

УДК: 612.13

## Биомоделирование микрососуда в микрофлюидном чипе

Колесов Д.В.<sup>1</sup>, Московцев А.А.<sup>1,2</sup>, Мыльникова А.Н.<sup>3</sup>, Савина Г.Д.<sup>2</sup>, Соколовская А.А.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва

<sup>3</sup> РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Разработка новых подходов для моделирования сосудов и сосудистой стенки *in vitro* представляет собой актуальное направление в биомедицине в связи с необходимостью уточнения молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляторных функций эндотелия и механотрансдукции. В данной работе представлен метод моделирования симметричной бифуркации микрососуда с использованием современных подходов микрофлюидики и клеточных технологий. Отличительной особенностью использованного подхода является использование вычислительной гидродинамики для расчета параметров микрофлюидного устройства и характеристики гидродинамических условий, учет физиологических закономерностей бифуркаций и сравнительно простая процедура производства полиметилметакрилатных подложек для последующего получения полимерных реплик методом мягкой литографии. Описывается технология создания замкнутой и способной к рециркуляции рабочей жидкости системы, включающей многоканальную систему подачи жидкостей и сменные микрофлюидные чипы. Приводятся результаты анализа адгезии и роста эндотелиоцитоподобной клеточной линии EA.hy926 с помощью прижизненной микроскопии.

**Ключевые слова:** биомоделирование, микрососуды, микрофлюидные чипы.

**Для цитирования:** Колесов Д.В., Московцев А.А., Мыльникова А.Н., Савина Г.Д., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Биомоделирование микрососуда в микрофлюидном чипе. Патогенез. 2016; 14(4): 4–8.

**Для корреспонденции:** Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. научн. сотр ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия. e-mail: bioinf@mail.ru.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Номер проекта № 16-04-01807

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.08.2016

## Biomodeling of microvessels in a microfluidic chip

Kolesov D.V.<sup>1</sup>, Moskovtsev A.A.<sup>1,2</sup>, Mylnikova A.N.<sup>3</sup>, Savina G.D.<sup>2</sup>, Sokolovskaya A.A.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Federal state budgetary scientific institute «Scientific institute of General Pathology and Pathophysiology»;

Baltiyskaya str, 8. Moscow, 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow

<sup>3</sup> DI. Mendeleev Russian Chemical-Technological University. Moscow, Russian Federation

Development of new approaches for modeling of blood vessels *in vitro* is an important trend which caused by the need to clarify the molecular mechanisms underlying the regulatory functions of the endothelium and mechanotransduction under the hydrodynamic conditions. We present a method for modeling of a symmetric bifurcation of a microvessel using microfluidics and cell technologies. A distinctive feature of our approach is the use of computational fluid dynamics (CFD) to calculate and to optimize the parameters of the microfluidic device based on physiological characteristics of bifurcations. CFD allows us to predict the hydrodynamic conditions for the endothelial lining in the microfluidic chip, e.g. wall shear stress intensity distribution. We showed here that the relatively simple procedure of micromechanical manufacturing of polymethyl methacrylate substrates is a consistent and cheap approach for the preparing of polymer replicas by subsequent soft lithography with enough reproducibility. We describe here the whole technology of creating of the closed multi-channel fluid system with changeable microfluidic chips capable of recycling of working fluid for well-controlled and long-term imitation of physiological and pathophysiological hydrodynamic conditions for endothelium. We demonstrate the usability of the system for the analysis of adhesion and growth of EA.hy926 endothelial-like cell line in the chip using intravital microscopy.

**Key words:** biomodeling, microvessels, microfluidic chips.

**For citation:** Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Mylnikova A.N., Savina G.D., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Biomodeling of microvessels in a microfluidic chip. Patogenez. 2016; 14(4): 4–8 (In Russian).

