—— ОБЗОРЫ —

УДК 611.013.9

# ПОДХОДЫ МИКРОФЛЮИДИКИ В СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

© 2018 г. А.В.Спиров

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44 *E-mail: sspirov@yandex.ru* Поступила в редакцию 19.02.2017 г. Окончательный вариант получен 02.10.2017 г.

Современные автоматизированные микросистемы на основе микрогидродинамических (микрофлюидных) технологий – лаборатории на чипах, – позволяют решать разнообразные академические и прикладные исследовательские задачи. В последние полтора десятилетия мы наблюдаем развитие этих подходов в приложении к проблемам современной количественной (системной) биологии развития. Здесь важны высокопроизводительные эксперименты, нацеленные на наработку больших объемов количественных данных для последующего их компьютерного анализа. В обзоре мы рассмотрим основные направления в разработках и приложениях микрофлюилных полходов для задач современной биологии развития на примере такого классического модельного объекта, как эмбрион плодовой мушки дрозофилы. Микрофлюидные устройства предоставляют возможность выполнять эксперименты, которые практически невыполнимы другими подходами. Такие устройства позволяют автоматизировано, быстро, надежно и правильно размещать много живых эмбрионов на подложке для параллельного конфокального сканирования, отсортировывать их, или инъецировать их различными агентами. Такие устройства позволяют, в частности, создавать контролируемые градиенты параметров микроокружения вдоль ряда развивающихся эмбрионов или, даже, скачок параметров в пределах микроокружения одного эмбриона, так что головная половина находится в других условиях по сравнению с хвостовой (при непрерывном сканировании). Такие подходы находят применение как в акалемических исследованиях функций генных ансамблей контроля раннего развития, включая проблемы устойчивости ранних паттернов к возмущениям, так и в тест-системах для скрининга химических агентов на развивающихся эмбрионах. Мы обсудим вопросы интеграции микрофлюидных устройств в системы для автоматизированного выполнения экспериментов, параллельно на многих развивающихся эмбрионах, при их непрерывном сканировании средствами современной флуоресцентной микроскопии. Методы и подходы, отработанные на дрозофиле, находят свое применение в приложениях к другим модельным объектам, вплоть до эмбрионов млекопитающих.

*Ключевые слова:* системная биология, количественная биология, биология развития, эмбриология дрозофилы, микрофлюидика, флуоресцентная микроскопия, автоматизация экспериментов, высокопродуктивные параллельные эксперименты, генетика развития, дифференцировка, морфогенез, устойчивость процессов эмбриогенеза

**DOI:** 10.7868/S0475145018030035

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Понимание того, как биологические системы функционируют макроскопически в процессах дифференцировки и морфогенеза, и как это функционирование управляется микроскопической активностью на уровне клеточного сигналинга и экспрессии генов, является ключевой задачей современной биологии развития. В современной биологии разработано немало эффективных подходов, включая непосредственные наблюдения за биологическими процессами в живых организмах (прежде всего, прижизненная флуоресцентная микроскопия), и компьютеризированные техники извлечения полезной информации из этих наблюдений.

В частности, разработчики в биологической инженерии добились впечатляющих успехов в создании автоматизируемых микрогидродинамических (микрофлюидных) технологий, позволяющих выполнять высокопродуктивную экспериментальную работу, и решать задачи, которые просто невозможно было решить другими способами.

Область автоматизированных микросистем на основании микрофлюидики для задач коли-

чественной и системной биологии развития<sup>1</sup> развивается впечатляющими темпами и ее прогрессу посвящено немало обзоров (Whitesides et al., 2001; Beebe et al., 2002; El-Ali et al., 2006; Feng et al., 2009). Микрофлюидные установки для генерации химических градиентов концентрации и их приложения в исследованиях клеточного хемотаксиса и процессов биологического морфогенеза рассмотрены в обзорах (Kim et al., 2010; Кухтевич и др., 2015). Отдельные обзоры посвящены использованию микрофлюидики в исследованиях по клеточным проблемам сосудистой биологии (van der Meer et al., 2009), по нейробиологии (Wang et al., 2009; Taylor et al., 2010), по материалам и технологиям пространственно-трехмерных клеточных культур (Ziolkowska et al., 2011), по общим проблемам клеточной биологии (Salieb-Beugelaar et al., 2010; Webster et al., 2011; Кухтевич и др., 2013). Несколько обзоров посвящены приложениям микрофлюидики в академических и прикладных задачах биологии развития на ряде модельных объектов, включая эмбрионы дрозофилы (Feng et al., 2009; Fakhoury et al., 2009: Levario et al., 2016a).

В этом обзоре мы освещаем недавние достижения в области разработок и эффективного применения микрофлюидных методов в экспериментальной работе с живыми объектами биологии развития на примере ранних эмбрионов плодовой мушки дрозофилы (Drosophila melanogaster). Наш обзор отличается от близких (Feng et al., 2009; Fakhoury et al., 2009; Levario et al., 2016a), как существенным количеством новых публикаций, так и вниманием именно к дрозофиле, как самому репрезентативному объекту и для этой области.

#### Микрофлюидные устройства в биологических исследованиях

Микрофлюидика (микрогидродинамика) это прикладное научное направление, изучающее поведение жидкостей (и газов) на микроуровне, нашедшее применение в самых различных областях. Стремительное развитие микрофлюидики привело к разработке приборов (микрофлюидных систем), в которых осуществляется воспроизводимое управление течением жидкостного (и газожидкостного) потоков нанолитровых объемов в микроразмерных каналах (Whitesides et al., 2001; Beebe et al., 2002; Squires, Quake, 2005). Как результат, появилась возможность реализации методик анализа и создания приборов с отличными от макроаналогов техническими характеристиками. В частности, биологические и медико-биологические приложения микрофлюидики рассмотрены и в отечественных обзорах (Евстрапов и др., 2011а; Занавескин и др., 2012).

Микрофлюидная система (микрофлюидное устройство) — это компактное устройство, которое оперирует небольшим количеством жидкости (нано/микролитровыми объемами), используя каналы с размерами десятки-сотни микрон. Течение в таких каналах, как правило, ламинарное, перенос масс осуществляется посредством диффузии (Bruus, 2006). В мировой литературе микрофлюидные системы зачастую называют как "лаборатории на чипах" (lab-on-chips). И ряд публикаций из журнала с таким названием (Lab on a Chip) обсуждаются в этом обзоре.

Топология и конструкция микроустройства для исследования биологических объектов определяются теми операциями, которые планируется реализовать на нем. В простейшем случае микрофлюидные устройства представляют собой конструкцию из двух герметично соединенных пластин: на одной пластине формируются миниатюрных размеров каналы, реакторы, клапаны, электроды и другие функциональные элементы, другая пластина — защитная (Зимина, 2009).

Общая схема изготовления микрофлюидного устройства рассматривается, например, в обзорах (Whitesides et al., 2001; Beebe et al., 2002; Евстрапов и др., 2011; Занавескин и др. 2012).

Идея дизайна такого устройства на примере проблематики этого обзора приведена на рис. 1. Две особенности типичного микроустройства для работы с эмбрионами — это его интеграция с системой микроскопирования (обычно как компонента автоматизированного микроскопного столика) и технические решения, обеспечивающие успешное манипулирование именно с такими необычными микрообъектами как живые эмбрионы (обеспечение их кислородом, прежде всего).

Важным моментом в обеспечении работы микрофлюидного устройства является организация движения потоков жидкости по микроканалам. Для простых устройств удобнее использовать внешние насосы (см рис. 1). Такая внешняя система подвода жидкости обеспечивает сборно-разборную конструкцию. Зачастую применяют программируемые шприцевые насосы, в этом случае подача и расход жидкостей задаются программой (Занавескин и др., 2012).

