выделение ЦОК
Мониторинг

Интеллектуальные системы доставки лекарственных препаратов

Ключевая проблема медикаментозного лечения онкологических заболеваний - пагубное воздействие на здоровые ткани и органы

Идеальный носитель: транспортировка и высвобождение антиракового препарата непосредственно в зону локализации опухоли. Исключение возможности «утечки» медикамента в процессе транспортировки.

Ткани либо имеют проблемы с диффузией препарата, либо окружающая их среда вязкая. В таких ситуациях важен ранний начальный момент доставки препарата для достижения широкого распределения медикаментов в «целевой» зоне.

Свойства интеллектуальных микрокапсул с механизмом впрыскивания медикамента:

- Введенный медикамент защищен от попадания в организм до момента достижения пораженной области
- Запуск механизма впрыскивания медикамента в пораженную ткань производится по локальным физическим или химическим сигналам.
- Введение препарата в самый начальный момент достижения пораженной области.

Интеллектуальные микрокапсулы обеспечивают эффективную терапию широкого спектра заболеваний со строго определенной областью локализации

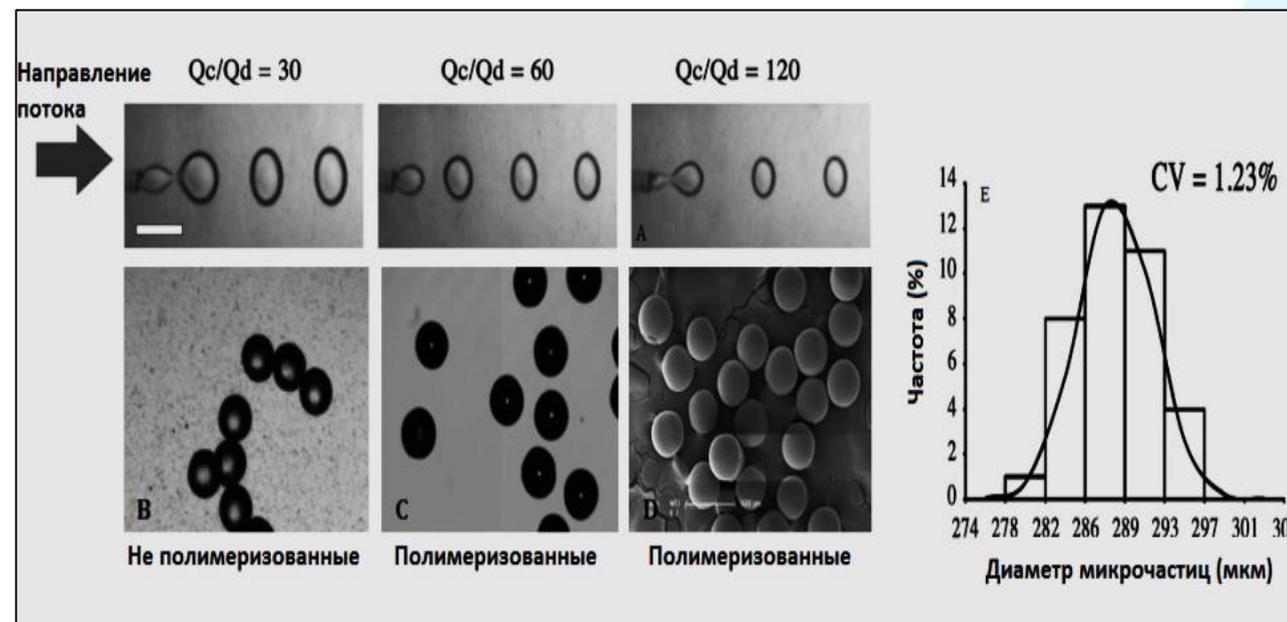
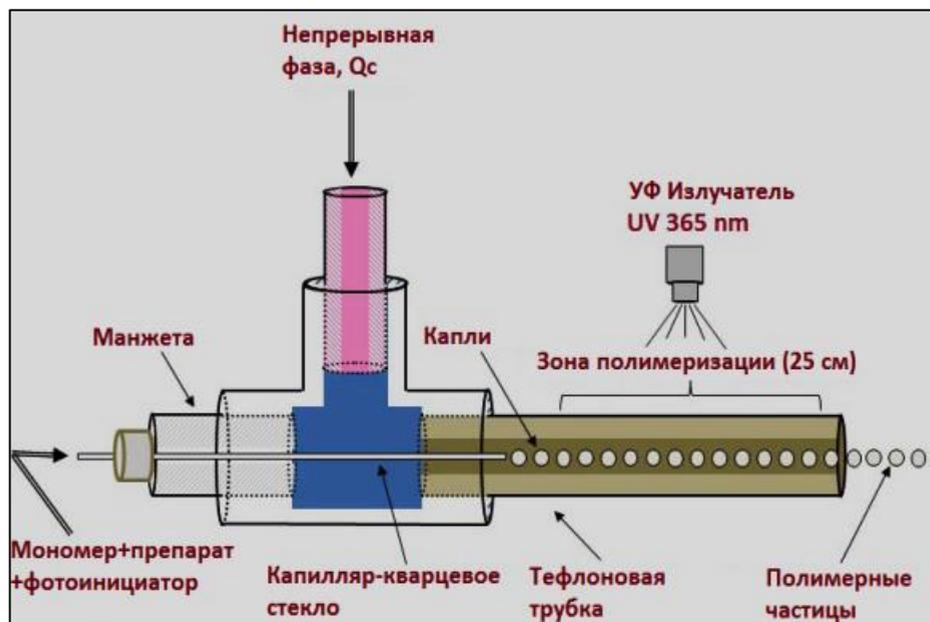
Интеллектуальные системы доставки лекарств