**For correspondence:** Moskovtsev Aleksey, PhD, Leading Researcher of Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Russian Federation, Moscow. e-mail: stgork@gmail.com

**Funding:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research. Project ID number 16-04-01807.

**Conflict of interest:** the authors declare that there is not potential conflict of interest.

Received 17.08.2016

## Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются самой распространенной причиной смертности в группе неинфекционных заболеваний в мире, составляя у мужчин 48%, у женщин — 35% и, в целом, 39% от общего числа причин преждевременной смерти [1]. Детальное понимание молекулярных механизмов возникновения и развития таких заболеваний чрезвычайно необходимо для разработки эффективных методов их лечения и профилактики.

Определенные гидродинамические условия в сосудах являются важным условием корректного функционирования эндотелия и сосудистого русла. Распределение пульсирующего потока в ветвящейся кровеносной системе влечет за собой существенную неоднородность гидродинамических условий для эндотелиальных клеток, как временную, так и пространственную. Атеросклероз часто возникает в местах ветвления и бифуркаций крупных артерий мышечного и эластического типа, где на очень коротких расстояниях происходит существенное изменение поперечного сечения сосудистого русла, а также в зонах с существенно нелинейной геометрией — таких, как дуга аорты [2]. Кровоток в этих регионах имеет сложный пространственный и временной характер, для него свойственны низкая интенсивность сдвиговой деформации, реверсия направления на фоне осцилляций, обусловленных сердечным циклом.

Предполагается, что в этих регионах эндотелий более предрасположен к атеросклерозу в связи с тем, что он не находится в физиологическом равновесии в достаточной степени [2], тем не менее, в норме он адаптирован к этим сложным гидродинамическим условиям, хотя и может экспрессировать маркеры воспаления на низком уровне. Детальное понимание того, как эндотелий определяет величину и направление сдвиговой деформации, как анализируются различные гидродинамические параметры потока, как они интегрируются клеткой и изменяют внутриклеточную и межклеточную передачу сигнала, является актуальной проблемой. Для установления и декодирования ключевых для эндотелия параметров потока необходимы хорошо воспроизводимые модельные эксперименты с возможностью эффективного управления потоком и прямого измерения скоростей. К сожалению, эксперименты в условиях *in vivo* ограничены в возможности управления потоком. Кроме того, при этом часто отсутствует возможность прямого наблюдения происходящих процессов на клеточном и субклеточном уровне. Также следует отметить крайне актуальный вопрос этичности таких исследований [3]. Все это создает предпосылки для разработки методов тканевой инженерии создания искусственных биомоделей кровеносных сосудов с целью исследований патогенеза сосудистых заболеваний, а также оптимизации терапевтических методов, в частности, доставки лекарственных препаратов [4].

Одним из таких методов является использование микрофлюидных чипов, специально спроектированных так, чтобы создавать оптимальные условия для 3D роста клеточных культур. Жестко задаваемое пространственное расположение поверхностей для роста клеток в 3-мерных структурах микрофлюидного чипа (МФЧ) наряду с активным массопереносом, осуществляемым каналами МФЧ, позволяют моделировать структурно-функциональные элементы различных органов,

включая сосудистое русло [5–7]. Возможность прецизионного контроля параметров потока и окружающей среды, а также организации адресного воздействия на клетки, позволяют воспроизводить как нормальные, так и патологические условия в чипе. Активный массоперенос влияет на клеточное микроокружение не только через установление и поддержание концентрационных градиентов, но также и посредством механических сил, возникающих при контакте потока жидкости со структурами и приводящих к возникновению сдвиговой деформации клеток, межклеточного вещества и даже отдельных макромолекул и их комплексов. Эндотелиальные клетки в норме в организме постоянно подвержены деформации сдвига потоком жидкости (крови), что является важным условием дифференцировки и выполнения ими специализированных функций [8, 9]. При статическом культивировании эндотелиоцитов указанное условие не соблюдается, что приводит к изменениям функциональной активности, морфологии клеток и затрудняет их использование в качестве модели выстилки сосуда.