Сегодня полимерные технологии играют ключевую роль в развитии микрофлюидных устройств. В частности, полидиметилсилоксан

Под системной биологией развития (the systems biology of development) мы в этом обзоре понимаем ту область современной биологии развития, где развиваются и используются современные высокопроизводительные (high throughput) автоматизированные и компьютеризированные подходы к анализу проблем биологии развития (например, (Peter, Davidson, 2013)).



**Рис. 1.** Принципиальное устройство простой микрофлюидной установки на примере задачи сортировки живых эмбрионов по наличию/отсутствию флуоресцентного сигнала в эмбрионе. Установка интегрирована с конфокальным микроскопом и имеет внешние насосы. На основе из прозрачного материала формируют (микро-)каналы, реакторы, клапаны, и пр. Сверху прибор герметично закрывается защитным (покровным) стеклом. К каналам контролируемо подаются насосами растворы. Камеры или каналы, где содержатся или обрабатываются живые развивающиеся эмбрионы, обычно находятся под объективом микроскопа (и зачастую сканируются лазерным лучом). Микрокамера-детектор определяет наличие в поле зрения эмбриона или флуоресцентного сигнала от эмбриона для его корректной сортировки и/или обработки.

(ПДМС) – наиболее дешевый, он оптически прозрачен в широком диапазоне длин волн, является мягким эластомером и основным материалом для поисковых и инженерных исследований (Whitesides et al., 2001; Занавескин и др., 2012). Технологии изготовления микроустройств из эластичных ("мягких") полимеров типа ПДМС получили название "мягкой" литографии (soft lithography), она несложна в освоении и именно она преимущественно применяется в приложениях для эмбриологии.

Отметим в заключение, что приложения микрофлюидики к задачам системной эмбриологии опираются на хорошо отлаженные технические разработки и хорошо себя зарекомендовавшие подходы. Так что их освоение биологами-экспериментаторами не представляет каких-либо серьезных методических трудностей.

## Микрофлюидика и системная эмбриология дрозофилы

Эмбрионы дрозофилы являются одной из наиболее доступных моделей экспериментального эмбриогенеза, поскольку оплодотворенные эмбрионы откладываются и развиваются непосредственно

ии (soft именно южениименно юженимикроии опие разраодходы. татораметоди-

нии для решения таких задач, как визуализация процессов развития, сортировка (сортинг) эмбрионов и микроинъекции эмбрионов. Эмбрионы дрозофилы – относительно небольшие (они имеют форму неправильных эллипсоидов, размерами, примерно 200 × 200 × 500 мкм), и традиционные методы включают трудоемкие ручные манипуляции. Для устранения этих ограничений, был сконструирован ряд микросистем

в окружающей среде, тем самым облегчая манипу-

лирование ими (Campos-Ortega, Hartenstein, 1985; Bate et al., 1993). Дрозофила – весьма удобный с ге-

нетической точки зрения объект, так как позволя-

ет в лабораторных условиях получать мушек практически с любым мутантным геном, нокаутным

(knockout) геном или геном-репортером (reporter

(микроустройств), чтобы облегчить и автоматизировать такие задачи, которые часто лимитируют скорость и эффективность выполнения эксперимента в целом.

Кроме того, микрофлюидные устройства были разработаны для управления микросредой, в которою помещен эмбрион, для того, чтобы локальными возмущениями в пространстве (локализованные изменения микроокружения эмбриона) и/ или пульсами во времени воздействовать на индивидуальное развитие. Перспективная цель подобных разработок — масштабные автоматизированные эксперименты со многими развивающимися эмбрионами параллельно (и так чтобы эмбрионы были на близких временах развития).

В современной биологии и медикобиологии потребность в масштабных автоматизированных тестах на живых эмбрионах модельных организмов как целого растет год от года, и эмбрионы и личинки дрозофилы по-прежнему остаются наиболее удобными организмами для таких целей (Fakhoury et al., 2009; Delubac et al., 2012). Соответственно, именно прогресс в разработках микросистем, включающих микрофлюидные устройства, делает возможным проведение масштабных параллельных тестов на живых эмбрионах как для академических целей анализа механизмов эмбриогенеза, так и для скрининга химических агентов и биохимических соединений.

В самом общем, контролируемые возмущения живых эмбрионов в микросистемах естественно разделить на внешние возмущения и внутренние (как представлено на диаграмме рис. 2). Внутренние возмущения включают использование генетических манипуляций (например, нокаутов генов или зависящих от температуры мутаций) или фармакологических агентов с целью оценить их эффект на эмбриональное развитие. В частности, микроинъекции позволяют в достаточно определенный интервал эмбриогенеза оказать направленное возмущение молекулярных компонентов эмбриональных процессов (Fakhoury et al., 2009). Внешние же возмущения — это прямое изменение среды, непосредственно окружающей развивающийся эмбрион (рис. 2). Это достигается посредством различных воздействий, включающих механические, температурные, жидкостные и химические, с целью оценить их эффект на эмбриогенез (Lucchetta et al., 2006).

Оставшаяся часть обзора организована следующим образом. В разделе 2.1 мы рассмотрим применение микрофлюидики для сортинга эмбрионов. В разделе 2.2 будут рассмотрены микрофлюидные устройства для микроинъекций в эмбрионы дрозофилы. В разделе 2.3 рассматриваются микрофлюидные устройства для регулярного расположения многих эмбрионов для параллельных экспериментов с ними и, в частности, для выравнивания эмбрионов для их визуализации. В разделе 2.4 дается обзор подходов к экспериментальному возмущению нормального эмбриогенеза средствами микрофлюидики. В разделе 2.5 мы обсуждаем интеграцию микрофлюидики с микроскопией плоскостного освящения. Наконец, раздел "Выводы и перспективы" завершает обзор.



**Рис. 2.** Микротехнологии для высокопроизводительного анализа эмбрионов дрозофилы в их взаимодействии, включая микрофлюидику. Ключевые разделы технологий микронного масштаба, обеспечивающие точный и эффективный количественный анализ, могут комбинироваться как для изучения механизмов эмбриогенеза, так и для прикладных задач скрининга химических агентов и фармпрепаратов. Такой подход представляет новые возможности для изучения влияния генетической вариабельности и (локальных) возмущений микросреды на клеточные сигнальные пути, клеточную механику и устойчивость регуляторных сетей эмбриогенеза.

#### Микрофлюидика для сортинга эмбрионов

Полностью картированный геном дрозофилы и широкие возможности генетических манипуляций делают дрозофилу отличной моделью для изучения молекулярных механизмов регуляции генов (Spradling et al., 1999; Adams et al., 2000). В частности, генные ансамбли, задающие своей активностью разметку (паттерн) раннего эмбриона для последующей дифференцировки и морфогенеза, относятся к наиболее изученным регуляторным сетям в эмбриогенезе. Поэтому эти сети все чаще используются как тестовые системы в отработке новых подходов и проверке новых идей.

В исследованиях молекулярных механизмов работы генов дрозофилы обычно используют мутантные линии, но трудности при этом заключаются в том, что зачастую требуется отобрать 25% гомозиготных мутантов от остальных эмбрионов в опыте. Обычные методы требуют визуальной идентификации представляющих интерес эмбрионов и их изоляции вручную, что является трудоемким процессом. Поэтому задача автоматизации сортинга была одной из первых, которую попытались решить методами микрофлюидики (см рис. 1 и рис. 3). Принципиальная схема организации сортирующих микрофлюидных систем представлена на обсуждавшимся рис. 1. Используемые конкретные техники могут отличаться. Для облегчения процесса сортинга Фёрлонг с соавторами (Furlong et al., 2001) (лаборатория Солгарда, Solgaard) разработали микросистему, сходную по дизайну с системами поточной цитометрии, которая может автоматически отсортировать флуоресцентно-меченные эмбрионы дрозофилы. По пути несущего эмбрионы потока жидкости, каждый эмбрион проходит через детектор флуоресции и эмбрионы сортируется в зависимости от отсутствия или наличия флуоресцентной метки (сравни рис. 1).