Механизмы управления впрыском медикаментов в целевую область

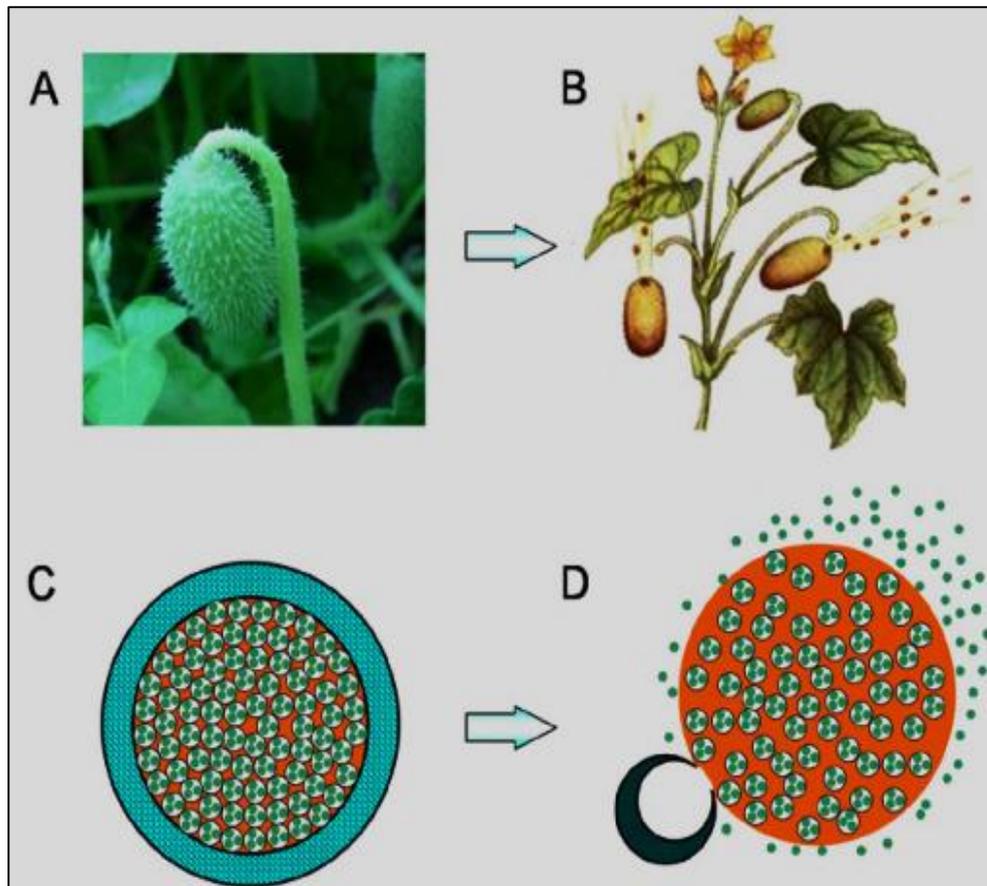
1. Термо чувствительность
2. Магнито чувствительность
3. Ионно чувствительность
4. pH чувствительность