Разрабатываемые в данной работе микрофлюидные чипы могут рассматриваться как простая модель кровеносного сосуда *in vitro*, для изучения воздействия сдвиговой деформации на эндотелий. При разработке конструкции чипов были использованы современные методы проектирования, которые позволяют предсказать параметры чипа и сравнить экспериментальные данные с результатами моделирования. Они также позволяют получить данные, которые не могут быть измерены напрямую экспериментально, в том числе распределение сдвиговой деформации на стенках микроканалов. Матрицы для создания МФЧ методом мягкой литографии были изготовлены микрофрезерованием, что существенно упростило и удешевило работу. В микроканалах полученных МФЧ был сформирован монослой эндотелиальных клеток человека, имитирующих клеточную выстилку кровеносного сосуда. Поток ростовой среды через каналы имитировал ток крови, оказывая сдвиговое воздействие на клетки.

## Материалы и методы

### *Изготовление микрофлюидных чипов (МФЧ)*

Одним из наиболее распространенных методов изготовления МФЧ является мягкая литография [10]. Метод основан на перенесении трехмерной структуры с твердой матрицы на полимерную реплику с микрометровым разрешением. Обычно в качестве матриц используют кремниевые подложки с нанесенными методом фотолитографии структурами. Такой подход позволяет получить элементы МФЧ любой сложности ввиду высокого развития техники фотолитографии. Однако далеко не всегда для решения конкретных задач требуется такое высокое разрешение. Так, в нашей работе для изготовления чипа мы использовали матрицы, изготовленные методом фрезерования из полиметилметакрилата (оргстекло). Современные фрезерные станки имеют разрешение до 1 мкм. Основным ограничивающим фактором является конечный размер фрезерующего инструмента, что приводит к появлению скруглений во внутренних углах геометрии чипа и невозможности близкого размещения отдельных элементов чипа. Несмотря на эти ограничения, данная технология позволяет изготавливать МФЧ высокого качества, подходящие для решения большинства задач клеточной

биологии и тканевой инженерии. Кроме того, особенности технологии позволяют легко совмещать на одной матрице микроэлементы чипа и макроскопические элементы, такие как места под температурные датчики, клапаны и т.д. Преимуществом данного подхода перед фотолитографией являются стоимость и скорость изготовления матриц, что даёт возможность легко и быстро оптимизировать конструкцию чипа.

Конструкция чипа предварительно моделируется с помощью компьютеризованных систем автоматизированного проектирования (САПР). Моделирование позволяет наглядно представить будущий чип. Кроме того, встроенные алгоритмы компьютерной гидродинамики позволяют предсказать поведение жидкости в чипе и определить некоторые параметры потока, в том числе, сдвиговую деформацию, являющуюся одним из ключевых факторов при моделировании кровеносного сосуда. По готовой модели чипа создается модель матрицы, которая затем переводится в управляющую программу для фрезерного станка. Наши матрицы были изготовлены на вертикальном обрабатывающем фрезерном центре с числовым программным управлением (ЧПУ) HURCO VMX1.

Далее идёт этап снятия полимерного оттиска. В качестве материала для изготовления тела чипа мы использовали полидиметилсилоксан (ПДМС) (Sylgard 184, Dow Corning). Это кремнийорганический полимер, который является широко распространенным материалом для изготовления МФЧ. Благодаря простоте работы, биосовместимости и прозрачности он хорошо подходит для изготовления МФЧ для биологических приложений. Смесь двух компонентов из коммерчески доступного набора в пропорции 1:10 заливали в изготовленную форму и вулканизировали при температуре 80°C в течение двух часов. Использование фрезерования для изготовления матриц позволяет создать не только микроструктуру чипа, но и задать границы конечного изделия, что приводит к экономии материала и избавляет от необходимости резать получившийся оттиск на отдельные чипы. После вулканизации, заготовка извлекалась из формы, в ней проделывались технологические отверстия для ввода подводных трубок, затем она пришивалась к подложке. В качестве подложки могут быть использованы кремниевые пластины, предметные или покровные стёкла и даже другие оттиски из ПДМС. С целью дальнейшего исследования чипа с помощью конфокального микроскопа мы использовали в качестве подложки покровные стекла толщиной 150 мкм. Для надёжной пришивки заготовка и подложка обрабатывались кислородной плазмой при давлении 0,5—1 мм рт. ст. и плотно прижимались друг к другу.