Конкретно Фёрлонг и его коллеги использовали магнитно-управляемый клапан, который открывает или перекрывает поток жидкости к "мусорной корзине" для сбора ненужных эмбрионов. Когда клапан открыт, эмбрион отсортировывался как "ненужный", когда клапан закрыт, эмбрион отсортировывается как "годный". Это устройство может автоматически сортировать порядка 15 эмбрионов в секунду, требуя только внесения суспензии эмбрионов на "вход" устройства.

Ченом с соавторами (Chen et al., 2004) была предпринята разработка микрофлюидного сортировщика эмбрионов, не использующего механических клапанов. В основе разработки — манипуляции сортируемыми объектами посредством изменений давлений в системе микроканалов (рис. 3). Система сходящихся и расходящихся каналов была настроена так, что изменение



**Рис. 3.** Задача сортировки эмбрионов и ее реализация одним из подходов микрофлюидики (Chen et al., 2004). Исходно система настроена так, что поток с эмбрионами ламинарно течет к отводному каналу 1 (схема (а), стрелка). Повышение давления в контрольных каналах перебрасывает поток основного канала к отводному каналу 2 (схемы (б) и (в), стрелка схемы (в)). Возврат давления в каналах контроля к допороговым значениям приводит к возврату потока с эмбрионами к отводному каналу 1. Тем самым обеспечивается сортировка эмбрионов на две группы. t – время эксперимента в секундах (от момента повышения давления); давление в каналах передается градациями серого (шкала в паскалях, Ра, приводится справа каждого из трех рисунков).

давления в каналах контроля перебрасывало основной поток (несущий сортируемые эмбрионы) от одного отводного канала к другому, и обратно, при возвращении давлений к исходным, допороговым уровням (рис. 3). Этот подход к сортингу наглядно иллюстрирует оригинальные технические решения, представляемые микрофлюидикой, и поэтому именно его мы привели в качестве иллюстрации в этом разделе.

Такой тип микрофлюидного сортировщика, как на рис. 3, перспективен для микроманипуляцией с разнообразными биологическими объектами, и может обеспечивать автоматические операции с высокой пропускной способностью и точностью. К сожалению, это направление до сих пор не получило продолжения.

Таким образом, автоматическая сортировка эмбрионов, как одна из базовых составляющих в организации практически любого масштабного эксперимента в области современной системной биологии развития, эффективно решается средствами микрофлюидики и при этом не единственным способом.

## Микрофлюидика для микроинъекций в эмбрионы

Прогресс системной биологии требует разработки техник точных, эффективных и контролируемых инъекций химических препаратов, ДНК, протеинов, энзимов, ионов, антител и метаболитов в живые эмбрионы (идея новых стратегий изображена на рис. 4а) (Fakhoury et al., 2009). В частности, весьма актуальны такие техники микроинъекций для высокопродуктивного скрининга интерферирующих РНК (РНКи, RNAi), поскольку утомительное ручное манипулирование при микроинъекции обычными способами становится лимитирующим фактором (Bernstein et al., 2004a).

Соответственно, в этом направлении были предприняты успешные попытки автоматизации средствами микрофлюидики. Так, Заппе с соавторами (Zappe et al., 2006) впервые успешно осуществили такую разработку и выполнили тесты с инъецированием двухцепочечной РНК (doublestranded, dsRNA), комплементарной ДНК гена armadillo (из класса генов segment polarity). Почти 80% инъецированных эмбрионов развили



**Рис. 4.** Подходы микрофлюидики для инъекций в эмбрионы дрозофилы. (а) Идея высокопроизводительной системы для микроинъекций одновременно многим эмбрионам, регулярно и надежно расположенным на системе микроподложек (Bernstein et al. 2004b). (б) Конкретная реализация микрофлюидного устройства для автоматических инъекций эмбрионам; входные и выходные отверстия микроканалов подписаны как у авторов публикации (Delubac и др., 2012); эмбрионы с током буфера поступают в канал через входное отверстие (Embryo Inlet), и посредством сдвигового течения (Sheath Flow) попадают в камеру микроинъектора, после инъекции эмбрионы током буфера транспортируются, в итоге, до выходного отверстия (Embryo Outlet). (в) Детальный вид камеры микроинъектора с эмбрионом и последовательность событий при микроинъекции (части установки, обведенной пунктиром на (б) при большем увеличении, под другим углом (Delubac и др., 2012)).

ожидаемую реакцию на эту инъекцию – сильный фенотип потери функции (loss-of-function).

Позднее группа Заппе (Delubac et al., 2012) в продолжение этих разработок (Zappe et al., 2006) сконструировала микрофлюидную систему с интегрированным микроинъектором для автоматизирования инъекций в эмбрионы дрозофилы (рис. 4в). Это микрофлюидное устройство автоматически извлекает эмбрионы из резервуара и доставляет их в микроинъектор при помощи "сдвигового течения" (sheath flow). Эмбрионы прокалываются микроиглой, когда они вталкиваются потоком в камеру микроинъектора, что эффективнее, чем ввод иглы в эмбрион (т.е., движутся эмбрионы, а не инъектор: как показано на рис. 4в). Видеокамера, нацеленная на "сайт" для инъекции, автоматически определяет наличие эмбриона и посылает микроинъектору команду выполнить инъекцию; после инъекции, эмбрион "выгружается" из микроинъектора в резервуар для сбора (также за счет потока жидкости).

Делибак с соавторами (Delubac et al., 2012) показали эффективность этой системы экспериментами с инъекцией эмбрионам, экспрессирующим флуоресцентный белок eGFP, короткой интерферирующей PHK, действующей на eGFP (так что вскоре после инъекции флуоресценция эмбрионов прекращалась). В этих тестах, удавалось производить инъекцию одного эмбриона каждые 3–4 сек (231 инъецированных эмбрионов за 14 мин), с 90% успешного "глушения" флуоресценции эмбрионов.

Разработка подходов к автоматическому инъецированию многих эмбрионов параллельно и на сравнимых временах эмбриогенеза особенно актуальна в задачах химического скрининга. Поэтому именно в этом направлении ожидаются дальнейшие разработки высокопродуктивных автоматических систем (как иллюстрируется рис. 4а).

# Как расположить живые эмбрионы правильными рядами?

Для количественного анализа функций генов в эмбриогенезе, особенно в масштабных генных и геномных исследованиях, крайне значимо иметь технические возможности быстро и эффективно располагать, и надежно иммобилизовать на соответствующем субстрате (подложке или пластине с лунками) живые эмбрионы в строгом порядке и с правильной ориентацией (см рис. 5 и рис. 6). Для количественного анализа экспрессии факторов, контролирующих последующие ранние морфогенезы как вдоль передне-задней оси (сегментация) (рис. 5а), так и дорзо-вентральной оси (гаструляция) (рис. 5б) необходимо, чтобы эмбрионы были как можно аккуратнее иммобилизованы под объективом микроскопа относительно этих главных осей эмбриона: паттерны экспрессии реально пространственно трехмерны и даже небольшие различия в положении относительно плана



Рис. 5. Проблемы конфокального сканирования многих живых эмбрионов одновременно для анализа устойчивости и воспроизводимости паттернов генной экспрессии (используются эмбрионы, экспрессирующие генноинженерные флюоресцирующие протеины). (а) Для количественного анализа экспрессии факторов, контролирующих последующие ранние морфогенезы вдоль передне-задней, А-Р, оси (сегментация) необходимо, чтобы эмбрионы были как можно аккуратнее иммобилизованы под объективом микроскопа относительно передне-задней и дорзо-вентральной, D-V, осей с целью минимизации ошибок измерения (конфокального сканирования). (б) Для количественного анализа экспрессии факторов, контролирующих последующие морфогенезы (гаструляцию, прежде всего) вдоль оси D-V, эмбрионы должны быть иммобилизованы так, чтобы все они были обращены одним концом (головным или хвостовым) к объективу.

