

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Ж.И. АЛФЁРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



ФИЛАТОВ Никита Алексеевич

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СИНТЕЗА
МОНОДИСПЕРСНЫХ МАКРОЭМУЛЬСИЙ И ГИДРОГЕЛЕВЫХ
МИКРОЧАСТИЦ

Специальность:

1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
к.ф.-м.н., А.С. Букатин

Санкт-Петербург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Развитие микрофлюидных систем для исследования биообъектов и клеток в микрокаплях жидкости.....	14
1.2. Применение методов компьютерного моделирования в микро- и нанофлюидике	20
1.3. Формирование стабильных макроэмульсий в микрофлюидных чипах	23
1.4. Основное устройство и материалы микрофлюидных чипов.....	28
1.5. Перемешивание реагентов в каплях макроэмульсий	32
1.6. Создание гидрогелевых микрочастиц на основе капель макроэмульсии	37
1.7. Методы исследования биомолекул и клеток в каплях жидкости	41
1.8. Уникальные методы использования капель макроэмульсии	44
1.8.1. Разработка методов регенерации тканей с помощью микрогелевых частиц	45
1.8.2. Создание искусственных клеток	49
1.8.3. Моделирование элемента органа в микрокапле	51
1.8.4. 3D биочернила на основе гидрогелевых микрочастиц	52
1.9. Основная приборная база для формирования капель эмульсии в микрофлюидных устройствах.....	55
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	59
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	64
2.1. Формирование макроэмульсии.....	64
2.1.1. Базовые принципы образования капли.....	64
2.1.2. Состав макроэмульсий и их характеристики.....	66
2.2. Методы изготовления микрофлюидных чипов	69
2.3. Разработка автоматизированной системы управления потоками жидкости в микрофлюидных чипах	73
2.3.1. Разработка микрофлюидного контроллера давлений.....	73
2.3.2. Генерация капель в микрофлюидном чипе с фокусировкой потока	79

2.3.3. Сравнение формирования капель при контроле давлений и при контроле расхода потоков.....	83
2.3.4. Оценка эффективной вязкости эмульсии и гидравлического сопротивления выходного микроканала	87
2.3.5. Практическое использование микрофлюидного контроллера давлений	90
Заключение к разделу 2.3	93
2.4. Формирование капель макроэмульсии отрицательным давлением	95
2.4.1. Микрофлюидная система для образования макроэмульсии отрицательным давлением	95
2.4.2. Исследование стабильности формирования капель отрицательным давлением.....	98
Заключение к разделу 2.4	103
2.5. Усиление перемешивания реагентов в асимметричных генераторах микрокапель.....	105
Заключение к разделу 2.5	116
2.6. Синтез и характеристика гидрогелевых микрочастиц в микрофлюидных генераторах капель.....	118
2.6.1. Изучение микрочастиц из PEGDA.....	119
2.6.2. Формирование микрочастиц из полиакриламида	124
2.6.3. Изучение выхода красителя из микрочастиц полиакриламида и PEGDA	127
2.6.4. Изучение микрочастиц из альгината натрия.....	129
2.6.5. Изучение микрочастиц из GelMA и агарозы	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
БЛАГОДАРНОСТИ	146
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	147
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	152

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время микрофлюидные технологии становятся востребованным и распространенным инструментом в биологических исследованиях и медицинской диагностике. Это привело к значительному росту публикаций в научных журналах, поскольку микрофлюидика в сочетании с микроэлектроникой и химической инженерией предлагает новые методы и технологии для создания лаборатории-на-чипе (Lab-on-a-Chip), устройств для диагностики на месте оказания помощи (Point-Of-Care Testing), а также высокопроизводительных и высокочувствительных систем скрининга биообъектов.

Главная особенность подхода заключается в том, что ввод образца, пробоподготовка, разделение, детектирование и другие этапы анализа могут быть объединены в одном микрофлюидном устройстве. Такая реализация анализа требует небольших объемов реагентов и имеет низкую тепловую инерцию, благодаря чему увеличивается скорость их ввода, точность дозирования, а также скорость нагрева и охлаждения. Все это приводит к увеличению воспроизводимости результатов, снижению времени и стоимости анализов. Более того, интеграция электрохимических, акустофлюидных или оптических чувствительных элементов может снизить предел обнаружения биомолекул, органических соединений (например, витамины) и т. п., повысить чувствительность анализа и открыть возможности создания компактных многопараметрических устройств для персонализированной медицины.

Одной из перспективных и активно развивающихся областей микрофлюидных технологий является капельная микрофлюидика, в которой эмульсии по типу «вода-в-масле» или «вода-масло-вода» используются в качестве пиколитровых или нанолитровых реакторов для проведения биохимических реакций и анализов. В такие капли можно инкапсулировать единичные биообъекты (клетки, ДНК и т. п.) и тем самым резко повышать локальную плотность вещества и увеличивать чувствительность его обнаружения. Также

возможно манипулировать каждой каплей в отдельности: соединять две вместе, разъединять одну на две, перемещать, хранить и т. п. В последнее десятилетие капельная микрофлюидика успешно применяется в молекулярной диагностике для выполнения высокочувствительных анализов, таких как цифровая капельная полимеразная цепная реакция (кцПЦР, ddPCR), петлевая изотермическая амплификация (LAMP), а также для обнаружения и скрининга активности ферментов и т. п.

Капельная микрофлюидика нашла широкое применение в химическом синтезе микро- и наночастиц, обладающих особыми свойствами, например, однослойных и многослойных монодисперсных микрочастиц со сложной внутренней структурой, которые можно использовать в качестве контейнеров для доставки лекарств, 3D биочернил, элементов тканевой инженерии, микролинз для фотоники, элементов биодатчиков и т. п. Все такие приложения обычно требуют упаковки биомолекул, отдельных клеток или полимеров с необходимыми химическими реагентами в отдельные монодисперсные микрокапли эмульсии «вода-в-масле». После этого в них проводят биохимические или химические реакции, продукты которых детектируются, например, по флуоресцентному сигналу. Поэтому одной из ключевых задач в микрофлюидных устройствах является формирование стабильных монодисперсных эмульсий заданных размеров и внутренней структуры и организация в них эффективного перемешивания реагентов. Поскольку в большинстве микросистем потоки носят ламинарный характер (низкие числа Рейнольдса), то эффективное перемешивание является отдельной подзадачей. Для ее решения используются длинные изогнутые микроканалы, создаются сложные микроструктуры внутри каналов, встраиваются в микрофлюидный чип внешние приборы (акустические, механические модули и т. п.). Такие методы приводят к усложнению чипа, увеличению его габаритов. Кроме того, исследователи указывают, что не существует общего и универсального технического решения, поэтому остается

актуальным вопросом разработки компактных и простых в изготовлении смесителей.

Одним из перспективных направлений синтеза микрочастиц является разработка гидрогелевых микрочастиц для задач тканевой инженерии и трансплантологии. Такие микрочастицы могут выступать в качестве материала 3D поддержки для роста клеток, быть носителями клеток или основой высокоразрешающих 3D биочернил. В рамках микрофлюидных технологий широко используют микрочастицы из распространённых и биосовместимых материалов: альгинат натрия, желатин, агароза, хитозан и др. Это позволяет проводить культивирование клеток, поддерживать их жизнеспособность и создавать биоразлагаемые структуры.

Несмотря на рост количества исследовательских статей, реальные коммерческие продукты, основанные на микрофлюидных технологиях, малочисленны. Например, система QX100/QX200 от компании Bio-Rad, Nadia instrument от Dolomite Bio, технологии Chromium и GemCode от 10X Genomics и Naica system for Crystal Digital PCR от Stilla Technologies. Выход из разработки в готовый (коммерциализация) продукт осложняется как технологическими сложностями при масштабировании производства, так и трудоёмкостью методик. При этом требуется наличие высококвалифицированного персонала способного разрабатывать такие сложные микрофлюидные системы. Формирование макроэмульсий требует специального оборудования, тщательного подбора дорогостоящих биосовместимых наборов реактивов (масла, поверхностно-активных веществ и т. д.) для предотвращения коалесценции и разрушения эмульсии при механических, тепловых или других нагрузках.

Все это подводит к задачам разработки доступных систем, в том числе с «открытым кодом» (open-source), для управления жидкостями в микрофлюидных чипах. Одним из перспективных решений является конструирование микрофлюидных контроллеров давлений для независимого управления четырьмя и более потоками и характеристика его работы для формирования микрокапель.

Существующие коммерческие контроллеры (например, от компаний Fluigent, Elveflow) и решения с «открытым кодом» (например, репозиторий Metafluidics) обычно довольно крупногабаритные, требуют калибровки, не являются гибкими и удобными для пользователя. Таким образом, они в основном предлагаются для продвинутых пользователей микрофлюидных систем и часто требуют дополнительной доработки и оптимизации для запланированных экспериментов.

Отдельного изучения заслуживают система по формированию микрокапель отрицательным давлением, прикладываемым к выходному каналу микрофлюидного чипа. Такой подход при должной проработке гидравлических сопротивлений микроканалов способен значительно упростить периферийное оборудование, необходимое для функционирования микрофлюидного устройства. Это особенно важно при формировании сложных эмульсий или микрочастиц, при синтезе которых требуется контролировать более трех потоков жидкости. Практика показывает, что даже автоматизированные микрофлюидные контроллеры и шприцевые насосы крайне неэффективно решают такие задачи. При этом метод с использованием отрицательного давления является до сих пор слабо проработанным – существуют работы по типу «proof-of-concept» (проверка концепции), но в них применяются методы, основанные на использовании шприца в «ручном» режиме, или подобные, но при которых не производится контроль давления на выходе. Также недостаточно исследованы зависимости размера микрочастиц и частоты их формирования от прикладываемого давления и гидравлических сопротивлений микроканалов.

Таким образом, актуальным является разработка микрофлюидной платформы, включающей в себя микрофлюидный чип для формирования эмульсии, систему перемешивания реагентов, систему ввода и управления жидкостями и методики их использования для синтеза микрочастиц. Формирование эмульсий в микрофлюидных чипах является нелинейным многопараметрическим процессом, для которого полноценной математической модели не существует. Поэтому требуются экспериментальные исследования и

характеризация процессов формирования макроэмульсий в микрофлюидных чипах для получения воспроизводимых результатов. А в виду перспективы развития новых материалов для тканевой инженерии тестирование такой платформы логично проводить на примерах упаковки клеток в микрокапли и синтеза гидрогелевых микрочастиц.

Цель и задачи работы

Целью работы являлась разработка и апробация микрофлюидной платформы для синтеза монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- Разработка и изготовление экспериментальных образцов микрофлюидных чипов для формирования макроэмульсий «вода-в-масле» и гидрогелевых микрочастиц.
- Разработка и апробация автоматизированной системы управления потоками жидкости в микрофлюидном устройстве. Сравнение режимов формирования монодисперсных эмульсий при вводе жидкостей в чип при постоянном давлении и постоянном расходе.
- Разработка способа формирования монодисперсных макроэмульсий отрицательным давлением с разными регуляторами потока воздуха.
- Исследование эффективности пассивного перемешивания жидкостей в асимметричных генераторах микрокапель.
- Разработка методов формирования и характеристика гидрогелевых микрочастиц из полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA), полиакриламида, желатин метакрилоила (GelMA), альгината натрия и агарозы при помощи разработанной микрофлюидной платформы.

Научная новизна

1. Впервые в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм выявлена линейная зависимость диаметра капель макроэмульсий «вода-в-масле» от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз в пределах значений 0,5-0,9, а также его независимость от их абсолютных значений (в диапазоне давлений 5–25кПа), что позволяет воспроизводимо управлять режимами генерации капель.
2. Путем сравнения режимов формирования капель эмульсии «вода-в-масле» при постоянном давлении и постоянном расходе жидкостей с помощью представления микроканалов эквивалентными электрическими схемами была впервые оценена эффективная вязкость эмульсии в выходном микроканале 200 мкм в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм, составившая 50 – 750 мПа·с, в зависимости от фактора заполнения, что позволяет рассчитывать режимы формирования эмульсий в микрофлюидных устройствах.
3. Экспериментально показано, что в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм диаметр капель при уровнях отрицательного давления от –30кПа до –80кПа преимущественно определяется гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов. Благодаря этому можно значительно упростить метод формирования эмульсии.
4. Впервые экспериментально показано, что при асимметричной фокусировке потока в области формирования микрокапель микрофлюидного генератора с апертурой 15 мкм структура и направление дисперсного потока зависят от аспектного соотношения ширины и глубины микроканалов, благодаря чему время перемешивания реагентов в каплях можно уменьшать до 6 раз по сравнению с генератором с симметричной фокусировкой потока.

Практическая значимость работы

- Создан 4-х канальный микрофлюидный контроллер давления и пневмоинтерфейсы для пробирок с реагентами объемом от 1,5 мл до 50 мл для стабильного формирования монодисперсных микрокапель объемами от 65 фл до 2,6 нл (диаметр 5 – 170 мкм) в микрофлюидных устройствах. Прибор обеспечивает управление воздушными каналами в ручном или автоматическом режиме по заданным протоколам.
- Разработан способ формирования монодисперсной макроэмульсии отрицательным давлением в микрофлюидном устройстве для эффективного формирования гидрогелевых микрочастиц со сложной внутренней структурой. Получен патент на полезную модель № 199373 от 28 августа 2020 года. Авторы патента: А.С. Букагин, Н.А. Филатов, Д. В. Ноздрюхин.
- Результаты экспериментальных исследований использовались при подготовке и проведении лабораторных работ по курсу «Микрофлюидные технологии» в СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова.

Методология и методы исследования

Чертежи микрофлюидных чипов были выполнены с применением системы автоматизированного проектирования Autodesk AutoCAD. Микрофлюидные чипы были изготовлены по технологии «Мягкой литографии». Прошивка микроконтроллера и программное обеспечение были созданы в среде IDE BlackBox Component Builder. Для прототипирования пневматических интерфейсов, конструкций экспериментальных установок (держатели, вспомогательные детали) использовались методы 3D печати: послойное наплавление (FDM) и стереолитография (SLA).

Обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась методами аппроксимации зависимостей и статистическими методами. Для исследований эффективного перемешивания в микрокаплях использовались методы 2D и 3D моделирования в программе Comsol Multiphysics. Регистрация и анализ

микрокапель и микрочастиц осуществлялись методами оптической микроскопии (в том числе флуоресцентной).

Положения, выносимые на защиту

1. Метод управления потоками жидкости с помощью контроля давления в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм и шириной выходного микроканала 200 мкм позволяет формировать микрокапли «вода-в-масле» с диаметром в пределах от 2 до 60 мкм. Диаметр линейно зависит от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз в пределах значений 0,5–0,9 и не зависит от их абсолютных значений (в пределах 5–25кПа).
2. Контроль давлений непрерывной и дисперсной фаз обеспечивает получение более широкого диапазона (на 45%) диаметров микрокапель по сравнению с использованием метода контроля расходов на одинаковых микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм.
3. В режиме контроля давления в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм эффективная вязкость эмульсии растет (в 3,8–9,4 раза) с увеличением отношения давлений фаз, что до 3,5 раз снижает частоту генерации капель.
4. Метод формирования капель отрицательным давлением в диапазоне до -80 кПа в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм позволяет стабильно формировать моодисперсные капли в течении более 4 часов с коэффициентом вариации диаметра менее 0,5%. Диаметр капель при уровнях отрицательного давления от -30кПа до -80кПа преимущественно определяется заданными гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов и не зависит от приложенного давления.
5. Асимметричный микрофлюидный генератор капель с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм и шириной выходного микроканала 60 мкм формирует стабильную эмульсию «вода-в-масле» в диапазоне диаметров 35–70 мкм и

способен одновременно до 6 раз быстрее производить перемешивание реагентов в микрокаплях по сравнению с симметричной фокусировкой потока.

Личный вклад автора

Автор участвовал в постановке цели и задач исследования, проводил анализ литературных источников по теме диссертации, разрабатывал чертежи микрофлюидных устройств в программе AutoCAD, и их изготавливал методами мягкой литографии. Изготавливал и проводил испытания автоматизированной системы управления потоками жидкости в микрофлюидных чипах, занимался исследованием вакуумного метода формирования микрокапель, разрабатывал методы по формированию водных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц из полиакриламида, полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA), альгината натрия, агарозы и желатин метакрилоила (GelMA). Все экспериментальные исследования, изложенные в диссертации, проведены лично автором. Также автор занимался представлением результатов исследований на конференциях и проводил работы по публикации научных результатов.

Основные экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично. Данные моделирования из раздела 2.5 предоставлены К.И. Белоусовым, выполнявшим их на базе Университета ИТМО (г. Санкт-Петербург).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется корректностью и строгостью математических выкладок, а также воспроизводимостью получаемых экспериментальных данных. В процессе работы проводились различные сравнения экспериментальных данных, в том числе с результатами моделирования, и с аналогичными данными, приводимыми в публикациях других исследователей.

Основные результаты докладывались и обсуждались на следующих конференциях: 8th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2021», (HSE University, St. Petersburg), Вторая российская конференция с международным участием и Третья международная конференция «Физика — наукам о жизни», 2017, 2019 (СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе), 3th, 4th, 5th, and 6th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN» 2016, 2017, 2018, 2019 (Санкт-Петербург), Skoltech Young Scientists Cross-Disciplinary Conference Gen-Y 2.0, 2019 (Sochi, Russia), EMBL Conference Microfluidics 2018 (Heidelberg, Germany), две международные конференции «Физика.СПб», 2015, 2017 (Санкт-Петербург), научная конференция с международным участием «Неделя науки», 2017 (СПбПУ Петра Великого, Санкт-Петербург), 5th International Scientific Conference STRANN, 2016 (Saint Petersburg).

Публикации

Основные научные результаты опубликованы в 24 печатных трудах, из которых 10 входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 2-х глав, заключения, списка литературы из 170 наименований. Работа содержит 66 рисунков и 1 таблицу. Полный объем диссертации – 167 страниц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Развитие микрофлюидных систем для исследования биообъектов и клеток в микрокаплях жидкости

Разработка новых вакцин и лекарств, диагностика генетических и инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также проведение разнообразных биохимических анализов критически связана с объемом пробирок, где происходят химические реакции, аналитические операции, детектирование и т. п. В частности, объем пробирок определяет расход реагентов, стоимость и скорость анализа, и т. п. Существенным достижением в росте производительности исследований и количестве проводимых анализов для научных исследований, медицинской диагностики и в фармацевтической промышленности стало активное использование к концу 1980-х годов микротитровального планшета – плоской прямоугольной чашки с многочисленными «ячейками», которые используются в качестве микропробирок. Например, появилась возможность организовать до 100 000 анализов в день на 1536-луночных планшетах (рабочий объем лунки 5-10 мкл). При этом постепенно происходила дальнейшая миниатюризация анализов в открытых резервуарах с объемами 1 мкл в 3456-луночных планшетах [1] и 200 нл в 9600-луночных планшетах [2]. Попытки сделать объем лунок еще меньше стали вскрывать значительные фундаментальные и технологические проблемы: испарение проб, недостаточная воспроизводимость результатов, ошибки дозирования и капиллярные явления, которые могли привести к перемешиванию жидкостей между лунками, а также к перекрестному загрязнению [3].

Для преодоления этих проблем исследователи стали проявлять интерес к использованию капель эмульсии нанолитровых и пиколитровых объемов в качестве своеобразных пробирок. Такой подход при должном развитии позволил бы не только упаковывать реагенты, клетки или биомолекулы внутрь капель, но и резко повысить производительность, чувствительность и скорость анализа, уменьшить объем требуемых реагентов [4] и, в конечном итоге, еще больше

снизить стоимость анализа. Уже в 1958 году G. J. V. Nossal [5] выделял отдельные клетки из лимфатических узлов крыс и помещал их в капли объемом 0,1 нл с целью изучения продукции антител. Ученый изготавливал специальный масляный резервуар из предметного и покровного стекол, где в минеральное масло раскапывал «нанолитровые пробирки» с клетками. Для этого использовались специально вытянутые стеклянные пипетки с диаметром носика около 50 мкм. А для внесения в такие капли бактерий или дополнительных объемов сред использовались стеклянные пипетки с диаметром наконечника примерно 20 мкм. Формирование капель и манипуляции с ними проводились вручную. Такой метод решал проблемы испарений и контаминаций, а также позволял еще больше уменьшить объем жидкостей с сотен нанолитров до десятых долей нанолитров. Однако он был очень длительным и трудоемким, поэтому в течение следующего десятилетия подобных экспериментов было выполнено всего несколько сотен.

Только к концу XX века концепция изучения объектов в каплях, которую еще называют компартиментализацией, *In Vitro Compartmentalization (IVC)* [6], получает значимое развитие, во многом благодаря технологическим достижениям в кремниевой микроиндустрии и развитии микро-электромеханических систем (MEMS, МЭМС). Последние являются системами, где в рамках одного миниатюрного устройства объединяются механические и электронные функциональные элементы, в том числе средства обработки сигналов [7]. Такой подход позволяет существенно улучшить чувствительность и надежность приборов, а также значительно снизить их размеры и стоимость.

Практически сразу же после появления первых МЭМС систем в конце 70-х годов XX века ученые начали объединять в одном компактном устройстве не только механическую и электронную, но и аналитическую часть [8,9]. В 1990 году профессор А. Манц предложил концепцию аналитических микросистем полного анализа (μ TAS – *micro total analysis system*) [10]. Согласно этой концепции, аналитическое устройство должно содержать систему пробоподготовки,

разделения и детектирования. При этом, изначально, концепция μ TAS была направлена на улучшение характеристик традиционных химических и биологических сенсоров. Также интеграция всех стадий анализа на единую платформу должна была позволить создавать высокопроизводительные системы одновременного мониторинга большого количества веществ. Но оказалось, что направление μ TAS имеет более широкое практическое применение, и оно трансформировалось в концепцию «Лаборатория-на-чипе» (Lab-on-a-Chip). Последняя концепция связана с созданием миниатюрных устройств и функциональных единиц инструментальной аналитической химии, а также диагностических систем и приборов. Важнейшими частями устройств «Лаборатории-на-чипе» являются жидкостные и газовые транспортные каналы, которые описываются уравнениями микрогидродинамики. Все это послужило началом новому направлению науки и технологии под названием микрофлюидика. При этом необходимость реализации крупных научно-исследовательских проектов, например, международного проекта «Геном Человека» (начало в 1990 году) [11], поиск новых подходов для высокопроизводительного скрининга биообъектов, методов ранней диагностики заболеваний и т.п., а также успехи в наукоемких технологиях, например, разработка нового биосовместимого эластомера полидиметилсилоксан (ПДМС), создание технологии «Мягкая литография», обеспечили продолжение всестороннего изучения процессов и явлений в микроразмерных системах.

Микрофлюидика как наука описывает поведение жидкостей, объем которых лежит в диапазоне от микролитров до фемтолитров, а как технология обеспечивает инструментарий для точного контроля и манипулирования потоками жидкости в специальных микроустройствах. Обычно, приставка микро обозначает одну из следующих характеристик: 1) малые объемы (мкл, нл, пл, фл), 2) малые размеры (мкм), 3) низкое потребление энергии, 4) эффекты/явления, связанные с микрометровым масштабом. Микрофлюидика использует знания из разных областей наук: инженерии, физики, химии, биохимии, нанотехнологии и

биотехнологии и т. п. [12]. Устройства с сетью микроканалов, где реализуются методы микрофлюидики, обычно называют микрофлюидными чипами или микрофлюидными устройствами.

Указанная выше концепция компартиментализации (изучения объектов в каплях) стала активно развиваться и выделилась в отдельное перспективное направление под названием «Капельная микрофлюидика». Технологии капельной микрофлюидики сосредоточены на развитии методов формирования в микрофлюидных чипах монодисперсных капель эмульсии с контролируемыми свойствами (размер, состав, форма), способов по манипулированию такими каплями (перемещение, сортировка, слияние, объединение, разрушение и т. п.) и анализа объектов, упакованных в них. Капли могут быть получены с частотой до нескольких миллионов штук в секунду (МГц) [13] с высокой монодисперсностью (коэффициент вариации диаметра капель менее 10%). Устройства по формированию микрокапель могут применяться для высокопроизводительного (≥ 1 л/ч) образования эмульсий или микрочастиц. Технологии капельной микрофлюидики позволяют создавать микрокапли со сложной внутренней структурой: двойные, тройные макроэмульсии, капли с двумя и более отсеками и т. д. Также возможно осуществлять протоколы полимеризации различных материалов в микрофлюидных чипах и получать из микрокапель монодисперсные микрочастицы.

Важно отметить, что в большинстве промышленных применений и в первых исследовательских разработках формирование эмульсий проводилось механическим перемешиванием [14] или с помощью ультразвука [15], то есть методами, которые позволяют создавать большие объемы эмульсий, но с высокой полидисперсностью капель. Однако, большая разница в размерах капель усложняет их анализ и не позволяет обеспечить одинаковые условия проведения биохимического анализа и тем самым добиться высокой воспроизводимости результатов [16]. Также фенотип исследуемого биологического объекта может искусственно отличаться в зависимости от объема капли, что способно привести к

неправильному отбору. Кроме того, без микрофлюидных технологий манипулировать каплями в полной мере невозможно, как с обычными пробирками или микроячейками планшетов, например, после процесса эмульгирования нельзя добавлять дополнительные реагенты массово и контролируемо во все капли.

Таким образом, микрофлюидные технологии предоставляют широкие возможности по проведению биологических анализов и тестов, что привело уже в 2000-х годах к появлению первых полноценных использований капель для биологических применений [14]. Яркий пример – в 1999 году Берт Фогельштейн (Bert Vogelstein) и Кеннет Кинзлер (Kenneth Kinzler) ввели термин «цифровая полимеразная цепная реакция» (или «цифровая ПЦР», цПЦР), и показали, что этот метод можно использовать для поиска редких мутаций рака [17]. Однако, цифровую ПЦР оказалось сложно выполнять из-за трудоемкости методики. В 2003 году Кинзлер и Фогельштейн продолжили совершенствовать цПЦР и создали улучшенный метод, который они назвали технологией BEAMing, что сокращенно означает «шарики, эмульсия, усиление и магнетизм». В новом протоколе использовалась эмульсия для разделения реакций амплификации в одной пробирке. Это улучшение позволило ученым масштабировать метод до тысяч реакций за одну процедуру [18]. При этом отметим, что первая система цПЦР для клинического использования была маркирована знаком соответствия основным требованиям директив Европейского союза СЕ только в 2017 году – компания Bio-Rad получила эту маркировку для кцПЦР (капельная цПЦР, ddPCR) анализа обнаружения слияния генов BCR-ABL для мониторинга реакции на лечение у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом. А в 2019 году компания Bio-Rad, мировой лидер в области биологических исследований и продуктов клинической диагностики, объявила о выпуске системы QXDx AutoDG ddPCR, в которой используется технология Droplet Digital PCR и QXDx BCR-ABL %IS Kit - первые в отрасли цифровые продукты ПЦР, получившие разрешение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и

медикаментов США (FDA). При совместном использовании система и набор Bio-Rad могут точно и воспроизводимо контролировать молекулярный ответ на лечение у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом.

Кроме всего вышеуказанного, технологии капельной микрофлюидики становятся одним из перспективных инструментов для создания монодисперсных микрочастиц (или микроконтейнеров) [19]. В последние десятилетия исследователи по всему миру работают над созданием микрофлюидных устройств для производства сложных микрочастиц с уникальными характеристиками: двух и более секционные сферические частицы с разным наполнением, вытянутые частицы с отсеками в виде сферических капель, частицы ядро-оболочка и др. Такие микрочастицы могут использоваться в качестве носителей клеток, каркасов для клеток в 3D биопечати и трансплантологии, капсул для доставки лекарств, активных пигментов для дисплеев, микросенсоров и т. д. Например, существуют разработки гидрогелевых микрочастиц, которые можно применять в качестве 3D биочернил для печати органов и тканей [20] или создания функциональных элементов систем «орган-на-чипе». Также разрабатываются микрофлюидные чипы для создания монодисперсных гидрогелевых микрочастиц, в которых внутреннее водное ядро отделено от внешней фазы с помощью гидрогелевой оболочки для исследования межклеточных взаимодействий [21].

Как полагают эксперты (отчет о рынке и технологиях, STATUS OF THE MICROFLUIDICS INDUSTRY September 2020, Yole Development) рынок приборов на основе микрофлюидных технологий продолжает активно развиваться. На ближайшую перспективу рынок микрофлюидной продукции вырастет с 11,2 млрд долл. США в 2019 г. до 24,5 млрд долл. США к 2025 году. при совокупном годовом темпе роста (CAGR2019-2025) около 14%. Основной рост будет обеспечиваться развитием инструментов для фармацевтических и медико-биологических исследований (Tools for pharmaceutical and life science research) и систем «Диагностики-на-месте» (Point-of-care diagnostics).

Перечисленные тенденции подтверждаются современными коммерчески доступными продуктами для детектирования или анализа сверхмалых количеств образца. Например, система QX100/QX200 для капельной цифровой полимеразной цепной реакции (Bio-Rad, USA); Nadia instrument от Dolomite Bio; технологии Chromium и GemCode от 10X Genomics и Naica system for Crystal Digital PCR т. д. [13].

Несмотря на активное развитие микрофлюидных технологий с 1990-х годов, рост количества публикаций в научных журналах и наличие успешных примеров коммерческих продуктов [13,22], большинство исследований носят более научный характер, чем прикладной [23]. Это обуславливается трудоемкостью создания микрофлюидных чипов, сложностью организации процессов, протекающих в таких микросистемах, большими затратами на обучение персонала и несовершенством периферийного оборудования для микрофлюидных чипов. Также основные области применения микрофлюидных технологий (медицина, биотехнологии) накладывают определенные требования на создаваемые устройства и материалы к ним: биосовместимость, термоустойчивость, твердость/пластичность, устойчивость к определенным растворителям, веществам, стабильные свойства поверхности и т. п. Поэтому многие технологические вызовы, создание простых и компактных устройств остаются актуальными до сих пор.

1.2. Применение методов компьютерного моделирования в микро- и нанофлюидике

По общепринятому определению, к наноструктурам относятся объекты, которые имеют хотя бы один характерный размер в интервале от 0,1 до 100 нм. Поэтому нанофлюидной называется система, характерные размеры каналов или других структур которой не превышают 100 нм. В ряде случаев в структурах, размеры которых находятся в диапазоне 100 нм – 1 мкм, наблюдаются аналогичные явления, поэтому для их описания используется термин

"расширенная нанофлюидика" [24]. Если характерные размеры структур находятся в диапазоне 1 – 1000 мкм, то это область микрофлюидики (хотя наиболее распространенными считаются размеры 30–300 мкм) [25].

Ключевые особенности функционирования микро- и наноразмерных систем закладываются фундаментальными принципами микрогидродинамики описывающими движение жидкостей в них. Чип, как основа таких систем, может представлять собой сложную систему микро- и наноканалов, микрореакторов, микроэлектродов и других функциональных частей. Для описания происходящих в нем процессов, например, течения жидкости по сети каналов, распределение концентраций веществ и электрических полей и т. д., часто не хватает теоретического и аналитического аппарата. Поэтому на сегодняшний день создан ряд математических пакетов, в которых реализованы численные методы, позволяющие решать комплексные, многопараметрические задачи.

Для наносистем предпочтительнее использовать моделирование методом молекулярной динамики. Подход исходит из первых принципов взаимодействия атомов и молекул друг с другом [26]. Такое компьютерное моделирование позволяет проследить изменения системы взаимодействующих атомов и/или молекул во времени с помощью интегрирования уравнений движения. Например, с его помощью в работе [27] изучалось ротационное нанофлюидное устройство для опреснения обратным осмосом. В настоящее время с помощью современных суперкомпьютеров возможно проводить исследования систем, состоящих из нескольких триллионов частиц [28–31].

Метод молекулярной динамики требует огромных вычислительных мощностей, поэтому активно развиваются методы численного и аналитического моделирования, основанные на гипотезе сплошной среды. В рамках такого подхода осуществляется численное решение уравнения Навье-Стокса, дополненного уравнениями теплопроводности, диффузии-конвекции и электродинамики. Для решения получившейся системы дифференциальных уравнений часто используется метод конечных элементов. Он основан на

сведении дифференциальных уравнений к системе алгебраических уравнений при помощи аппроксимации решения кусочно-линейными функциями на сетке конечных элементов. На практике, для моделирования могут использоваться математические пакеты (например, MatLab, Maple) и языки программирования (например, C/C++, Fortran). Также для решения таких уравнений разработаны специализированные программы, например, Comsol Multiphysics [32], которые позволяют решать системы дифференциальных уравнений в частных производных и не требуют наличия навыков программирования. Однако при этом такие программы оставляют достаточно большую свободу действий для профессиональных пользователей.

Анализ применимости гипотезы сплошной среды проводится на основе сравнения длины свободного пробега частицы с характерным размером системы. Данный критерий называется критерием Кнудсена (Kn) и основан на вычислении числа $Kn = \lambda / d$, где λ — длина свободного пробега в газе или жидкости, d — характерный геометрический размер канала [33]. При $Kn < 10^{-3}$ гипотеза сплошной среды применима. При Kn от 10^{-3} до 10^{-1} гипотеза сплошной среды еще правомерна и, кроме того, допустимо применение условия прилипания частиц к жестким стенкам канала. Сама формулировка последнего условия также может быть различна: как в форме нулевой скорости $V = 0$, так и в более сложной форме, связанной с касательными напряжениями [33]. При Kn более 10^{-3} следует учитывать неравновесные эффекты в среде. Если же число Кнудсена $Kn > 1$, то течение нужно рассматривать как движение отдельных молекул или ионов. Например, для воды $\lambda = 0,3$ нм [25] и для микроканала 1 мкм число Кнудсена составляет $3 \cdot 10^{-4}$, то есть гипотеза сплошной среды применима.