#### *Загрузка клеток*

К собранному чипу подводились трубки и далее чип использовался для загрузки клеток. Для подачи различных растворов в чип была использована двухканальная дозирующая система на базе модульной системы Nemesi (Cetoni, Швейцария). Система позволяет варьировать скорость потока в широком диапазоне, а также оснащена клапанами, позволяющими загружать новые растворы в шприцы без потери стерильности и осуществлять мгновенную остановку потока. Контроль температуры в каналах чипа осуществлялся посредством термоэлектрическо-

го модуля управляемого контроллером (RMT Ltd, Россия) с системой обратной связи по температуре.

Каналы чипа предварительно промывались последовательно нестерильной деионизированной водой, 70%-ным водным раствором этилового спирта и стерильной деионизированной водой в течение не менее 15 минут для каждой стадии при скорости потока 100 мкл/мин через каждый вход чипа. На этапе промывки раствором спирта система закрывалась и далее все операции проводились в стерильных условиях. Для улучшения адгезии клеток к поверхности чипа, каналы инкубировались раствором коллагена I с концентрацией 0,01% в течение ночи при комнатной температуре.

Для имитации клеточной выстилки сосуда была использована соматическая гибридная клеточная линия человека EA.hy 926. Эндотелиальная линия EA.hy926, полученная путем гибридизации первичной эндотелиальной клеточной линии HUVEC с клеточной линией аденокарциномы легкого A-549. Данная клеточная линия является эндотелиоцитоподобной с адгезионным типом роста. Была получена из Университета Северной Каролины, США.

Для культивирования клеток использовали среду DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамин, 1% NEAA и фактора роста НАТ. Культивирование проходило в культуральном инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> / 95% воздушной атмосфере. При культивировании в МФЧ без обогащения атмосферы углекислым газом в среду дополнительно добавляли NEPES с конечным содержанием 20 мМ для поддержания необходимого уровня pH и препятствия закисления среды в процессе жизнедеятельности клеток. Субкультивирование проводили в 75 см<sup>2</sup> пластиковых матрасах по достижении конfluence. Для этого клеточный монослой открепляли от поверхности культурального сосуда под действием 0,25% раствора трипсина с ЭДТА в течение 3 минут, после чего осаждали центрифугированием на скорости 200g в течение 5—10 минут, ресуспендировали в малом объеме надосадочной жидкости и, после подсчета, разводили суспензию питательной средой до плотности 5x10<sup>4</sup> клеток/мл, после чего помещали в новые 75 см<sup>2</sup> матрасы. Субкультивирование проводили каждые 2—3 дня. Для обновления культуры производилась ее криоконсервация. Для этого клетки (10<sup>6</sup> клеток/мл) помещали в среду для заморозки (95% FBS, 5% ДМСО). Далее ампулы с суспензией клеток охлаждали в течение 24—48 часов при -80°C, после чего переносили в жидкий азот (-195,8°C).

Для загрузки в чип была приготовлена клеточная суспензия 6—7 млн клеток в 1 мл ростовой среды с NEPES. Загрузка суспензии осуществлялась на скорости 100 мкл/минуту с резкой остановкой с помощью клапана. После загрузки выдерживалась пауза 30 минут для того, чтобы дать возможность клеткам начать адгезировать к поверхности. После этого включался поток ростовой среды со скоростью 1 мкл/мин. Таким образом, окончательное «распластывание» клеток и дальнейшее культивирование осуществлялось под постоянным воздействием потока, что является характерным для эндотелиоцитов в природе.