#### СПИРОВ



**Рис. 6.** Задачи автоматического надежного и упорядоченного расположения эмбрионов на поверхности ((а), (б)) или в ряд, вертикально к объективу ((в), (г)). Такие задачи могут быть решены несколькими различными приемами микрофлюидики. (а) Фрагмент микрофото с эмбрионами, иммобилизованными на пластинке с микроподложками (Bernstein et al., 2004b). (б) Схема пластинки с микроподложками с микрофото (а). Пластинка – гидрофильная, микроподложки – с гидрофобным покрытием, эмбрионы прилипают к микроподложкам. ((в), (г)) Схема того, как потоки буфера по системе микроканалов (стрелки) размещают эмбрионы по лункам для их последующего микроскопирования, при этом разворачивая их (в), и микрофото части соответствующего микрофлюидного устройства для этой цели (г) (Levario et al., 2013). Фрагмент, выделенный пунктирным прямоугольником на (г), соответствует схемам (в).

главных осей эмбриона будут давать свою систематическую и неустранимую ошибку измерения (микроскопирования, сканирования) (Gregor et al., 2007; Kanodia et al., 2011; 2012; Reeves et al., 2012; Petkova et al., 2014). Именно микрофлюидика предоставляет такие возможности.

Паттерн генов-регуляторов раннего эмбриогенеза дрозофилы вдоль дорзально-вентральной оси является одним из наиболее понятных и наиболее изученных, но экспериментальное изучение затруднено из-за утомительного ручного манипулирования, необходимого для расположения эмбриона под конфокальным микроскопом вертикально, (головным) концом к объективу (как на рис. 6в, 6г). Поэтому, одной из первых такого рода задач было автоматически поместить и закрепить ряд эмбрионов в вертикальном положении (т.е., "стоймя") относительно объектива микроскопа (см (Witzberger et al., 2008)).

Группы Лу и Шварцмана (Chung et al., 2011; Levario et al., 2013) разработали микрофлюидную ловушку для эмбрионов, которая может автоматически ориентировать живые или фиксированные эмбрионы передним или задним концом к объективу, используя гидродинамику (рис. 6в, 6г). Гидродинамические силы в каналах микрофлюидной установки дают возможность ориентировать эмбрион дрозофилы требуемым образом (например, головным концом к объективу), используя анизотропность формы эмбриона (близкой к неправильному, деформированному эллипсоиду) (рис. 6в).

Эта система позволяет правильно ориентировать для последующего конфокального микроскопирования несколько сотен эмбрионов в течение нескольких минут, что требуется для количественной оценки пространственной протяженности областей экспрессии регуляторных генов, участвующих в формировании дорзо-вентрального паттерна эмбриона.

Недавно группы Лу и Шварцмана (Levario et al., 2016b), в продолжение совместного проекта, разработали установку, которая интегрирует подходы микрофлюидики, автоматизированную обработку изображений и извлечение данных программными средствами на компьютере. Система была использована для количественного анализа реакции эмбрионов дрозофилы на кратковременное кислородное голодание (аноксия). Эта система использует микрофлюидику для того, чтобы правильно расположить и правильно ориентировать десятки живых эмбрионов, а затем, чтобы кратковременно, пульсом, через микроканалы подать к этим живым развивающимся эмбрионам жидкую среду без кислорода, тем самым поместив их в условия кратковременной аноксии. В результате, Леварио с коллегами (Levario et al., 2016b) количественно оценили вызванную аноксией задержку в эмбриональном развитии и детали динамики реакции эмбриона на аноксию (арест развития при аноксии и восстановление развития после аноксии).

Сходное микрофлюидное устройство было недавно разработано группой Шварцмана (Levario et al., 2016а) для автоматического выравнивания живых эмбрионов с их латеральной ориентацией к объективу микроскопа для исследований паттернов генной экспрессии и последующих морфогенетических движений вдоль главной, передне-задней оси эмбриона.

Более общая задача автоматического размещения (и удержания в условиях экспериментов) множества живых эмбрионов на субстрате (например, пластинке на предметном столике под объективом микроскопа) решалась в серии публикаций группы Салгарда (Bernstein et al., 2004a; 2004b; Zhang et al., 2005; 2006). Идея подхода заключалась в использовании небольших (под размер эмбриона) золотых подложек, размещенных регулярно на гидрофильной пластинке (рис. 6б). При этом, каждая подложка для эмбриона покрыта каплей гидрофобного флюорокарбонового масла. В результате, эмбрионы из суспензии в буфере захватывались золотыми подложками за счет капилярных сил (и демонстрировали тенденцию к правильной ориентации, вдоль подложки), как иллюстрирует микрофото рис. 6а.

Быстрое, точное и надежное автоматическое размещение живых эмбрионов регулярно на поверхности (подложке) или в ряд (со строгой их ориентацией) требуется во многих современных проектах системной биологии развития. Мы в этом разделе рассмотрели актуальность этой проблемы на примере задач регулярного размещения эмбрионов в ряд и вертикально к объективу для их параллельного конфокального сканирования и задач автоматического размещения множества живых эмбрионов на субстрате (регулярными рядами) (сравни рис. 5). Актуальной эта проблема является и для других задач, таких как параллельное инъецирование многих эмбрионов (сравни рис. 4а и рис. 6а, 6б) или для тестов с рядами эмбрионов, развивающихся в условиях градиентов химических факторов (см раздел 2.5).

#### Возмущения нормального эмбриогенеза средствами микрофлюидики

Как отмечалось, одно из самых больших преимуществ микрофлюидики это то, что она дает возможность проводить эксперименты, которые чрезвычайно трудно или даже невозможно выполнить другими средствами. Уже упоминалось, что Леварио с соавторами (Levario et al., 2016b), использовали микрофлюидное выравнивание, чтобы временно подвергнуть живые эмбрионы дрозофилы аноксии и непрерывно отслеживать динамику реакции эмбрионов в *in vivo* посредством конфокального сканирования при вертикальной ориентации эмбрионов.

Что еще более важно, микрофлюидные подходы способны обеспечить точный контроль выбора момента времени начала действия и продолжительности действия изучаемого фактора (например, температура или газовый состав), а также возможности локальных изменений микросреды по этому фактору (например, воздействию подвергается только головная или только хвостовая половинка эмбриона).

Физические явления, которые контролируемо происходят в микрометровом масштабе, тем самым обеспечивают точный пространственный контроль микросреды. Потоки жидкости в каналах микрометровых ширин характеризуется ламинарными токами (см рис. 7). В ламинарном потоке, частицы жидкости движутся в соседних слоях рядом без конвективного перемешивания. Это означает, что диффузия существует только вдоль оси, перпендикулярной к направлению потока. Поэтому работа с микрофлюидными устройствами позволяет стабильно поддерживать резкий скачок и/или устойчивый градиент концентрации или температуры (поперек канала) на протяжении всего микрофлюидного канала.

В лаборатории Исмагилова (Ismagilov) была разработана микрофлюидная система, позволяющая поддерживать половинки эмбриона (головную и хвостовую) в соседних стационарных ламинарных потоках буфера, отличающихся температурой (Lucchetta et al., 2005; 2006; 2008), как на рис. 7а. Устройство из ПДМС имеет "игрек-образную" форму, живой эмбрион крепился в канале вручную липкой лентой и буфер подводился от спаренных шприцевых насосов. Использование внешних механизированных поршневых насосов и систем охлаждения / подогрева позволяло поддерживать стационарно или быстро менять температуру буфера в этих соседних ламинарных токах.