Интеллектуальные системы доставки лекарств

Микрофлюидная инкапсуляция - производство микрокапсул



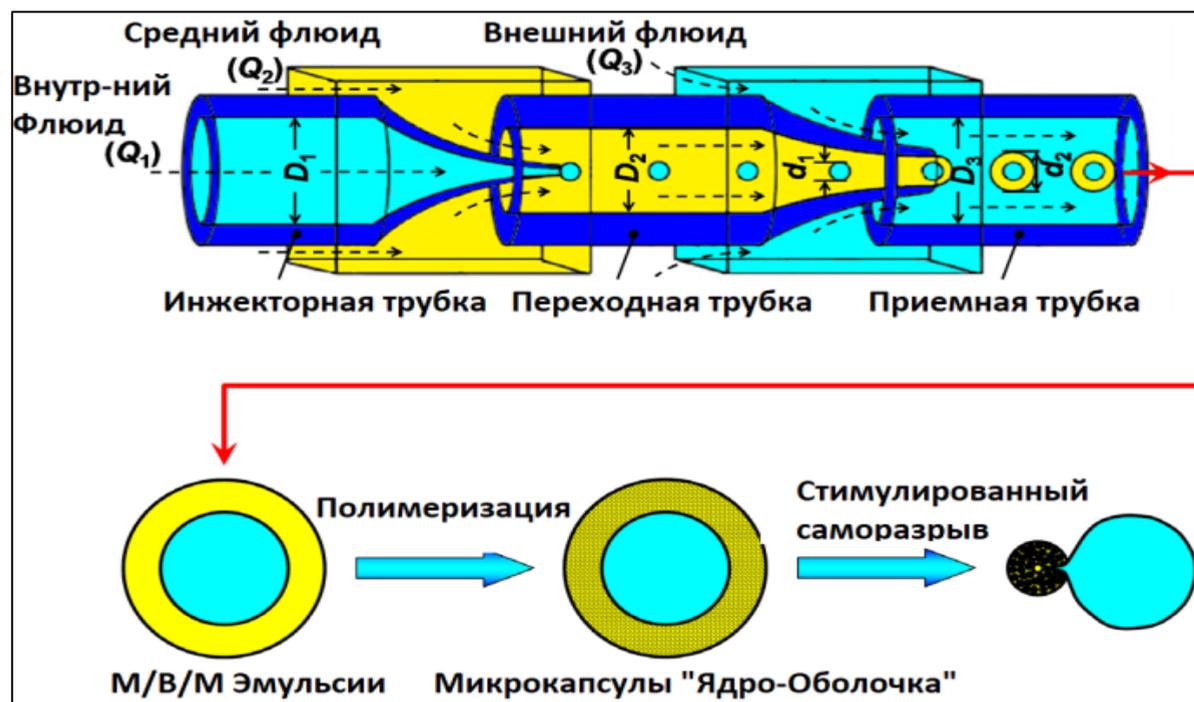
Производство интеллектуальных микрокапсул с управляемым механизмом впрыскивания препарата



Микрофлюидные ТЕХНОЛОГИИ – наиболее эффективный путь производства интеллектуальных микрокапсул с управляемым механизмом впрыскивания препарата