Одна из проблем использования любых результатов моделирования состоит в корректной проверке полученных данных. Наилучшим решением является сравнение результатов с экспериментальными данными [34]. Также важным фактом является проверка сходимости решения. Можно использовать чувствительный анализ — анализ устойчивости решения в зависимости от

небольших изменений коэффициентов в уравнении. В соответствии с теорией дифференциальных уравнений, здесь следует наблюдать непрерывную зависимость решения, то есть его слабое изменение при малых отклонениях параметров системы. Еще сходимость можно проверить в самой программе. Меняя шаг сетки, можно найти такое его значение, после которого дальнейшее его уменьшение не приводит к заметным изменениям в решении. Также результаты моделирования можно сравнивать с аналитическими расчетами. Но сложность состоит в том, что вручную большинство вычислений в сложных микросистемах не осуществить. Для этого, например, можно сравнивать предельные случаи, где допускается пренебречь рядом параметров для упрощения аналитических решений.

Таким образом, моделирование оказывается одним из инструментов при разработке микро- и нанофлюидных систем. Моделирование процессов позволяет решать задачи оптимизации конструкции нано- или микросистемы, или ее отдельных элементов, а также осуществлять оптимальный выбор режима анализа до проведения экспериментов или создания прототипов и т. п. Благодаря этому можно снижать временные и материальные затраты, или даже находить новые эффекты и зависимости.

1.3. Формирование стабильных макроэмульсий в микрофлюидных чипах

Как правило, микрофлюидные устройства применяются для формирования капель эмульсии объемом от нескольких нанолитров до нескольких фемтолитров, которые могут представлять собой своеобразные микрореакционные камеры или микрореакторы для проведения биохимических реакций. Также ведутся работы по созданию устройств для получения капель аттолитровых объемов [35]. В зависимости от размера капель, эмульсии делятся на макроэмульсии (размер капель 1-100 мкм), миниэмульсии (до 100 нм) и микроэмульсии (до 10 нм). Фаза, которая распалась на капли называется дисперсной фазой. Непрерывная фаза – это иное название транспортного потока. В качестве непрерывной фазы чаще

всего используются минеральное, силиконовое или фторуглеродное масла (Рисунок 1.3.1). Существуют прямые (капли неполярной жидкости в полярной среде – «масло-в-воде», М/В) и обратные («вода-в-масле», В/М) эмульсии, однократные и множественные (мультифазные) эмульсии, в которых капли одной из фаз содержат в своем объеме более мелкие капли («вода-в-масле-в-воде», В/М/В; «масло-в-воде-в-масле», М/В/М и т. п.). Рисунок 1.3.2 иллюстрирует размеры капель в сравнении с объектами природы. Так, крупинцы песка мелкой фракции сопоставимы с нанолитровыми каплями, а эукариотические клетки – с пиколитровыми. Фемтолитровые (10^{-15} л) капли близки к размерам бактерий и клеточных органелл.

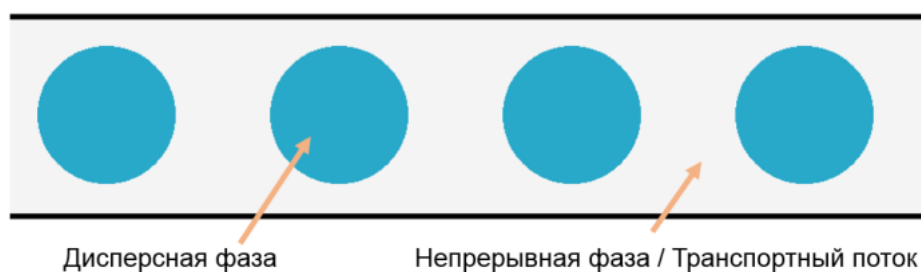


Рисунок 1.3.1 – Схематическое изображение изолированных микрореакторов (капель) в потоке транспортной жидкости.

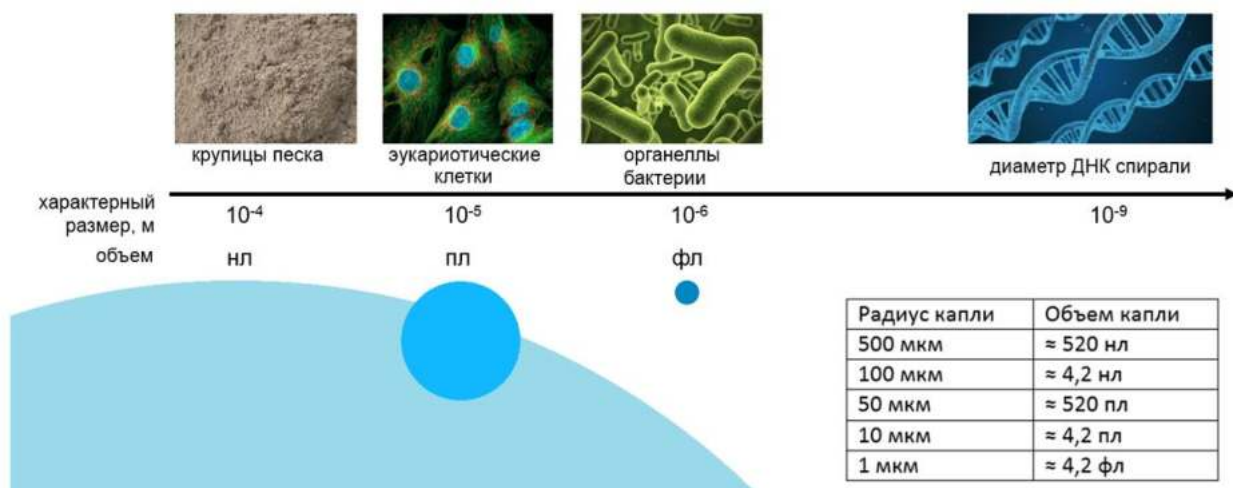


Рисунок 1.3.2 – Характерные масштабы капель в микрофлюидике. Изображения капель имеют условные размеры и приведены для иллюстрации.

Для формирования капель макроэмульсии требуется создать условия, при которых дисперсный поток начнет «распадаться» на стабильные и регулярные микрокапли в непрерывном потоке. Для этого могут применяться как активные

[36], так и пассивные методы [37]. Активные методы используют внешние силы, вызываемые тепловыми полями, электрическим, магнитным или ультразвуковыми полями и т. п., что значительно усложняет микрофлюидные устройства. Поэтому большее распространение получили пассивные методы формирования капель эмульсии, для которых характерно применение конструктивных особенностей микрофлюидных устройств для создания неустойчивости течения жидкостей и распада потока на отдельные капли. На рисунке 1.3.3 изображены самые распространенные принципы пассивного формирования капель, базирующиеся на разных физических механизмах: распад в пересекающихся потоках (Т-инжектор, T-injector), распад при фокусировке потока (flow focusing), распад в соосных потоках (co-flowing) и ступенчатое эмульгирование (step emulsification) [38].

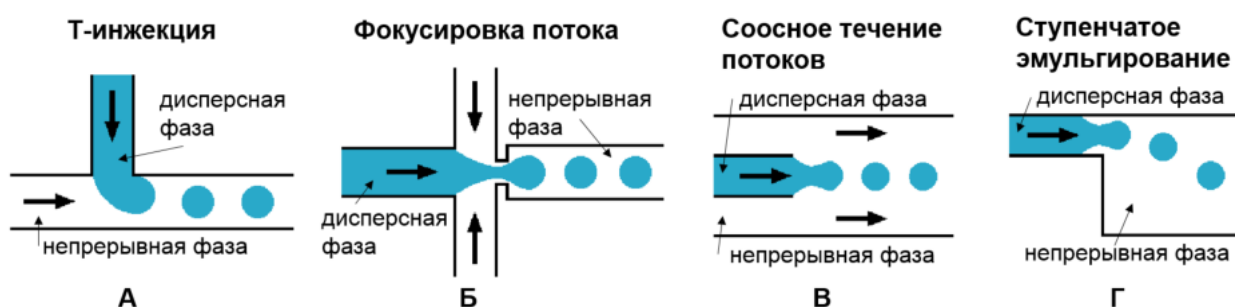


Рисунок 1.3.3 – Четыре базовых принципа формирования капель: Т-инжекция (А), фокусировка потока (Б), соосное течение потоков (В), ступенчатое эмульгирование (Г) [38].

Т-инжекционный принцип был первым разработанным методом для получения капель в микрофлюидных устройствах. Он заключается в пересечении канала, содержащего диспергируемую фазу, каналом непрерывной фазы. Дисперсная фаза заполняет соединение до тех пор, пока не создаются условия для отрыва на капли (Рисунок 1.3.3А). Принцип фокусировки потока (Рисунок 1.3.3Б) основан на том, что диспергируемая жидкость зажимается между двумя потоками непрерывной фазы и далее разбивается на микрокапли. В этой геометрии сдвиг является симметричным, в отличие от Т-образного соединения, что повышает стабильность генерации капель. Если производство капель реализовано через

серию концентрических капилляров, то такое устройство называется соосным или коаксиальным. Капилляр с дисперсной фазой находится внутри канала с непрерывной фазой. В такой конфигурации удобно формировать эмульсий по типу капля в капле, увеличив количество коаксиальных капилляров (Рисунок 1.3.3В).

Ступенчатое эмульгирование заметно отличается от трех указанных принципов и основано на резком, ступенчатом изменении высот микроканалов. Дисперсная фаза поступает по микроканалу и обрывается в более глубоком канале с непрерывной фазой. Важно отметить, что на Рисунке 1.3.3Г у непрерывной фазы не показано направление движения непрерывной фазы. Дело в том, что для ступенчатой генерации существует целый ряд технических решений протекания непрерывной фазы. Например, она может поступать также из канала, по которому движется дисперсная фаза [39]. В этом случае в микрофлюидном чипе сначала происходит гидрофокусировка дисперсной фазы потоками непрерывной фазой без образования капель, и затем, такой сфокусированный поток обрывается на капли на резком перепаде высот микроканалов. Помимо этого, непрерывная фаза может иметь движение в выходном глубоком канале в том направлении, по которому технологически удобнее отводить сформированные капли и осуществлять их сбор. Также, есть вариант замены глубокого выходного канала на целый резервуар (объемом в несколько десятков мл) с непрерывной фазой. В таком подходе непрерывная фаза может не иметь направленного движения и быть также местом накопления капель [40].

Для получения воспроизводимого результата анализа или синтеза микрочастиц, требуется отсутствие коалесценции капель эмульсии и сохранение их размеров с течением времени. Часто макроэмульсии должны быть устойчивы к температурным и механическим воздействиям. Так, для стабилизации макроэмульсии применяют эмульгатор, в роли которого выбирается поверхностно-активное вещество (ПАВ). В качестве ПАВ, как правило, выбирают амфифильные молекулы с гидрофобными и гидрофильными группами. ПАВ

адсорбируется на границе раздела масло-вода и снижает поверхностное натяжение, что препятствует слиянию капель и придает им метастабильность. Это означает, что эмульсии имеют ограниченное время жизни до слияния, которое может варьироваться от миллисекунд до нескольких лет в зависимости от стабилизирующих характеристик ПАВ и физических условий окружающей среды [41]. В зависимости от задач требуется подбирать ПАВ для использования в микрофлюидных устройствах, чтобы они обладали необходимыми свойствами для обеспечения эффективности выбранной методики анализа или синтеза. Так, в случае скрининга лекарственных средств, они должны быть совместимы с клетками в течение времени, необходимого для исследования, быть инертными по отношению к компонентам в капле, регулировать молекулярный обмен между каплями или предотвращать миграцию биомолекул к границе фаз [42].

Распространенными ПАВ в «капельной» микрофлюидике являются неионные Span и Tween. Например, капли в минеральном масле можно стабилизировать за счёт Span 80, ABIL EM90 или ABIL EM180. Для фторуглеродного масла требуются специально разработанные ПАВы, например, FluoSurf для HFE-7500.

Несмотря на огромное число публикаций, многие вопросы стабилизации капель остаются не освещены. Часто эмульгатор подбирается экспериментальным путем, поэтому все еще актуальны исследования влияния концентрации ПАВ на диаметр микрокапель и на частоту их формирования. Для задач анализа и синтеза веществ остается актуальным поиск ПАВ, чтобы капли были замкнутыми пространствами для биомолекул. Изучается вопрос влияния ПАВ на перенос молекул из капли через его стенки (границу раздела фаз) в непрерывную фазу [19,43].

Кроме того, на формирование капель влияют следующие параметры: гидрофильность/гидрофобность стенок микроканалов, состав дисперсной и непрерывной фаз, конструктивные особенности, межфазное натяжение, скорости потоков жидкостей и т. п. Изучение взаимосвязи между составом среды,

конструкцией каналов, динамикой генерации макроэмульсии позволяет создавать феноменологические и аналитические модели, которые затем можно исследовать экспериментально [43,44]. Все это обеспечивает целый пласт нерешенных задач по генерации устойчивых капель.

1.4. Основное устройство и материалы микрофлюидных чипов

В простейшем случае микрофлюидные чипы представляют собой конструкцию из двух герметично соединенных пластин: одна с микроканалами, другая пластина — защитная, герметизирующая чип. Реакторы, клапаны, электроды и другие функциональные элементы могут быть встроены в любую из пластин. Емкости с реактивами могут располагаться как на самом чипе, так и присоединяться к нему при помощи капилляров, фитингов, интерфейсов. Выбор геометрии микроканалов и конструкции самого чипа сильно зависят от типа исследуемых биологических объектов и набора операций, которые реализуются в нем [45]. А материалы, из которых состоит чип, определяют технологический процесс изготовления микроканалов и микроструктур в них с учетом требуемых функциональных характеристик и точности, а также экономических затрат.

Несмотря на то, что кремний был одним из первых материалов при изготовлении микрофлюидных чипов [46] ввиду заимствования части методик из микроэлектроники, со временем стекло и полимерные материалы получили более широкое распространение. Так, основные технологические операции (фотолитография, травление, осаждение материалов), применяемые в кремниевой технологии, могут быть использованы и для обработки стекла с небольшими изменениями [47]. Использование стекла в микрофлюидных технологиях обусловлено: 1) низким поглощением в широкой области спектра, что позволяет применять оптические методы детектирования; 2) биосовместимостью, химической инертностью и непроницаемостью для газов; 3) высокой химической и термической устойчивостью; 4) высоким удельным сопротивлением; 5) отработанными технологиями герметизации. В настоящее время стеклянные

микрофлюидные чипы серийно производятся, например, компаниями Micronit, Dolomite и др. Однако, использование стекла, как и кремния, для быстрого прототипирования ограничено из-за необходимости применения высокотехнологичного дорогостоящего оборудования, а также высокой стоимости самого материала и сложного процесса обработки в условиях чистых помещений.

В связи с этим с начала 1990-х годов широкое применение в микрофлюидике получают полимерные материалы [48], в первую очередь из-за простоты их обработки и доступности. Также полимеры не требуют использования процессов химического структурирования, таких как травление, связанных с использованием опасных веществ (например, фтороводородной кислоты). В промышленности полимеры обычно микроструктурируют с помощью технологий термического формования или репликации, например, путем литьевого формования, что позволяет достигать высокопроизводительного и относительно дешевого производства. Ключевыми достоинствами полимеров являются широкий выбор материалов, прозрачность, отработанные методы получения микроструктур, биосовместимость [49] и возможность серийного выпуска изделий. Кроме того, менее трудоемкими по сравнению со стеклянными материалами являются способы герметизации микроканалов и реакционных камер. Обычно применяются методы обработки кислородной плазмой, спекания (при температурах до 250 °С), связывание полимерными композициями (в том числе и фото- или термоотверждаемыми клеями), адгезивами и др. В микрофлюидике широко распространены: полидиметилсилоксан (ПДМС), полиметилметакрилат (ПММА), поликарбонат (ПК), полиимид, поливинилхлорид и др.

К настоящему времени для полимерных материалов существует ряд доступных технологий формирования микроструктур, которые условно можно разделить на группы:

1. технологии прямого формирования (все виды прецизионной механической микрообработки, в том числе лазерной) [50,51];
2. технологии с использованием масок и шаблонов (плазменные методы, некоторые виды литографии, например, рентгеновская) [52];
3. методы с применением мастер-форм («мягкая» литография, инжекционное литье, горячее тиснение, и др.) [53];
4. аддитивные технологии, 3D-печать [54–56];
5. комбинированные методы (например, сочетание методов 3D печати и «мягкой» литографии).

Поскольку для изготовления микроструктур в полимерных материалах не применяются агрессивные реагенты, а оборудование для изготовления полимерных микрофлюидных чипов более экономично в эксплуатации и дешевле систем для кремний-стеклянных технологий, то получать микрофлюидные устройства в условиях исследовательских лабораторий становится проще, что приводит к ускоренному развитию микрофлюидики в академических и исследовательских центрах, и ее постепенному внедрению в сферы промышленного применения. Особенно перспективным является использование полимеров для создания одноразовых устройств для биомедицинских приложений, систем диагностики на месте оказания помощи (Point-of-Care testing, «Диагностика-на-месте») и др.

Следует отметить, что при изготовлении микрофлюидных чипов используют также сочетания материалов, например, стекло и полимеры, кремний и стекло. Такие гибридные конструкции идеально подходят для исследовательских лабораторий, если требуется разработать прототип устройства или системы за относительно короткое время и провести на нем исследование. Например, работа [57] по разработке методики изготовления массивов наноканалов в кремниевом-стеклянных чипах методом фрезерования сфокусированным ионным пучком для исследования ионного транспорта.

Со временем, большую популярность приобрели методы мягкой литографии для изготовления микрофлюидных чипов из эластомерных материалов, таких как ПДМС, особенно для исследовательских работ. Впервые использование ПДМС в качестве материала для создания микроустройств было рассмотрено в работе Г. Вайтсайда (G. Whitesides) [58]. Материал является оптически прозрачным в диапазоне от 240 до 1100 нм, эластичным, прочным, биосовместимым, обладает высокой адгезией к кремнию и стеклу. В процессе полимеризации материал испытывает умеренную усадку (1-3%) [59] и в нем можно формировать прецизионные структуры реплик с точностью до 10 нм. ПДМС устойчив к температурам от -45 до 200 °С, ко многим химическим средам, а также обладает высокой газопроницаемостью, что может быть полезно при работе с клеточными культурами. Упругие механические свойства ПДМС позволяют создавать пневматические клапаны, элементы для микронаносов и интегрировать их в микрофлюидные чипы.

Изготовление микро- и наноструктур в ПДМС методом «мягкой» литографии значительно упростило и ускорило прототипирование микрофлюидных систем, что также сказалось на широком распространении этого материала. Кратко, эта технология основана на использовании кремниевой или стеклянной мастер-формы с рельефом из микроканалов, на которую заливается неотвержденный ПДМС, который полимеризуется при температуре 60 – 110°С, и тем самым формирует реплику с микроканалами [60]. Для герметизации таких реплик с другим слоем ПДМС или стеклом можно применять вполне доступные методы обработки поверхностей в кислородной плазме [60] или коронным разрядом [61].

Отличительной особенностью микрофлюидных чипов для формирования макроэмульсии является наличие активного или пассивного генератора капель, для стабильной работы которых требуется обеспечить заданные свойства внутренних поверхностей микроканалов. Так, для образования стабильной эмульсии по типу «вода-в-масле», требуется придавать стенками микроканалов

гидрофобные свойства. Для этого могут использоваться специальные водоотталкивающие покрытия, формируемые, например, при помощи ClearVue Rain Repellent (Turtle Wax Inc., США) или Aquapel Glass Treatment (США). Напротив, для эмульсий по типу «масло-в-воде», требуется придавать поверхности гидрофильные свойства, например, с помощью покрытия из поливинилового спирта.

Таким образом, существует целый ряд методов для прототипирования микрофлюидных устройств. Среди них, как наиболее простой и распространённый, выделяется «мягкая литография» с применением ПДМС. Однако в общем, технология изготовления микрофлюидных чипов определяется конечными задачами исследований.

1.5. Перемешивание реагентов в каплях макроэмульсий

В одном микрофлюидном устройстве может быть реализовано сразу несколько аналитических операций. Как правило, процесс анализа включает в себя отбор пробы, пробоподготовку, дозирование, транспортировку по микроканалам, добавление к пробе реагентов, перемешивание, проведение биохимических реакций, детектирование продуктов реакций и обработку результатов. На Рисунке 1.5.1 показана условная схема ключевых функциональных узлов для типичного устройства в рамках концепции Lab-on-a-chip. Образец для анализа вводится через порт 1, а затем взаимодействует с реагентом, вводимым через порт 2. Далее образец перемешивается с реагентом для проведения биохимической или химической реакции. Наконец, интересующий продукт реакции выделяется и детектируется, а также проходит иные стадии анализа [62].

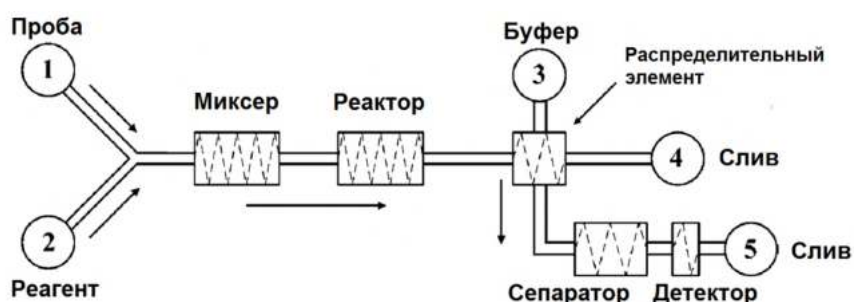


Рисунок 1.5.1 – Условная схема ключевых компонентов для типичного устройства в рамках концепции Lab-on-a-chip [62].

Одним из ключевых этапов проведения биохимических и химических реакций в микрофлюидных устройствах является эффективное перемешивание реагентов [63,64]. Применение технологий капельной микрофлюидики обычно включает в себя инкапсуляцию биомолекул, отдельных клеток или полимеров с необходимыми химическими реагентами в отдельные монодисперсные капли «воды-в-масле» или «воды-в-масле-в-воде» и др. Однако, в микрофлюидных системах эффективное перемешивание оказывается сложной задачей, поскольку для микроканалов характерно ламинарное течение, при котором жидкость или газ перемещаются слоями без турбулентного перемешивания и пульсаций (беспорядочных быстрых изменений скорости и давления). Ламинарное течение возможно до некоторого критического значения числа Рейнольдса, после которого оно переходит в турбулентное. Число Рейнольдса Re – безразмерная величина, характеризующая отношение инерционных сил к силам вязкого трения в жидкостях и газах. Из-за малых размеров микроканалов (типичные размеры сечения не превышают 300 мкм) Re часто меньше 1, поэтому силы вязкого трения преобладают над силами инерции, что приводит к возникновению ламинарного потока. Это означает, что конвективный массоперенос в микрофлюидных устройствах происходит только в направлении потока жидкости, а перемешивание происходит только за счет молекулярной диффузии [65,66]. Время перемешивания, связанное с диффузией, зависит от квадрата расстояния, что может быть ограничивающим фактором при увеличении размера капель [67]. Кроме того, это может иметь решающее значение для высокопроизводительных и точных измерений кинетики ферментов для скрининга лекарств, систем

тестирования на месте оказания медицинской помощи (Point-Of-Care Testing), для кинетических исследований слияния вируса и мембраной оболочки [68–70]. Например, для молекулы ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) из 30 пар оснований в воде коэффициент диффузии $D \sim 4 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ [12], значит для прохождения расстояния в 100 мкм потребуется около 250 секунд (4 минуты). Для молекулы ДНК из 5000 пар оснований в воде $D \sim 1 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ [12], поэтому на расстояние в 100 мкм необходимо около 10^4 секунд (3 часа). Поэтому для обеспечения эффективного перемешивания жидкостей необходимо использовать специальные перемешивающие устройства (микромиксеры), интегрированные в микрофлюидные чипы.

Микромиксеры можно разделить на две группы: пассивные и активные. Для последних характерно использование дополнительной энергии: тепловой [71], механической [72], электрической [73], магнитной [74] и т. п. Пассивные методы базируются на особенностях течения ламинарных потоков жидкости [75] или на создании микрофлюидных каналов особой геометрии [76,77] или специфических микроструктур в них [78,79], которые способствуют более эффективному взаимодействию жидкостей.

Примером активного перемешивания может являться акустожидкостной микромиксер [80]. Благодаря методам глубокого ионного травления поверхность стенок микроканалов делается рифленой. Рядом с местом течения жидкостей интегрирован источник акустических волн. Это необходимо для того, чтобы создавать эффект кавитации – образования полостей/пузырьков в микроканале. Наличие кавитации нарушает ламинарность потоков и реагенты перемешиваются. Такой микромиксер способен перемешивать очень вязкие вещества. Как утверждают исследователи, его можно использовать при анализе мокроты в диагностических целях. Однако у миксера есть ряд недостатков. Требуется проработки вопрос о том, сколько времени необходимо для исчезновения образовавшихся пузырей в смеси, и критично ли это для определенных видов анализа. Также остается вопрос простоты изготовления подобного миксера и

компактности, ведь необходимо специфически подготавливать поверхность и встраивать акустический элемент. Другой пример, в работе [81] используется микрофлюидный чип, в котором перемешивание осуществляется при помощи воздушных пузырьков. Ученые отмечают, что устройство позволяет перемешивать в диапазоне тех вязкостей, которые характерны для слез, слюны, сыворотки крови, чистой крови. Отрицательной стороной такого пассивного миксера является длительное время перемешивания и необходимость дополнительных лунок для забора воздуха

Примеры пассивных миксеров приведены в ряде работ [75,76,78,79], где для эффективного перемешивания создают микроканалы со сложной трехмерной геометрией. На Рисунке 1.5.2 приведены примеры таких микроканалов. А работы [78,82] иллюстрируют возможность использования гидродинамического фокусирования для перемешивания.

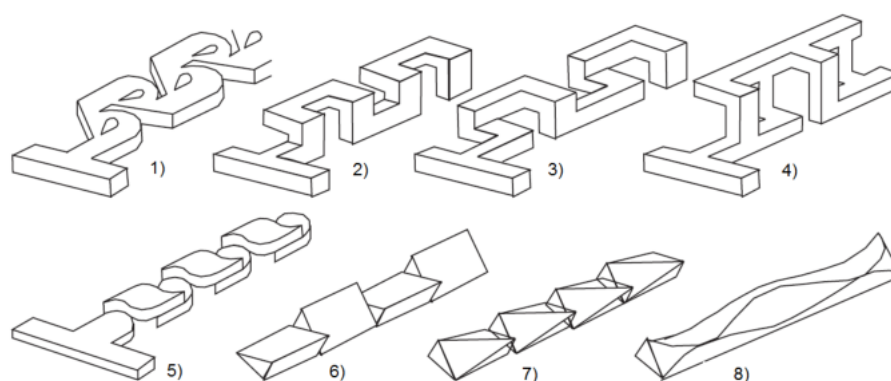


Рисунок 1.5.2 – Варианты микромиксеров 1) смеситель на эффекте Коанда, 2) С-форма, 3) L-форма, 4) поперечная L-форма, 5) скрученные микроканалы, 6,7,8) – иные виды геометрии. Источник [75].

Однако самое важное, что не все микрофлюидные методы по перемешиванию можно перенести в плоскость капельной микрофлюидики. Например, наличие специфических структур в микроканалах может разрушать капли или приводить к их неконтролируемым слияниям или разделениям.

Несмотря на то, что активные капельные миксеры позволяют эффективно перемешивать компоненты реакции (например, микроволнами) [83], вопросы сложности и дороговизны их изготовления, потребления энергии, сильно

затрудняют выход работ из области академических интересов. Кроме того, активные миксеры, как правило, подразумевают наличие системы управления миксером, что сильно влияет на габариты устройств.

При этом недостатки активных методов раскрывают потенциал пассивных. Например, в прямом микрофлюидном канале устойчивые рециркулирующие потоки внутри движущихся капель могут улучшить перемешивание, правда это очень чувствительно к начальному распределению реагентов [84]. Такой эффект может достигаться путем регулирования относительных расходов непрерывной и дисперсной фаз в Т-образном генераторе. Наиболее распространенный способ перемешивания, который нечувствителен к начальному распределению реагентов, – это использование геометрически индуцированной адвекции внутри капель. Эта адвекция происходит во время ее движения в изогнутом микроканале (Рисунок 1.5.3А, Б), расположенном сразу после области образования капель [66,85,86]. К сожалению, такой изогнутый канал требует дополнительного пространства и имеет поперечное сечение, близкое к размеру капли, что ограничивает частоту генерации из-за его высокого гидравлического сопротивления.

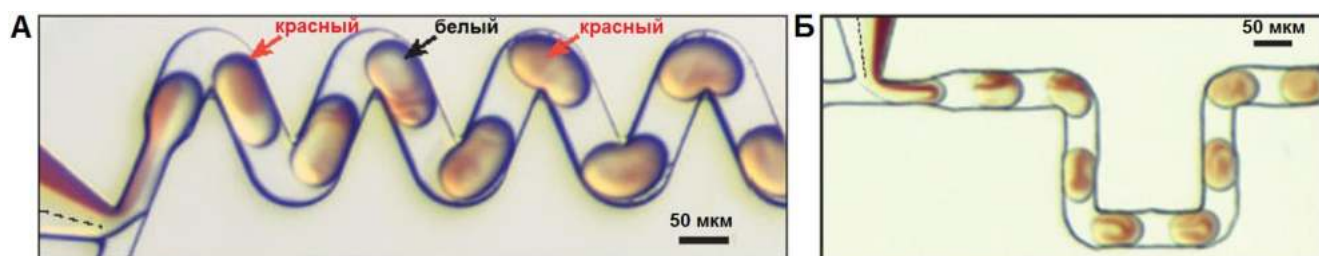


Рисунок 1.5.3 – Иллюстрация геометрически индуцированной адвекции внутри капель: А) – канал для перемешивания с «угловыми» изгибами [85], Б) – канал с «прямоугольными» изгибами [66].

Таким образом, требуется решать задачи о поиске вариантов конструкций и условий (скорость, состояние поверхности и т. п.) для обеспечения эффективного перемешивания. Малоизученным остается вопрос влияния стенок микроканала на процесс перемешивания. Ведутся работы по созданию моделей для описания перемешивания [87]. Также есть мнение [88], что не существует единого подхода при выборе смесителей, удовлетворяющих всем требованиям и пригодными для

всех приложений. Из этого можно сделать вывод о постоянной актуальности разработки новых методов перемешивания веществ в микрофлюидных устройствах.

1.6. Создание гидрогелевых микрочастиц на основе капель макроэмульсии

Сложные микрочастицы или микрокапсулы [89–95], обладающие уникальными характеристиками, такими как монодисперсность, контроль и задание размеров и состава, сложная внутренняя структура частиц, находят применение в качестве контейнеров для доставки лекарств [96,97], 3D биочернил, элементов тканевой инженерии, элементов биодатчиков, продукты питания [98,99], косметику [100,101] и т. п. Синтез микрочастиц обычно протекает по следующей схеме. Сначала происходит упаковка биомолекул, отдельных клеток или иного объекта с необходимыми химическими реагентами (для реакции полимеризации) в отдельные монодисперсные микрокапли эмульсии. Далее происходит воздействие на такие капли (охлаждение или нагрев, УФ засветка, подвод катализаторов реакции и др.), и они полимеризуются и становятся микрочастицами.

Как правило, традиционные методы получения микрочастиц связаны с эмульсионной полимеризацией с использованием роторов / статоров или клапанов-гомогенизаторов высокого давления. Но такие подходы имеют ряд проблем, такие как полидисперсность получаемых микрочастиц, плохая воспроизводимость и отсутствие контроля структуры и свойств.

На Рисунке 1.6.1 приведена иллюстрация разных методов формирования микрочастиц нестандартной морфологии и состава, где капельная микрофлюидика занимает центральное место [19]. Капельной микрофлюидикой возможно получение нескольких типов сферических микрочастиц, различающихся по химическому составу и морфологии: пористые, двусоставные, сегментированные, микрочастицы с оболочками, микрочастицы, содержащие другие микрочастицы и т. п. (Рисунок 1.6.2) [102].

Для создания микрочастиц в микрофлюидных чипах, как правило, используются следующие методы: 1) полимеризация под действием ультрафиолета (УФ), 2) термическая полимеризация, в том числе тепловое разделение фаз, 3) химическая полимеризация, 4) методы направленного разделения фаз, и др. На Рисунке 1.6.3 показаны примеры создания микрочастиц. Как правило, в микрофлюидный чип вводятся дисперсная и непрерывная фазы с требуемыми реагентами. Далее происходит образование капель, в которых полимеризация протекает самостоятельно, или из-за внешних воздействий (УФ засветка капель, нагрев), или за счет диффузии молекул из непрерывной фазы в каплю и т. п. Комбинации химических методов, разных геометрий микроканалов и дополнительных функциональных элементов микрофлюидных чипов (УФ источник, нагревательный модуль и др.) позволяют создавать сложносоставные микрочастицы (Рисунок 1.6.2Б) [19].