Ключевой эксперимент сводился к тому, что ранний развивающийся эмбрион подвергался перепаду температур вдоль его главной оси в течение заданного периода времени, после чего температура выравнивалась. (Напомним, что темпы развития эмбриона существенно определяются температурой). В этих неестественных условиях, когда головная и хвостовая половины эмбриона развивались при разных температурах и, соответственно,



**Рис.** 7. Примеры микрофлюидных устройств для выполнения экспериментов по локальному возмущению микросреды (физическому или химическому) с живыми развивающимися эмбрионами. ((а), (б)) принципиальная схема «игрек-образного» микроустройства для выполнения экспериментов по поддержанию контролируемого различия микросреды вдоль главной, передне-задней оси эмбриона (Lucchetta et al., 2006; Dagani et al., 2007). Два ламинарных тока буфера разной температуры и/или разного состава, не перемешиваясь обтекают эмбрион, создавая скачок условий микроокружения вдоль главной оси эмбриона. ((б), (г)) Идея автоматической иммобилизации эмбриона и его правильной ориентации на гидрофобной подложке «самосборкой» для экспериментов с ламинарными токами. Схема (г) иллюстрирует события самосборки (и последующего удаления эмбриона) с точки зрения потенциальной энергии, когда сродство эмбриона к гидрофобному покрытию подложки выше, чем в буфере и в других частях микроканалов, и поэтому он прилипает к нему. (в) Микрофотография микрофлюидной установки Дагани с соавторами (Dagani et al., 2007); в основном канале, по которому текут два ламинарных тока, установлены три микроподложки для иммобилизации эмбрионов.

разными темпами, эмбрион как целое оказывался в состоянии в дальнейшем компенсировать эти различия и обеспечить нормальное развитие в значительном диапазоне экспериментальных возмущений температур и длительностей этих возмущений (Lucchetta et al., 2005; 2008).

Авторы пришли к заключению (Lucchetta et al., 2005; 2008), что такой подход с локальными возмущениями температур можно трактовать как своего рода комплементарный к широко распространенным методам экспериментальных возмущений молекулярных компонент контроля раннего эмбриогенеза (нокаут определенных генов, мутации, включая чувствительные к температуре, инъецирование определенных макромолекул и ингибиторов, и пр.). В этой роли новый подход позволил сделать некоторые существенные заключения о механизмах устойчивости раннего эмбриогенеза на примере модельного объекта дрозофилы.

Эти результаты говорят о том, что, эмбриогенез (включая ранний) в условиях постоянных возмущений окружающей среды, устойчив к этим возмущениям, плоть до таких маловероятных в природных условиях, как скачек температур в пределах одного эмбриона. Анализ результатов привел авторов, в частности, к новым заключениям о механизмах, обеспечивающих устойчивое развитие передне-задних паттернов экспрессии регуляторных генов раннего эмбриона. В частности, они пришли к выводу, что простая система перекрестных морфогенетических градиентов вдоль главной оси раннего эмбриона, скорее всего, не является механизмом, лежащим в основе такой устойчивости (Lucchetta et al., 2005).

Лукетта с коллегами (Lucchetta et al., 2008) использовали эту же экспериментальную технику в опытах на линии дрозофилы, экспрессирующей гибридный (fusion) белок Bicoid-GFP, и показали, что точный и воспроизводимый морфогенетический градиент бикоида не является необходимым для нормального эмбрионального развития. В свою очередь, это ставит вопрос о новых, еще не исследованных механизмах обеспечения устойчивости раннего эмбриогенеза в нестабильной окружающей среде. В частности, авторы пришли к заключению, что широко распространенная гипотеза, что градиент морфогенетического фактора бикоид формируется простой диффузией, не может объяснить устойчивое формирование передне-заднего паттерна раннего эмбриона.

В последней из этой серии публикаций лаборатории Исмагилова обсуждаемая система была использована для исследования роли сигнального пути endo-siRNA в компенсации последствий температурных возмущений в эмбриогенезе дрозофилы (Lucchetta et al., 2009). В экспериментах с температурным скачком авторы показали, что белки DICER-2 и ARGONAUTE2 (а это интегральные факторы сигнального пути endo-siRNA) необходимы для устойчивого развития эмбриона в условиях температурных возмущений. Примечательно, что эмбрионы с нарушением этого сигнального пути развиваются нормально в нормальных условиях, но чувствительны к возмущениям и отклонениям температуры за пределы нормы. Охарактеризованная функция – новая для этого сигнального пути у дрозофилы, и авторы предполагают, что этот консервативный сигнальный путь может играть сходные роли у других видов, включая млекопитающих.

В свое время, Лукетта с соавторами (Lucchetta et al., 2006) выяснили, в частности, что точность, правильность положения и воспроизводимость, с какой эмбрион вручную помещается в требуемое место канала микрофлюидного устройства, являются критичными для воспроизводимости таких экспериментов. Соответственно, используемые в этом подходе ручные манипуляции могут приводить к существенной невоспроизводимости результатов и, к тому же, требуют немало времени до начала эксперимента (а эмбрион при этом продолжает свое развитие). Более того, подобные системно-биологические эксперименты, нацеленные на сбор количественных данных с высокой воспроизводимостью и надежностью, нуждаются в возможностях работы не с одним, а с несколькими (в идеале – многими) эмбрионами параллельно, и это становится критичным для развития подхода в целом.

В продолжение этого направления исследований, Дагани с соавторами (Dagani et al., 2007) реализовали (так называемую) самосборку микрофлюидного устройства с целью устранить утомительное размещение эмбрионов в микроканале вручную, как иллюстрируется схемами рис. 7. Подход, в свою очередь, основывается на статьях Жанга с соавторами (Zhang et al., 2005; 2006), где разработана техника для иммобилизации эмбрионов на субстрате "самосборкой" (рассмотрена в разделе **2.3**). Конкретно ими использовались пластинки с гидрофобным покрытием, которое способно захватывать и удерживать эмбрион на пластинке (рис. 6а и рис. 7в, 7г). Кратковременная добавка в омывающий эмбрион буфер этанола позволяет быстро "смыть" эмбрион с его золотой подложки и тем самым завершить эксперимент с ним (Dagani et al., 2007).

Эту технику Дагани с соавторами (Dagani et al., 2007) использовали в микрофлюидном устройстве (рис. 7в) для автоматизированных экспериментов с пространственным скачком температуры эмбриона, как и в опытах Лукетты с соавторами (рассмотренных выше). Используя съемку таймлапс (time-lapse) интерференционно-контрастной микроскопией авторы продемонстрировали, что температурные возмущения приводят к нарушениям морфогенетических движений у эмбрионов.

Эта же исследовательская группа (группа Жанга, Zhang) продемонстрировала возможность и эффективность микрофлюидных экспериментов по скринингу химических соединений на живых эмбрионах в параллельных тестах (Fakhoury et al., 2009). Конкретно они использовали колхицин и цитохалазин Б и показали, что они нарушают целлюляризацию и эмбриогенез в условиях такого эксперимента.

Такое устройство установки с двумя ламинарными токами позволяет быстро начать омывать эмбрион буфером с тестируемым химическим агентом и быстро это прекратить, переключив буфер. При этом, непрерывное микроскопирование в реальном времени позволяет точно датировать время эмбрионального развития и состояние эмбриона. Тестируемое соединение может быть добавлено в один из ламинарных токов или в оба, и, соответственно, обработке будет подвергаться или одна из половин эмбриона или он весь. Более того, техника позволяет подавать в один канал - одно соединение, а в другой – другое, тем самым анализируя синергизм или антагонизм их действия. Авторы полагают, что все эти возможности делают такую микрофлюидную технику тестирования химических соединений на развивающихся эмбрионах перспективной и требующей дальнейшего развития (Fakhoury et al., 2009).