Интеллектуальные системы доставки лекарств

Микрофлюидное устройство получения двойной эмульсии



Интеллектуальные системы доставки лекарств

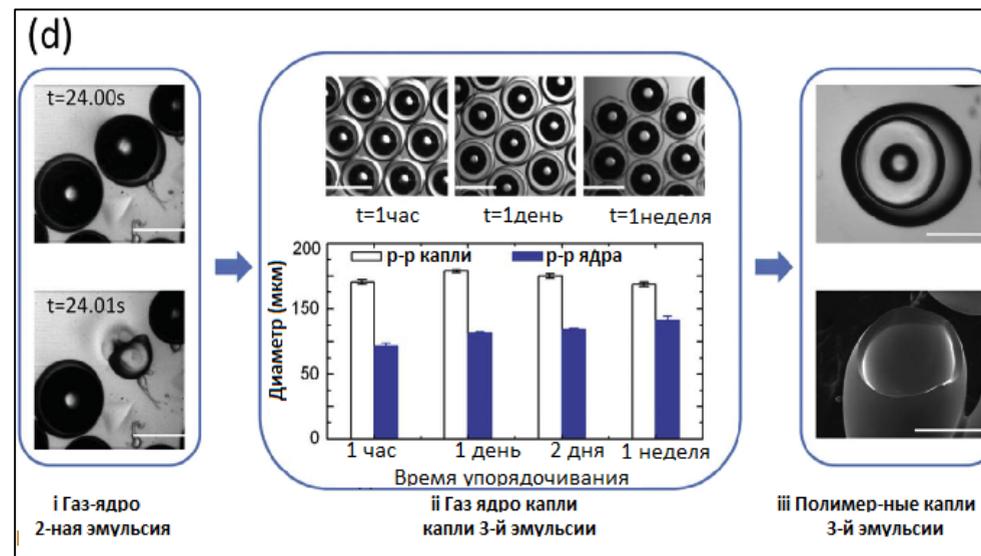
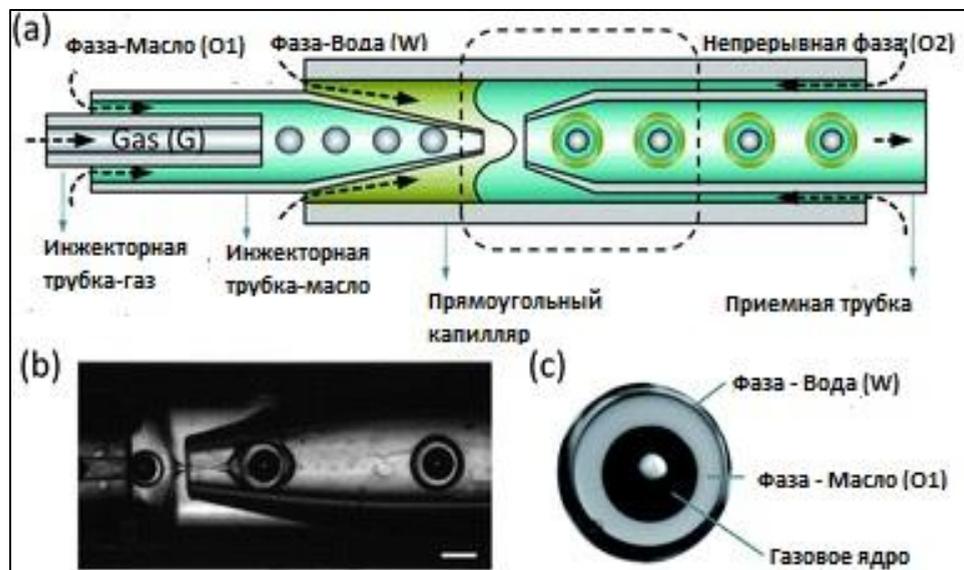
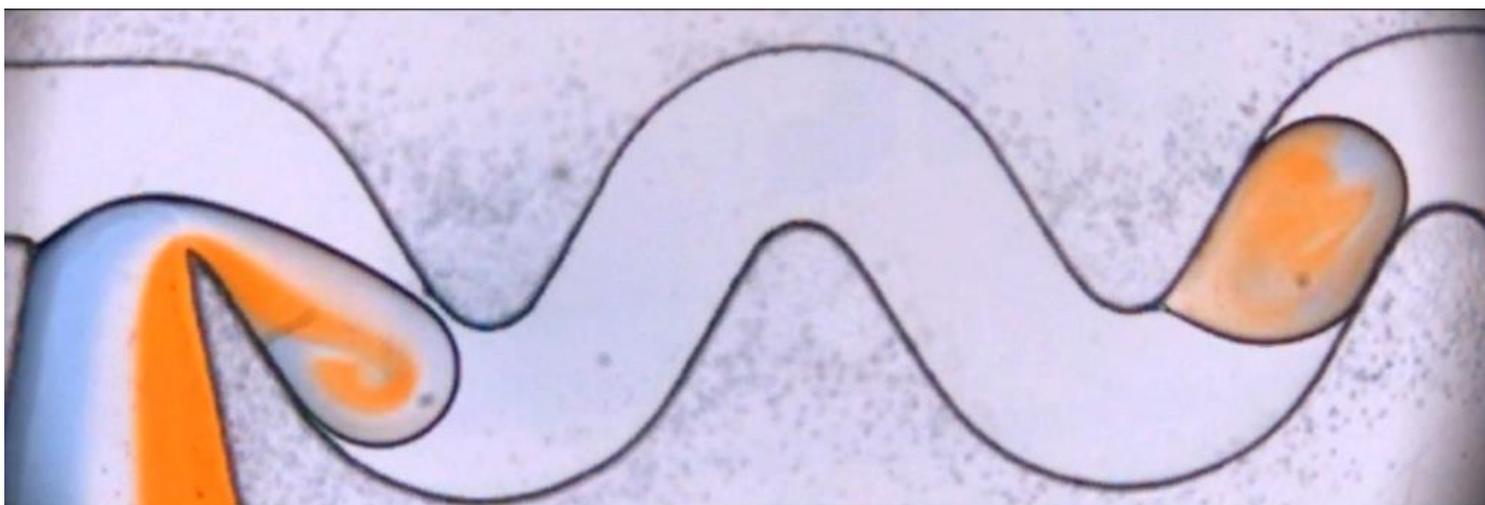
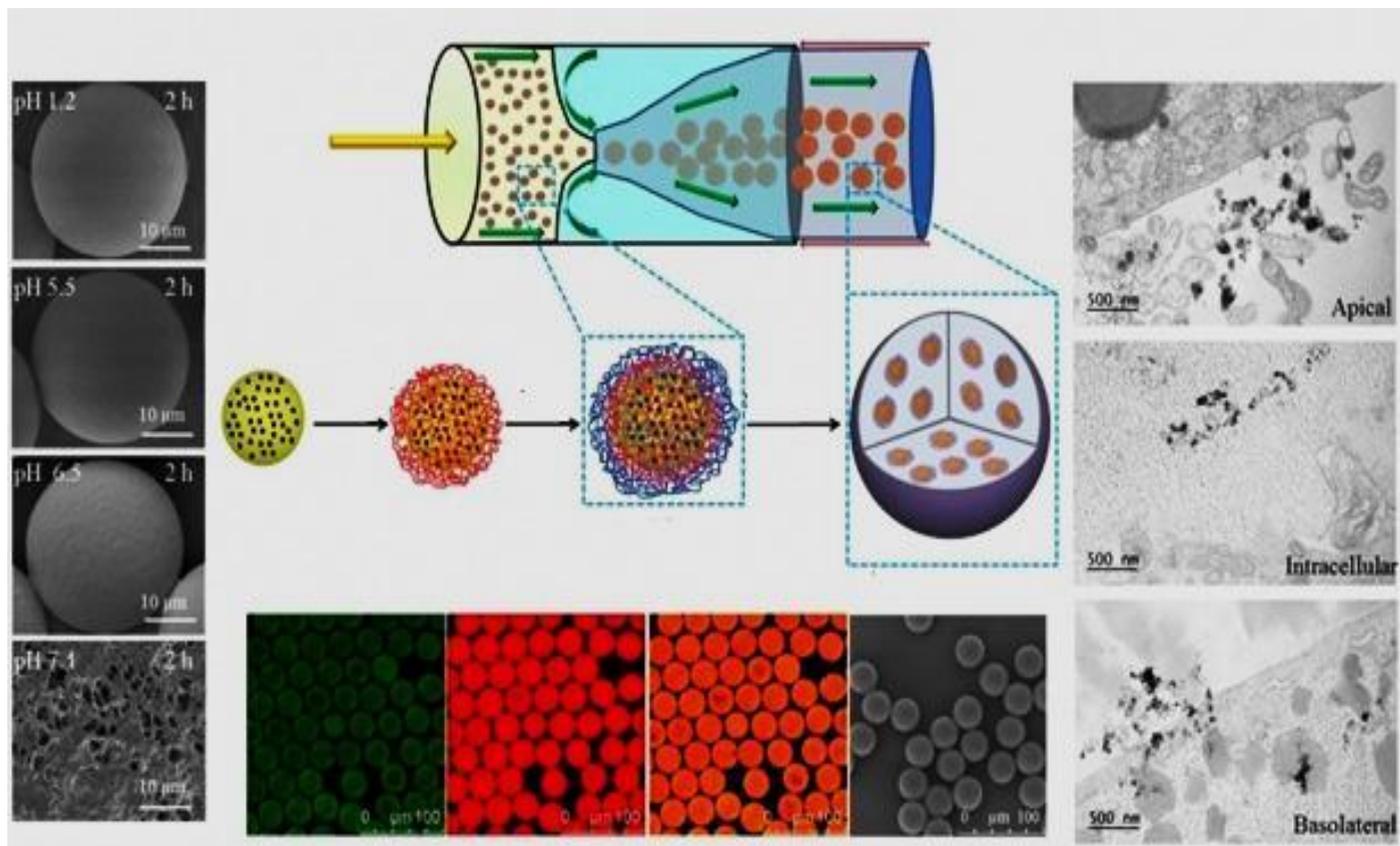