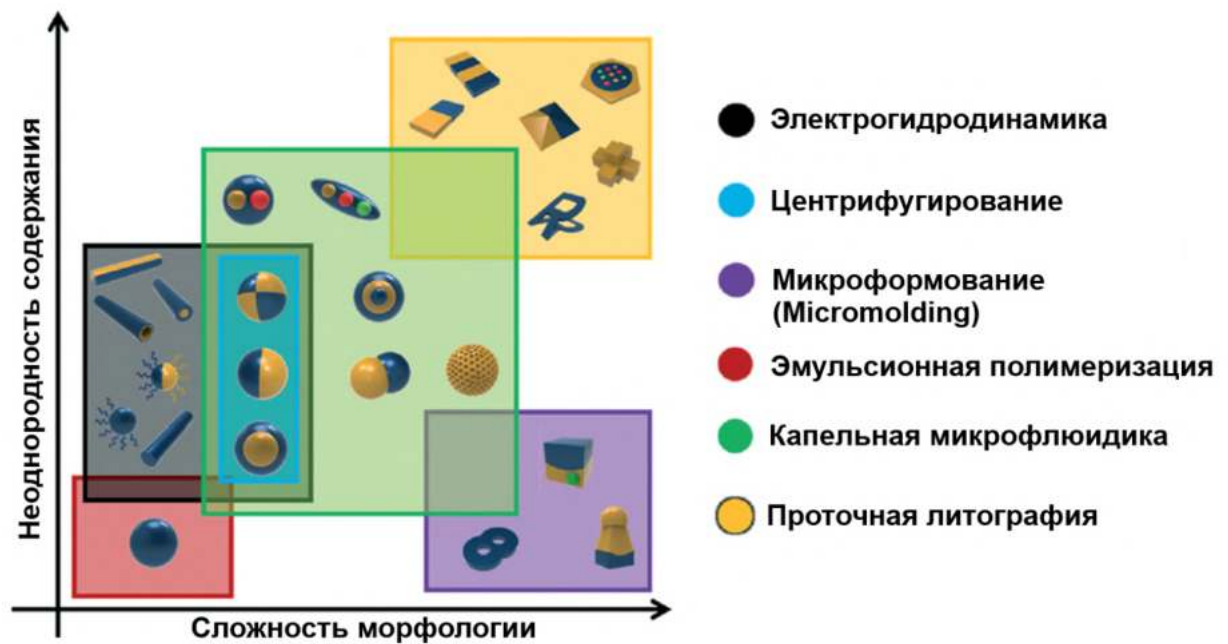


Рисунок 1.6.1 – Иллюстрация методов создания микрочастиц нестандартной морфологии и состава [19].

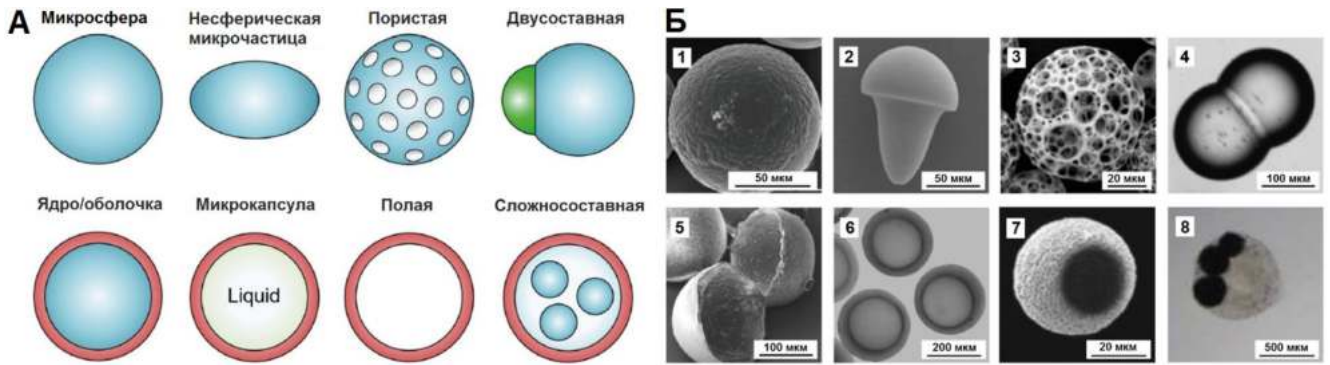


Рисунок 1.6.2 –Биополимерные микрочастицы (МЧ) различной структуры, полученные методами капельной микрофлюидики: А) Схематическое изображение различных типов биополимерных МЧ; Б) Микроскопические изображения 1) микросфер, 2) несферических (грибовидных) МЧ, 3) пористых МЧ, 4) двухсоставные МЧ, 5) МЧ ядро-оболочка, 6) микрокапсулы, 7) полых МЧ и 8) сложных МЧ; [102].

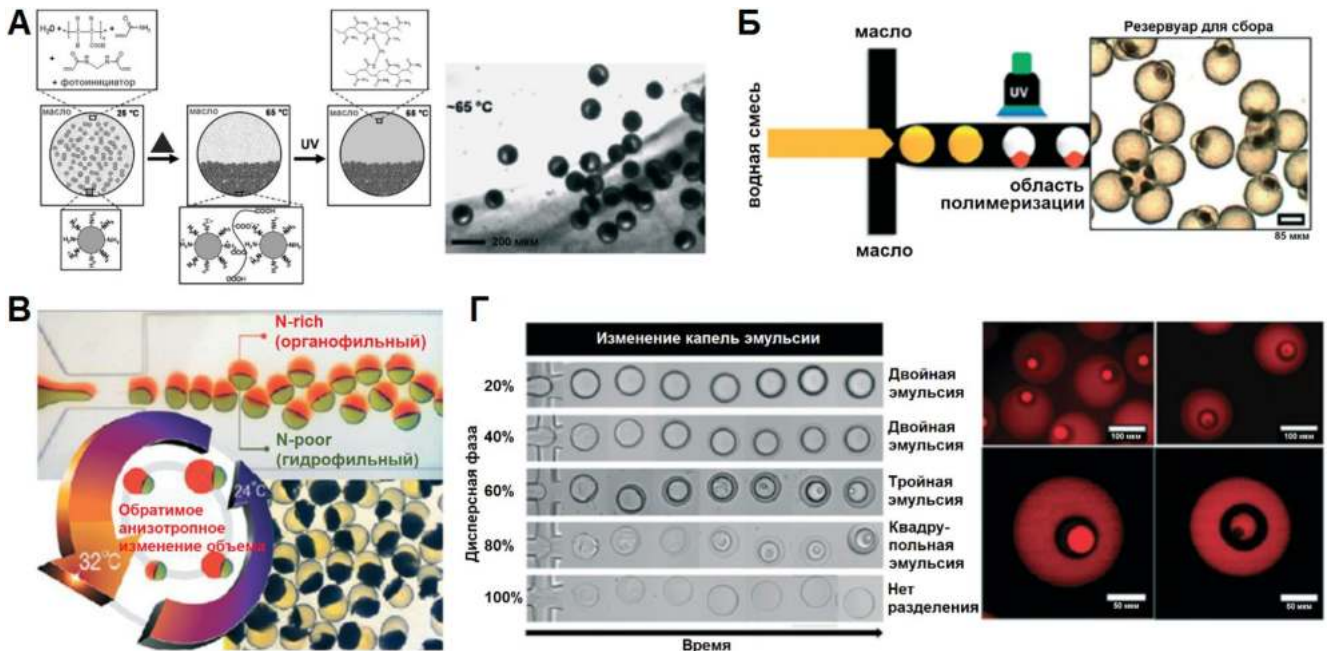


Рисунок 1.6.3 – Методы создания микрочастиц нестандартной морфологии: А) тепловое разделение фаз, Б) ультрафиолетовое направленное разделение фаз, В) мономерное фазовое разделение при помощи перенасыщенного N-изопропилакриламида (NIPAAm), Г) разделения фаз за счет диффузии разделительного агента [19].

Выбор реагентов и тип получаемых МЧ связан с возможностью организации протокола их синтеза в микрофлюидном чипе. Кроме того, если применение микрочастиц подразумевает упаковку в них клеток и их дальнейшее инкубирование, то требуется обеспечивать биосовместимость материала МЧ, контроль микроокружения, рост разных культур вместе и т. п. Для решения таких

биомедицинских задач в рамках микрофлюидных технологий активно применяют различные гидрогели. Условно можно выделить наиболее часто используемые: полиэтиленгликоль диакрилат (PEGDA), альгинат, агароза, коллаген, хитозан, поли N-изопропилакриламид (PNIPAAm). Для целей создания 3D биочернил более пригодны природные полимеры: желатин, коллаген, хитозан, альгинат [103] или лигнин [104].

Несмотря на рост публикаций по теме микрочастиц, выделяется общая тенденция: исследования остаются на этапе разработки. Трудоемкость изготовления МЧ в микрофлюидных чипах замедляет выход готовых коммерчески доступных продуктов. Также микроконтейнеры для использования *in vivo*, например, для доставки клеток или лекарств, для тканевой инженерии, требуют глубокого изучения всех факторов влияния на живые организмы, а также, безусловно, нуждаются в одобрении в системах регулирования на государственном уровне.

При этом для микрофлюидных технологий не до конца проработан вопрос массового производства МЧ (масштабная генерация или параллелизация генерации) [19]. Количество МЧ, изготовленных в одном микрофлюидном генераторе капель, имеет верхний предел частоты образования капель. Так, синтез МЧ на лабораторном уровне является малопродуктивным (например, около 100 г/день). Решение задач по увеличению производительности является важной предпосылкой для коммерциализации, выхода в реальные отрасли, где может требоваться скорость порядка нескольких килограммов в час и выше. Например, для масштабирования синтеза МЧ в микрофлюидных системах используется параллельное размещение нескольких генераторов микрокапель в одном устройстве. Так, в работе Jeong et al. [105] на одном микрофлюидном чипе было размещено 1000 генераторов капель, что обеспечило производительность до 1,5 л/ч с коэффициентом вариации диаметра капель около 6,6%.

Однако существенным препятствием при параллельной генерации капель в одном устройстве является то, что расходы непрерывной и дисперсной фаз

должны быть одинаковы во всех микрогенераторах для образования монодисперсных МЧ. В связи с этим масштабирование протоколов синтеза МЧ является непростой задачей. Поэтому микрофлюидные МЧ пока не нашли широкого применения в коммерческих продуктах. При этом перспективы развития колоссальны, и постепенно появляются реальные приложения. Так, начинающая компания Capsum разрабатывает МЧ для косметических рецептов. BUCHI Labortechnik выпустила на рынок устройство для производства объемных микрокапсул и микрокапсул типа ядро-оболочка из альгината, целлюлозы, желатина и других материалов с производительностью несколько тысяч микрочастиц в секунду (частота генерации несколько кГц) [19].

Таким образом, создание методов формирования сложных микрочастиц является актуальной задачей в капельной микрофлюидике. Важно отметить, что микрочастицы в сочетании с инкубированием в них живых клеток могут расширить возможности технологий 3D биопечати органов или функциональных элементов систем «орган-на-чипе» (например, при разработке новых видов биочернил), экспресс систем тестирования на месте оказания медицинской помощи. Это согласуется с прогнозами компании Yole Department (раздел 1.1), в которых обозначена актуальность развития инструментов для фармацевтических, медико-биологических исследований и систем «Диагностики-на-месте».

1.7. Методы исследования биомолекул и клеток в каплях жидкости

В последнее десятилетие капельная микрофлюидика успешно применялась в молекулярной диагностике для выполнения высокочувствительных анализов, таких как капельная цифровая полимеразная цепная реакция (кцПЦР, ddPCR) [106], петлевая изотермическая амплификация (LAMP) [107], анализ генома одной клетки [13,108,109] и для обнаружения/скрининга активности ферментов [37]. Из-за небольших отклонений в объемах капель (высокая монодисперсность) все реакции проводятся в однородных условиях, что в конечном итоге приводит к высокой воспроизводимости результатов. В индивидуальных каплях эмульсии

«вода-в-масле» продукты реакции в большинстве случаев анализируются с помощью специализированных флуоресцентных ридеров (анализаторов) или сортеров [37]. Хотя для двойных эмульсий (по типу «вода-масло-вода») можно использовать существующие коммерческие сортировщики клеток по флуоресцентному сигналу (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting) [110,111].

Главными преимуществами использования микрокапель в качестве микрореакторов для проведения биохимических реакций, реакций синтеза или детектирования биообъектов являются малый расход реагентов и способность детектировать единичные молекулы [13]. Кроме того, в микрокаплях можно исследовать одиночные микроорганизмы, биомолекулы и клетки [4]. С помощью данного принципа исходную пробу большого объема (от микролитров и выше) можно преобразовать в массив из сотен тысяч, миллионов микрокапель (Рисунок 1.7.1). Инкапсуляция молекул-мишеней в микрокаплях позволяет резко снизить предел обнаружения за счёт локального увеличения концентрации искомого объекта [112]. Для наглядности, удобно сравнить два случая. Первый, когда одна молекула-мишень в 1 мл пробы. Второй, если одна молекула-мишень в пиколитровой капле. Полезный сигнал легче обнаружить во втором случае, где локальная концентрация объекта выше. Таким образом, конвертация большого объема пробы во множество капель (Рисунок 1.7.1) является действенным методом для повышения чувствительности. Кроме того, чем выше эффективная концентрация, тем быстрее протекают реакции и поэтому время анализа в микрореакторах может сократиться до нескольких минут или даже секунд. Для сравнения, характерное время реакции для макросистем составляет несколько часов [113].

Условно можно выделить следующие методы исследования биомолекул и клеток в микрокаплях:

- Визуальные методы, методы оптической микроскопии
- Скрининг клеточных библиотек
- Капельная цифровая ПЦР

- Секвенирование транскриптома одиночных клеток
- Рентгеновская дифракция для изучения кристаллизации белков в каплях



Рисунок 1.7.1 – Компартментализация пробы и ее анализ методами капельной микрофлюидики.

Некоторые из таких методов уже реализуют при разработке прототипов компактных устройств концепции тестирования на месте (Point-of-care). Например, в работе [114] ученые разработали переносимое устройство на базе капельной микрофлюидики для мониторинга уровней глюкозы и лактата в ткани кожи, который сочетает в себе отбор проб жидкости с анализом на месте (Рисунок 1.7.2) с использованием методов «мокрой химии» (wet-chemical assays), взаимозаменяемых в зависимости от целевой биомолекулы. Устройство может отслеживать уровни глюкозы и лактата в кожной ткани у здоровых пациентов-добровольцев. В исследовании показано, что данные полностью согласуются со стандартным анализом.

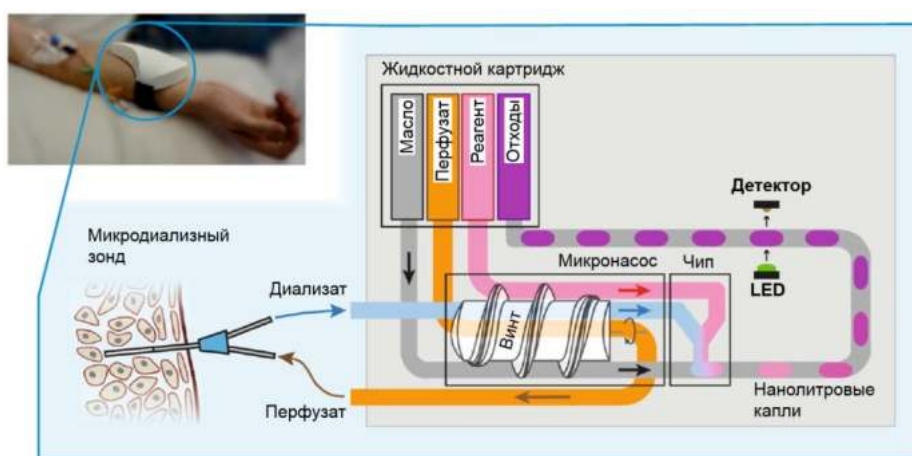


Рисунок 1.7.2. Принципиальная схема переносного биодатчика на базе капельной микрофлюидики [114].

Также примером анализа живых организмов в каплях является работа [115] по использованию иммобилизованного массива микрокапель для скрининга реакции поведения червей *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) на химические вещества.

Важно отметить, что при решении указанных задач существует ряд проблем, начиная от конструкций микрофлюидных чипов и периферийного оборудования до подбора химии (составы фаз, выбор поверхностно-активных веществ). Все это замедляет создание коммерческих устройств и приборов на базе микрофлюидики. Следует понимать, что существующие микрофлюидные продукты являются относительно простыми с точки зрения технологий XXI века, что во многом и обеспечило им выход из академических кругов. Например, система капельной цифровой ПЦР QX200 Bio-RAD. Можно предположить, что ее успех обеспечен проработкой конструкции простых одиночных генераторов капель, созданных в полимерном микрофлюидном чипе, наладке производства таких чипов, в химии макроэмульсии, которая стабильна и термоустойчива. Безусловно, это сложные задачи, и они были решены, как и технология анализа самих капель после реакции. Однако, в общей картине развития микрофлюидики, при усложнении процессов, например, при добавлении новых функций (возможности изменять размер капель по требованию заказчика) или сложных топологий микроструктур, особенно при внедрении функциональных элементов (электродов, магнитов и т. п.) многократно возрастает трудоемкость, и, следовательно, порог выхода из прототипа в готовое решение.

1.8. Уникальные методы использования капель макроэмульсии

Капельная микрофлюидика открывает широкие возможности использования макроэмульсии и синтезированных в них монодисперсных микрочастиц в качестве структурного материала поддержки для клеточных культур во время 3D биопечати, что позволяет создавать на основе микрокапель искусственные клетки, развивать методы регенерации тканей и др. Такие методы

можно считать на данный момент новаторскими и немногочисленными, поэтому ниже по отдельности приводятся ключевые примеры.

1.8.1. Разработка методов регенерации тканей с помощью микрогелевых частиц

Миллионы пациентов страдают от больных или поврежденных тканей. Хотя трансплантация ткани может использоваться для лечения пациентов, ее применение ограничено из-за острой нехватки донорского материала. Поэтому перспективными оказываются методики тканевой инженерии, которые предлагают создание искусственных тканей. В настоящее время популярный подход в тканевой инженерии заключается в выделении и включении клеток пациента в трехмерные каркасы, которые имитируют функции внеклеточного матрикса. Эти нагруженные клетками каркасы могут быть вставлены в пораженную область тела пациента для формирования новой ткани. Материал, составляющий каркас, определяет его физические и биологические свойства, которые необходимо учитывать в зависимости от ткани-мишени. Многие синтетические полимеры, в том числе полигликолевая кислота, полимолочная кислота и полимолочно-гликолевая кислота, уже использовались в качестве каркасных материалов, но они требуют хирургических разрезов для размещения в теле пациента. Напротив, гидрогели, которые представляют собой трехмерные полимерные матрицы, образованные сшиванием гидрофильных гомополимеров, сополимеров или макромеров, могут доставляться в организм минимально инвазивным способом (например, через укол). Кроме того, гидрогели не только биосовместимы, но также структурно и по составу сходны с внеклеточным матриксом. Несмотря на эти благоприятные свойства, инкапсуляция клеток в макроскопических гидрогелях часто приводит к ограниченному контакту клетка-клетка, а также к нарушению обмена питательных веществ из-за снижения их скорости диффузии по каркасу. Эта проблема может быть решена путем образования микрогелевых микросфер или микрогелей, чье большое отношение

площади поверхности к объему способствует эффективному переносу питательных веществ, а также улучшает взаимодействие клетка-матрица, тем самым поддерживая долгосрочную жизнеспособность инкапсулированных клеток [116].

Так, в работе [116] рассматривается ряд публикаций на тему микрогелевых капель для тканевой инженерии. Например, исследователь Н. Ф. Chan и его коллеги разрабатывают методику формирования клеточных сфероидов в каплях двойной эмульсии (Рисунок 1.8.1.1).

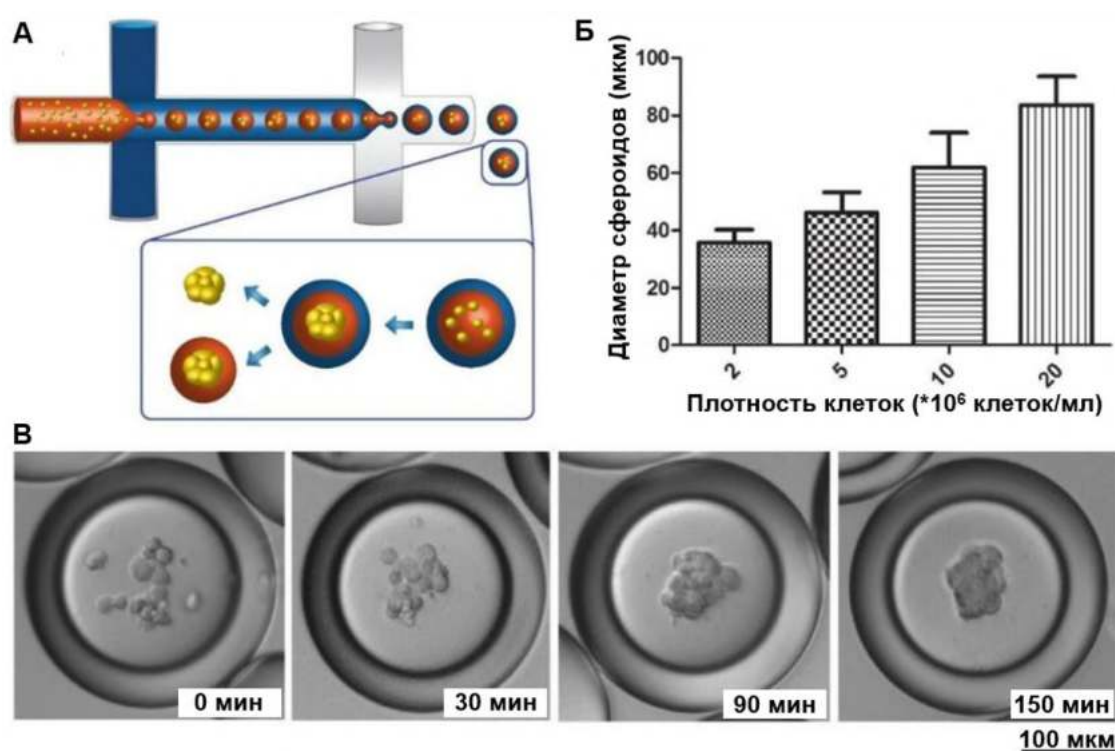


Рисунок 1.8.1.1 – Формирование сфероидов в микрогелевых каплях двойной эмульсии. А) Принципиальная схема генерации капель двойной эмульсии и последующего образования сфероидов. Б) Диаметр сфероидов, измеренный при различной плотности инкапсулированных клеток ($n \geq 50$). (Данные = среднее значение \pm стандартное отклонение). В) Хронология образования сфероидов за 150 мин [116].

Авторы отмечают, что привлекательным вариантом для тканевой инженерии является использование многоклеточных сфероидов в качестве микроканав, особенно со сфероидом стволовых клеток. Но обычные методы изготовления сфероидов имеют низкую производительность и высокую

полидисперсность по размеру. Поэтому ученые предлагают применять гидрогелевые капли двойной эмульсии по типу «вода-в-масле-в-воде» в качестве биореактора пиколитрового объема для быстрой сборки клеток и формирования хорошо контролируемой микросреды для сфероидальной культуры (Рисунок 1.8.1.1). Исследователи указывают, что в таких каплях клетки быстро агрегировали с образованием сфероидов с регулируемым размером 30–80 мкм в течение 150 мин против 1-4 дня для существующих технологий. Далее сфероиды могли быть извлечены из капель с помощью агента для разрушения эмульсий (1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol, Sigma-Aldrich). Кроме того, сфероиды могут быть использованы как отдельные кластеры, так и вместе с внутренней фазой раствора гидрогеля (Рисунок 1.8.1.1А). В качестве примера, ученые осуществили инкапсуляцию мезенхимальных стволовых клеток человека в микрокапли с ядром из альгината или из альгинат-аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты (alginate-RGD) и показали последующее образование сфероидов (Рисунок 1.8.1.1В) из таких клеток и остеогенную дифференцировку. Преимуществами такого подхода является скорость образования сфероидов и точный контроль размеров самих сфероидов. Указывается, что можно получать средние размеры сфероидов 36, 46, 62 и 84 мкм с плотностью 2, 5, 10, и 20 миллионов клеток/мл в каплях двойной эмульсии диаметром около 200 мкм.

В обзорной работе [116] рассматривается концепция микрофлюидного изготовления желатиновых микрогелей, полимеризуемых под действием ультрафиолетового (УФ) излучения в сочетании с нанесением защитного слоя из силикагеля на поверхность микрокапель, чтобы в конечном итоге генерировать желатин-силикагелевые микрочастицы по типу ядро-клетки-оболочка для таких применений, как *in vitro* платформа для культивирования клеток на поверхности микрочастиц и инъекций тканевых конструкций. Микрофлюидный генератор капель с фокусировкой потока (Рисунок 1.8.1.2А), был использован для формирования микрочастиц из желатина метакрилоила (GelMA), с последующим фотосшиванием гидрогеля УФ излучением. Размер микрочастиц можно было

легко контролировать, изменяя соотношение скоростей потока водной и масляной фаз. Затем микрокапли GelMA использовались в качестве основы для культивирования сердечных SP-клеток. Клетки легко прилипали к поверхности микрогеля GelMA и со временем делились, сохраняя высокую жизнеспособность (~90%). Клетки на микрогелевых частицах были также в состоянии мигрировать в некоторой окрестности. Кроме того, с течением времени происходила биodeградация материала частиц.

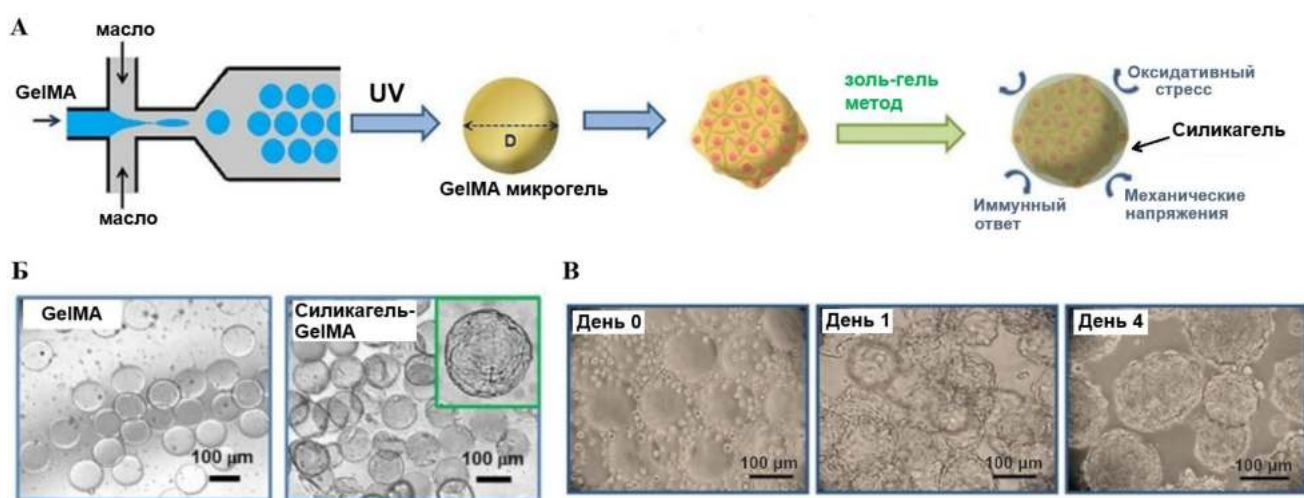


Рисунок 1.8.1.2 – Микрофлюидное изготовление желатин-силикагель сердцевинно-оболочечных микрочастиц для инъекционных тканевых конструкций. А) Процесс изготовления микрокапель GelMA с клетками. Б) Оптические изображения микрогелей GelMA и микрогелей GelMA с силикагелевым покрытием. В) Микроскопические изображения сердечных SP-клеток, культивированных на микрокаплях GelMA [116].

Дополнительно ученые показали, что покрытие клеток на GelMA ядрах-микрокаплях биосовместимым и биоразлагаемым силикагелем с помощью золь-гель-метода обеспечивает их значительную защиту от окислительного стресса, который часто встречается во время инъекции и после нее в ткани хозяина и наносит ущерб клеткам. Тонкая оболочка силикагеля со временем разлагается, не влияя на клеточную активность. Таким образом, авторы предполагают, что их технология может перерасти в платформу для разработки инъекционных тканевых конструкций для различных применений в регенеративной медицине.

1.8.2. Создание искусственных клеток

Создание объектов, которые напоминают и имитируют базовую единицу живого организма, является чрезвычайно сложной задачей. Но в тоже время такой подход предлагает возможность замены дефектных биологических компонентов у людей, страдающих такими патологиями, как диабет, печеночная недостаточность или иммунодефицит, а также новые подходы для понимания устройства живой клетки путем сборки функциональных составляющих по принципу «снизу-вверх», от простого к сложному.

Хотя строгое определение искусственной клетки все еще является предметом дискуссий, в течение прошлого столетия этот термин обычно применялся к любой системе, которая, объединяя природные и синтетические химические компоненты, способна имитировать или замещать клеточные функции. Неудивительно, что искусственные клетки уже нашли применение в качестве заменителей клеток крови и для адресной доставки лекарств. Тем не менее, надежный и высокоэффективный метод генерации искусственных клеток все еще редкость [117].

В работе [118] рассматривается создание искусственных клеток по типу микрокапель-везикул путем инкапсуляции бесклеточной системы экспрессии на основе клеток HeLa в капли двойной эмульсии (Рисунок 1.8.2.1). Бесклеточная система экспрессии млекопитающих способна экспрессировать мембранные белки в бислои или растворимые белки внутри везикул. Для формирования микрокапель-везикул образуются ультратонкие двойные эмульсии, состоящие из летучего эфирного масла в качестве средней фазы (Рисунок 1.8.2.1А), разделяющей внутреннюю капсулированную водную фазу и внешнюю водную фазу. Фосфолипиды Liss-Rhod-PE, растворенные в средней масляной фазе, во время формирования микрокапель собираются на внешней и внутренней границах раздела фаз вода-масло и стабилизируют макроэмульсию. После испарения летучего масла внешний слой липидов объединяется с внутренним, и образуется везикула.

В итоге, такой метод использовали для создания везикул, экспрессирующих цитозольный зеленый флуоресцентный белок (GFP) и механочувствительные мембранные белки (MscL), объединенным с С-концом GFP. Зеленый флуоресцентный сигнал от цитозольного GFP на конфокальных изображениях подтвердил, что цитозольные GFP были экспрессированы и равномерно распределены внутри липосомы (Рисунок 1.8.2.1Б верхний ряд). В эксперименте, экспрессирующем MscL-GFP, флуоресцентный сигнал был обнаружен на мембране и показал вставку MscL в липидный бислой везикулы (рис. 1.8.2.1Б нижний ряд). Такой подход иллюстрирует технологию конструирования искусственных клеток путем включения цитозольных или мембранных белков в микрокапли сложной морфологии. Поскольку искусственная клетка может экспрессировать только заданные белки, она может выступать в виде некой платформы для исследования биологических процессов в упрощенной и контролируемой среде.

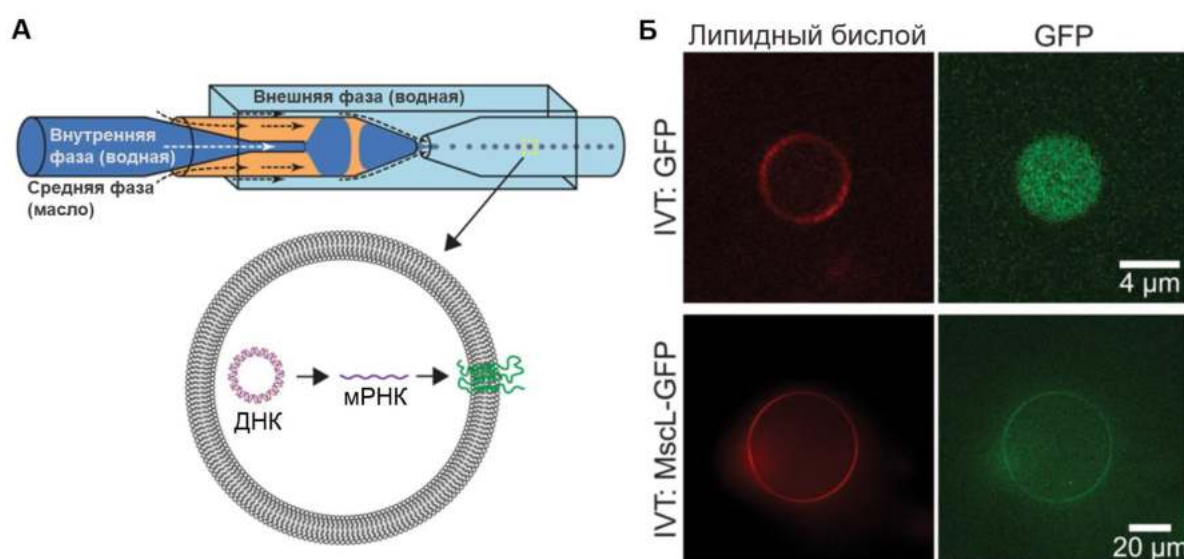


Рисунок 1.8.2.1 – А) Схема создания искусственных клеток методом двойной эмульсии. Б) Конфокальные изображения везикул, экспрессирующих либо растворимый GFP (верхний ряд), либо Gsc-метку MscL (нижний ряд). Везикулы содержали липиды Liss-Rhod-PE, так что липидную мембрану можно визуализировать (левый столбец) [118].

Тем не менее, существуют некоторые ограничения таких систем. Во-первых, реакционные субстраты ограничены объемом микрокапли, и экспрессия

белка будет устойчивой только в течение нескольких часов. Во-вторых, если не использовать генетические схемы (Genetic circuits), не будет контроля над тем, сколько белка будет экспрессировано с течением времени. Однако в данной работе ученые на основании концентрации GFP оценили число копий GFP $\sim 71\,000$ в капле диаметром 10 мкм. Этот уровень производства белка почти совпадает со средним числом копий белка на одну клетку, найденным в исследовании, которое количественно определяло продукцию белка в масштабе всего генома [119]. В-третьих, трудоемкость методики создания микровезикул методами капельной микрофлюидики.