## Результаты и обсуждение

### Конструкция чипа и моделирование

Для имитации различных участков сосудистого русла были разработаны две конструкции чипа. Одна из них представляет собой прямой канал сечением 250x200 мкм (рис. 1а). Вторая конструкция для моделирования бифуркации сосудов имеет разветвление на два канала размером 200x200 мкм (рис. 1б). Обе конструкции имеют два входа для жидкости (стрелки, направленные вниз) и один выход (стрелки вверх) на рис. 1. Это позволяет независимо загружать жидкости в чип. Таким образом, в МФЧ моделируется прямой участок сосуда и область бифуркации. В местах ветвления сосудов режим течения крови отличается от прямых участков, что может приводить к развитию патологий — атеросклероза [8, 9].

С помощью компьютерной гидродинамики было проведено моделирование работы чипа в различных режимах. Основными характеристиками моделирования являются распределение скоростей потока, траектории течения и сдвиговая деформация (рис. 2). Сдвиговая деформация является ключевым фактором, оказывающим воздействие на клетки эндотелия и отличающим биомоделирование в МФЧ от традиционного культивирования. Величина и характер сдвиговой деформации не только влияют на морфологию клеток, но и являются одним из факторов регуляции функций эндотелия. На рис. 2 представлены распределения сдвиговой деформации в МФЧ чипе с бифуркацией. Видно, что в области ветвлений, а также, в меньшей степени, в области изгибов канала, сдвиговая деформация отличается по величине от прямого канала.

Программное обеспечение также позволяет моделировать поведение частиц в потоке жидкости в канале (рис. 3). Такая задача может возникнуть при исследовании поведения клеток крови в кровеносных сосудах.

При изготовлении матриц методом фрезерования важное значение имеет качество обработки получаемой поверхности. В зависимости от параметров фрезерования и качества используемого инструмента обработанная поверхность может иметь разную шероховатость. Шероховатость поверхности влияет на адгезию полимерного оттиска к подложке. Для уменьшения шероховатости поверхности и устранения мелких дефектов, изготовленную матрицу можно поддерживать в парах растворителя, например, хлороформа в течение ночи. Пример готовой матрицы представлен на рис. 4.

По произведенным матрицам был изготовлен ряд чипов для исследования адгезии эндотелиальных клеток в каналах. Метод мягкой литографии позволяет изготавливать идентичные чипы.

Загрузка клеток осуществлялась через центральный порт. Непосредственно после загрузки клетки имеют сферическую форму, как в суспензии, и слабо связаны с поверхностью (рис. 5а). Обычно процесс адгезии клеток к поверхности занимает от 15 минут до 1 часа. После «распластывания» клетки подвергались воздействию потока со скоростями более 400 мкм/мин, соответствующими сдвиговой деформации до 7 Па, без наблюдаемого отрыва от поверхности (рис. 5).

Адгезировавшие клетки культивировались в канале от 6 часов до 3 суток при постоянном потоке ростовой среды с HEPES со скоростью 1 мкл/мин. При этом клетки сохраняли жизнеспособность и способность к делению. Де-

ление происходило непосредственно в потоке, при этом клетки приобретали шарообразную форму и заново распластывались после завершения деления (рис. 6).

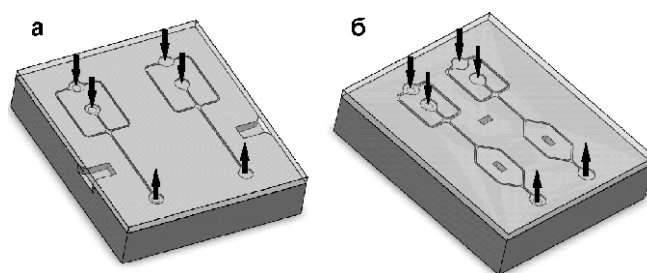


Рис. 1. Трехмерные модели микрофлюидных чипов для биомоделирования прямого участка кровеносного сосуда (а) и области бифуркации (б).