Схема МФ устройства создания тройных эмульсий с газовым ядром.

Процесс комплексной инкапсуляции

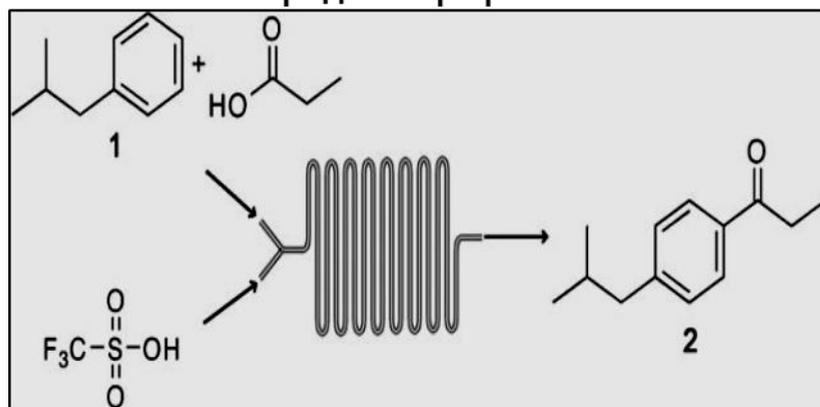


Производство фармацевтических субстанций в микрореакторах

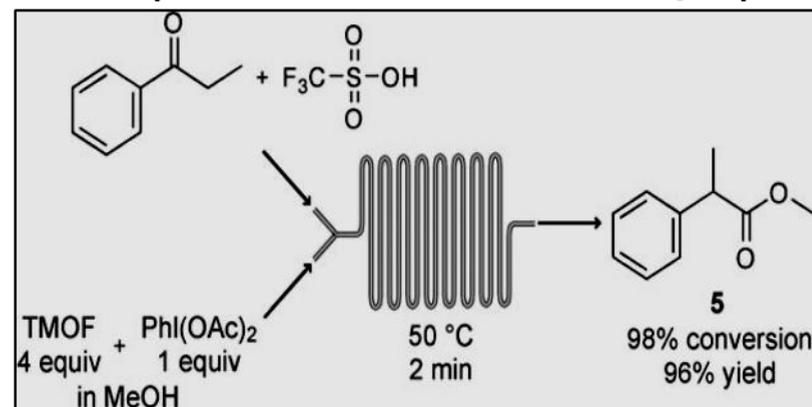


Синтез ибупрофена в микрокапиллярной системе QMIX

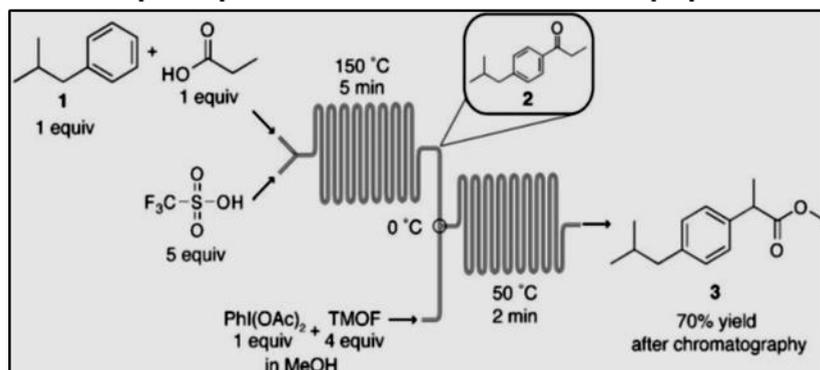
Шаг 1: Ацилирование Фриделя-Крафтса



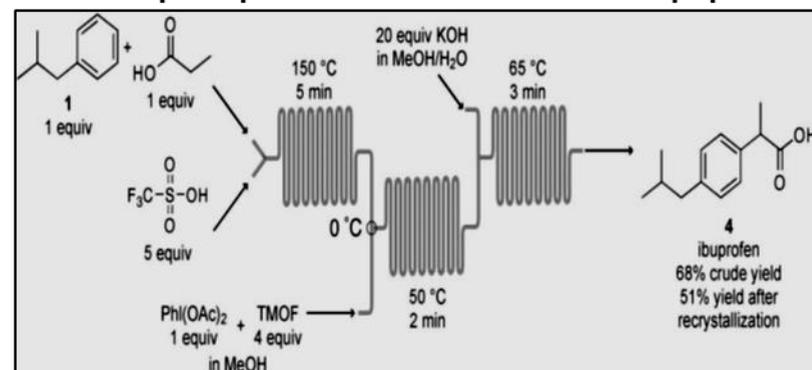
Шаг 2: Оптимизация реакционных параметров для интермедиатов PhI(OAc)₂ и сдвига 1,2-арила