1.8.3. Моделирование элемента органа в микрокапле

Исследователь Q. Chen и его коллеги [21] сообщили в 2016 году о новаторском подходе по созданию гидрогелевых микрочастиц, которые позволяют организовывать разные типы клеток в тесном контакте друг с другом для формирования искусственных органов.

На примере микрочастицы с оболочкой была смоделирована микроткань печени. Такие объекты представляют интерес для исследования межклеточных взаимодействий. В работе используется микрофлюидный чип (Рисунок 1.8.3.1) для формирования микрочастиц по типу ядро-оболочка. За счет специально подобранных фаз происходит формирования гидрогелевой оболочки вокруг ядра. Для этого применяется альгинат натрия, способный при контакте с ионами кальция Ca^{2+} образовывать гидрогель. Инкапсуляция клеток в ядро и оболочку создает инструмент для сборки гепатоцитов и фибробластов в трехмерный каркас ядра и оболочки, что и позволяет образовывать искусственную микропечень в каждой микрочастице. Высокая проницаемость гидрогелевой оболочки позволяют клеткам в сфероидах жить и развиваться в течение длительного времени. В оптимизированной микромасштабной структуре, которая способствует образованию как гомотипических, так и гетеротипических межклеточных взаимодействий, совместное культивирование гепатоцитов в ядре, окруженном

фибробластами в оболочке, успешно выражает специфические функции печени. Такие структуры могут быть перспективными моделями печени *in vitro* для высокопроизводительных анализов скрининга лекарств. Кроме того, гепатоциты и фибробласты могут быть легко заменены другими клетками для конструирования других моделей тканей и изучения межклеточного взаимодействия других типов клеток.

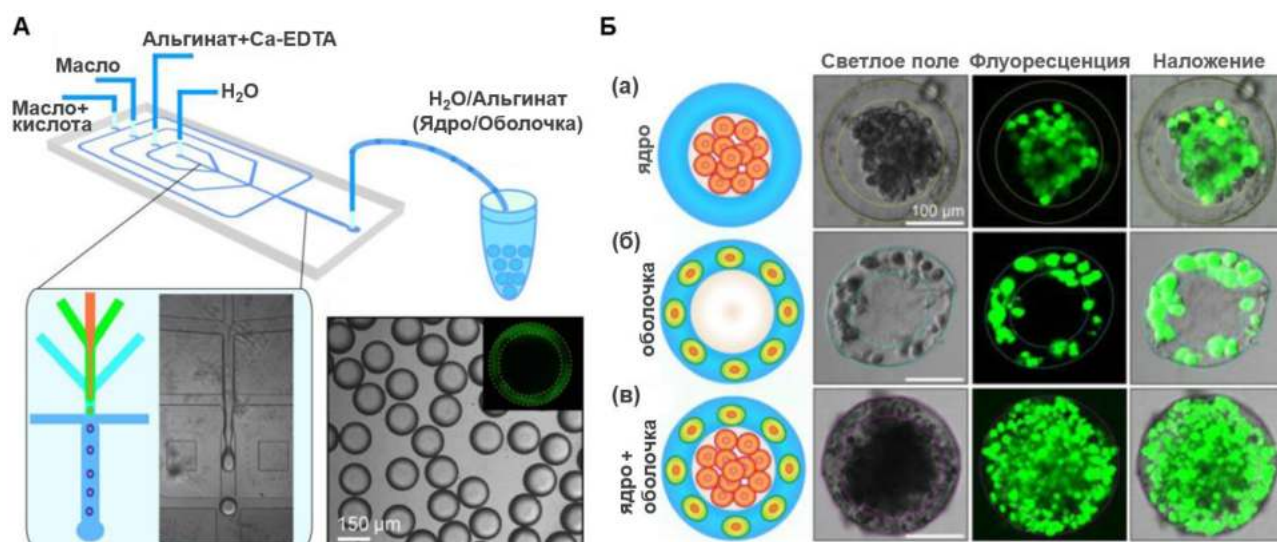


Рисунок 1.8.3.1 – А) Формирование гидрогелевых микрочастиц по типу ядро-оболочка при помощи сшивания альгинатных сетей в присутствии ионов кальция Ca^{2+} . Б) Пространственное размещение различных клеток в трехмерном каркасе микрочастицы с ядром и оболочкой. а) Клетки HepG2 ограничены в ядре оболочкой из гидрогеля. б) Фибробласты NIH-3T3, иммобилизованные сшитой альгинатной сеткой в оболочке. в) Одновременная сборка гепатоцитов в ядре и фибробластов в оболочке, образующих в микрочастице искусственную печень. Жизнеспособность клеток проверялась набором для окрашивания Calcein AM / EthD-1 [21].

1.8.4. 3D биочернила на основе гидрогелевых микрочастиц

Согласно профилю PhRMA биофармацевтических исследований за 2015 год на создание одного лекарства уходит от 10 лет и менее 12% кандидатов проходят все тестирования и выходят на рынок. Если в 1970-х годах стоимость разработки лекарства составляла 179 млн долларов (в эквиваленте доллара 2013 года), то к 2010-м годам уже рекордные 2,6 млрд долларов (в эквиваленте доллара 2013 года). Сложности создания новых препаратов обусловлены неидеальностью моделей для тестирования лекарства. До сих пор основными моделями для

тестирования являются клеточные культуры и животные. При этом для клеточных культур сложно создать реальное природное микроокружения, а результаты не показательны в полной мере для целого организма. Для животных, где результаты также не показательны в полной мере, нет прямого (real-time) наблюдения внутренних процессов, а также присутствуют серьезные этические вопросы.

Такие проблемы стимулируют разработки искусственных систем, а именно, создание трехмерной модели органов и систем «орган-на-чипе» [120]. Для сведения, системы «орган-на-чипе» занимаются моделированием одного функционального элемента органа или нескольких, или даже сразу целой группы органов, максимально стараясь повторить всю связку процессов в живом организме *in vitro*. Это позволяет максимально визуализировать все процессы и точнее отслеживать параметры живых функциональных единиц. Помимо тестирования лекарственных препаратов такой подход развивает технологии персональной медицины, которые представляют собой совокупность методов профилактики патологического состояния, диагностики и лечения болезни, основанных на индивидуальных особенностях пациента, на анализе его уникальных клеток и органов.

Технология 3D биопечати занимается созданием объёмных моделей на клеточной основе, при которой сохраняются функции и жизнеспособность клеток. Задача максимум состоит в том, чтобы искусственно выращивать полноценные органы или ткани, готовые для трансплантации или других исследований. Для развития данной технологии остро стоит вопрос материала печати – биочернил, которые должны быть биосовместимыми, выдерживать определенные нагрузки, безопасно разлагаться со временем и т. п.

В работе К. Pataky и его коллег [20] предлагается струйный метод печати органов с использованием альгинатных микрочастиц (Рисунок 1.8.4.1). Ученые показывают возможности биопечати, аналогичные промышленному быстрому прототипированию, и оптимизируют процесс гелеобразования микрочастиц.

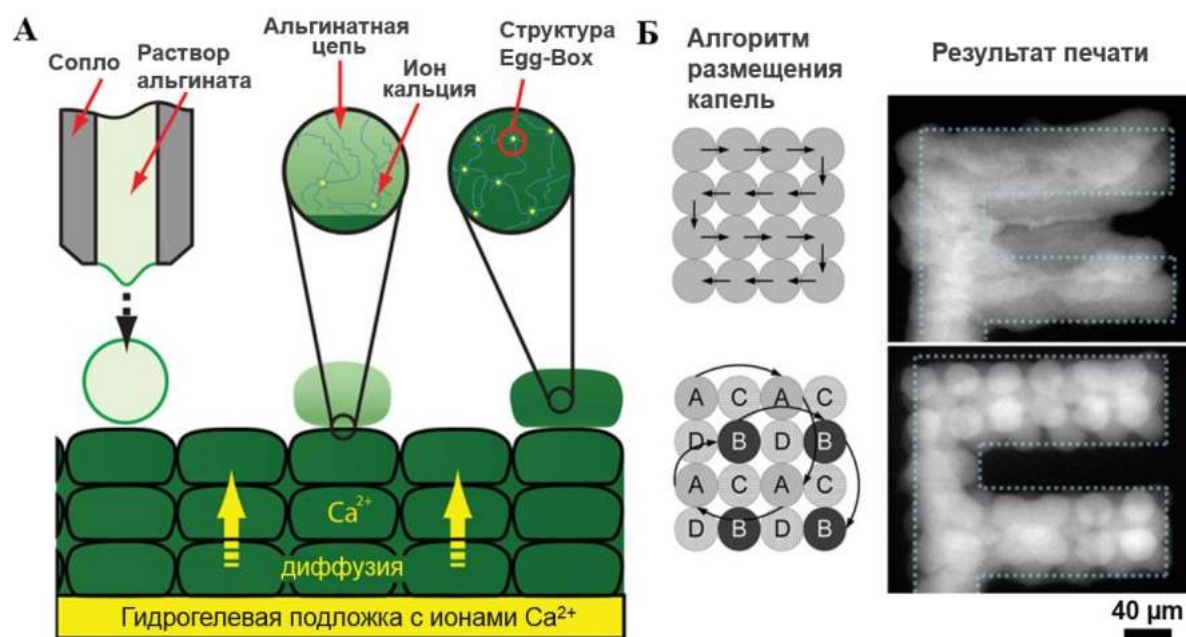


Рисунок 1.8.4.1 – А) Принцип 3D биопечати на основе микрочастиц альгината натрия. Б) Качество формируемого объекта зависит от алгоритма печати [20].

Альгинатные микрокапли печатаются на желатиновой подложке, нагруженной хлоридом кальция CaCl_2 . В процессе печати с подложки диффундируют ионы кальция Ca^{2+} , которые при взаимодействии с альгинатными микрокаплями сшивают их в гидрогелевые микрочастицы. Микрокапли на верхних слоях образуют гель за счет ионов, диффундирующих через нижележащие слои гелеобразного альгината. Оптимизация объема напечатанных микрокапель зависит от концентрации ионов кальция. На Рисунке 1.8.4.1Б показано влияние способа печати. Сверху: 2D-объект, напечатанный путем размещения капель в ряд с частотой 5 Гц. Потеря четкости происходит из-за слияния частично желатинизированных соседних капель. Снизу: тот же 2D-объект, напечатанный путем разделения слоя на подгруппы капель. Капли печатаются не друг за другом, а специальными подгруппами. Коалесценция исключается, потому что между печатью соседних капель проходит десятки секунд, а перекрытие между соседними каплями сведено к минимуму.

На данный момент большое распространение получили биочернила на основе сфероидов из клеток, созданных на специальных луночных (в виде полусфер) планшетах. Методика состоит в том, что сначала формируются

сфероиды в лунках планшета, а затем они с клеточным буфером загружаются в 3D манипулятор-принтер для последующей печати. Простота технологии обеспечила готовые технические решения (например, принтер Fabion от компании 3D Bioprinting Solutions). Однако необходимость использования планшетов ограничивает масштабы и сроки изготовления разных биочернил, а минимальные размеры сфероидов составляют порядка 150-250 мкм, что влияет на детализацию создаваемого органа. Поэтому методы создания биочернил на основе капельной микрофлюидики будут все более и более востребованными, ведь конечная цель биопечати – это хорошо детализированный полноценный орган. Кроме того, полноценный орган гетерогенен по клеточному составу, что требует наличия и возможности одновременной печати несколькими типами биочернил. Все это объясняет основные преимущества использования методов капельной микрофлюидики для создания биочернил на основе гидрогелевых микрочастиц.

1.9. Основная приборная база для формирования капель эмульсии в микрофлюидных устройствах

Указанный выше потенциал микрокапель напрямую зависит от способа управления и контроля потоками реагентов в процессе их генерации в микрофлюидных чипах. Французская компания-производитель микрофлюидного оборудования Elveflow, являющаяся лидером на рынке микрофлюидного оборудования, провела исследование [121] с целью выяснить какие устройства наиболее распространены среди ученых, работающих в области капельной микрофлюидики.

В исследовании указывается, что для формирования монодисперсных эмульсий в микрофлюидных устройствах исследователи должны выбирать между двумя типами ввода жидкостей: при постоянном расходе $Q=\text{const}$ и при постоянном давлении $\Delta P=\text{const}$. Это позволяет точно контролировать потоки дисперсной и непрерывной фаз независимо от выбранной геометрии микрофлюидного чипа.

Компания опросила 100 исследователей из лабораторий, работающих в области капельной микрофлюидики, какое оборудование они использовали для контроля потоков в своих экспериментах. Результаты опроса представлены на рисунке 1.9.1.

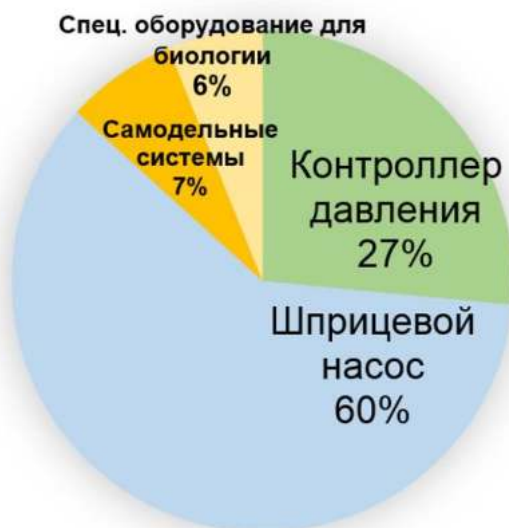


Рисунок 1.9.1 – Распространенность оборудования для контроля потоков жидкостей при формировании монодисперсных эмульсий в микрофлюидных устройствах. Исследование компании Elveflow основано на добровольных ответах 100 исследователей, работающих в области капельной микрофлюидики [121].

Так, значительное количество исследователей (~60%) использует шприцевые насосы для контроля потоков в своих экспериментах по образованию и управлению движением капель. Примерно 27% исследователей выбирают контроллеры давлений для ввода жидкостей в микрофлюидные чипы. Четверть пользователей систем контроля давления отмечают, что используют обе указанные технологии одновременно. Интересно, что некоторые из опрошенных исследователей создали собственные системы ввода жидкостей (~7%), используя гидростатическое давление или герметичные баллоны с клапанами. А часть исследователей (~6%) применяют специальное оборудование для биологии при работе с микрокаплями.

Таким образом, в настоящее время в основном используются два подхода по управлению потоками жидкости в микрофлюидных чипах: контроль расходов (~60%) и контроль давлений (~27%).

К преимуществам шприцевых насосов относят простоту настройки и управления, мониторинг расходов потоков, коммерческую доступность. Для сравнения, сильными сторонами контроллеров давления являются простота настройки и контроля, быстрое время стабилизации для большого диапазона скоростей (<50 мс), отсутствие пульсаций потока. Также одним из основных преимуществ является возможность дозирования жидкостей объемами от нескольких микролитров до нескольких литров с одинаковыми характеристиками – нет зависимости от объема, возможен контроль жидкости в тупиковых каналах.

К недостаткам шприцевых насосов относятся длительное время реакции системы при изменении расхода (от секунд до минут), возникновение пульсаций потока жидкости, вызванных неравномерностью движения поршня шприца при низкой скорости потока, что может приводит к увеличению вариации объема формируемых капель [122], сильная зависимость точности расходов и диапазона доступных скоростей потоков от объемов шприцов, несовместимость с системой пневматических клапанов внутри микрофлюидных чипов. Для сравнения, слабая сторона контроллера: отсутствие у регуляторов давлений возможности измерять расходы потоков, что не позволяет учитывать во время работы микросистем изменения гидравлических сопротивлений микроканалов, которые сильно влияют на скорость потоков [123]. Однако такой недостаток можно преодолеть с помощью установки обратной связи с помощью датчиков расхода жидкости (например, MFS от компании Elveflow).

Из указанного выше, критическим моментом применения шприцевых насосов в микрофлюидных устройствах является то, что в силу конструктивных особенностей объем шприца оказывает влияние на точность расходов и на диапазон возможных скоростей потоков. Для большого расхода потока требуется, чтобы объем шприца был большим, что не позволяет получить нужной точности

при работе с таким шприцем на малых расходах, и наоборот. Для каждой задачи требуется подбирать объем шприца. Для сравнения, при работе с контроллером давлений нет зависимости точности расходов от объема емкостей с пробой, потому что управление идет через поддержание постоянного заданного давления. Также шаговый мотор в шприцевых насосах может приводить к пульсациям.

Однако формирование капель макроэмульсии определяется капиллярным числом [124], которое зависит от скорости, которая в свою очередь зависит от расходов потока, следовательно, если используется шприцевой насос, то автоматически происходит контроль расхода, потому что прибор так устроен изначально, он работает с расходами жидкости в шприцах. А если используется контроллер давления, то расход задается давлением, но при этом нет контроля за изменениями гидравлического сопротивления, которое может изменяться со временем. Для этого требуется ставить дополнительно расходомеры. Также представляет большой интерес изучить явления, которые будут происходить, в случае если не будет контроля за гидравлическим сопротивлением.

Для исследователей, работающих в области микрофлюидики, несколько компаний, такие как Elveflow, Fluigent и Dolomite-microfluidics, разработали набор периферийного оборудования на основе шприцевых насосов и/или контроллеров давления для контролируемого ввода жидкостей в микрофлюидные устройства. В качестве альтернативы коммерческим продуктам исследователями был создан интернет репозиторий с открытым исходным кодом под названием Metafluidics, где разработчики могут делиться проектами, спецификациями сборки и программным обеспечением с открытым исходным кодом своих микрофлюидных устройств [125]. Сейчас существует ряд проектов, которые активно используют 3D-печать, коммерчески доступные компоненты и даже блоки по типу LEGO для изготовления перистальтических [126,127], шприцевых систем [128–130], контроллеров давлений [131,132], микрофлюидных систем по управлению единичными каплями [133], соединителей [134,135], камер [136], компактных устройств для визуализации и анализа микрокапель [137]. Но эти решения обычно

довольно крупногабаритные, требуют калибровки, не являются гибкими и удобными для пользователя. Таким образом, они в основном предлагаются для продвинутых пользователей микрофлюидных систем и часто требуют дополнительной доработки и оптимизации для запланированных экспериментов.

Отдельного изучения заслуживают системы по формированию микрокапель отрицательным давлением, прикладываемым к выходному каналу микрофлюидного чипа. Такой подход при должной проработке гидравлических сопротивлений микроканалов способен значительно упростить периферийное оборудование, необходимое для функционирования микрофлюидного устройства. Это особенно важно при формировании сложных эмульсий или микрочастиц, при синтезе которых требуется контролировать более трех потоков жидкости [21]. Практика показывает, что даже микрофлюидные контроллеры и шприцевые насосы крайне неэффективно решают такие задачи. Более того, сочетание положительного и отрицательного давления, прикладываемого к устройству, может обеспечить дополнительные функции, такие как создание капель по запросу [138]. Для применения в системах Point-of-Care специальный вакуумный модуль [139] может быть компактно интегрирован в микрофлюидный чип.

Однако метод с использованием отрицательного давления является до сих пор слабо проработанным – существуют работы по типу «proof-of-concept» (проверка концепции), но в них применяются или ручные методы создания отрицательного давления [140,141], или отсутствует его контроль, слабо исследованы зависимости размера микрочастиц и частоты их формирования от прикладываемого давления и гидравлических сопротивлений микроканалов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

На основании проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод о том, что капельная микрофлюидика является перспективным и популярным инструментом в решение задач биотехнологий, медицинской диагностики, синтеза функциональных микрочастиц и т. п. Её ключевое

преимущество в сравнении с традиционными методами эмульгирования заключается в контролируемой инкапсуляции от фемто- до нанолитровых объемов компонентов реакций в монодисперсные капли эмульсии. А сочетание с технологиями микроэлектроники, химии, биотехнологии и наук о материалах открывает возможности по созданию микрофлюидных чипов и аналитических микрофлюидных платформ, где можно контролируемо формировать капли и манипулировать ими, а также организовывать в пределах миниатюрного устройства целый ряд этапов анализа: инъекция пробы, подготовка пробы, разделение, обнаружение и другие. Реализация традиционных методов биохимического анализа или химического синтеза на микрометровом масштабе позволяет снижать время анализа и расход реагентов, повышать чувствительность детектирования вплоть до единичных молекул, создавать монодисперсные микрочастицы с заданными свойствами и составом, что в конечном итоге приводит к снижению стоимости проведения исследований, анализов и открывает возможности создания компактных переносных тест систем, биосенсоров, а также новых материалов и т. д.

Особенный интерес вызывают монодисперсные гидрогелевые микрочастицы, которые можно применять для систем орган-на-чипе или в качестве новейших 3D биочернил. Для них ключевой проблемой является разработка способов реализации протокола синтеза таких микрочастиц в микрофлюидных чипах, а также дальнейшее их производство в промышленных масштабах.

Несмотря на наличие реальных компаний в сфере микрофлюидики, и роста числа публикаций в научных журналах, большинство работ и технологий носят более научный, академический, чем прикладной характер. А сам круг компаний сильно органичен. Это обуславливается трудоемкостью создания микрофлюидных чипов, сложностью организации процессов, протекающих в микросистемах, затратами на обучение персонала и периферийное оборудование. Также области применения (медицина, биотехнологии) капельной

микрофлюидики накладывают определенные требования на создаваемые устройства и материалы к ним: биосовместимость, термоустойчивость, химическая устойчивость, стабильные свойства поверхности и т. п. Поэтому вопросы упрощения технологий, их удешевления и снижения габаритов приборов остаются актуальными до сих пор. Отдельно стоят вопросы стандартизации и сертификации подобных систем на государственном уровне.

Анализ приборной базы по формированию микрочастиц, а также литературные источники показывают, что существует запрос на создание автоматизированных систем по управлению потоками жидкости в микрофлюидных чипах. Особенно на разработки систем с «открытым исходным кодом» (open-source), отличающихся от аналогов низкой стоимостью и наличием дополнительных функций. При этом формирование эмульсий в микрофлюидных чипах является нелинейным многопараметрическим процессом, для которого полноценной математической модели не существует, поэтому требуются как разработки новых чипов, так и экспериментальные исследования процессов формирования стабильных монодисперсных макроэмульсий в них для получения воспроизводимых результатов.

При этом для сложных протоколов по созданию микрокапель (например, по типу «вода-масло-вода») или микрочастиц (например, по типу ядро-оболочка) требуется управление множеством входных потоков жидкостей (от 3х и более). Это требует, как минимум трехканальных регуляторов давления или 3-х отдельно управляемых шприцов, а также точной настройки всех компонентов экспериментальной установки. Практика показывает, что даже автоматизированные микрофлюидные контроллеры и шприцевые насосы крайне неэффективно решают такие задачи. Чтобы преодолеть эти ограничения и упростить образование капель, был предложен метод введения жидкостей в микрофлюидное устройство путем создания в выходном резервуаре отрицательного давления. Такой подход при должной проработке гидравлических сопротивлений микроканалов способен значительно упростить периферийное

оборудование, необходимое для функционирования микрофлюидного устройства. При этом метод с использованием отрицательного давления является до сих пор слабо проработанным – существуют работы по типу «proof-of-concept» (проверка концепции), но в них применяются методы, основанные на использовании шприца в «ручном» режиме, или подобные, но при которых не производится контроль давления на выходе. Также недостаточно исследованы зависимости размера микрочастиц и частоты их формирования от прикладываемого давления и гидравлических сопротивлений микроканалов.

Кроме того, не существует единого подхода в выборе элементов для быстрого перемешивания реагентов в микрокаплях при проведении биохимических реакций в микрофлюидных чипах, удовлетворяющих всем требованиям и пригодными для всех приложений. Поэтому требуется разрабатывать новые методы перемешивания, осуществлять поиск компактных и эффективных способов перемешивания, лишенных недостатков потребления энергии и сложности изготовления.

Таким образом, актуальным является разработка микрофлюидной платформы, включающей в себя микрофлюидный чип для формирования капель эмульсии, систему перемешивания реагентов, систему ввода и управления жидкостями и методики их использования для синтеза микрочастиц. А в виду перспективы развития новых материалов для тканевой инженерии тестирование такой платформы логично проводить на примерах упаковки клеток в микрокапли и синтеза гидрогелевых микрочастиц.

Подводя итог, целью работы являлась разработка и апробация микрофлюидной платформы для синтеза монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- Разработка и изготовление экспериментальных образцов микрофлюидных чипов для формирования макроэмульсий «вода-в-масле» и гидрогелевых микрочастиц.

- Разработка и апробация автоматизированной системы управления потоками жидкости в микрофлюидном устройстве. Сравнение режимов формирования монодисперсных эмульсий при вводе жидкостей в чип при постоянном давлении и постоянном расходе.
- Разработка способа формирования монодисперсных макроэмульсий отрицательным давлением с разными регуляторами потока воздуха.
- Исследование эффективности пассивного перемешивания жидкостей в асимметричных генераторах микрокапель.
- Разработка методов формирования и характеристика гидрогелевых микрочастиц из полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA), полиакриламида, желатин метакрилоила (GelMA), альгината натрия и агарозы при помощи разработанной микрофлюидной платформы.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе представлены разработки микрофлюидных систем по формированию монодисперсных макроэмульсий: 1) микрофлюидный контроллер давлений и 2) устройство генерации капель отрицательным давлением. Приводятся исследования характеристик и возможностей таких систем на каплях по типу «вода-в-масле», изучаются режимы по стабильному формированию макроэмульсий. Выполняются этапы по изготовлению экспериментальных образцов микрофлюидных чипов. Исследуется эффективное перемешивание в микрокаплях. Изучаются способы создания различных гидрогелевых микрочастиц при помощи разработанных устройств. Также, на примере микрочастиц из полиакриламида и полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA) исследуются свойства полученных микрочастиц.

2.1. Формирование макроэмульсии

2.1.1. Базовые принципы образования капли

В данной работе используются пассивные микрофлюидные генераторы для формирования микрокапель. На образование капель влияют соотношения межфазных, вязких и инерционных сил. Характеристическое число Вебера описывает баланс между силами поверхностного натяжения и силами инерции. Число Вебера определяется по формуле:

$$We = \frac{\rho V^2 L}{\gamma},$$

где ρ – это плотность жидкости, V – скорость потока, L – характерный размер канала (гидравлический диаметр), γ – поверхностное натяжение между двумя фазами. Величина L вычисляется по формуле $L=4A/P$, где A – площадь сечения канала, P – периметр канала [142].

Если число Вебера больше критического $We > 12$, то стабилизирующие силы поверхностного натяжения меньше, чем гидродинамические, и может наблюдаться распад дисперсного потока на капли в непрерывной фазе [142].

Однако такие значения характеристического числа верны для жидкостей с низкой вязкостью. Число Вебера не зависит от вязкости жидкости, хотя формирование капель от нее также зависит. Чтобы принять во внимание влияние вязкости, рассматривают характеристическое число Онезорге [142]. Оно характеризует отношение сил поверхностного натяжения к инерционным силам (с учетом вязких сил).

В работе [124] показывается, что диаметр капель зависит от соотношения капиллярных чисел дисперсной и непрерывной фаз, которые линейно пропорциональны расходам. Капиллярное число Ca характеризует соотношение сил поверхностного натяжения и вязких сил:

$$Ca = \frac{\eta V}{\gamma},$$

где V – скорость потока, η – динамическая вязкость среды, γ – поверхностное натяжение между двумя фазами.

При числах $Ca < 10^{-2}$ вязкие силы слабее сил поверхностного натяжения, на образование макроэмульсий влияют скорости потоков непрерывной и дисперсной фаз. Если нет дополнительных деформаций, вызванных конструктивными особенностями микросистемы, то капли формируются сферической формы. При сравнительно больших Ca сильнее оказываются вязкие силы, и тогда поток может деформировать капли, приводя к асимметричным, несферическим формам [143].

Число Вебера можно переписать так: $We = Ca \cdot Re$, где $Re = \rho VL / \eta$ – число Рейнольдса. В типичных микроканалах число $Re < 1$, следовательно, $We / Ca < 1$, то есть в микрофлюидных системах главенствующими являются межфазные эффекты, а процесс формирования капель в основном описывается капиллярным числом.

Таким образом, формирование капель обусловлено деформацией интерфейса на границе раздела фаз и следующей за этим нестабильностью дисперсного потока [67]. На размер капель, а также на их движение, влияет целый ряд параметров: поверхностное натяжение, вязкость жидкостей,

гидрофильность/гидрофобность стенок микроканалов, конструкция микроканалов, скорости потоков и др.

2.1.2. Состав макроэмульсий и их характеристики

На Рисунке 2.1.2.1 изображен пример монодисперсной макроэмульсии по типу «вода-в-масле». В данном случае, приведены капли деионизованной воды (Millipore Milli-Q) в минеральном масле (mineral oil light, Sigma-Aldrich) с 3,1% ПАВ Abil EM180.

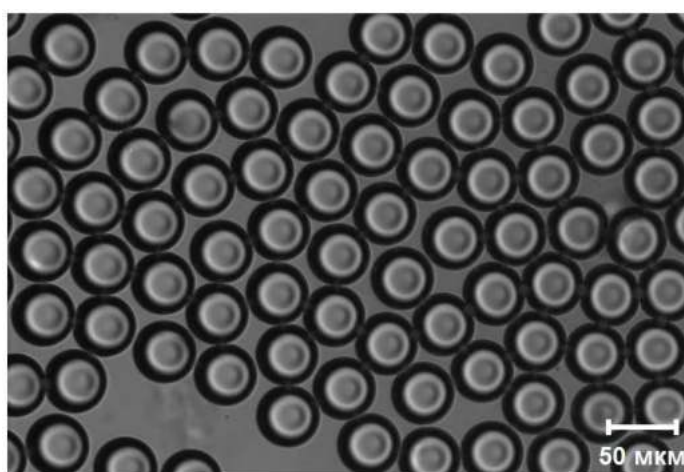


Рисунок 2.1.2.1 – Иллюстрация монодисперсной макроэмульсии по типу «вода-в-масле».

Основными характеристиками макроэмульсий являются диаметр микрокапель и частота их образования (капель/с), устойчивость к внешним воздействиям (температура, давление, механическое воздействие).

Для изучения формирования капель по типу «вода-в-масле» в качестве непрерывной фазы использовалось легкое минеральное масло (mineral oil light, Sigma-Aldrich) с добавлением различной концентрации от 3% до 5% ПАВ Abil EM180 (Evonik Nutrition & Care GmbH). Дисперсионной фазой являлась деионизованная вода (получена на приборе Millipore Milli-Q). Выбор указанного минерального масла обусловлен его коммерческой доступностью и инертностью. Выбор ПАВ обусловлен термостабильностью и биосовместимостью. Для

формирования гидрогелевых микрочастиц дополнительно использовался ПАВ Span 80.

ПАВ требуется для стабилизации макроэмульсии и предотвращения её коалесценции. Принцип действия ПАВ заключается в снижении поверхностного натяжения между фазами. Уменьшение натяжения происходит за счет образования ориентированного слоя молекул ПАВ между двумя фазами (Рисунок 2.1.2.2А). Без ПАВ эмульсия стремится к минимизации поверхностной энергии, что приводит к слиянию соприкасающихся капель. Добавление ПАВ снижает поверхностное натяжение в системе и создает потенциальный барьер, предотвращающий коалесценцию эмульсии. При помощи метода «висячей капли» [144] для данного ПАВ Abil EM 180 была измерена зависимость поверхностного натяжения γ границы раздела между водой и маслом с добавлением ПАВ в зависимости от концентрации ПАВ в масле (Рисунок 2.1.2.2Б). Каждое значение поверхностного натяжения было измерено три раза. На графике показаны средние величины натяжения. Относительная погрешность не превышает 10%.

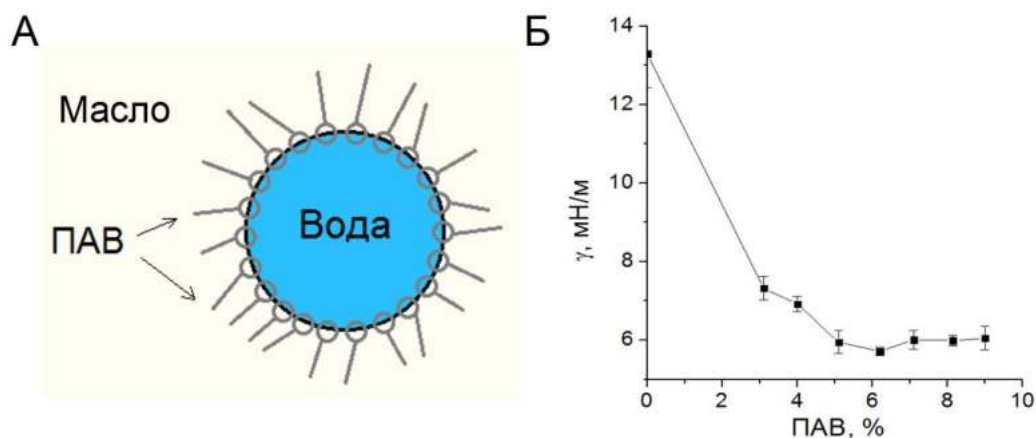


Рисунок 2.1.2.2 – А) Схематическое изображение капли воды в масле с ПАВ. Б) Зависимость поверхностного натяжения от концентрации ПАВ в минеральном масле. Вертикальные отрезки обозначают погрешность измерений с доверительной вероятностью 0,95.