Описанные в этом разделе эксперименты лаборатории Измагилова (Lucchetta et al., 2005; 2008; 2009) по скачку температуры вдоль главной оси развивающегося эмбриона средствами микрофлюидики наиболее известные в этой новой области системной биологии, тогда как дальнейшее развитие этого подхода группой Жанга (Fakhoury et al., 2009) демонстрирует его новые возможности и перспективы.

#### Объединение микрофлюидики с микроскопией плоскостного освещения

В последние годы значительные успехи в оптических методах делают возможным микрокопирование в глубине интактных тканей с высоким СПИРОВ



**Рис. 8.** Объединение микрофлюидного устройства с микроскопом плоскостного освящения. (а) Схема размещения источника освещения (лазерного), объектива микроскопа, водяной призмы и микрофлюидного устройства с покровным стеклом (микроскоп – инвертированный) (McGorty et al., 2015). (б) Схема каналов микрофлюидного устройства, создающего градиенты концентраций: в основном канале находятся живые эмбрионы, и они непрерывно сканируются микроскопом на протяжение всего эксперимента; система дополнительных микроканалов создает и поддерживает градиент концентраций тестируемого агента (передано стрелкой) вдоль серии живых развивающихся эмбрионов в основном канале (McGorty et al., 2015). На вставке приведена часть микрофото с цепочкой живых эмбрионов в основном канале. (в) Принцип работы микроскопа плоскостного освещения, когда объект микроскопирования – основной микроканал с живыми эмбрионами – непрерывно сканируется слева-направо с плоскостью сканирования под углом 45° к предметному стеклу, так что за каждый проход слева направо через канал получается массив конфокальных изображений и этот 3D массив данных компьютерными средствами преобразуется в объемное изображение этой цепочки эмбрионов.

пространственно-временным разрешением, получая на выходе объемные (3D) изображения с высокой детализацией (например, (Royer et al., 2016)). Одна из самых актуальных проблем для микрофлюидных технологий в биологии это – интеграция с различными техниками микроскопии и, в частности, с микроскопией плоскостного освящения (light-sheet microscopy). В микрофлюидных устройствах, предполагающих микроскопирование, обычно используются покровные стекла для микроскопии на той стороне устройства, которое обращено к объективу, но проблема в том, что покровные стекла вызывают сильные оптические аберрации при микроскопии плоскостного освящения.

Не так давно МакГорти с соавторами (McGorty et al., 2015) разработали новую конструкцию микроскопа плоскостного освещения (selective plane illumination microscope), совместимую с микрофлюидными устройствами. Ключевым элементом разработки стала водяная призма, которая уменьшает оптические аберрации, вызываемые микроскопированием через покровное стекло под углом 45 градусов (рис. 8а).

Микрофлюидное устройство (как и в большинстве разработок этого обзора). изготовлялось из ПДМС стандартной техникой мягкой литографии. Это устройство позволяет помещать в микроканал "цепочку" живых развивающихся эмбрионов (располагающихся один за другим и ориентированных главной эмбриональной осью вдоль оси канала) (рис. 8б-8в). Этот канал со всеми эмбрионами в нем (32 эмбриона в приводимом как пример эксперименте на вставке рис. 8б) непрерывно сканируется целиком методом микроскопии плоскостного освящения, выдавая в итоге многочасовую (36 час) серию 3D данных сканирования (рис. 8в). Дыхание эмбрионов поддерживается, как и в других подобных микроустройствах, стационарным потоком буферного раствора с кислородом.

Это микрофлюидное устройство, посредством сложной системы дополнительных микроканалов (рис. 8б) поддерживает нарастающий градиент хлорида метилртути вдоль канала с эмбрионами, а этот химикат подавляет развитие центральной нервной системы (ЦНС) у эмбрионов. Для контроля развития ЦНС использовались линии эмбрионов с нейронами ЦНС, продуцирующими флюоресцирующий гибридный белок сGFP, так что при

176

подавлении нейрогенеза не появляется сигнал от GFP. ЦНС развивалась лишь у тех эмбрионов, которые оказались в начале микроканала — в начале градиента концентрации хлорида метилртути.

Такие интегрированные подходы к высокоэффективным экспериментам в сочетании микрофлюидных устройств с новыми разработками в микроскопии, в частности, микроскопии плоскостного освещения, позволяют в режиме реального времени наблюдать в динамике реакции живых развивающихся эмбрионов на контролируемые воздействия, так что получаемые в итоге 3D+t массивы данных дают возможность количественного анализа деталей эмбриогенеза. Мы убеждены, что рассмотренные здесь разработки МакГорти с соавторами (лаборатория Хуанга, Huang) послужат прототипами для следующего поколения интегрированных с микроскопией систем на основе микрофлюидики для новых высокопродуктивных количественных экспериментов в биологии развития, как в академических, так и прикладных областях.

## ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В этом обзоре мы показываем, что новые подходы микрофлюидных технологий с помощью флуоресцентной микроскопии и благодаря привлечению методов компьютерной визуализации для автоматического извлечения данных позволяют масштабно увеличить эффективность и продуктивность экспериментов биологии развития (Levario et al., 2016а).

В частности, мы имеем все основания ожидать что именно микросистемы на основе микрофлюидных техник позволят разрешить известные проблемы с оценками биологической вариабельности первичных морфогенетических градиентов (бикоид и Dorsal) и непосредственных генов-мишеней этих градиентов в раннем эмбриогенезе дрозофилы (Houchmandzadeh et al., 2002; Spirov, Holloway, 2003; Crauk, Dostatni, 2005; Holloway et al., 2006; Bergmann et al., 2007; Gregor et al., 2007; He et al., 2008; 2015; Kanodia et al., 2011; 2012; Reeveset al., 2012). Последние разработки лаборатории Шварцмана (Levario et al., 2016а; 2016b) явно нацелены на такие задачи.

Широкое использование микрофлюидных технологий в биологии, в свою очередь, зависит как от разработки простых в обращении устройств, так и от разработок удобного программного обеспечения для автоматизации экспериментов (Levario et al., 2016а).

В ближайшие годы мы ожидаем дальнейшего прогресса в области микросистем, включающих микрофлюидику, для академических и прикладных задач, так что распространенный термин "лаборатория на чипе" будет все более соответствовать своему названию по сути. Более того, ожидаемый прогресс в нано-электромеханических системах (nano electromechanical systems, NEMS), включающих нанофлюидные устройства (Fakhoury et al., 2009; Евстрапов, 2011в), позволит ставить задачи количественного анализа локального отклика процессов эмбриогенеза на локализованные возмущения и микроманипуляции (в сериях параллельных опытов на многих эмбрионах). Принимая во внимание, что современная биофотоника позволяет успешно визуализировать отдельные макромолекулы и их комплексы и на живых объектах (и замерять сигнал от них количественно) (Rajet al., 2008; Little et al., 2013), мы ожидаем существенного прогресса именно на стыке нано-чипов и биофотоники отдельных молекул.

В частности, имеющиеся технические возможности инъецировать РНК (и другие молекулы) в отдельные клетки эмбриона (Zhang, Yu, 2008; Kieserman et al., 2008; Weisblat, Kuo, 2009), можно ожидать, позволят разработать микроустройства для прицельной инъекции в отдельные клетки раннего эмбриона (в параллельных экспериментах). Например, естественно было бы попытаться такими подходами трансформировать (отдельные) полярные клетки (клетки зародышевого пути) или получать мозаичные эмбриональные пласты и ткани.

Помимо эмбрионов дрозофилы, микрофлюидные устройства разрабатываются для работы с живыми личинками дрозофилы (смотри (Levario et al., 2016а)) и для других модельных организмов биологии развития: нематода Caenorhabditis elegans (например, (Krajniak, Lu, 2010)), рыбка-зебра Danio rerio (например, (Choudhury et al., 2012)), цветковое растение Arabidopsis thaliana (например, (Busch et al., 2012)) и даже эмбрионы мышей (например, (Esteves et al., 2013)). По всем этим модельным объектам мы отсылаем читателей для начального ознакомления к обширному недавнему обзору (Levario et al., 2016а).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №№ 15-04-06480, 15-04-07800 и 16-04-00821).