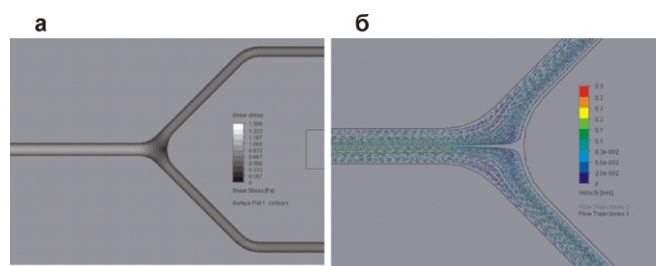


Рис. 2. Распределение сдвиговой деформации в канале (а) и поле скоростей (б) для потока со скоростью 100 мкл/мин при подаче через крайний порт.

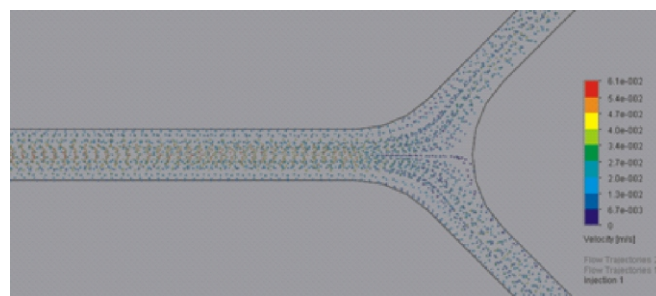


Рис. 3. Моделирование поведения сферических частиц диаметром 30 мкм в канале чипа в потоке с объемной скоростью 100 мкл/мин.

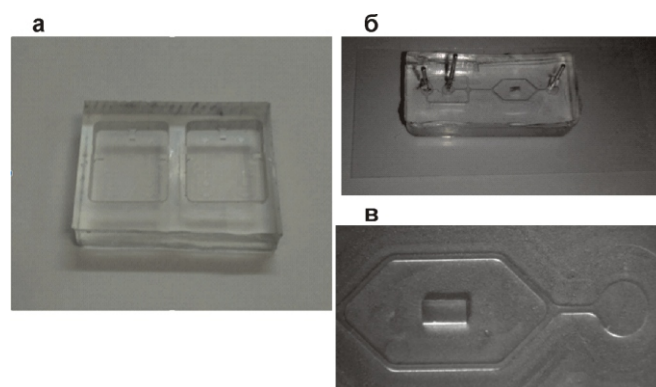


Рис. 4. Изготовленная методом фрезерования матрица для производства микрофлюидных чипов (а); собранный микрофлюидный чип (б); и увеличенное изображение каналов чипа, имитирующего бифуркацию кровеносных сосудов (в).

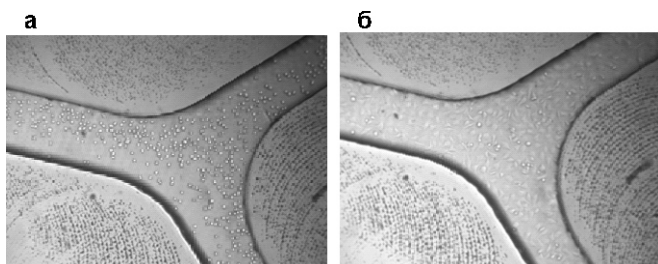


Рис. 5. Эндотелиальные клетки в канале микрофлюидного чипа сразу после загрузки (а) и через 12 часов под воздействием потока со скоростью 1 мкл/мин (б).