Из графика (Рисунок 2.1.2.2Б) можно сделать вывод, что при отсутствии ПАВ (0%) поверхностное натяжение имеет относительно большое значение и каплям энергетически выгодно объединяться. Добавление ПАВ резко снижает поверхностное натяжение (до 1,9 раза при 3-4% ПАВ). При высоких

концентрациях ПАВ зависимость выходит на плато – поверхностное натяжение слабо меняется.

Дополнительно, чтобы получать стабильное формирование макроэмульсии «вода-в-масле» стенки микроканалов должны быть гидрофобными – отталкивать от себя воду. И наоборот, для капель «масло-в-воде» стенки должны быть гидрофильными. В данной работе для гидрофобизации стенок микроканалов использовалось жидкое водоотталкивающее вещество ClearVue Rain Repellent (Turtle Wax Inc.), для которого экспериментально установлено, что угол смачивания капли воды (Рисунок 2.1.2.3А) на поверхности ПДМС составлял 112° с дисперсией 2° . Для создания гидрофильного покрытия (Рисунок 2.1.2.3Б) использовался 1% раствор поливинилового спирта. Для такого покрытия угол смачивания для капли воды на поверхности ПДМС составлял 21° с дисперсией 3° . Данные в каждом случае вычислялись по пяти измерениям.

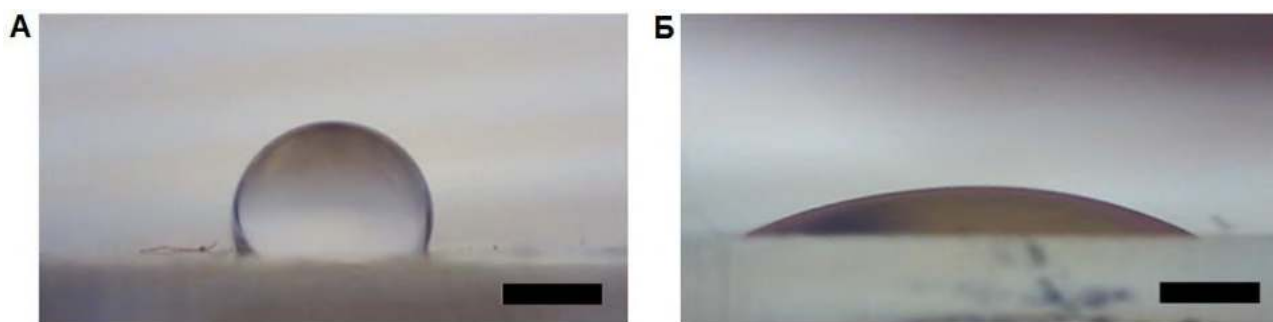


Рисунок 2.1.2.3 – Капля воды на (А) гидрофобной, (Б) гидрофильной поверхности ПДМС. Шкала 1мм.

Для измерения диаметров капель и частоты генерации использовался оптический микроскоп Leica DM 4000B LED с камерой Pike F-100 B (Allied Vision Technologies, США) или с камерой Ximea MC023MG-SY-UB или микроскоп Axiovert 200 (Zeiss, Оберкохен, Германия) с камерой Daheng Imaging (Пекин, Китай). Диаметр капель измерялся вручную с использованием записанных видеок кадров в программе ImageJ. Если измеренное значение было больше, чем высота микроканала, форма капли аппроксимировалась эллипсоидом. Таким образом, для капли с диаметром больше высоты микроканала, рассчитывался эквивалентный диаметр сферической капли. Для анализа формы микрокапель на

поверхности для оценки угла смачивания использовался USB микроскоп ЛОМО Prime Expert.

Основными параметрами, определяющими режимы генерации в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока, являются капиллярные числа, которые описывают соотношение между поверхностным натяжением и вязким трением [124]:

$$Ca = \frac{\eta V}{\gamma} = \frac{\eta}{\gamma S} Q = \frac{\eta}{\gamma S R_h} \Delta P ,$$

где V – средняя скорость (м/с), η – вязкость (Па·с), γ – поверхностное натяжение между дисперсной и сплошной фазами (Н/м), S – площадь поперечного сечения в точке образования капли, Q – расход (м³/с), ΔP – перепад давления (Па), R_h – гидравлическое сопротивление (Па·с/м³). Следовательно, капиллярное число непрерывной или дисперсной фазы можно регулировать разными способами: путем управления расходом Q или разностью давлений ΔP . Для сравнения этих двух режимов генерации измерялись диаметры капель и частоты их генерации (Гц=капель/с).

2.2. Методы изготовления микрофлюидных чипов

Для формирования капель в микрофлюидных системах применяются как активные методы, так и пассивные. Основное внимание в данной работе направлено на использование пассивных методов, при которых образование капель осуществляется благодаря конструктивным особенностям микрофлюидного чипа.

Для исследования условий формирования капель «вода-в-масле», двойной эмульсии «вода-масло-вода», для гидрогелевых микрочастиц были разработаны конструкции микрофлюидных чипов на основе принципа фокусировки потока (Рисунок 2.2.1), в которых за счет возникновения неустойчивости в месте контакта двух несмешивающихся жидкостей (воды и масла) происходит формирование монодисперсной макроэмульсии (капель) «воды-в-масле». Диаметр образующихся капель определяется как геометрическими размерами

микроканалов, так и соотношением между расходами непрерывной (масло) и дисперсной (вода) фаз. Поскольку численное моделирование процесса формирования макроэмульсии в микрофлюидном чипе является сложной и до конца нерешенной задачей, определение оптимальных конструкций микроканалов осуществлялось в основном экспериментальным путем.

Чертежи микрофлюидных чипов были созданы в системе автоматического проектирования Autodesk AutoCAD. Всего было разработано 25 различных вариантов конструкций чипов с разной шириной (60 – 200 мкм) и глубиной (40 – 120 мкм) выходного канала. Размер апертуры a составлял 15 мкм. На Рисунке 2.2.1 схематически показано устройство входных и выходных микроканалов микрофлюидного чипа по типу фокусировки потоков, а также на вставке справа увеличена область чипа – место образования микрокапель, где отмечены апертура a и ширина выходного канала w . Средняя глубина микроканалов всех микрофлюидных чипов около 45 мкм, кроме тех чипов, где специально увеличивалась высота выходного канала (для достижения оптимальной генерации гидрогелевых микрочастиц). Входы для непрерывной и дисперсной фаз содержали фильтры 5 мкм и 20 мкм соответственно, чтобы предотвращать засорение микроканалов.

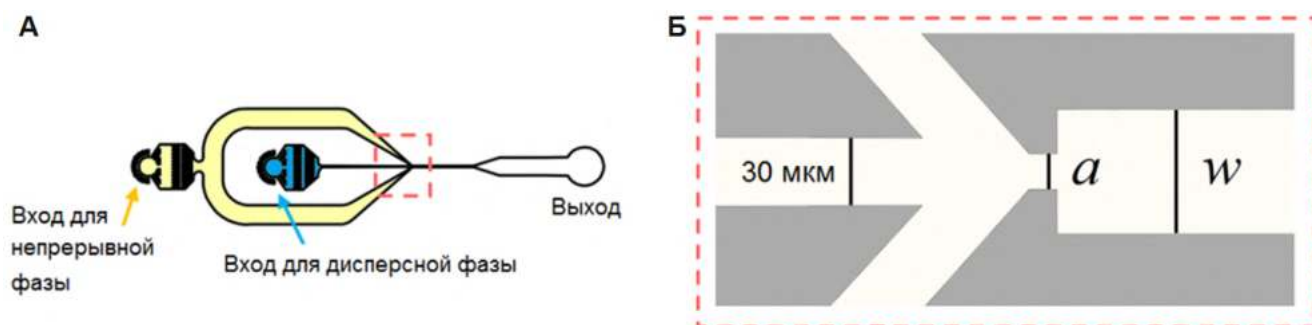


Рисунок 2.2.1 – А) Устройство микрофлюидного чипа с фокусировкой потока. Б) Увеличенное изображение генератора капель.

Микрофлюидные чипы изготавливались методом «мягкой» литографии (soft lithography) [60] из полидиметилсилоксана (ПДМС, PDMS Sylgard 184, Dow Corning, USA) и стекла. Для этого применялись специально изготовленные Si/Su-8 мастер-формы.

Первым этапом создания Si/Su-8 мастер-формы являлось изготовление фотошаблона методом лазерной фотолитографии на установке Heidelberg DWL-66fs. На Рисунке 2.2.2А приведена схема основных технологических операций при изготовлении фотошаблона. На первом шаге на стеклянной подложке формировался слой хрома толщиной 100 нм методом электронно-лучевого испарения и далее центрифугированием наносился позитивный фоторезист AZ1505 толщиной 1 мкм. После этого на установке лазерной литографии происходило экспонирование по заданному чертежу микроструктур. После проявления фоторезиста, травления хрома и снятия остатков фоторезиста фотошаблон готов.

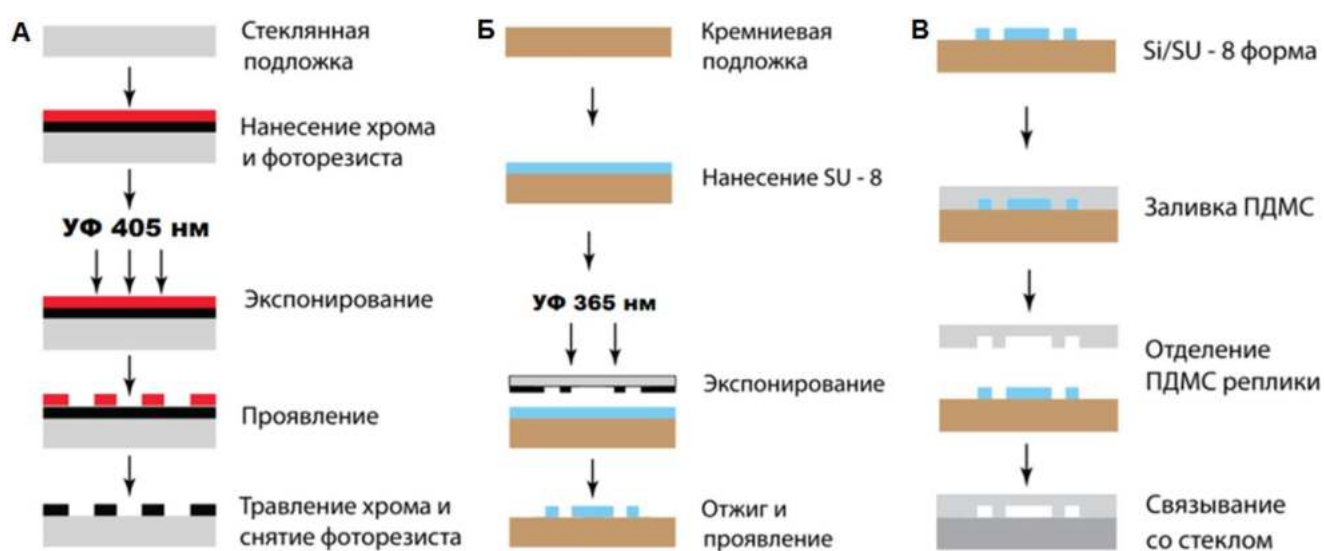


Рисунок 2.2.2 – Принципиальная схема изготовления микрофлюидный чипов по методу «мягкой» литографии. Последовательности операций при создании (А) фотошаблона; (Б) мастер-формы; (В) ПДМС/стеклянного микрофлюидного чипа.

Для изготовления мастер-формы (Рисунок 2.2.2Б) использовалась кремниевая подложка и негативный фоторезист SU-8 2025 (MicroChem Corp., США). При помощи центрифуги на кремниевую подложку наносился фоторезист требуемой толщины с последующим отжигом при температуре 95°C. Затем выполнялось экспонирование по фотошаблону на установке контактной фотолитографии SUSS MJB4. В конце происходил отжиг при 95°C и проявление с помощью SU8-Developer (MicroChem Corp., США). Так как фоторезист негативный, то на кремниевой подложке остаются проэкспонированные области.

Мастер-форма, с заданной системой микроканалов, позволяет создавать реплики из ПДМС. Основные стадии процесса изготовления микрофлюидных чипов ПДМС/стекло отражены на Рисунок 2.2.2В. На Рисунке 2.2.3 показаны примеры готовых ПДМС/стеклянных микрофлюидных чипов и разработанных мастер-форм.

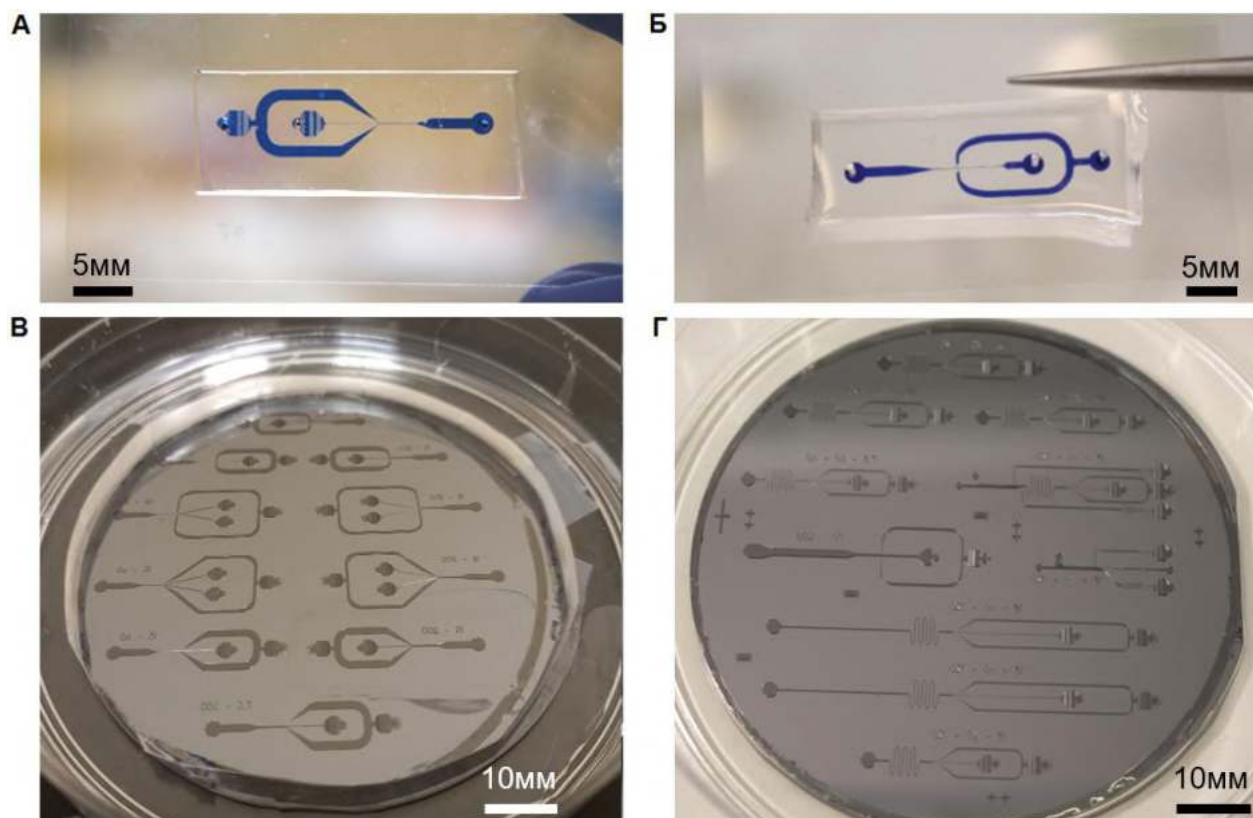


Рисунок 2.2.3 – Изображения готовых ПДМС/стеклянных микрофлюидных чипов с симметричной геометрией (А) и асимметричной (Б). Для лучшей визуализации микроканалы заполнены синим красителем Coomassie Brilliant Blue G-250.

Примеры (В), (Г) разработанных Si/SU-8 мастер-форм.

Первоначально, необходимо тщательно смешать отверждающий агент с жидкой силиконовой основой ПДМС, в пропорции 1:10 по весу. Далее смесь дегазируется в эксикаторе. После этого производится ее заливка на мастер-форму (Рисунок 2.2.2В) и происходит ее отверждение в термошкафе при температуре 65°C в течении 4 часов. После отверждения ПДМС реплика отделяется от мастер-формы. При помощи стилета для биопсии диаметром 1 мм или 2 мм изготавливаются отверстия для капилляров или металлических фитингов. Заключительной стадией изготовления микрофлюидного чипа является обработка

ПДМС реплики с отверстиями и стеклянной пластины (покровное или предметное стекло) в кислородной плазме на установке Plasma Finish для последующего герметичного соединения между собой. Устойчивое неразрывное соединение происходит благодаря формированию ковалентных связей между ПДМС-репликой и стеклом после плазменной обработки.

2.3. Разработка автоматизированной системы управления потоками жидкости в микрофлюидных чипах

Для методов капельной микрофлюидики требуется наличие как микрофлюидных чипов с проработанной геометрией системы микроканалов, так и приборов для контролируемого управления потоками жидкости в микроканалах. В данном разделе рассматривается создание и характеристика микрофлюидного контроллера давления без наличия датчиков расхода жидкости. Также приводятся результаты разработки коннекторов и элементов пневматических интерфейсов.

2.3.1. Разработка микрофлюидного контроллера давлений

Чтобы улучшить функциональность и удобство использования микрофлюидных технологических решений с «открытым исходным кодом» (open-source), был разработан многофункциональный контроллер с модульной конструкцией для подачи жидкостей в микрофлюидные устройства при постоянном давлении. В его основе заложены коммерчески доступные и недорогие (~200 USD) соленоидные электропневматические регуляторы, управляемые микроконтроллером STM32F407. Чтобы расширить возможные области применения контроллера, в него были встроены дисплеи, дополнительный канал для вакуумного насоса, аналоговые и цифровые интерфейсы, а также релейные выходы для подключения внешних клапанов, датчиков, исполнительных механизмов и т. д. Разработанное программное обеспечение с открытым исходным кодом позволяет управлять всеми функциями в ручном режиме или создавать протоколы для полностью автоматизированной

работы с микрофлюидным устройством. Чтобы охарактеризовать разработанный микрофлюидный контроллер давлений (МФКД) и сравнить режимы формирования микрокапель со шприцевыми насосами, которые очень распространены среди исследователей, занимающихся микрофлюидикой (раздел 1.9), он был использован в паре с микрофлюидными чипами с фокусировкой потоков.

Идея МФКД состоит в том, чтобы поддерживать воздух под определенным давлением в герметичной пробирке или емкости с жидкостью для пробы. Под этим постоянным давлением жидкость попадает в микрофлюидное устройство по гибкой трубке (как правило, по капилляру). Схематический вид экспериментальной установки представлен на Рисунке 2.3.1.1А. Контроллер основан на компактных электропневматических регуляторах серии SMC ITV00X0, плавно регулирующих давление воздуха пропорционально электрическому сигналу. Они содержат электромагнитный клапан подачи воздуха, управляемый цепью обратной связи через встроенный датчик давления. Когда входной сигнал возрастает, клапан открывается. Таким образом, часть приложенного давления проходит через электромагнитный клапан и изменяет выходное давление. Модели регуляторов серии ITV отличаются друг от друга максимальным значением выходного давления. МФКД имеет модульную конструкцию с возможностью установки от 1 до 4 регуляторов и имеет упрощенную и расширенную версии, которые показаны на Рисунке 2.3.1.1Б. В данной работе использовались регуляторы ITV-0010 и ITV-0030 (SMC Pneumatics, Япония) с диапазоном выходного давления 0,001–0,1 МПа и 0,001–0,5 МПа, соответственно. Встроенные датчики давления имеют процентную погрешность 6%. Для увеличения точности измерения давления использовались дополнительные датчики давления MPX5050GP или MPX5700GP (Freescale Semiconductor, США) с максимальной погрешностью 2,5%. Они использовались только для контроля выходного давления и не были интегрированы в цепь обратной связи регуляторов. Кроме того, расширенная версия контроллера имеет

вакуумный насос для ввода жидкостей под отрицательным давлением [138], релейные выходы, аналоговые входы, шину I2C и UART для подключения внешних функциональных элементов (клапаны, расходомеры, нагреватели, источники высокого напряжения и так далее).

Выходы ITV регуляторов давления могут подключаться к стандартным лабораторным пробиркам для образцов объемом 1,5 мл, 15 мл и 50 мл через специально разработанные пневмоинтерфейсы – переходники воздух/жидкость (Рисунок 2.3.1.1В). Эти интерфейсы были разработаны в программе Autodesk AutoCAD и изготовлены на 3D-принтере FormLab 2 из прозрачной отверждаемой смолы (Clear Resin) по технологии стереолитографии (SLA). Адаптеры подключаются к контроллеру давлений с помощью пневматической полиуретановой трубкой с внешним диаметром 4 мм через быстросъемный фитинг (Camozzi цанговый прямой 6512-4-M7-M), а также к микрофлюидному устройству через гибкий капилляр Tygon с внутренним диаметром 1/32 дюйма. Для надежной герметизации пневмоинтерфейсы содержат резиновые прокладки.

Для автономного управления всем оборудованием контроллера использовалась электронная плата на базе микроконтроллера STM32F407VGT6. Электронная схема и печатная плата МФКД были созданы в САПР DipTrace (Novarm Limited, Россия). Отладочная плата Diymore STM32F4 с микроконтроллером STM32F407VGT6 использовалась для упрощения сборки электронных компонентов. Регуляторы ITV управляются аналоговыми сигналами напряжения, поэтому использовались 12-битные цифро-аналоговые преобразователи Adafruit MCP4725 (Microchip Technology, США) с энергонезависимой памятью EEPROM. Принципиальная схема МФКД показана на Рисунке 2.3.1.2.

МФКД управляется с компьютера по интерфейсу USB программным приложением (Рисунок 2.3.1.3), которое было разработано в среде IDE BlackBox Component Builder с открытым исходным кодом (Oberon Microsystems, Швейцария). Приложение позволяет управлять давлениями на всех выходах

регуляторов ITV, мониторить их значения в реальном времени и записывать их в текстовый файл (Рисунок 2.3.1.3А). Кроме того, оно имеет специальные панели инструментов для управления вакуумным насосом (Рисунок 2.3.1.3Б), релейными выходами (Рисунок 2.3.1.3В) и другими компонентами контроллера.

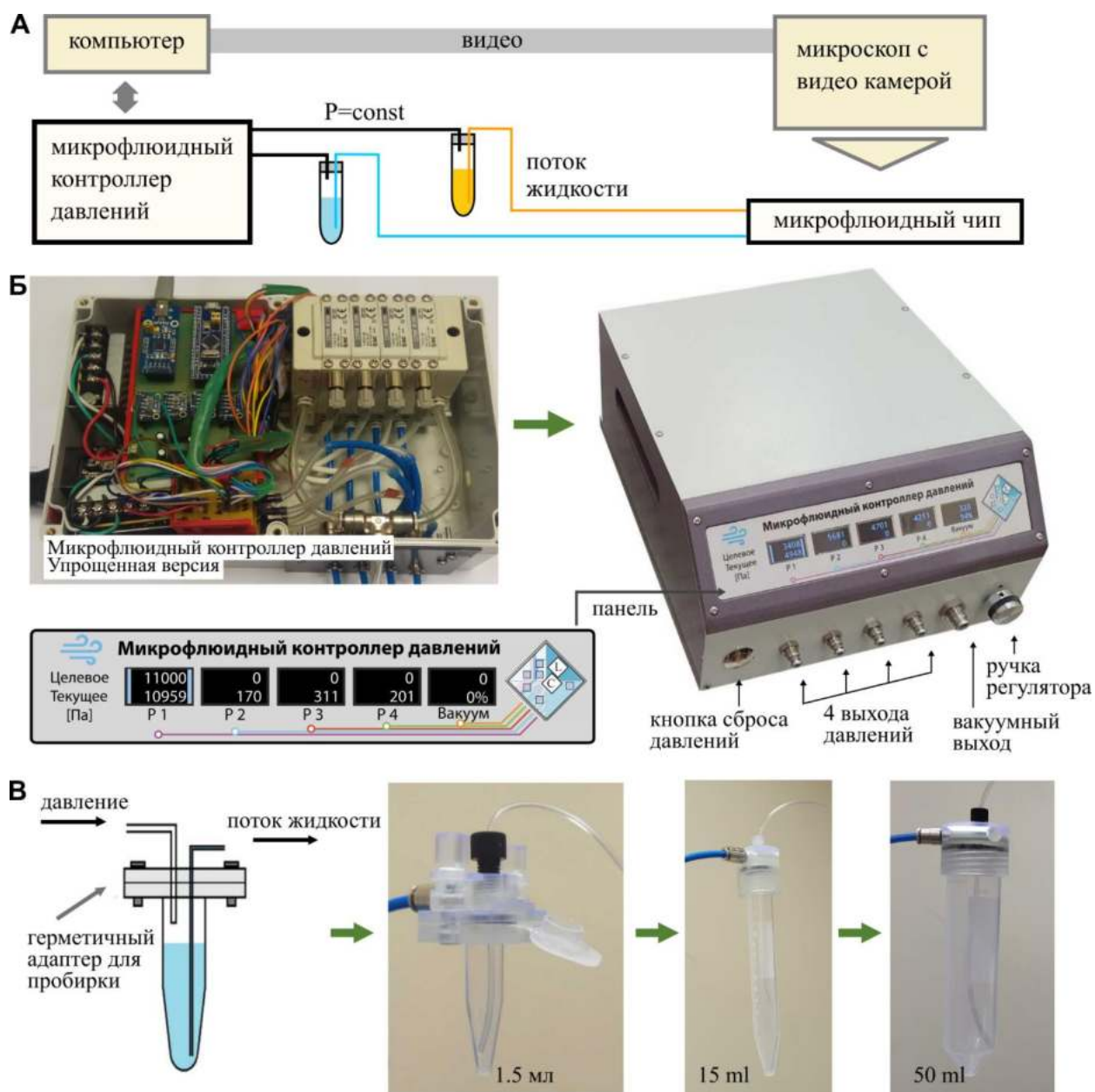


Рисунок 2.3.1.1 – А) Принципиальная схема экспериментальной установки для генерации капель в микрофлюидном устройстве; Б) Общий вид упрощенной и расширенной версий микрофлюидного контроллера давлений; В) Пневмоинтерфейсы воздух/жидкость для подачи жидкости в микрофлюидные устройства с помощью контроллера давлений.

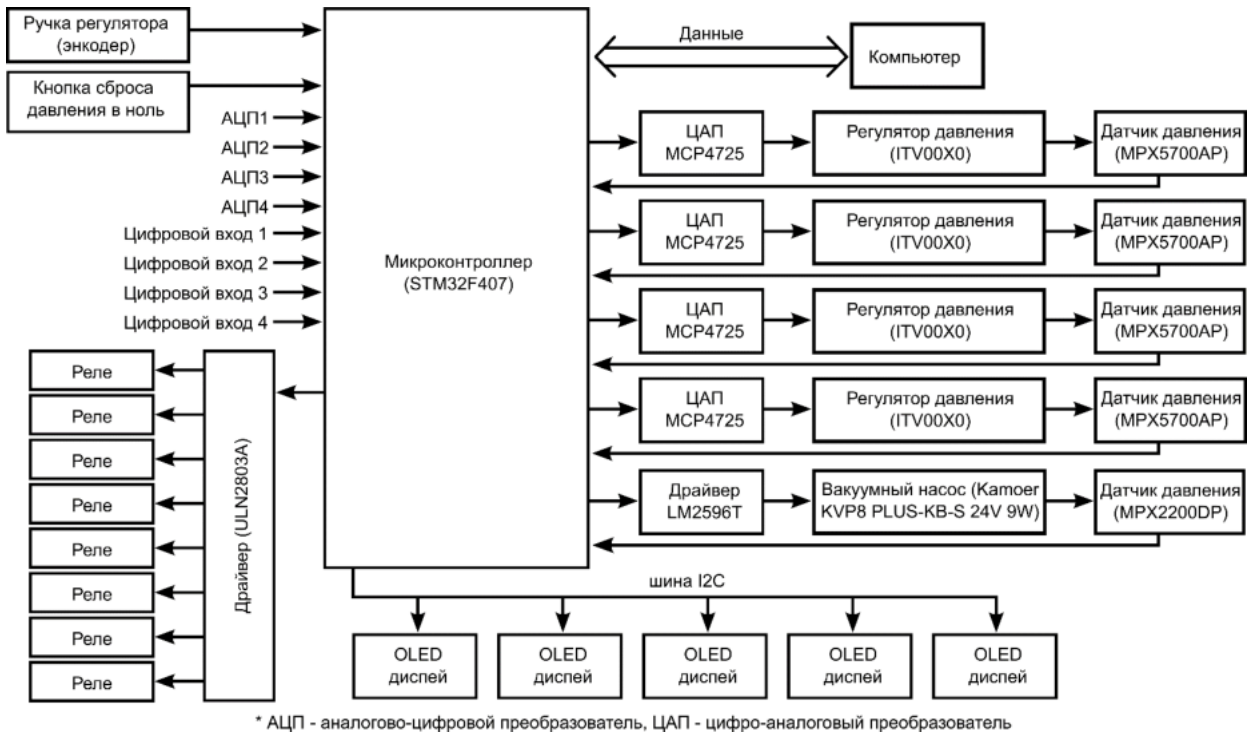


Рисунок 2.3.1.2 – Принципиальная электрическая схема микрофлюидного контроллера давления.

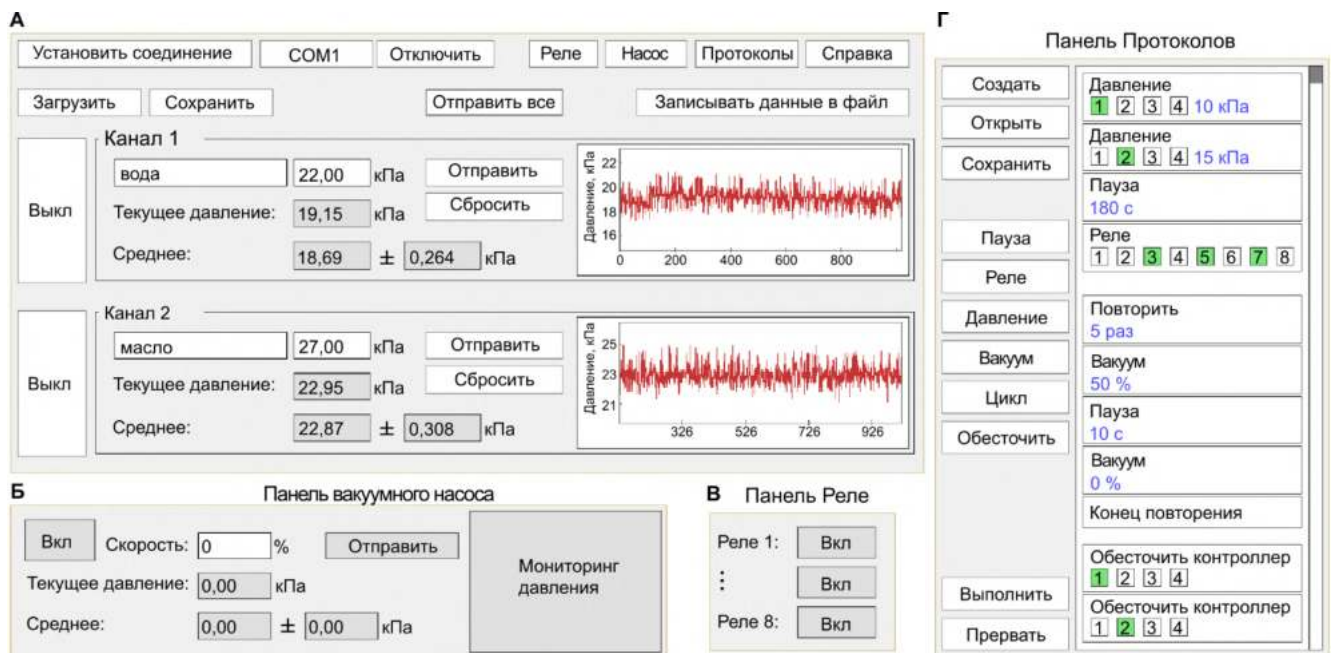


Рисунок 2.3.1.3 – Программный интерфейс микрофлюидного контроллера давления. А) Главное окно интерфейса, которое позволяет контролировать и отслеживать давление в каждом канале. Б) Панель инструментов для управления встроенным вакуумным насосом. В) Панель инструментов для управления внешними устройствами через релейные выходы. Г) Панель инструментов для написания последовательностей для автоматизации экспериментов.

В приложении пользователи могут управлять всеми функциями контроллера вручную или создавать последовательности операций (протоколы) для автоматического выполнения стадий эксперимента. Эти последовательности состояются с помощью готовых функциональных кнопок и выбора их параметров (Рисунок 2.3.1.3Г). Кроме того, расширенная версия контроллера (Рисунок 2.3.1.1Б) имеет пять OLED-дисплеев, которые показывают выходное давление и их целевые значения в каждом канале, один энкодер (ручка регулятора) для ручного управления устройством без компьютера и аварийную кнопку, которая сбрасывает значения давлений во всех каналах до нуля.