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евстрапов А.А. Микрофлюидные чипы для биологических и медицинских исследований. // Российский химический журнал. 2011а. Т. 55. № 2. С. 99–110.
- *Евстрапов А.А.* Наноразмерные структуры в микрофлюидных устройствах (обзор). // Научное приборостроение. 2011в. Т. 21. № 3. С. 3–16.
- Занавескин М.Л., Миронова А.А., Попов А.М. Микрофлюидика и ее перспективы в медицине // Молекулярная медицина: квартальный научно-практический журнал. 2012. N5. C. 9–16.

- Зимина Т.М. Миниатюрные аналитические системы биомедицинского назначения — лаборатории на чипе. // Биотехносфера. 2009. № 1. С. 11–17.
- Кухтевич И.В., Евстрапов А.А., Букатин А.С. Микрофлюидные устройства для исследования клеток. // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 4. С. 66–75.
- Кухтевич И.В., Белоусов К.И., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Топологии микрофлюидных устройств для изучения миграции клеток в градиентах химических веществ (обзор). // Научное приборостроение. 2015. Т. 25. № 1. С. 3–16.
- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., et al. The genome sequence of Drosophila melanogaster. // Science. 2000. V. 287. P. 2185–2195.
- Bate M., Martinez Arias A., editors. The development of Drosophila melanogaster. II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1993. 1558 pp.
- *Beebe D.J., Mensing G.A., Walker G.M.* Physics and applications of microfluidics in biology. // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2002. V. 4. P. 261–286.
- Bergmann S., Sandler O., Sberro H., Shnider S., Schejter E., Shilo B.-Z., Barkai N. Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. // PLoS Biol. 2007. V. 5. P. 232–242.
- Bernstein R.W., Zhang X., Zappe S., Fish M., Scott M.P., Solgaard O. Characterization of fluidic microassembly for immobilization and positioning of Drosophila embryos in 2-D arrays. // Sensors and Actuators A: Physical. 2004a. V. 114. P. 191–196.
- Bernstein R.W., Scott M., Solgaard O. BioMEMS for highthroughput handling and microinjection of embryos. // Proceedings of SPIE – the International Society for Optical Engineering. 2004b. V. 5641. P. 67–73.
- *Bruus H.* Theoretical microfluidics. Lecture notes third edition. MIC Department of Micro and Nanotechnology Technical University of Denmark. 2006. 247 pp.
- *Busch W., Moore B.T., Martsberger B., Mace D.L., Twigg R.W.,* et al. A microfluidic device and computational platform for high-throughput live imaging of gene expression. // Nat. Methods. 2012. V. 9. P. 1101–1107.
- Campos-Ortega J.A., Hartenstein V. The Embryonic Development of Drosophila melanogaster. Berlin: Springer. 1985. 405 pp.
- Chen C.C., Zappe S., Sahin O., Zhang X.J., Fish M., Scott M., Solgaard O., Design and operation of a microfluidic sorter for Drosophila embryos. // Sens. Actuators B: Chemical. 2004. V. 102. P. 59–66.
- Choudhury D., van Noort D., Iliescu C., Zheng B.X., Poon K.L., et al. Fish and chips: a microfluidic perfusion platform for monitoring zebrafish development. // Lab Chip. 2012. V. 12. P. 892–900.
- Chung K., Kim Y., Kanodia J.S., Gong E., Shvartsman S.Y., Lu H. A microfluidic array for large-scale ordering and orientation of embryos. // Nat. Methods. 2011. V. 8. P. 171–176.

- Crauk O., Dostatni N. Bicoid determines sharp and precise target gene expression in the Drosophila embryo. // Curr Biol. 2005. V. 15(21). P. 1888–1898.
- Dagani G.T., Monzo K., Fakhoury J.R., Chen C.C., Sisson J.C., Zhang X.J. Microfluidic self-assembly of live Drosophila embryos for versatile high-throughput analysis of embryonic morphogenesis. // Biomed. Microdevices. 2007. V. 9. P. 681–694.
- Delubac D., Highley C.B., Witzberger-Krajcovic M., Ayoob J.C., Furbee E.C., et al. Microfluidic system with integrated microinjector for automated Drosophila embryo injection. // Lab Chip. 2012. V. 12. P. 4911–4919.
- *El-Ali J., Sorger P.K., Jensen K.F.* Cells on chips. // Nature. 2006. 442. P. 403–411.
- Esteves T.C., van Rossem F., Nordhoff V., Schlatt S., Boiani M., Le Gac S. A microfluidic system supports single mouse embryo culture leading to full-term development. // R. Soc. Chem. Adv. 2013. V. 3. P. 26451–26458.
- Fakhoury J.R., Sisson J.C. and Zhang X.J., Microsystems for controlled genetic perturbation of live Drosophila embryos: RNA interference, development robustness and drug screening. // Microfluid. Nanofluid. 2009. V. 6(3). P. 299–313.
- Feng, X. J., Du, W., Luo, Q. M., Liu, B.F. Microfluidic chip: Next-generation platform for systems biology. // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 650. P. 83–97.
- Furlong E.E.M., Profitt D., Scott M.P. Automated sorting of live transgenic embryos. // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 153–156.
- Gregor T., Wieschaus E.F., McGregor A. P., Bialek W., Tank D.W. Stability and nuclear dynamics of the Bicoid morphogen gradient. // Cell. 2007. V. 130. P. 141–152.
- He F., Wen Y., Deng J., Lin X., Lu L.J., Jiao R., Ma J. Probing intrinsic properties of a robust morphogen gradient in Drosophila. // Dev Cell. 2008. V. 15(4). P. 558–567.
- *He F., Wei C., Wu H., Cheung D., Jiao R., Ma J.* Fundamental origins and limits for scaling a maternal morphogen gradient. Nat Commun. 2015. V. 6. P. 6679.
- Holloway D.M., Harrison L.G., Kosman D., Vanario-Alonso C.E., Spirov A.V. Analysis of pattern precision shows that Drosophila segmentation develops substantial independence from gradients of maternal gene products. // Dev. Dyn. 2006. V. 235. P. 2949–2960.
- Houchmandzadeh B., Wieschaus E., Leibler S. Establishment of developmental precision and proportions in the early Drosophila embryo. // Nature. 2002. V. 415. P. 798–802.
- Kanodia J.S., Kim Y., Tomer R., Khan Z., Chung K., Storey J.D., Lu H., Keller P.J., Shvartsman S.Y. A computational statistics approach for estimating the spatial range of morphogen gradients. // Development. 2011. V. 138(22). P. 4867–4874.
- Kanodia J., Liang H.-L., Kim Y., Lim B., Zhan M., Lu H., Rushlow C., Shvartsman S. Pattern formation by graded and uniform signals in the early Drosophila embryo. // Biophysical Journal. 2012. V. 102(3). P. 427–433.