Шаг 3: двухступенчатая реакция преобразования в метиловый эфир

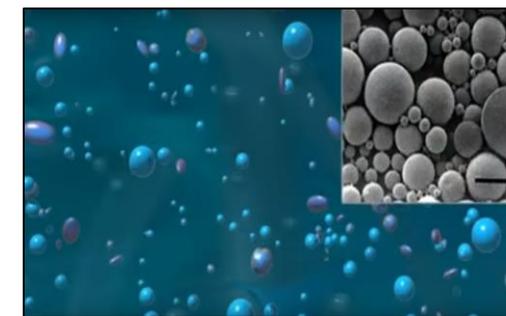
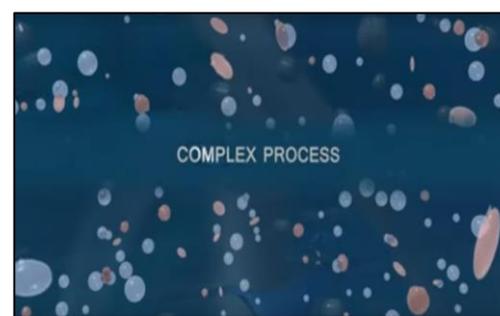
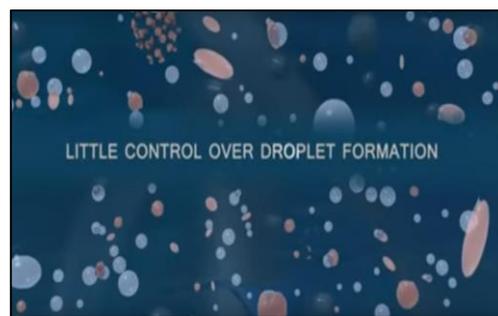


Шаг 4: двухступенчатая реакция преобразования в метиловый эфир

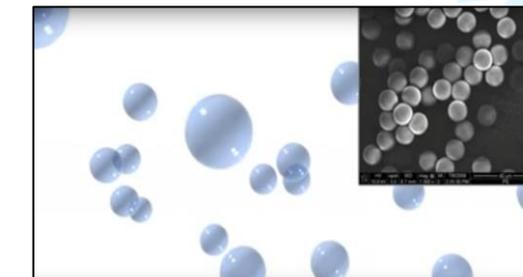
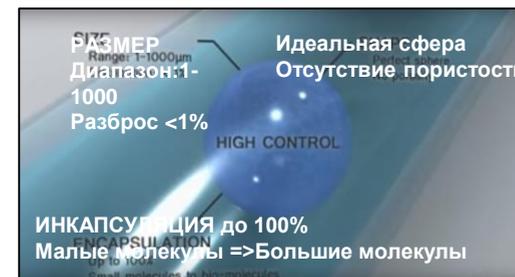
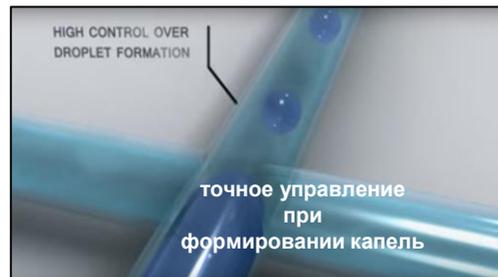
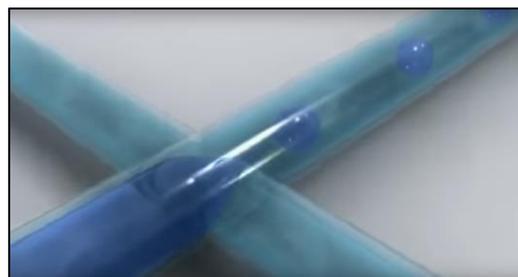