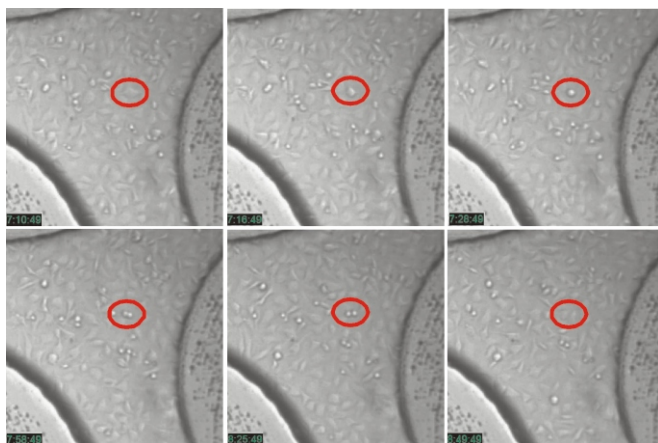


Рис. 6. Деление эндотелиальных клеток (отмечены красными кружочками) в канале микрофлюидного чипа в условиях потока ростовой среды с NEPEs со скоростью 1 мкл/мин.

### Заключение

Была разработана конструкция двух микрофлюидных чипов для имитации кровеносного русла. Проведено моделирование гидродинамических параметров чипов методами компьютерной гидродинамики и выявлены особенности в распределении сдвиговой деформации в чипе с бифуркацией. Имитация выстилки сосуда была создана

### Сведения об авторах:

Колесов Дмитрий Валерьевич (Kolesov D.V.), науч. сотр. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», e-mail: maedros@bk.ru

Московцев Алексей Александрович (Moskovtsev A.A.), канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», доцент кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru

Мыльникова Алёна Николаевна (Mylnikova A.N.), аспирантка РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Савина Галина Дмитриевна (Savina G.D.), старш. преподаватель кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Соколовская Алиса Анатольевна (Sokolovskaya A.A.), канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Кубатиев Аслан Амрханович (Kubatiev A.A.), докт. мед. наук, академик РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», зав. кафедрой общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

путём загрузки в каналы чипов эндотелиальных клеток гибридной линии человека EA.Hy926 и культивирования их под воздействием сдвиговой деформации со стороны постоянного потока питательной среды. Клетки при данных условиях остаются жизнеспособными и способными к делению. Было показано, что в процессе деления клетки частично открепляются от поверхности.

Разработанная система является простой моделью для изучения стрессового воздействия на клетки эндотелия, в том числе вызванного изменением характера и величины сдвиговой деформации, а также обусловленных этим воздействием патологических изменений. Также данная модель может быть использована для исследования взаимодействия клеток крови в микроциркуляторном русле и выявления особенностей такого взаимодействия в местах ветвлений и изгибов кровеносных сосудов.

### References

1. Mendis S., Puska P., Norrving B. et al. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Health Organization*. 2011.
2. Davies P.F., Civelek M., Fang Y., Fleming I. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular research*. 2013; 99(2): 315-27.
3. Ghasemi M., Dehpour A.R. Ethical considerations in animal studies. *Journal of Medical Ethics and History of Medicine*. 2009; 2:12.
4. Hasan A., Paul A., Vrana N.E., Zhao X., Memic A. et al. Microfluidic techniques for development of 3D vascularized tissue. *Biomaterials*. 2014; 35: 7308-25.
5. Konar D., Devarasetty M., Yildiz D.V., Atala A., Murphy S.V. Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development. *Biomedical engineering and computational biology*. 2016; 7: 17.
6. Bhatia S.N., Ingber D.E. Microfluidic organs-on-chips. *Nature*. 2014; 201: 4.
7. Kim S., Lee H., Chung M., Jeon N.L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab on a Chip*. 2013; 13: 1489-500.
8. Ziegler T., Nerem R.M. Effect of flow on the process of endothelial cell division. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994; 14: 636-43.
9. Zhou J., Li Y-S., Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014; 34: 2191-8.
10. Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography. *Annual review of materials science* 1998; 28: 153-84.