Для МФКД использовались монохромные OLED-дисплеи с диагональю 0,96 дюйма с драйвером SSD1306. Транзистор AO3401A (Alpha and Omega Semiconductor, США) использовался для управления мощностью регуляторов ITV. Для управления реле использовались матрицы транзисторов Дарлингтона ULN2803A (Texas Instruments, США). Понижающий импульсный регулятор LM2596T (Texas Instruments, США) использовался для привода встроенного в МФКД вакуумного насоса KVP8 PLUS-KJ-S 24V 9W (Kamoer, Китай). Для ручного управления устройством без использования персонального компьютера в контроллере присутствуют энкодер PEC16-4220F-S0024 (Bourns, США) и кнопка PBS28B (Jietong Switch, Китай). Разработанная печатная плата изготовлена в сервисе PCB Way (Китай). Два блока питания DR-15-24 15W 24V 630mA (Mean Well Enterprises Co, Тайвань) использовались для независимого питания вакуумного насоса и всех остальных компонентов устройства. Понижающий напряжение DC-DC преобразователь LM2596 уменьшал 24 В до 8 В. Линейный регулятор LM7805 использовался для обеспечения 5 В для реле, второй такой же линейный регулятор использовался для питания всех электронных компонентов с напряжением 5 В.

Нижняя, левая и правая стенки корпуса контроллера давления и панель для OLED-дисплеев были изготовлены из модельного пластика Necuron 840 (NECUMER GmbH, Германия) методом микрофрезерования на станке с числовым

программным управлением (ЧПУ) Modela MDX-40 (Roland, Япония). Передняя, верхняя и задняя стенки устройства были изготовлены из цельного стального листа методом лазерной резки. Примерная стоимость основных компонентов (таблица 1) расширенной версии микрофлюидного контроллера давления составляет ~ 1233 \$ США.

Таблица 1. Основной список компонентов МФКД.

№	Название	Количество
1	ITV 0010 / ITV 0030	4
2	ITV00-04 коллекторный узел	1
3	Фитинг SMC KQB2E04-00	5
4	Фитинг SMC KQB2E06-00	1
5	Отладочная плата Diymore STM32F4	1
6	Цифро-аналоговый преобразователь MCP4725	4
7	Датчики давления MPX5050GP / MPX5700GP	4
8	Датчик отрицательного давления MPX2200DP	1
9	Монохромный дисплей 0,96" OLED с драйвером SSD1306	5
10	Вакуумный насос Kamoger KVP8 PLUS-KJ-S 24V 9W	1
11	Матрица с транзисторами Дарлингтона ULN2803A	1
12	Понижающий импульсный регулятор LM2596T	1
13	Энкодер PEC16-4220F-S0024	1
14	Блок питания MEAN WELL DR-15-24 15W 24V 630mA	2
15	DC-DC понижающий регулятор напряжения LM2596	1
16	Линейный регулятор LM7805	2
17	Печатная плата	1
18	Модельный пластик Neuron 840	0,5 м ²
19	Металлическая панель корпуса	1
	Всего:	≈1233 \$ США

2.3.2. Генерация капель в микрофлюидном чипе с фокусировкой потока

Для характеристики разработанного МФКД с электропневматическими регуляторами ITV 0010 и ITV 0030 исследовалось образование капель в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока в режиме контроля давления ($\Delta P = \text{const}$), и проводилось его сравнение с режимом контроля расходов при помощи шприцевых насосов ($Q = \text{const}$). Для этих исследований применялись два

типа микрофлюидных устройств, которые различались шириной выходного канала, составлявшей 60 мкм или 200 мкм (Рисунок 2.3.2.1). Минеральное масло (№ 330779, № M8410 или № M5310, Sigma-Aldrich, Merck) с поверхностно-активным веществом ABIL EM 180 и деионизированной (ДИ) водой были выбраны в качестве непрерывной и дисперсной фаз, соответственно. Для режима регулирования расхода потока ($Q=\text{const}$) использовались два шприцевых насоса PHD 2000 (Harvard Apparatus, США) со шприцами Hamilton – Microliter Series Gastight 50, 100 или 1000 мкл.

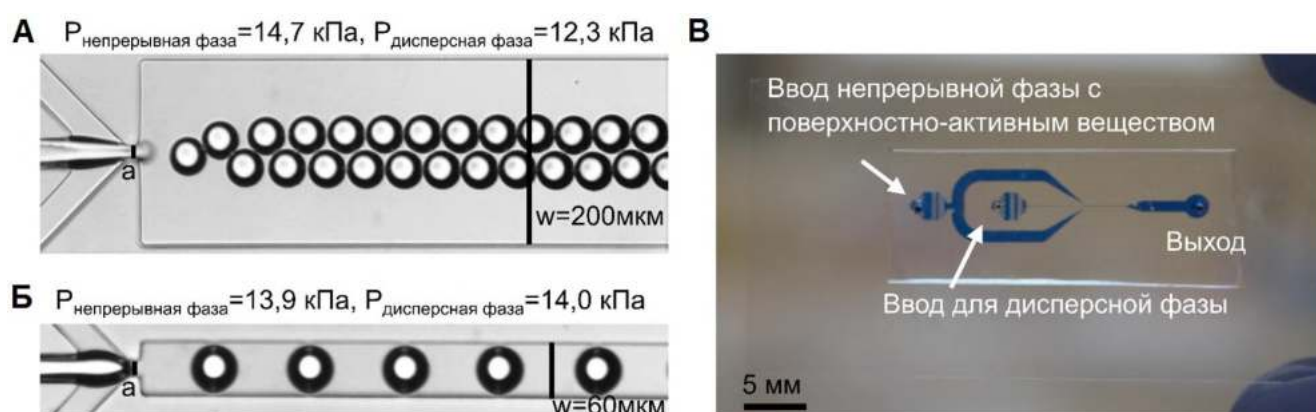


Рисунок 2.3.2.1 – Микрофлюидные генераторы капель с фокусировкой потока. (А, Б) Изображения образования капель в режиме контроля давления, в устройстве с апертурой $a = 15$ мкм и выходным каналом с шириной w равной (А) 200 мкм или равной (Б) 60 мкм. (В) Изображение микрофлюидного устройства; для лучшей визуализации каналы были заполнены синим красителем Coomassie Brilliant Blue G-250.

Для обоих типов электропневматических регуляторов серии ITV было получено стабильное формирование монодисперсной эмульсии «вода-в-масле» (Рисунок 2.3.2.1А, Б). Для анализа стабильности ее формирования в режиме контроля давления $\Delta P=\text{const}$ и расхода $Q=\text{const}$ проводился мониторинг диаметра капель в микрофлюидном чипе с шириной $w=200$ мкм в течение 4 часов каждые 15 минут. Дополнительно для режима $\Delta P=\text{const}$ контроля давлений записывались с датчиков давления дисперсной и непрерывной фаз.

Данные показывают (Рисунок 2.3.2.2), что для каждого измерения в режиме контроля давления коэффициент вариации (CV) диаметра капель составлял $CV \leq 4,3\%$. Таким образом, генерация капель была стабильной в небольшие

промежутки времени. Однако с течением времени диаметр капель и, соответственно, их объем немного менялись. В обоих случаях использования регуляторов ITV 0010 и ITV 0030, которые различаются диапазоном выходных давлений, 100 кПа и 500 кПа соответственно, стандартное отклонение диаметра капель составляло 2 мкм. В случае ITV 0010 диаметр капель линейно увеличивался со временем от 48 до 53 мкм, однако при использовании регуляторов ITV 0030 диаметр капли периодически изменялся с 43 до 50 мкм. Для регулятора ITV 0010 давления дисперсной и непрерывной фазы (Рисунок 2.3.2.2В) показывали схожую динамику, в то время как, для регулятора ITV 0030 давление непрерывной фазы монотонно увеличивалось или уменьшалось с течением времени (Рисунок 2.3.2.2Е), тем самым отличаясь от давления дисперсной фазы. Такие нестабильности в генерации капель можно объяснить гистерезисом в цепи обратной связи электропневматических регуляторов.

Хотя экспериментальные данные диаметра капель одинаковы для каждой серии ITV, шаги настройки давления зависят от диапазона регуляторов ITV. Чем больше диапазон, тем больше шаг, поэтому регуляторы с меньшим диапазоном давления (ITV 0010, 0–100 кПа) лучше подходят для точного образования капель при малых частотах генерации, где требуются низкие давления (до 20кПа).

Для режима контроля потока ($Q=\text{const}$), полученного с помощью двух шприцевых насосов (PHD 2000, Harvard Apparatus, США) со стеклянными гамильтоновскими шприцами объемом 1 мл, коэффициент вариации диаметра капель при каждом измерении был аналогичен режиму контроля давления и составлял $CV \leq 4,2\%$ (Рисунок 2.3.2.3). В течение длительного периода времени стабильность образования капель зависит от диаметра шприца и скорости потока фаз. При низких скоростях потока 0,75 мкл/мин для каждой фазы стандартное отклонение диаметра капель за 4 часа составляло 2 мкм. Кроме того, было замечено, что при таких расходах системе требуется больше времени для стабилизации процесса образования капель, чем при использовании контроллера давлений. При более высоких скоростях потока 2,8 мкл/мин для дисперсной фазы

и 2,3 мкл/мин для непрерывной фазы стандартное отклонение диаметра капель составляло 1 мкм за 4 часа.

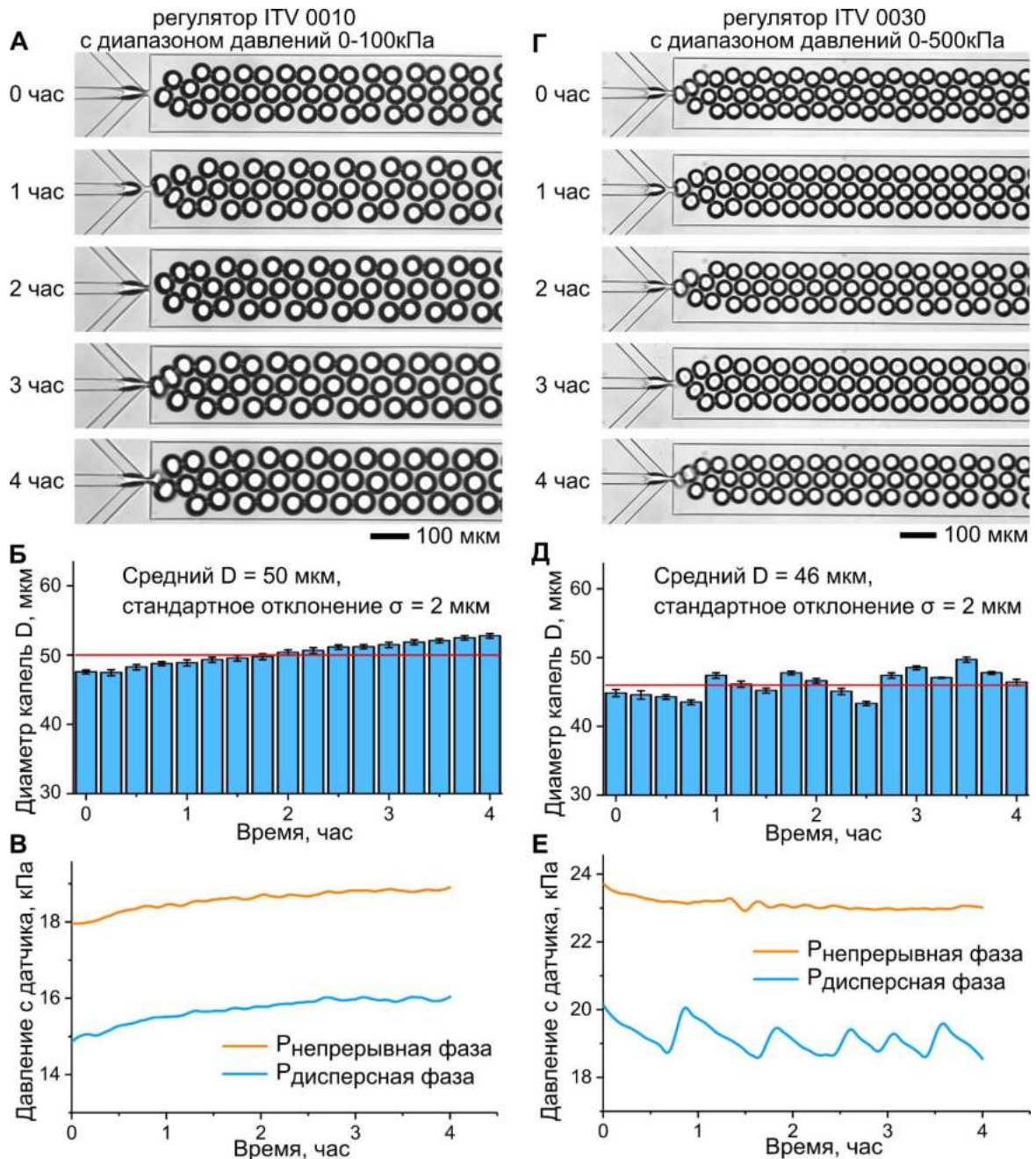


Рисунок 2.3.2.2 – Экспериментальные данные по стабильной генерации капель при помощи МФКД на базе ITV 0010 и ITV0030 в режиме контроля давления. (А, Г) Изображения образования капель в течении 4-часового теста на стабильность. (Б, Д) Зависимость диаметра капель от времени. (В, Е) Зависимость давления на выходах контроллера давлений от времени. Планки ошибок указывают на стандартное отклонение, красные линии указывают на средний диаметр капли.

Каждое значение диаметра было получено усреднением 10 измерений. Экспериментальные данные (В, Е) были сглажены в программе Origin методом Loess (span = 0.1).

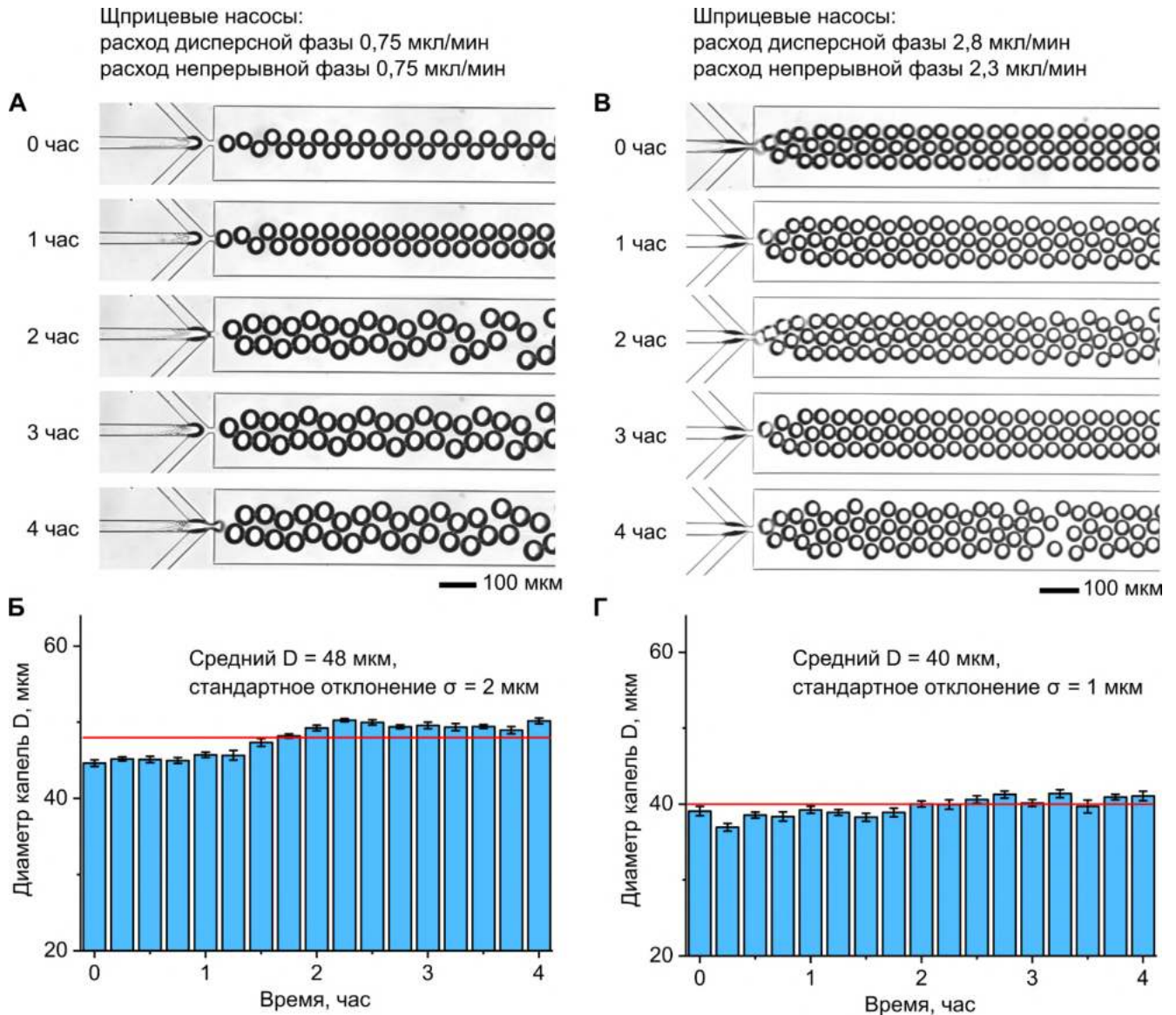


Рисунок 2.3.2.3 – Экспериментальные данные по стабильной генерации капель в режиме управления потоком. (А, В) Изображения образования капель во время 4-часового теста на стабильность. (Б, Г) Зависимость диаметра капель от времени. Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение, красные линии - на средний диаметр. Каждое значение диаметра было получено усреднением 10 измерений.

2.3.3. Сравнение формирования капель при контроле давлений и при контроле расхода потоков

Для сравнения формирования капель в двух режимах генерации измерялись диаметры капель и частоты их генерации. В обоих случаях, контроля давления и контроля расхода, диаметр капли зависит только от соотношения между давлениями или расходами дисперсной и непрерывной фаз, но не от их

абсолютных значений (Рисунок 2.3.3.1, Рисунок 2.3.3.2). Результаты показывают, что для генерации в режиме контроля давлений диаметр капель линейно зависит от этого отношения, в отличие от режима контроля расхода, где это соотношение является нелинейным (Рисунок 2.3.3.1А, Б). Согласно экспериментальным данным, для режима контроля давления в устройствах с выходным каналом с шириной 200 мкм диаметр капли может изменяться в диапазоне от 5 до 65 мкм, а в режиме контроля расходов – в диапазоне от 20 до 60 мкм.

В отличие от диаметра капель, частота их генерации сильно зависит как от абсолютных значений давлений или расходов фаз, так и от их соотношения (Рисунок 2.3.3.1В, Г). В случае контроля расходов частота генерации монотонно увеличивается с увеличением расходов каждой фазы. Напротив, в случае контроля давлений существует оптимальное соотношение между давлениями дисперсной и непрерывной фаз, при котором частота генерации принимает наибольшее значение.

Чтобы объяснить эту закономерность, важно отметить, что в микрофлюидном чипе с широким выходным каналом образование капель может быть, как однорядным, так и многорядным. Когда давления или расходы увеличиваются, выходной канал все больше и больше заполняется каплями. Из-за того, что вязкость эмульсий значительно больше вязкости чистых жидкостей, гидравлическое сопротивление выходного канала увеличивается [145,146]. Это приводит к уменьшению расходов, средних скоростей и капиллярных чисел каждой фазы в режиме контроля давления. Таким образом, частота генерации в режиме контроля давления уменьшается, когда капли максимально заполняют пространство в выходном канале. В случае использования шприцевых насосов расходы фаз не зависят от гидравлического сопротивления выходного канала, поэтому частота генерации монотонно увеличивается.

Чтобы учесть такую особенность эмульсии для режима контроля давлений в коммерческих микрофлюидных регуляторах давлений обычно используются датчики расхода и контур обратной связи, который поддерживает постоянный

расход, регулируя давление. Разработанный МФКД имеет шины I2C или UART для подключения внешних коммерчески доступных или интегрированных в микрофлюидные устройства [147] датчиков потока.

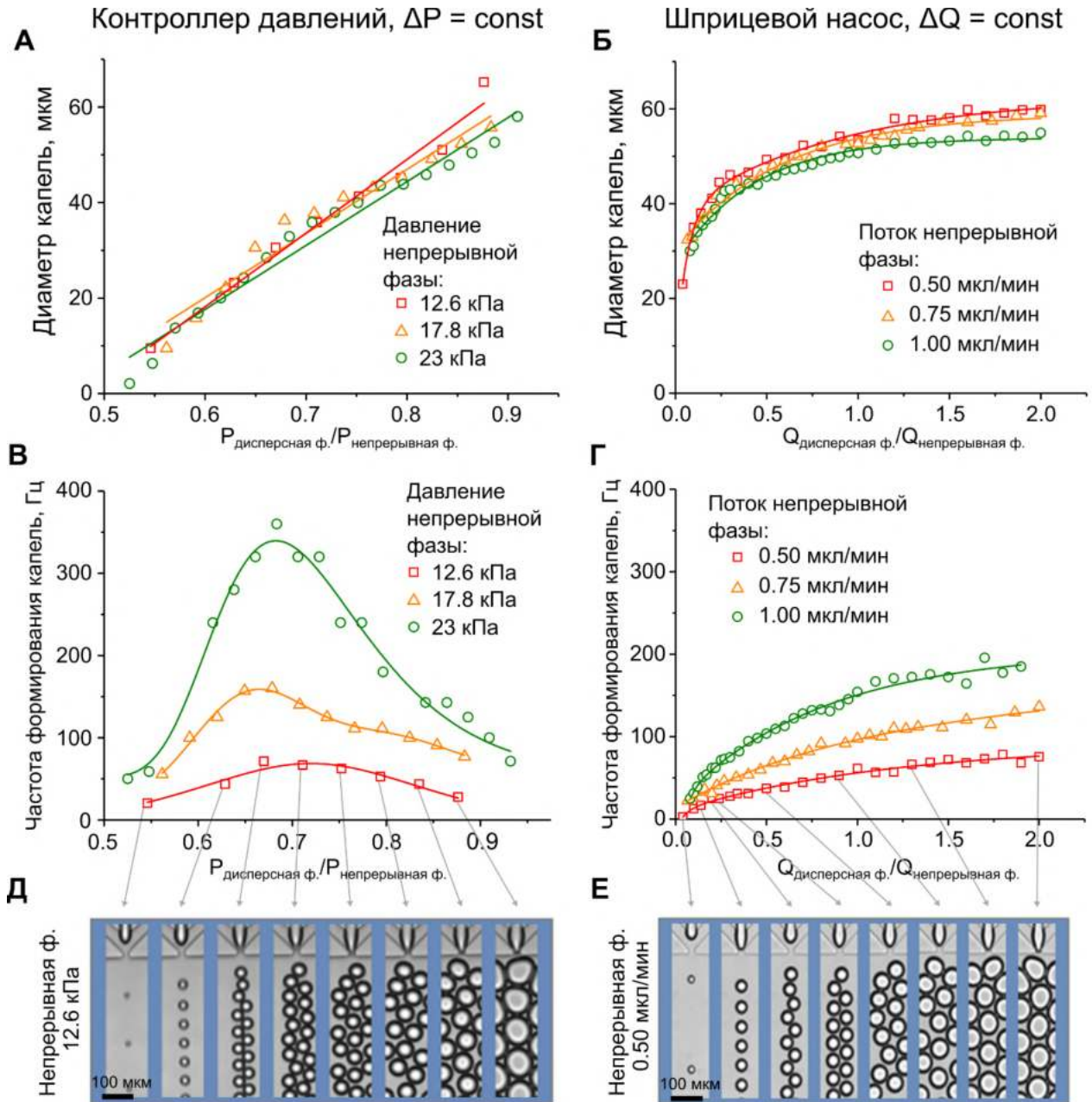


Рисунок 2.3.3.1 – Режимы образования капель в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потоков в режимах контроля давления и контроля расходов: (А, Б) зависимость диаметра капель от отношения давлений/расходов дисперсной и непрерывной фаз; (В, Г) зависимость частоты генерации от отношения давлений/расходов дисперсной и непрерывной фаз; (Д, Е) изображения образования капель при различных давлениях и расходах дисперсной и непрерывной фаз. Использовался микрофлюидный чип с выходным каналом $w = 200$ мкм и контроллер давлений на основе электропневматических регуляторов ITV0010.

Экспериментальные исследования режимов генерации капель в микрофлюидных устройствах с фокусировкой потоков с узким выходным каналом (60 мкм) показали аналогичные результаты (Рисунок 2.3.3.2).

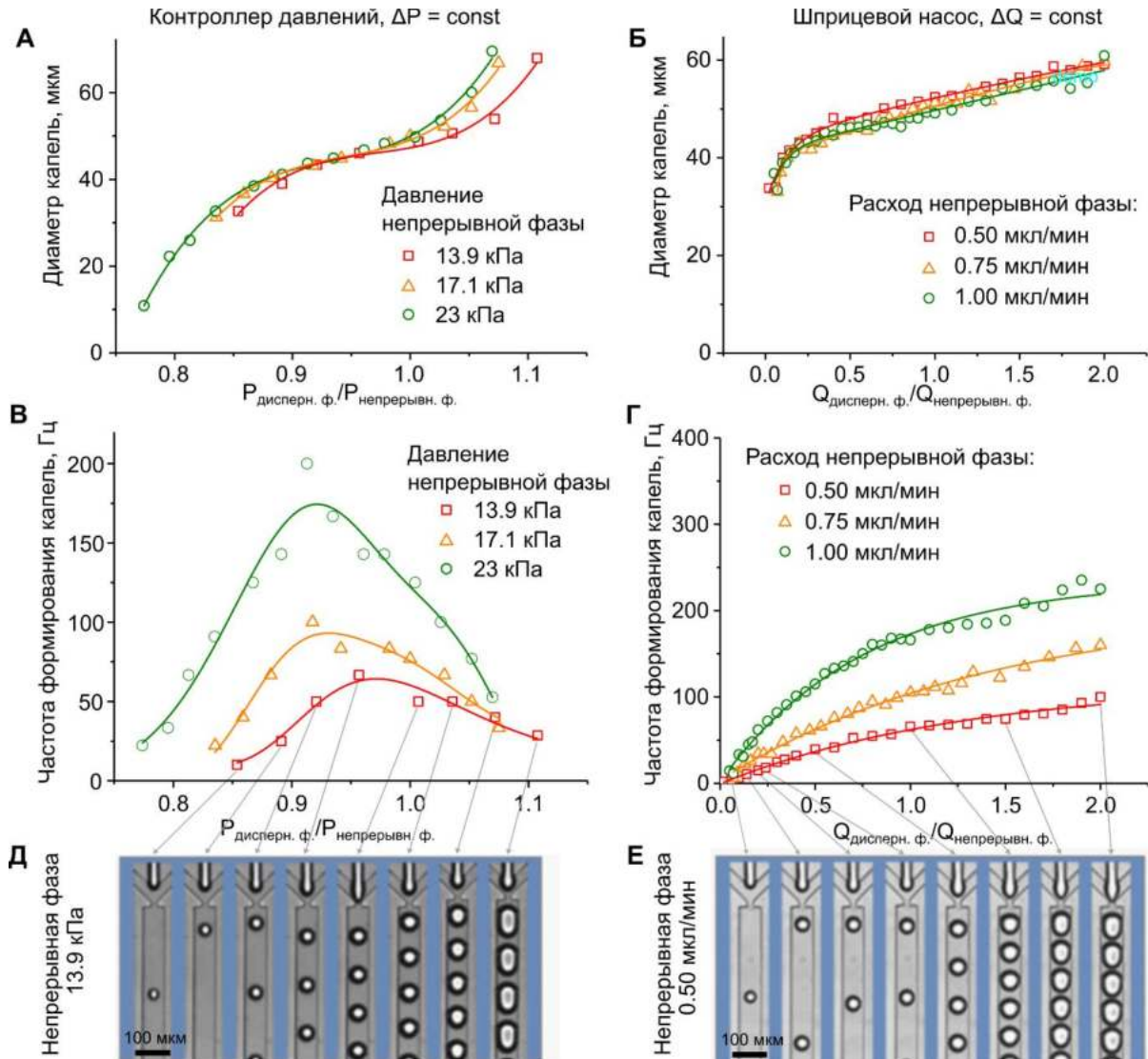


Рисунок 2.3.3.2 – Режимы образования капель в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потоков с использованием режимов контроля давления и контроля расходов: (А, Б) зависимость диаметра капель от отношения давлений/расходов дисперсной и непрерывной фаз; (В, Г) зависимость частоты генерации от отношения давлений/расходов дисперсной и непрерывной фаз; (Д, Е) изображения образования капель при различных давлениях и расходах дисперсной и непрерывной фаз. Использовался микрофлюидный чип с узким выходным каналом ($w = 60$ мкм) и контроллер давления на основе электропневматических регуляторов ITV0010.

По представленным данным (Рисунок 2.3.3.2), в случае контроля давления диаметр капель может изменяться в диапазоне от 10 до 70 мкм, тогда как в режиме

контроля расходов он находится в диапазоне от 30 до 60 мкм. Однако в таких микрофлюидных чипах происходит только однорядовая генерация капель, но их концентрация и гидравлическое сопротивление выходного канала по-прежнему зависят от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз. Это приводит к снижению частоты генерации капель при высоких соотношениях давлений для случая режима контроля давления.

2.3.4. Оценка эффективной вязкости эмульсии и гидравлического сопротивления выходного микроканала

Исследования двух режимов формирования микрокапель с помощью МФКД и шприцевых насосов показали схожее поведение диаметров генерируемых капель в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потоков, но в ходе экспериментов наблюдалась значительная разница в частотах их генерации (Рисунок 2.3.3.1). Это явление можно объяснить, если учесть, что вязкость эмульсии в выходном микроканале зависит от ее концентрации [148]. Таким образом, его гидравлическое сопротивление увеличивается при увеличении расхода жидкостей и соотношения давлений дисперсной и непрерывной фаз, что приводит к снижению частоты генерации.

Сравнивая частоты генерации капель с одинаковыми диаметрами в случае контроля давления и в случае контроля расхода, были сделаны оценки гидравлического сопротивления выходного канала, а также оценки вязкости эмульсии, применяя теорию эквивалентных схем и законов Кирхгофа [12]. Для расчетов использовалась зависимость между гидравлическим сопротивлением и вязкостью эмульсии. В прямоугольном микроканале сопротивление определяется следующим выражением:

$$R_h = \frac{12\eta L}{wh^3(1-0.63h/w)},$$

где η – вязкость жидкости, w – ширина, h – высота, L – общая длина канала. Это выражение действительно, когда $h < w$.

Чтобы оценить сопротивление R_h и вязкость η , была проведена аналогия между системой микроканалов и электрической цепью [12], в которой напряжение представляет собой разность давлений ΔP , электрический ток представляет собой расход жидкости Q , а электрическое сопротивление – гидравлическое сопротивление R_h . В соответствии с этим подходом микрофлюидные устройства были представлены в виде эквивалентной электрической схемы (Рисунок 2.3.4.1А). По ней была составлена система линейных уравнений Кирхгофа, которая определяла поведение потоков жидкости в устройствах:

$$\begin{cases} \Delta P_{\text{disp.ph.}} = Q_{\text{disp.ph.}} R_{\text{disp.ph.}} + QR_h \\ \Delta P_{\text{cont.ph.}} = Q_{\text{cont.ph.}} R_{\text{cont.ph.}} + QR_h \\ Q = Q_{\text{disp.ph.}} + Q_{\text{cont.ph.}} \end{cases}$$

В изготовленных микрофлюидных чипах гидравлические сопротивления входных каналов для дисперсной и непрерывной фаз были близки, $R_{\text{disp.ph.}} \approx R_{\text{cont.ph.}} \approx R_0$. Решение системы:

$$R_h = \frac{\Delta P_{\text{disp.ph.}}}{Q_{\text{disp.ph.}} + Q_{\text{cont.ph.}}} - \frac{Q_{\text{disp.ph.}} (\Delta P_{\text{cont.ph.}} - \Delta P_{\text{disp.ph.}})}{(Q_{\text{cont.ph.}} - Q_{\text{disp.ph.}})(Q_{\text{cont.ph.}} + Q_{\text{disp.ph.}})}, \text{ когда}$$

$$Q_{\text{cont.ph.}} - Q_{\text{disp.ph.}} \neq 0.$$

В режиме контроля давления задавались входные давления фаз, а выходное давление было атмосферным. В режиме контроля расходов задавались только входные расходы. Поскольку диаметр капель и частота их генерации определяются только капиллярными числами дисперсной и непрерывной фаз [124], чтобы выяснить все параметры уравнений, было проведено сравнение двух режимов для вычисления расходы каждой фазы в режиме контроля давления. После этого, решая уравнения, были рассчитаны гидравлическое сопротивление выходного канала и вязкость эмульсии для различных коэффициентов заполнения эмульсией выходного канала (Рисунок 2.3.4.1Б, В). Фактор заполнения определялся как доля дисперсной фазы в выходном канале. В широком выходном

канале, ширина которого составляла 200 мкм (Рисунок 2.3.4.1Б), генерация капель была однорядной или многорядной, поэтому такую эмульсию можно обозначить как 2D. В узком выходном канале, ширина которого была сопоставима с диаметром капли и составляла 60 мкм (Рисунок 2.3.4.1В), происходила генерация только однорядных капель, и такую эмульсию можно обозначить 1D.