- Kieserman E.K., Glotzer M., Wallingford J.B. Developmental regulation of central spindle assembly and cytokinesis during vertebrate embryogenesis. // Curr Biol. 2008. V. 18. P. 116–123.
- Kim, S. Kim, H.J. Jeon, N.L. Biological applications of microfluidic gradient devices. // Integr. Biol. 2010. V. 2. P. 584–603.
- Krajniak J., Lu H. Long-term high-resolution imaging and culture of C. elegans in chip-gel hybrid microfluidic device for developmental studies. // Lab Chip. 2010. V. 10. P. 1862–1868.
- Levario T.J., Zhan M., Lim B., Shvartsman S.Y., Lu H. Microfluidic trap array for massively parallel imaging of Drosophila embryos. Nat. Protoc. 2013. V. 8. P. 721–736.
- *Levario T.J., Lim B., Shvartsman S.Y., Lu H.* Microfluidics for High-Throughput Quantitative Studies of Early Development. // Annu Rev Biomed Eng. 2016a. V. 18. P. 285–309.
- Levario T.J., Zhao C., Rouse T., Shvartsman S.Y., Lu H. An integrated platform for large-scale data collection and precise perturbation of live Drosophila embryos. // Sci Rep. 2016B. V. 6. P. 21366.
- Little S.C., Tikhonov M., Gregor T. Precise developmental gene expression arises from globally stochastic transcriptional activity. // Cell. 2013. V. 154. P. 789–800.
- Lucchetta E.M., Lee J.H., Fu L.A., Patel N.H., Ismagilov R.F. Dynamics of Drosophila embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics. // Nature. 2005. V. 434. P. 1134–1138.
- Lucchetta E.M., Munson M.S., Ismagilov R.F., Characterization of the Local Temperature in Space and Time around a Developing Drosophila Embryo in a Microfluidic Device. // Lab on a Chip. 2006. V. 6. P. 185–190.
- Lucchetta E.M., Vincent M.E., Ismagilov R.F. A precise Bicoid gradient is nonessential during cycles 11–13 for precise patterning in the Drosophila blastoderm. // PLOS ONE. 2008. V. 3. P. e3651.
- Lucchetta E.M., Carthew R.W., Ismagilov R.F. The EndosiRNA Pathway Is Essential for Robust Development of the Drosophila Embryo. // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e7576.
- McGorty R., Liu H., Kamiyama D., Dong Z.Q., Guo S., Huang B. Open-top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens. // Opt. Express. 2015. V. 23. P. 16142–16153.
- McGorty R., Liu H., Kamiyama D., Dong Z.Q., Guo S., Huang B. Open-top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens. // Opt. Express. 2015. V. 23. P. 16142–16153.
- Petkova M.D., Little S.C., Liu F, Gregor T. Maternal origins of developmental reproducibility. // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 1283–1288.
- Peter I.S., Davidson E.H. Transcriptional network logic: the systems biology of development. In: Handbook of Systems Biology. Concepts and Insights. (Eds A.J. Marian Walhout. M. Vidal and J. Dekker). Academic Press/ Elsevier, 2013. P. 211–228.
- Raj A., van den Bogaard P., Rifkin S.A., van Oudenaarden A., Tyagi S. Imaging individual mRNA molecules using

multiple singly labeled probes. // Nat Methods. 2008. V. 5. P. 877–879.

- Reeves G.T., Trisnadi N., Truong T.V., Nahmad M., Katz S., Stathopoulos A. Dorsal-ventral gene expression in the Drosophila embryo reflects the dynamics and precision of the dorsal nuclear gradient. // Developmental cell. 2012. V. 22(3). P. 544–557.
- Royer L.A., Lemon W.C, Chhetri R.K., Wan Y., Coleman M., Myers E.W., Keller P.J. Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms. // Nat Biotechnol. 2016. V. 34(12). P. 1267–1278.
- Salieb-Beugelaar G.B., Simone G., Arora A., Philippi A., Manz A. Latest developments in microfluidic cell biology and analysis systems. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 4848–4864.
- *Spirov A.V., and Holloway D.M.* Making the body plan: precision in the genetic hierarchy of Drosophila embryo segmentation. // In Silico Biol. 2003. V. 3. P. 89–100.
- Spradling A.C., Stern D., Beaton A., Rhem E.J., Laverty T., et al. The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. // Genetics. 1999. V. 153. P. 135–177.
- Squires T., Quake S. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. // Revs Mod. Phys. 2005. V. 77. P. 977–1007.
- Taylor A.M., Jeon N.L. Micro-scale and microfluidic devices for neurobiology. // Curr. Opin. Neurobiol. 2010. V. 20. P. 640–647.
- van der Meer A.D., Poot A.A., Duits M.H.G., Feijen J., Vermes I. Microfluidic Technology in Vascular Research. // J. Biomed. Biotechnol. 2009. 823148.
- Wang J.Y., Ren L., Li L., Liu W.M., Zhou J., Yu W.H., Tong D.W., Chen S.L. Microfluidics: a new cosset for neurobiology. // Lab Chip. 2009. V. 9. P. 644–652.
- Webster A., Greenman J., Haswell S.J. Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2011. V. 86. P. 10–17.
- Weisblat D.A., Kuo D.H. Microinjection of Helobdella (leech) embryos. // Cold Spring Harb Protoc. 2009. V. 2009 (4). P. pdb.prot5190.
- Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S., et al. Soft lithography in biology and biochemistry. // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2001. V. 3. P. 335–373.
- Witzberger M.M., Fitzpatrick J.A.J., Crowley J.C., Minden J.S. End-on imaging: a new perspective on dorsoventral development in Drosophila embryos. // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 3252–3259.
- Zappe S., Fish M., Scott M.P., Solgaard O. Automated MEMS-based Drosophila embryo injection system for high-throughput RNAi screens. // Lab Chip. 2006. V. 6. P. 1012–1019.
- Zhang X.J., Chen C.-C., Bernstein R.W., Zappe S., Scott M.P., Solgaard, O. Microoptical characterization and modeling of positioning forces on Drosophila embryos self-assembled in two-dimensional arrays. // J. Microelectromech. Syst. 2005. V. 14. P. 1187–1197.

- Zhang X.J., Scott M.P., Quate C.F., Solgaard O. Microoptical Characterization of Piezoelectric Vibratory Microinjections in Drosophila Embryos for Genome-Wide RNAi Screen. // J. Microelectromech. Syst. 2006. V. 15. P. 277–286.
- Zhang Y., Yu L.C. Single-cell microinjection technology in cell biology. // Bioessays. 2008. 30(6):606–610.
- Ziolkowska K., Kwapiszewski R., Brzozka Z. Microfluidic devices as tools for mimicking the in vivo environment. // New J. Chem. 2011. V. 35. P. 979–990.

# **Microfluidics Approaches in Modern Developmental Biology**

A. V. Spirov

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia e-mail: sspirov@yandex.ru Received February 19, 2017; in final form, October 2, 2017

Modern automated microsystems based on microhydrodynamic (microfluidic) technologies - labs on chipsmake it possible to solve various basic and applied research problems. In the last 15 years, the development of these approaches in application to the problems of modern quantitative (systems) developmental biology has been observed. In this field, high-throughput experiments aimed at accumulating ample quantitative data for their subsequent computer analysis are important. In this review, the main directions in the development and application of microfluidics approaches for solving problems of modern developmental biology using the classical model object. Drosophila embryo, as an example is discussed. Microfluidic systems provide an opportunity to perform experiments that can hardly be performed using other approaches. These systems allow automated, rapid, reliable, and proper placing of many live embryos on a substrate for their simultaneous confocal scanning, sorting them, or injecting them with various agents. Such systems make it possible, in particular, to create controlled gradients of microenvironmental parameters along a series of developing embryos or even to introduce discontinuity in parameters within the microenvironment of one embryo, so that the head half is under other conditions compared to the tail half (at continuous scanning). These approaches are used both in basic research of the functions of gene ensembles that control early development, including the problems of resistance of early patterns to disturbances, and in test systems for screening chemical agents on developing embryos. The problems of integration of microfluidic devices in systems for automated performance of experiments simultaneously on many developing embryos under conditions of their continuous scanning using modern fluorescence microscopy instruments will be discussed. The methods and approaches developed for Drosophila are also applicable to other model objects, even mammalian embryos.

*Keywords*: systems biology, quantitative biology, developmental biology, Drosophila embryology, microfluidics, fluorescence microscopy, automation of experiments, high-throughput parallel experiments, developmental genetics, differentiation, morphogenesis, embryogenesis stability