Синтез ибупрофена в микрокапиллярной системе QMIX

Инкапсулирование ибупрофена методом двойного эмульгирования (традиционный процесс) – распределение частиц по размерам неоднородное



Инкапсулирование ибупрофена микрокапиллярным методом – распределение частиц по размерам полностью однородное



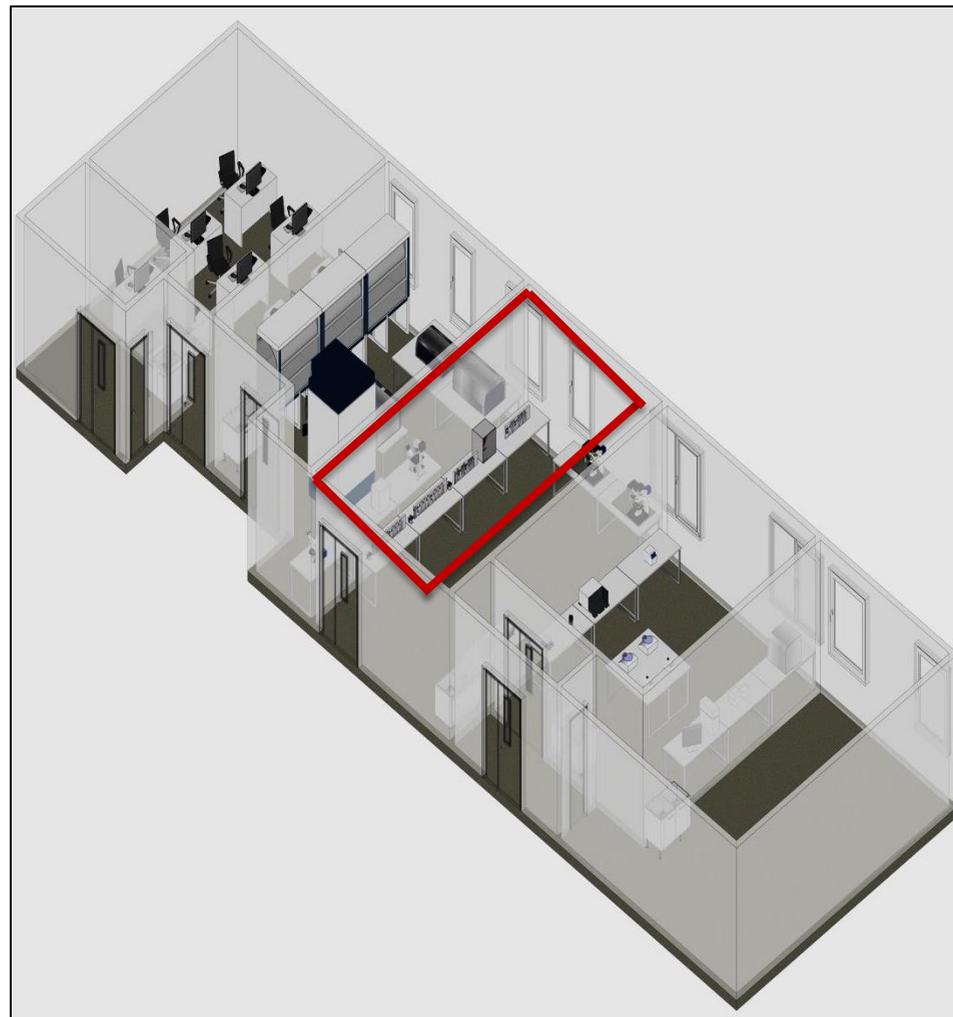
Сравнительный анализ получения субстанции в традиционном и микрокапиллярном реакторе

Параметр	Традиционный Реактор	Микрокапиллярный реактор
Максимальный выход субстанции	86%	100%
Время проведение скрининга для 22 реакций	22 дня	1 день
Затраченное количество реагентов	500 мл	4,7 мл
Очистка субстанции после синтеза	да	нет
Производительность системы по субстанции	0,05 кг/час	1.0 кг/час

Преимущества:

- Выход готового продукта выше на **14%**
- Время проведения скрининга меньше в **22** раза
- Затрачено реагентов более, чем **100** раз меньше
- Производительность системы в **20** раз выше

Микрофлюидный комплекс в исследовательском центре



Ваши вопросы



**Спасибо
за внимание**

Email: info@edunano.ru

www.edunano.ru