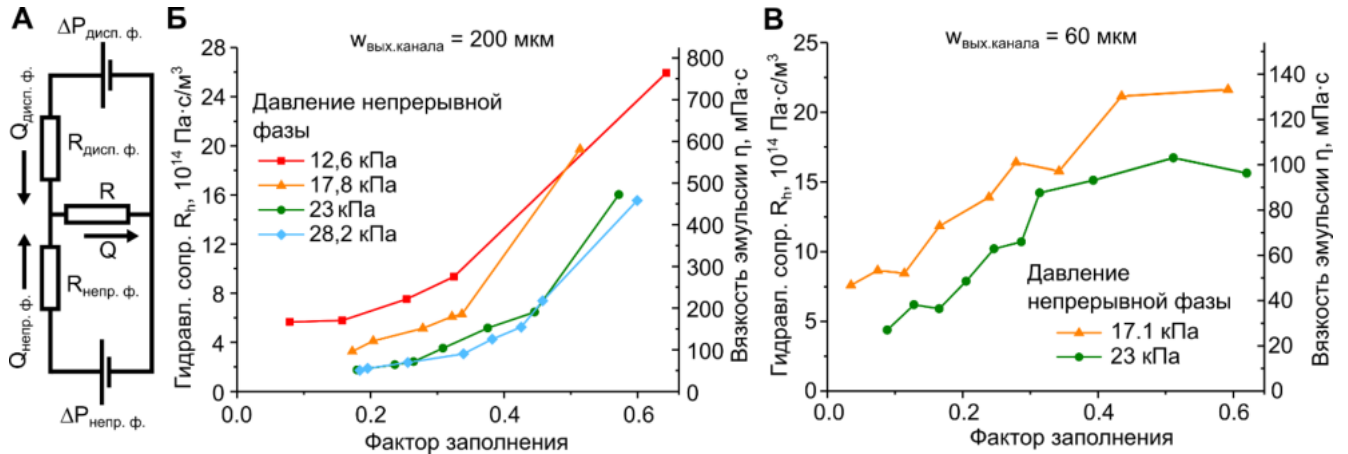


Рисунок 2.3.4.1 – Оценка гидравлического сопротивления выходного канала микрофлюидного устройства с фокусировкой потока: модель эквивалентной схемы устройства (А); гидравлическое сопротивление и вязкость эмульсии в выходном канале с шириной 200 мкм (Б) и 60 мкм (В) как функция коэффициента заполнения эмульсии.

Данные показывают, что эффективная вязкость 1D и 2D эмульсий зависит от коэффициента заполнения. Она выше вязкости дисперсной (1 мПа·с) и непрерывной фаз (11,7-14,2 мПа·с) и составляет от 50 до 750 мПа·с для коэффициентов заполнения 0,08-0,64. Кроме того, вязкость зависит от абсолютного давления и скорости потока фаз, что указывает на то, что монодисперсная эмульсия «вода-в-масле» является неньютоновской жидкостью. Эти факты хорошо согласуются с предыдущими исследованиями [148–150] и показывают, что в режиме контроля давления вязкость эмульсии следует учитывать для выбора подходящих давлений фаз для образования капель с заданными характеристиками.

2.3.5. Практическое использование микрофлюидного контроллера давлений

Актуальной задачей технологий капельной микрофлюидики является упаковка живых клеток в капли в заданных концентрациях, вплоть до одной клетки в капле. Поэтому разработанный МФКД и микрофлюидные чипы были протестированы для задач упаковки клеток хронического миелоидного лейкоза человека K562 (Рисунок 2.3.5.1А) и бактерий *E.Coli* (Рисунок 2.3.5.1Б, В) в микрокапли в микрофлюидном чипе с апертурой 15 мкм и переменной шириной выходного канала от 60 мкм до 120 мкм. В качестве непрерывной фазы использовалось биосовместимое газопроницаемое фторуглеродное масло (№186-3005, Bio-Rad). Для клеток K562 в качестве дисперсной фазы использовалась клеточная среда RPMI с клетками с ПАВ Pluronic F-127 3% wt/vol. Для работы с бактериями в качестве дисперсной фазы выступала питательная среда LB.

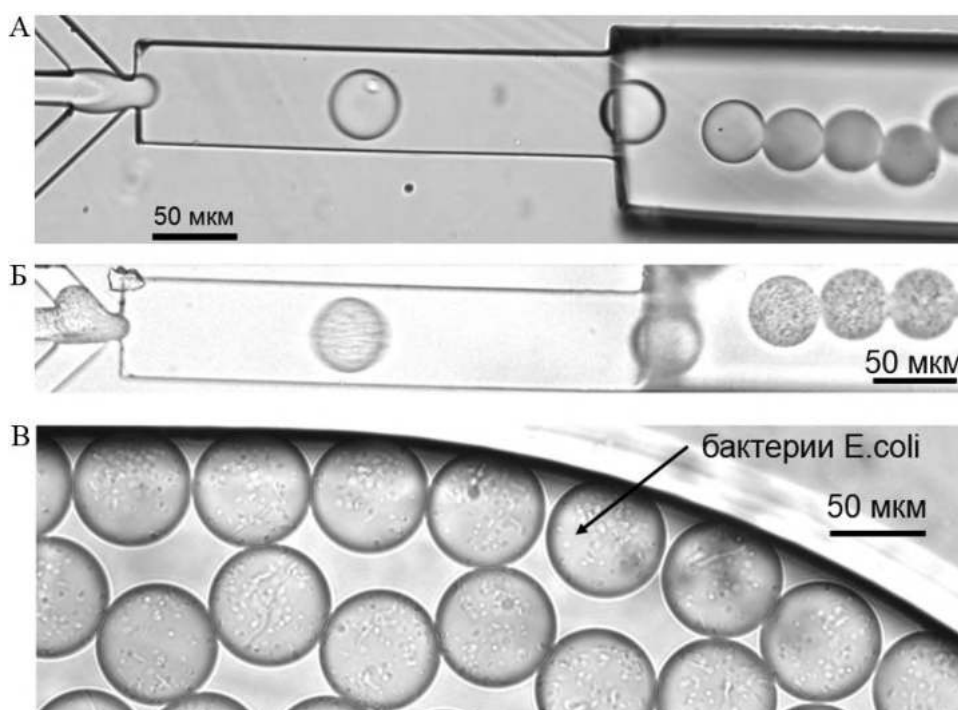


Рисунок 2.3.5.1 – Упаковка клеток K562 (А) и бактерий (Б) в капли макроэмульсии с помощью МФКД. (В) Увеличенное изображение капель с бактериями *E.Coli*.

Кроме использования простых двухфазных эмульсий, таких как «масло-в-воде» или «вода-в-масле», большой интерес обращен к сложным многофазным дисперсиям (множественным эмульсиям), когда одна микрокапля, содержит

одинокые или множественные внутренние отсеки. Множественные эмульсии часто являются промежуточными продуктами в синтезе микрокапсул, в частности микрокапсул с гидрогелевыми оболочками, используемых для защиты активных веществ от химической деградации или испарения, или для контролируемого высвобождения активных веществ (например, лекарств). Они также находят многочисленные применения в микросенсорах, материалах для самовосстановления и в синтезе новых материалов [151]. Также при работе с клетками требуется создавать благоприятные условия их жизнедеятельности. В случае простых эмульсий, когда капля воды окружена только маслом, доступ питательных и других веществ через объемную масляную среду может быть сильно затруднен (например, из-за плохой растворимости) [152]. Также макроэмульсии «вода-масло-вода» позволяют использовать для аналитических целей стандартное оборудование для проточной цитометрии.

В данном подразделе для формирования двойной эмульсии с помощью МФКД использовался микрофлюидный чип, эскиз которого приведен на рисунке 2.3.5.2. Он совмещает в себе два генератора капель по типу фокусировки потоков с шириной апертуры 20 мкм. Высота всех микроканалов 45 мкм. Первый генератор капель (слева направо на Рисунке 2.3.5.2) формирует макроэмульсии «вода-в-масле», поэтому он предварительно обработан гидрофобным агентом ClearVue Rain Repellent (Turtle Wax Inc., США). Дисперсная фаза – деионизованная вода, подкрашенная синим красителем кумасси (Coomassie Brilliant Blue), непрерывная – минеральное масло с ПАВ 3% Abil EM 180. Далее такая эмульсия обжимается водной фазой во втором генераторе, и на выходе образуется двойная эмульсия «вода-масло-вода». Для второго генератора требуется создавать гидрофильное покрытие с помощью 1% раствора поливинилового спирта. На втором генераторе дисперсная фаза – поток капель воды в минеральном масле, а непрерывная фаза – деионизованная вода, подкрашенная также синим красителем кумасси. На Рисунке 2.3.5.3 показана сформированная монодисперсная двойная эмульсия. Изображение (Рисунок

2.3.5.3Б) доказывает, что сгенерированы именно капли двойной эмульсии – при увеличении 20х устанавливается наличие тонкой масляной оболочки. Такой чип может применяться для скрининга клеток и для формирования оболочечных гидрогелевых микрочастиц.

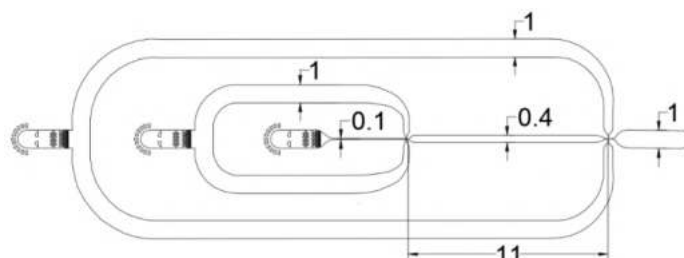


Рисунок 2.3.5.2 – Конструкция микрофлюидного чипа для двойной эмульсии. Оба генератора каплей устроены по типу фокусировки потоков с перпендикулярным пересечением микроканалов. Апертура обоих генераторов 20 мкм. Размеры приведены в мм.

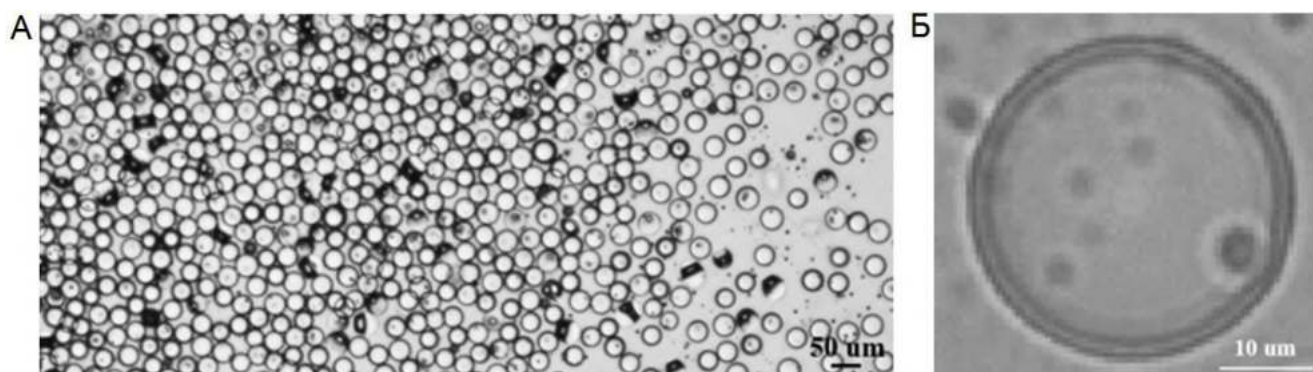
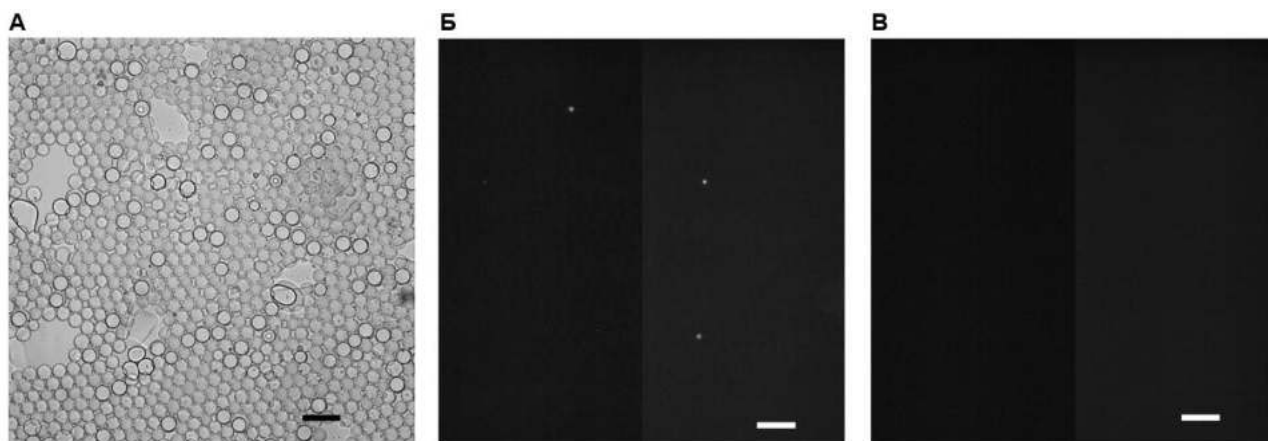


Рисунок 2.3.5.3 – А) Сформированные капли двойной эмульсии. Б) Увеличенное изображение капли «вода-масло-вода».

После этого разработанный микрофлюидный чип был использован для упаковки клеток К-562 в капли двойной эмульсии с помощью МФКД. Для первого генератора состав фаз следующий. Дисперсная фаза: клеточная среда RPMI с клетками К-562 с поверхностно-активным веществом 3% wt/vol Pluronic F-127. Для лучшего распознавания клеток, их ядра были окрашены красителем Hoechst (2,5мкл/1мл). Для контроля живая/мертвая клетка, в раствор был введен йодистый пропиций (5мкл/1мл). Для второго генератора в качестве непрерывной фазы использовалась клеточная среда RPMI с 3% wt/vol Pluronic F-127. Для наилучшего тока клеток в капилляре и входном микроканале использовался

специально созданный пневмоинтерфейс для инсулиновых шприцев объемом 1 мл. На Рисунке 2.3.5.4 показаны изображения единичных клеток в каплях двойной эмульсии, после 24 часов в инкубаторе. Наличие флуоресценции в канале красителя Hoechst и ее отсутствие в канале йодистого пропидия показывает, что клетки сохранили жизнеспособность.



Рисунке 2.3.5.4 – Капли двойной эмульсии с клетками K562 после 24 часов в инкубаторе. А) Изображение, полученное в проходящем свете (светлое поле), в видимом диапазоне; Б) Изображение, полученное во флуоресцентном режиме с возбуждением на длине волны 365 нм, на котором видна флуоресценция красителя Hoechst в ядрах клеток; В) Изображение, полученное во флуоресцентном режиме с возбуждением на длине волны 549 нм, показывающее отсутствие флуоресценции йодистого пропидия в ядрах клеток. Шкала 100мкм.

Заключение к разделу 2.3

В ходе проведенных исследований был разработан 4х канальный микрофлюидный контроллер давления с «открытым исходным кодом». Контроллер имеет модульную конструкцию и основан на четырех недорогих электропневматических регуляторах серии SMC ITV00X0. Он подключается к микрофлюидным устройствам через пневмоинтерфейсы для лабораторных пластиковых пробирок объемом 1,5 мл, 15 мл или 50 мл, изготовленные методом 3D-печати.

Специально разработанное программное обеспечение с открытым исходным кодом используется для управления всеми компонентами контроллера давления в ручном или в полностью автоматическом режиме с персонального компьютера. Дополнительно, расширенная версия контроллера содержит

вакуумный насос, релейные выходы, аналоговые входы и цифровые входы/выходы для подключения внешних устройств. Кроме того, он содержит 5 дисплеев и энкодер для ручного управления без подключения к компьютеру. Такая функциональность контроллера давления позволяет выполнять множество сложных экспериментальных протоколов не только в микрофлюидных устройствах, но и автоматизировать биохимические процедуры в стандартных пробирках или планшетах.

Разработанный МФКД был охарактеризован при выполнении исследований режимов образования микрокапель «вода-в-масле» в микрофлюидных устройствах с фокусировкой потока. Было проведено сравнение режимов образования капель, полученных с помощью МФКД, и коммерческих шприцевых насосов. Результаты показали, что образование эмульсии по типу «вода-в-масле» в микрофлюидных чипах, когда обе жидкости вводились при постоянном давлении с помощью МФКД было стабильным не менее 4 часов. Стандартное отклонение диаметра капель не превышало 2 мкм, что сопоставимо с генерацией капель с помощью шприцевых насосов. Изменяя входные давления, в микрофлюидных чипах с апертурой 15 мкм и шириной выходного канала 200 мкм с помощью МФКД можно получать монодисперсные капли диаметром от 5 мкм до 65 мкм, а при использовании шприцевых насосов только от 20 мкм до 60 мкм. Дальнейшие исследования показали, что в режиме контроля давления, диаметры капель линейно зависят от соотношения давлений дисперсной и непрерывной фаз, хотя для режима контроля расходов при помощи шприцевых насосов эта зависимость является нелинейной. Более того, оказалось, что частоты генерации капель в этих режимах сильно различаются. При высоких давлениях дисперсной фазы эмульсия занимает почти все пространство в выходном канале и показывает неньютоновское поведение. Таким образом, его гидравлическое сопротивление зависело от входного давления каждой из фаз и приводило к снижению частоты генерации. Это явление показало, что в режиме контроля давления, необходимо учитывать вязкость эмульсии для выбора подходящих давлений фаз для

образования капель с заданными характеристиками. Кроме того, было проведено тестирование МФКД на примере упаковок клеток в капли эмульсии «вода в масле» и «вода-масло-вода», которые показали, что разработанный МФКД с открытым исходным кодом может использоваться для ввода жидкостей в микрофлюидные устройства для решения задач капельной микрофлюидики.

2.4. Формирование капель макроэмульсии отрицательным давлением

2.4.1. Микрофлюидная система для образования макроэмульсии отрицательным давлением

Для сложных протоколов по созданию микрокапель (например, по типу «вода-масло-вода») или микрочастиц (например, по типу ядро-оболочка) необходимо согласованное управление несколькими входными потоками жидкости (от 3х и более). Это требует использования, как минимум трехканального контроллера давления или 3-х независимых шприцевых насосов, а также точной настройки всех компонентов экспериментальной установки. Чтобы преодолеть эти ограничения и упростить периферийное оборудование для образования капель и синтеза микрочастиц, рядом исследователей был предложен метод введения жидкостей в микрофлюидное устройство за счет создания отрицательного давления в выходном резервуаре давления [140,141]. Однако, существующие решения не обеспечивают доступных методов контроля и изменения отрицательного давления и требуют исследований влияния величины давления и геометрических характеристик микрофлюидных устройств на режимы образования капель.

В разработанном микрофлюидном контроллере давлений (МФКД) для создания отрицательного давления встроен мини-диафрагменный вакуумный насос (KVP8 PLUS-KJ-S, 24 V, 9 W, Kamoer Fluid Tech, China), обеспечивающий минимальное давление -95 кПа. Он был использован для ввода жидкостей с помощью отрицательного давления в выходном резервуаре микрофлюидного

устройства с фокусировкой потока. В ходе исследования режимов образования капель по типу «вода-в-масле» было проведено сравнение двух способов регулировки отрицательного давления: 1) с помощью компактного электропневматического регулятора ITV0090-2L (SMC Corporation, Япония); и 2) с помощью ручного клапана давления воздушного потока RFU 482-1 / 8 (Camozzi Automation spa, Италия). В обоих случаях была проанализирована стабильность образования капель, а также зависимость их диаметра и частоты генерации от давления в выходном резервуаре и от гидравлических сопротивлений входных микроканалов.

Экспериментальная установка состояла из микрофлюидного чипа с фокусировкой потока с двумя входами со вставленными наконечниками от лабораторных пипеток (200 мкл), содержащими необходимые реагенты (вода и минеральное масло), одним выходным резервуаром для сбора эмульсии, регулятором давления и вакуумным насосом (Рисунок 2.4.1.1А, Б). Для изменения значения отрицательного давления в выходном резервуаре использовался ручной клапан или электропневматический регулятор. При этом вакуумный насос всегда работал на полную мощность при максимальном допустимом напряжении 24 В. Клапан ручного управления потоком использовался для снижения величины отрицательного давления в выходном резервуаре за счет дополнительной подачи атмосферного воздуха, в то время как регулятор ITV0090 напрямую регулировал давление пропорционально электрическому сигналу от внешнего регулятора напряжения (0–5В) с помощью встроенного электромагнитного клапана, датчика давления и контура обратной связи. Емкость для сбора капель состояла из фитингов и укороченного пластикового шприца объемом 5 мл. Для контроля величины отрицательного давления использовался датчик давления MPX2200DP (NXP Semiconductors, Нидерланды). Данные с датчика были обработаны в программе Origin методом сглаживания Loess (span = 0,1).

Для экспериментов использовались специально разработанные микрофлюидные чипы с генераторами капель с фокусировкой потока (Рисунок

2.4.1.1В). Их отличительная особенность в том, что для исследования влияния гидравлических сопротивлений входных микроканалов на режимы генерации капель, чипы содержали длинные входные каналы для дисперсной фазы со специальными отметками. Такая конструкция позволяла формировать входные отверстия на разном расстоянии от области образования капли и тем самым изменять гидравлическое сопротивление входного микроканала для дисперсной фазы. В полученных микрофлюидных чипах высота каналов составляла ~ 45 мкм, ширина выходного канала 200 мкм, апертура 15 мкм (Рисунок 2.4.1.1В). Габаритные размеры ПДМС реплики чипа были выбраны таким образом, чтобы расстояние от микроканалов до границ чипа составляли не менее 4 мм для предотвращения попадания воздуха в каналы сквозь ПДМС из-за его высокой газопроницаемости [153–155]. Дополнительно, места соединений смазывались минеральным маслом. В качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло (M5310, Sigma-Aldrich, Merck) с 3,5% w/w поверхностно-активного вещества Abil EM 180, в качестве дисперсной фазы – деионизированная вода.

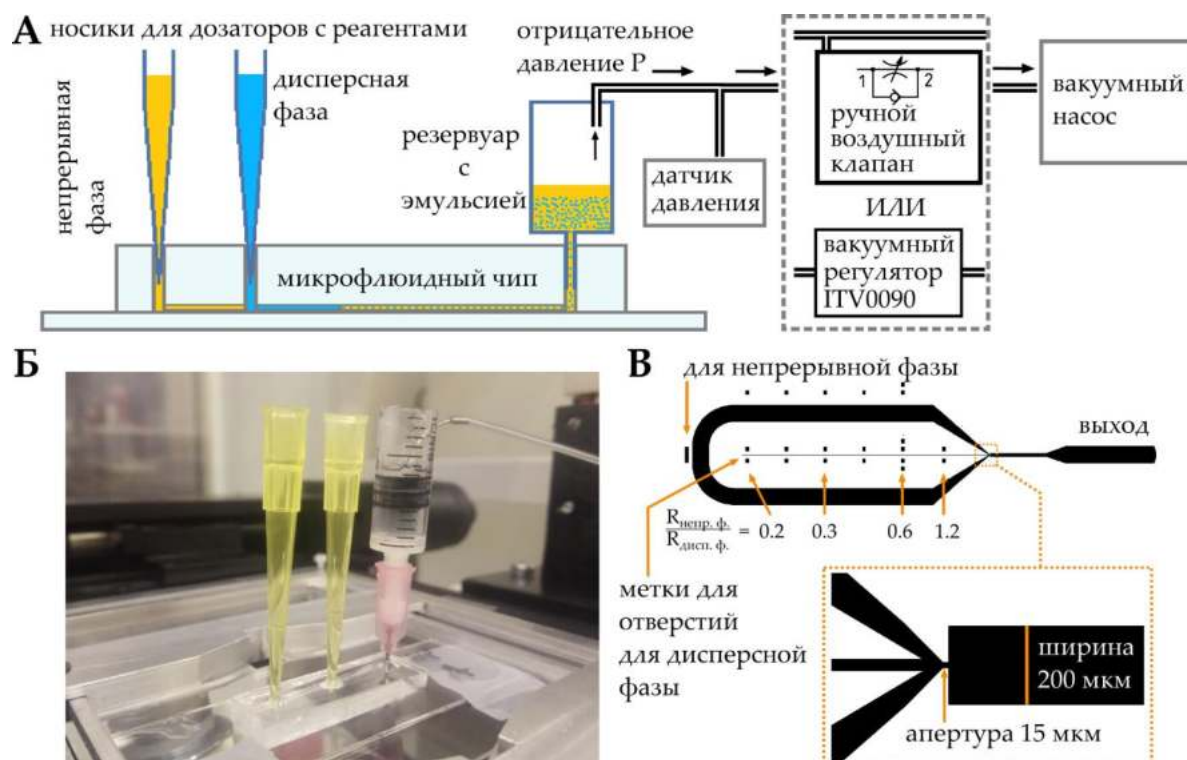


Рисунок 2.4.1.1 – Генерация капель эмульсии «вода-в-масле» в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока за счет приложения отрицательного давления к выходному резервуару: А) принципиальная схема установки; Б) общий вид микрофлюидного устройства; В) конструкция микрофлюидного чипа.

2.4.2. Исследование стабильности формирования капель отрицательным давлением

Как описывалось в разделе 2.1.1, основными параметрами, определяющими образование капель, являются капиллярные числа дисперсной и непрерывной фаз: $Ca = \eta V / \gamma$, где V – средняя скорость (м/с). η вязкость (Па·с) и γ межфазное поверхностное натяжение (Н/м). Средняя скорость определяется как: $V = Q/S$, где S – поперечное сечение каналов. Расход можно определить, как $Q = \Delta P / SR_h$ и среднюю скорость $V = \Delta P / SR_h$, где ΔP – это перепад давления, а R_h – гидравлическое сопротивление микроканалов. Гидравлическое сопротивление R_h зависит от размеров каналов и вязкости жидкости. Для прямоугольного микроканала длиной L , шириной w и глубиной h , заполненного жидкостью с вязкостью η , гидравлическое сопротивление можно рассчитать с помощью следующего уравнения [12]:

$$R_h = \frac{12\eta L}{wh^3(1-0.63h/w)}, h < w$$

Диаметр капель зависит от соотношения расходов [124], при этом в случае метода формирования капель отрицательным давлением разность давлений для фаз одинаковая, поэтому диаметр капель должен сильно зависеть именно от соотношения между гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов. От абсолютного значения прикладываемого давления на выходе должна зависеть частота генерации. Согласно уравнению, гидравлическое сопротивление линейно зависит от вязкости жидкости и длины канала. Поэтому для исследования их влияния на параметры капель, в ходе экспериментов варьировалась длина входного микроканала для дисперсной фазы, за счет изготовления входных отверстий на разном расстоянии от области генерации капель в соответствии с отметками, представленными на Рисунке 2.4.1.1В. Соотношение сопротивлений между непрерывной и дисперсной фазами $R_{con.ph.}/R_{disp.ph}$ при этом находилось в диапазоне от 0,23 до 1,2.

Для управления давлением в выходном резервуаре микрофлюидного устройства использовались два типа регуляторов: электропневматический регулятор ITV0090 и ручной клапан управления воздушным потоком. В обоих случаях было показано образование монодисперсной эмульсии вода-в-масле в капаящем режиме (Рисунок 2.4.2.1А). Чтобы оценить ее стабильность, диаметр капель и давление в выходном резервуаре измерялись каждые 15 минут в течение 4 часов (Рисунок 2.4.2.1Б). Для каждого измерения в установке с регулятором ITV и ручным клапаном коэффициент вариации (CV) диаметра капли, который определяется как отношение стандартного отклонения к среднему значению, составлял $CV_{ITV} \leq 1,2\%$ или $CV_{valve} \leq 1,3\%$ соответственно. Таким образом, образование капель было стабильным, а эмульсия воды в масле, собранная в выпускном резервуаре, была монодисперсной. Для обоих типов регуляторов общее стандартное отклонение диаметра капель составляло около 0,2 мкм при среднем диаметре 44 мкм. Данные датчика давления показали стандартное отклонение давления в выходном резервуаре при использовании ITV регулятора как $\sigma_{ITV} = 0,3$ кПа при среднем давлении $\langle P_{ITV} \rangle = -3,9$ кПа (Рисунок 2.4.2.1В). При использовании ручного клапана управления воздушным потоком стандартное отклонение было примерно в 10 раз выше: $\sigma_{valve} = 2,9$ кПа при среднем давлении $\langle P_{valve} \rangle = -4,5$ кПа (Рисунок 2.4.2.1Г). Однако значительно более сильные в этом случае колебания давления в выходном резервуаре не повлияли на стабильность режима образования капель при использовании ручного клапана управления воздушным потоком. Таким образом, оба типа регуляторов могут использоваться для создания монодисперсных эмульсий «вода-в-масле».

Экспериментальные данные, представленные на Рисунке 2.4.2.2, показывают, что диаметр капель и частота их генерации зависят от величины приложенного отрицательного давления в выходном резервуаре. По мере увеличения разницы давлений между входом и выходом микрофлюидного устройства скорость потока жидкости увеличивалась, что приводило к увеличению диаметра капель с 33–35 мкм до 45–65 мкм, в зависимости от

коэффициента гидравлического сопротивления $R_{\text{cont. ph.}}/R_{\text{disp.ph.}}$, при использовании регулятора ITV. Однако при отрицательном давлении ниже -30 кПа диаметр капель переставал зависеть от давления. Это происходило из-за того, что он в основном определяется соотношением капиллярных чисел или расходов дисперсной и непрерывной фаз и не зависит от их абсолютных значений (Рисунок 2.4.2.2А, Б) [124]. При использовании ручного клапана управления воздушным потоком диапазон диаметров капель был меньше, от 35 до 60 мкм.

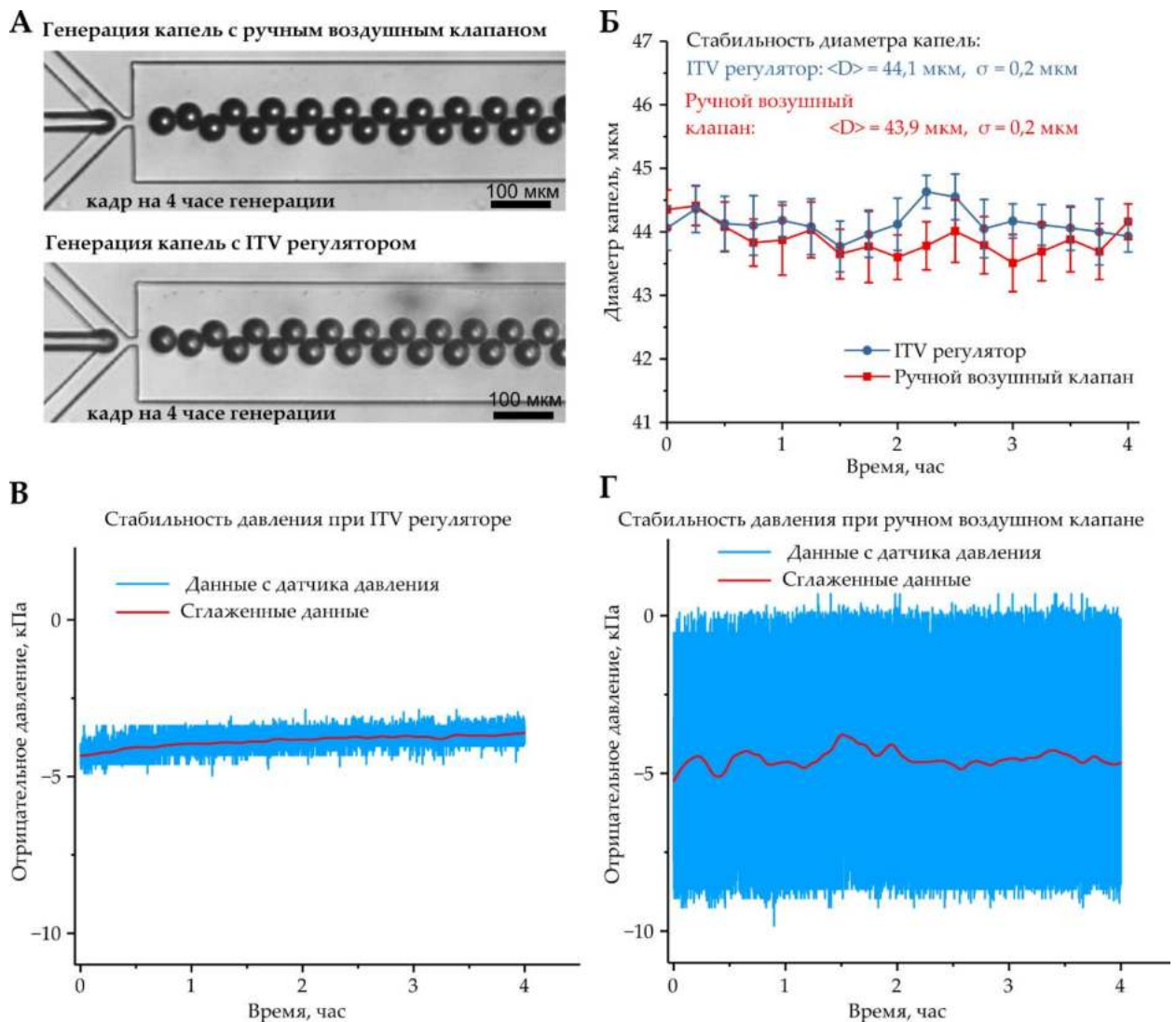


Рисунок 2.4.2.1 – Стабильность режимов генерации капель отрицательным давлением. А) Изображения образования капель в микрофлюидном устройстве с использованием регулятора ITV и ручного клапана управления воздушным потоком; Б) Зависимость диаметра капель от времени в течении 4-часового испытания на стабильность. Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение; В), Г) вариации давления в течении испытания для обоих типов регуляторов. Экспериментальные данные сглажены методом Loess (Span = 0,1).

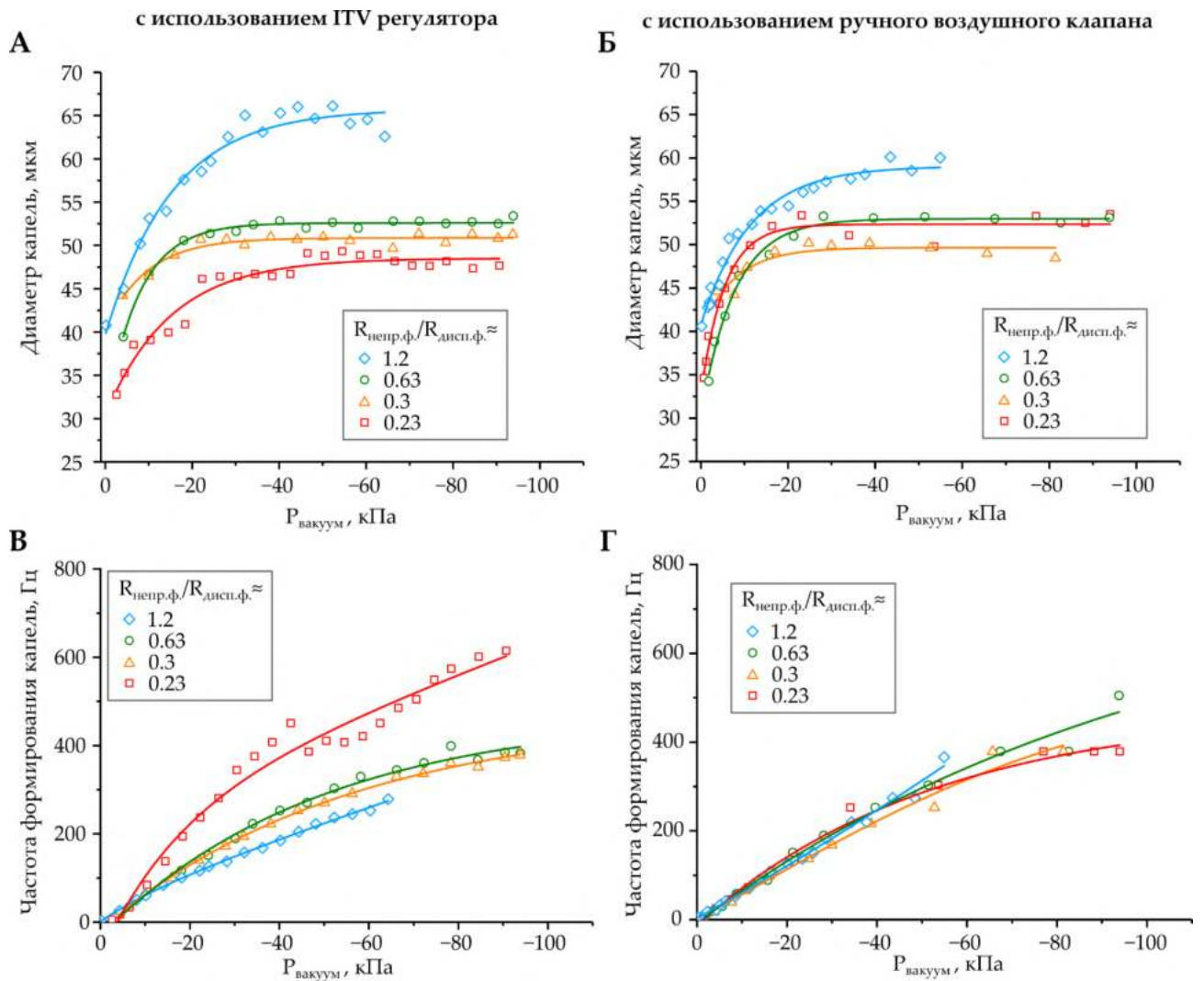


Рисунок 2.4.2.2 – Характеристики режимов генерации капель в микрофлюидном чипе по типу фокусировки потока при различных отрицательных давлениях в выходном резервуаре и различных гидравлических сопротивлениях входных каналов в установке с регулятором давления ITV или с ручным клапаном управления потоком воздуха: (А, Б) Зависимость диаметра капель от давления; (В, Г) Зависимость частоты генерации капель от давления. Линии на графиках являются ориентирами для удобного восприятия данных.

В отличие от диаметров капель частота их генерации монотонно возрастала с увеличением значения отрицательного давления в выходном резервуаре. В случаях образования капель с помощью регулятора ITV диапазон частот составлял от 0 Гц до 400–600 Гц, в зависимости от гидравлических сопротивлений впускных каналов (Рисунок 2.4.2.2В). При использовании ручного управления воздушным потоком частотный диапазон был немного ниже, от 0 Гц до 400–500 Гц, но практически не зависел от гидравлических сопротивлений

входных каналов (Рисунок 2.4.2.2Г). Предполагается, что эти различия в полученных параметрах генерации связаны с колебаниями давления в выходном резервуаре, вызванными колебаниями мембраны насоса, которые были значительно ниже при использовании регулятора ITV по сравнению с ручным клапаном.

Дальнейшие исследования показали, что при высоких уровнях отрицательного давления, когда диаметр капель не зависел от давления, он линейно зависел от соотношения между гидравлическими сопротивлениями входных каналов $R_{\text{con.ph.}}/R_{\text{disp.ph.}}$ при использовании либо регулятора ITV, либо клапана ручного управления воздушным потоком (Рисунок 2.4.2.3). Это указывает на то, что образование капель при высоких значениях отрицательного давления в выходном резервуаре нечувствительно к изменениям давления, стабильно и может обеспечивать высокую частоту формирования монодисперсных эмульсий «вода-в-масле» с каплями необходимого диаметра.

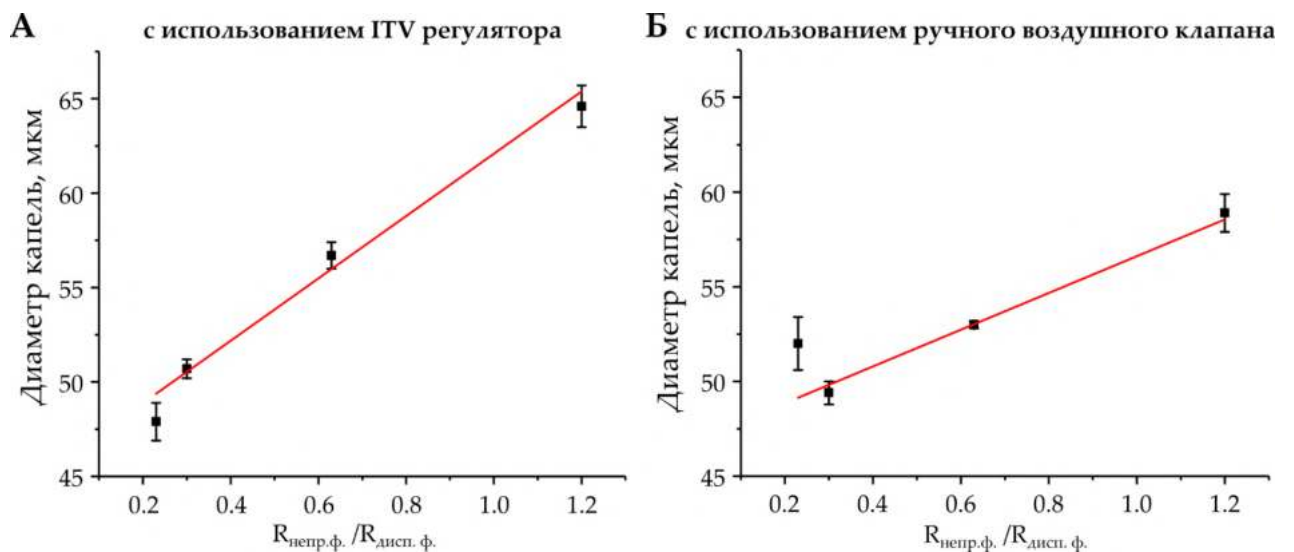


Рисунок 2.4.2.3 – Диаметр капель как функция соотношения между гидравлическими сопротивлениями непрерывной и дисперсной фаз, $R_{\text{cont.ph.}}/R_{\text{disp.ph.}}$. Генерация капель осуществлялась в установке с (А) регулятором ITV и (Б) ручным клапаном управления воздушным потоком. Значения диаметров измерены при давлении в выходном резервуаре -50 кПа, когда диаметр капель не зависел от его абсолютного значения. Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение.

Конструкция микрофлюидного устройства для формирования капель отрицательным давлением защищена патентом на полезную модель №199373 от 28 августа 2020 года (авторы Букатин А.С., Филатов Н.А., Ноздрюхин Д.В.).

Для исследования разработанного метода формирования капель эмульсии «вода-в-масле» с использованием отрицательного давления для образования двусоставных микрокапель (Рисунок 2.4.2.4) использовался микрофлюидный чип с апертурой 250 мкм и шириной выходного микроканала 1000 мкм, а также встроенный в МФКД вакуумный насос. В качестве непрерывной фазы применялось минеральное масло 3,5% Abil EM 180, а для дисперсной фазы – водный раствор PEGDA 50% w/w с фотоинициатором Irgacure 1,4 % w/w. Для различия двух потоков дисперсных фаз – одна из них была подкрашена синим красителем.

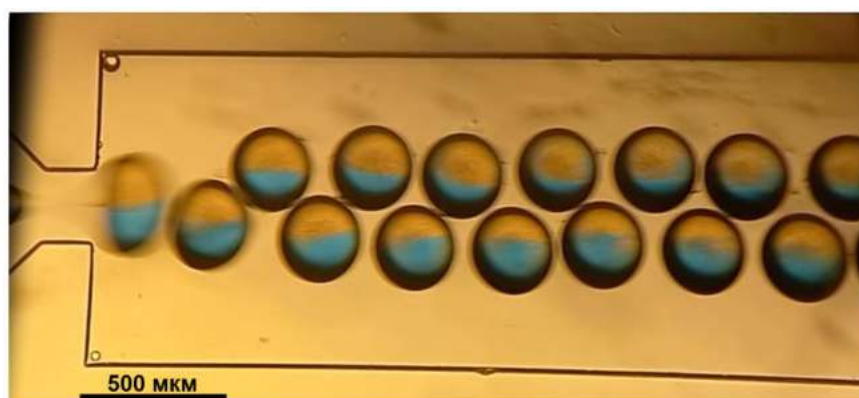


Рисунок 2.4.2.4 – Формирования двусоставных микрокапель отрицательным давлением из гидрогеля PEGDA.

Заключение к разделу 2.4

В данном разделе были исследовали режимы образования монодисперсных капель «вода-в-масле» в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока, ввод жидкостей в которое осуществлялся путем создания отрицательного давления в выходном резервуаре, в то время как входные резервуары поддерживались при атмосферном давлении. Для этого было предложено использовать мини-диафрагменный вакуумный насос для создания отрицательного давления и либо электропневматический регулятор SMC

ITV0090-2L, либо ручной клапан для управления уровнем разряжения в выходном резервуаре.

Экспериментальные данные показали, что с обоими типами регуляторов давления образование эмульсии вода-в-масле было стабильным в течение не менее 4 часов. Коэффициент вариации диаметра капель в обоих случаях составил не более 1,3%, а его стандартное отклонение 0,2 мкм при среднем диаметре 44 мкм. Однако, регулятор ITV лучше подавлял вариации давления в выходном резервуаре, вызванные колебаниями мембраны насоса, что приводило к достижению большего диапазона диаметров капель и частот генерации.

Дальнейшие исследования показали, что при относительно высоких уровнях отрицательного давления, ниже -30 кПа, диаметр капель не зависит от абсолютного значения давления, а определяется соотношением между гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов. Эти сопротивления определяют скорости потоков и капиллярные числа непрерывной и дисперсной фаз. Было экспериментально показано, что диаметр капель линейно зависит от соотношения между этими гидравлическими сопротивлениями. Напротив, частота образования капель определяется суммарными абсолютными значениями расходов обеих фаз и монотонно зависит от приложенного отрицательного давления, показывая слабую зависимость от гидравлических давлений входных микроканалов.

В ходе исследования было показано, что ввод жидкостей в микрофлюидный чип с фокусировкой потока отрицательным давлением в выходном резервуаре является удобным и надежным способом создания монодисперсных эмульсий «вода-в-масле» с заданным диаметром капель. Оба регулятора давления подходят для этой цели и дают аналогичные результаты. Однако электропневматический регулятор серии ITV оказался предпочтительнее и удобнее для точного контроля давления с помощью внешнего электрического сигнала по сравнению с ручным клапаном управления воздушным потоком.

Важно отметить, что для получения воспроизводимых результатов с помощью отрицательного давления не требуются внешние датчики давления и специальная калибровка. Для определения значений гидравлических сопротивлений входных микроканалов для конкретных типов жидкостей, можно проводить экспериментальные испытания, направленные на поиск стабильных режимов генерации и/или проводить численное моделирование. После учета полученных данных в конструкции микрофлюидного чипа образование капель эмульсии под действием отрицательного давления в выпускном резервуаре будет стабильным и нечувствительным к колебаниям давления, поэтому его можно использовать как альтернативу шприцевым насосам и МФКД для создания капель эмульсии или микрочастиц со сложной внутренней структурой, таких как двух- и многослойные эмульсии, для которых требуется несколько типов непрерывных и дисперсных фаз.

2.5. Усиление перемешивания реагентов в асимметричных генераторах микрокапель

Анализ литературных данных показал, что в микрофлюидных устройствах (типичные размеры каналов 10 – 500 мкм) организация эффективного перемешивания веществ оказывается отдельной научно-технической задачей. Для таких систем характерно ламинарное течение, когда жидкость или газ перемещаются параллельными слоями без образования завихрений. При этом для большинства практических приложений микрофлюидных чипов требуется контролируемо и в рамках заданного времени перемешивать реагенты на микроуровне для обеспечения воспроизводимых результатов биохимических и химических реакций. Особенно это важно при проведении капельной ПЦР, синтезе химических веществ, создании микрочастиц. Поэтому актуальной задачей является разработка компактных и эффективных микромиксеров.

В данной работе исследуется асимметричная конструкция генератора капель с фокусировкой потока (Рисунок 2.5.1А) в сравнении с классической

симметричной (Рисунок 2.5.1Б), которая обеспечивает перемешивание реагентов сразу при формировании капли, не требует дополнительных функциональных элементов и является более компактной по сравнению с существующими в настоящее время решениями.

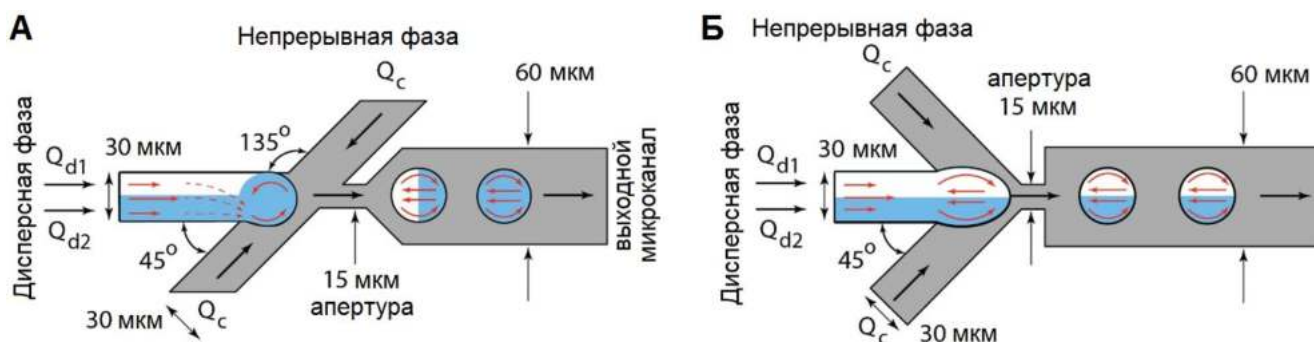


Рисунок 2.5.1 – Схема организации потоков жидкости в генераторах капель с фокусировкой потоков. А) Асимметричная конструкция с боковыми каналами, расположенными под углом 45° и 135° к центральному каналу. Б) Симметричная конструкция с боковыми каналами, расположенными под углом 45° к центральному каналу.

Для определения условий перемешивания проводилось двухмерное численное моделирование потоков жидкости и распределения реагентов в каплях и полученные результаты сравнивались с обычным симметричным устройством. Также проводились экспериментальные исследования для проверки результатов моделирования.

Генерация и движение капель в микрофлюидном устройстве можно описать двухфазными потоками двух несмешивающихся жидкостей. На границе раздела двух фаз, в отличие от границы раздела жидкость-твердое тело, задается граничное условие непрерывности скорости и тангенциального напряжения [67]:

Граница раздела жидкость/жидкость	Граница раздела жидкость/твердое тело
$u_n _{in} = u_n _{out} = V_{interface}$ $u_\tau _{in} = u_\tau _{out}$ $\eta_{in} \frac{\partial u_\tau}{\partial r} \Big _{in} = \eta_{out} \frac{\partial u_\tau}{\partial r} \Big _{out}$	(Проскальзывания нет) $\mathbf{u} _{interface} = V _{interface}$

где u_n и u_τ – нормальная и тангенциальная составляющие скорости жидкости, η_{in} и η_{out} – вязкость, $V_{interface}$ – скорость границы раздела жидкость/жидкость или жидкость/твердое тело.

Из-за таких граничных условий в двухфазных потоках движение непрерывной фазы вызывает появление двух сложных вихрей внутри движущейся капли. Исследования подобных эффектов проводились с помощью метода *micro-PIV* (particle image velocity) [156]. Если капли движутся по прямому каналу, вихри располагаются симметрично относительно его центра. Таким образом, перемешивание реагентов ограничивается в основном диффузией через границу между этими вихрями.

Граничные условия также играют ключевую роль в структуре потоков жидкости во время образования капель. В микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока это происходит в струйном (*jetting*) или капающем (*dripping*) режиме [124]. В режиме капания этот процесс делится на несколько этапов: заполнение дисперсной фазой области генерации, ее сужение и отрыв капли от нее [157]. На стадии заполнения скорость границы раздела между двумя жидкими фазами намного меньше, чем скорость непрерывной фазы. Таким образом, поток непрерывной фазы вызывает вихри в дисперсной фазе во время образования капель. Симметрия каналов определяет симметрию этих вихрей, а отверстие (апертура), вставленное перед выходным каналом, увеличивает время стадии заполнения, чтобы усилить влияние этих вихрей на распределение реагентов во вновь образованных каплях. Следовательно, асимметричная форма генератора капель вызывает асимметричный вихрь в дисперсной фазе, который может улучшить перемешивание во время образования капель.

Чтобы выяснить, как симметрия каналов влияет на потоки жидкости и распределение реагентов в каплях, были рассмотрены асимметричное микрофлюидное устройство с фокусировкой потока с боковыми каналами, расположенными под углом 45° и 135° к центральному каналу (Рисунок 2.5.1А), и симметричное устройство с боковыми каналами, расположенными под углом 45°

к центральному каналу (Рисунок 2.5.1Б). Ширина выходного микроканала в обоих вариантах составляла 60 мкм. Эти устройства имели один вход для непрерывной фазы (минеральное масло) и два входа для дисперсной фазы (вода и водный раствор красителя). Раствор красителя вводился из нижней половины канала дисперсной фазы (Q_{d2} на Рисунке 2.5.1), а другая половина была заполнена водой без красителя (Q_{d1} на Рисунке 2.5.1). В качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло (№ M8410, Sigma-Aldrich, Merck), с плотностью 840 кг/м^3 , вязкость $0,03 \text{ Па}\cdot\text{с}$. Концентрация ПАВ ABIL EM 180 в масле составляла 3,5%. Для измерения скорости жидкости в дисперсную фазу (деионизованная вода) добавляли индикаторные частицы размером 1 мкм (Polysciences Inc., № 08226-15). Для изучения перемешивания малых молекул в одну из дисперсных фаз добавляли краситель Coomassie Brilliant Blue G-250 (№ 1154440025, Sigma-Aldrich, Merck).

Эффективность перемешивания во время образования капель напрямую зависит от профилей скорости непрерывной и дисперсной фаз в микрофлюидном устройстве. Ключевую роль в процессе перемешивания играет скорость и положение границы раздела между этими фазами. Несколько групп разработали подходы к моделированию образования капель в устройствах для симметричной фокусировки потока [158,159] и дробления капель в T-образном переходе [160]. Хотя трехмерное моделирование наиболее предпочтительно в виду того, что реальные микроканалы трехмерны, оно требует больших вычислительных ресурсов, и в ряде случаев двухмерное моделирование также может предоставить информацию о протекающих процессах и иметь хорошее качественное согласие с экспериментальными данными [158,161]. Более того, оно позволяет прогнозировать распад капель в T-образном соединении и моделировать ранние стадии распада, но может переоценить толщину «перешейка» между двумя вновь образованными каплями [159]. Количественное описание режимов генерации капель может быть выполнено, если геометрия устройства позволяет использовать двумерное осесимметричное моделирование [159].

Чтобы проверить, как симметрия области фокусировки потока генераторов капель влияет на потоки жидкости и распределение реагентов, проводилось двумерное численное моделирование образования капель как для симметричных, так и для асимметричных генераторов в программе Comsol Multiphysics, используя подход, аналогичный подходу, описанному в [159].

Двумерное моделирование процесса образования капель в микрофлюидных устройствах с фокусировкой потока было выполнено в программе COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc., Берлингтон, Массачусетс) с использованием модулей «Ламинарный двухфазный поток, фазовое поле» и «Транспорт разбавленных веществ» (“Laminar Two-Phase Flow, Phase Field” and “Transport of Diluted Species” modules) [162]

Чтобы экспериментально исследовать, как симметрия генераторов капель по типу фокусировки потоков влияет на движение жидкости и распределение реагентов, были изготовили микрофлюидные устройства ПДМС/стекло с симметричным и асимметричным генераторами. Глубина каналов этих устройств составляла 40 мкм и 60 мкм. Такие глубины соответствовали аспектному соотношению сторон области образования капель 1:1 и 3:2 соответственно и позволили проверить, насколько сопоставимы результаты проведенного численного моделирования с экспериментом. Соотношения сторон были рассчитаны как $Aspect_Ratio = D/\sqrt{A}$, где D – глубина каналов, а A – площадь места образования капель.

Непрерывная фаза и дисперсные фазы (одна или две) загружались в гамильтоновские стеклянные шприцы объемом 500 мкл и 100 мкл, соответственно, в два шприцевых насоса (PHD 2000, Harvard Apparatus, США). Далее жидкости вводились в микрофлюидный генератор капель при постоянном расходе в диапазоне 0,1–2 мкл/мин. Для измерений поля скоростей методом micro-PIV и распределения реагентов в дисперсную фазу добавляли индикаторные микрочастицы диаметром 1 мкм или краситель Coomassie Brilliant Blue G-250.

Высокоскоростное получение изображений (1000–6000 кадров в секунду) осуществлялось на камере SC-1 (Edgertronic, США) в сочетании с инвертированным оптическим микроскопом Nikon Eclipse TE2000 с объективом 40×NA 1.4. PIV-анализ выполнялся с помощью программного обеспечения PIV lab [163]. Для получения статических изображений капель с помощью красителя Coomassie Brilliant Blue G-250 использовался объектив 20×NA 0,75 и камера Nikon D3000. Фокус линзы регулировался по центру выходного канала устройства по максимальному контрасту границы капель. Для расчета индекса перемешивания внутри капель все цветные изображения были преобразованы в черно-белые [164]. Интенсивность света внутри капель использовалась для расчета относительного распределения красителя и индекса перемешивания с помощью скрипта Matlab. При этом на полученных изображениях все капли выделялись в ручном режиме. Затем для каждой капли рассчитывались максимальная и средняя концентрации красителя, анализируя цвет каждого пикселя. Изображение отдельной капли имело размер около 250×250 пикселей², граница капель в 20 пикселей не учитывалась из-за сильного рассеяния света на изогнутой поверхности интерфейса и взаимодействия с границами канала. Чтобы сделать расчеты более точными, изображения были инвертированы и осуществлялась нормализация интенсивности пикселей внутри капель к интенсивности пикселей с нулевой и максимальной концентрацией красителя во впускном канале перед областью образования капли. После такой нормализации все пиксели имели значения от 0 до 1.

Двумерные измерения профиля скорости дисперсной фазы с помощью micro-PIV показали, что направление и структура потока жидкости в области образования капель на стадии заполнения зависит от симметрии и глубины каналов устройства (Рисунок 2.5.2). Чтобы оценить структуру потока жидкости и проверить, является ли она 2D или 3D, использовалось уравнение неразрывности для несжимаемой жидкости $\text{div}(\mathbf{V})=0$. Согласно этому уравнению распределение безразмерной величины $K=\text{div}(\mathbf{V}_{2D}) \cdot h/|\mathbf{V}_{2D}|$, где \mathbf{V}_{2D} - скорость, полученная с

помощью 2D PIV, h – глубина канала, может указывать на трехмерную структуру потока, поскольку она пропорциональна величине проекции скорости на ось Z . В симметричной геометрии поток жидкости состоял из двух симметричных вихрей независимо от глубины каналов. Напротив, в генераторах асимметричных капель структура и направление потока жидкости сильно зависели от глубины каналов из-за различного положения границы раздела между дисперсной и непрерывной фазами на стадии заполнения (Рисунок 2.5.2А–В). Вихрь приобретал сложную трехмерную структуру течения с увеличением аспектного отношения от 1:1 (глубина канала 40 мкм) до 3:2 (глубина канала $h = 60$ мкм). Это приводило к изменению направления потока жидкости на противоположный независимо от расходов дисперсной и непрерывной фаз. Более того, в обеих асимметричных геометриях эти вихри были асимметричными, и их максимальная скорость была в несколько раз выше, чем в симметричной геометрии, что соответствовало более высокой дисперсии Тейлора из-за более высокого числа Пекле.

Чтобы определить, как изменения геометрии генератора капель и потоков жидкости повлияют на параметры капель, были измерены их диаметр и частота генерации при различных расходах дисперсной фазы, в то время как расход непрерывной фазы Q_c составлял 1 мкл/мин (Рисунок 2.5.2К). Во всех случаях режимы генерации были стабильными, а диаметры капель линейно зависели от соотношения между расходами фаз с коэффициентом вариации менее 4%. Если аспектное соотношение области образования капель составляло 1:1 (глубина канала 40 мкм), диаметры и частоты генерации капель, образовавшихся в симметричном и асимметричном генераторах, были близки друг к другу и близки к результатам моделирования. Для соотношения сторон 3:2 (глубина канала 60 мкм) диаметры капель и частоты генерации сильно зависели от симметрии устройства, что приводило к увеличению диаметра до 30% и более высоким частотам в симметричной геометрии.

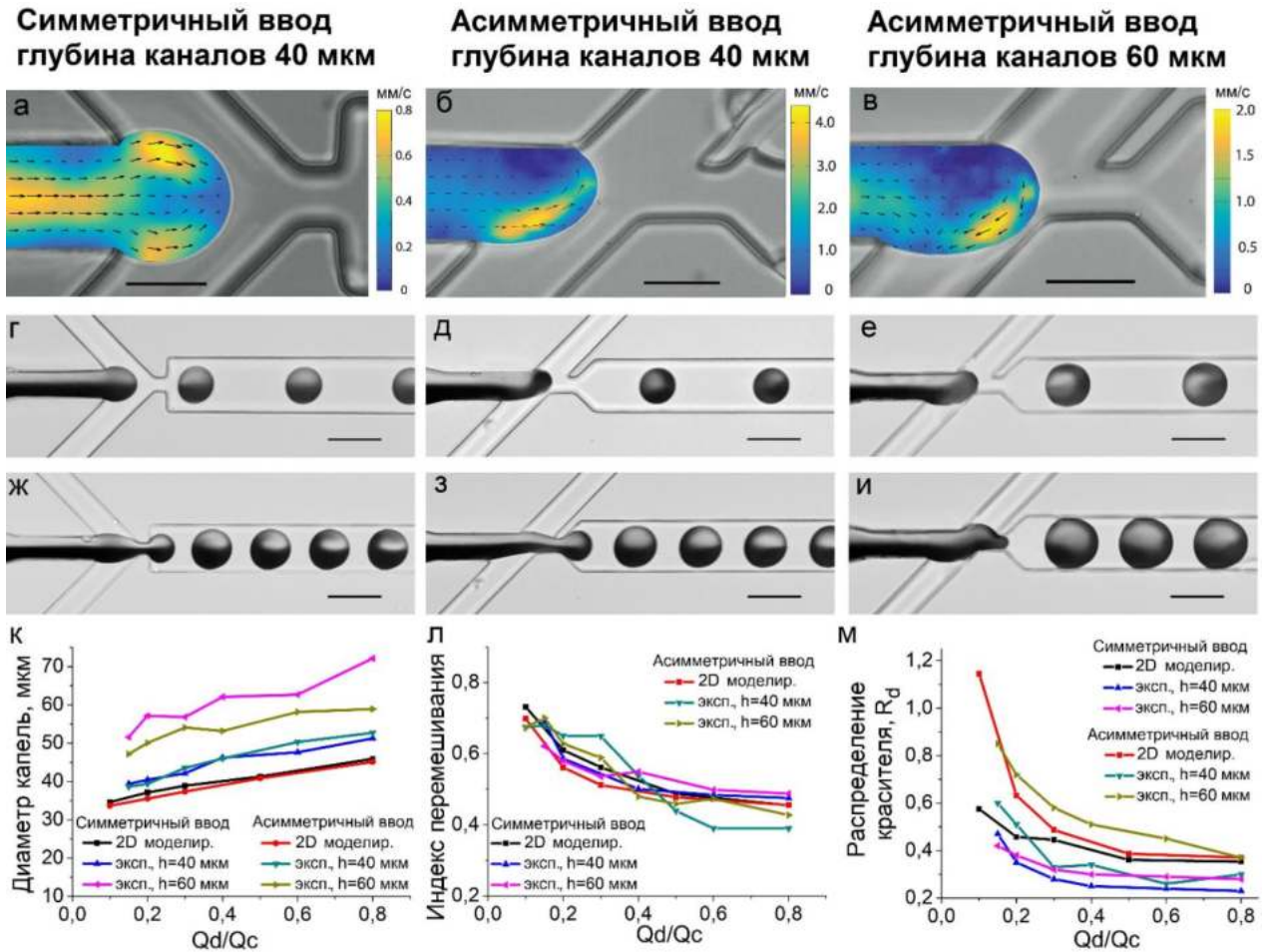


Рисунок 2.5.2 – Экспериментальная характеристика процесса образования капель в симметричных и асимметричных генераторах. (а-в) PIV-измерения профиля скорости дисперсной фазы на стадии заполнения. (г-и) Упаковка красителя в капли. (к) Диаметр капель при различных расходах дисперсной и непрерывной фаз. (л) Индекс перемешивания во вновь образованных каплях в различных генераторах капель. (м) Коэффициент распределения красителя R_d при различных расходах. Расходы дисперсной и непрерывной фазы Q_d и Q_c составляли (а-е) 0,2 мкл/мин и 1 мкл/мин, (ж-и) 0,6 мкл/мин и 1 мкл/мин, соответственно. (к-м) Расход непрерывной фазы $Q_c = 1$ мкл / мин. Масштаб составляет 30 мкм (а-в) и 60 мкм (г-и).

Чтобы исследовать усиление перемешивания, вызванное асимметричными вихрями в области образования капель, исследовалось распределение красителя в каплях во время их движения в прямом выходном канале. Оно было основано на измерениях интенсивности света внутри капель, соответствующей концентрации красителя, и включало в себя расчет индекса перемешивания (MI) [165] и коэффициента распределения красителя R_d между его количествами в верхней и нижней половинах капель:

$$MI = 1 - \left(\frac{\iint (c - \bar{c})^2 dA}{A \bar{c} (c_{\max} - \bar{c})} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad R_d = \frac{Q_{up}}{Q_{down}},$$

где A – площадь капли, c – концентрация красителя, \bar{c} и c_{\max} – средняя и максимальная концентрации красителя в капле соответственно, Q_{up} и Q_{down} – количество красителя в верхней и нижней половинах капли.

Измерения распределения красителя (Рисунок 2.5.2Г–И) показывают, что из-за асимметричного вихря количество красителя в верхней половине капли увеличивается. Сразу после образования капли индекс перемешивания реагентов в ней не зависел от конструкции всех рассмотренных генераторов капель и глубины каналов (Рисунок 2.5.2Л). Для капель диаметром 35–45 мкм (объем 30–50 мкл) индекс перемешивания составлял примерно 0,6–0,7 и уменьшался с увеличением размера капель. Напротив, коэффициент распределения R_d сильно зависел от симметрии генераторов капель (Рисунок 2.5.2М), и в асимметричных устройствах он был значительно выше, чем в симметричных. Такое поведение указывает на то, что прямого перемешивания во время образования капель не происходит из-за малой длительности стадии образования капли. Однако, асимметричные вихри изменяют распределение реагентов во вновь образованных каплях, и эти изменения значительны, когда объем капель близок к объему области образования капель. Дальнейшее моделирование показывает, что эти изменения монотонно зависят от угла между боковыми каналами и центральным каналом и являются относительно сильными, поскольку в асимметричной геометрии индекс перемешивания практически не зависит от коэффициента диффузии (в диапазоне 10^{-11} – 10^{-10} м²/с), тогда как в симметричной геометрии быстро уменьшается.

Поле скоростей и направление течения жидкости в области образования капель в асимметричном микрофлюидном устройстве с глубиной каналов 40 мкм (соотношение сторон 1:1) хорошо соотносится с результатами двумерного моделирования. Установлено, что с увеличением глубины до 60 мкм

(соотношение сторон 3:2) рециркулирующий вихрь показывает противоположное направление. В то же время экспериментально определенные значения индекса перемешивания и коэффициента распределения R_d в устройствах с глубиной каналов 60 мкм ближе к результатам моделирования, чем для устройств с глубиной каналов 40 мкм. Такие различия указывают на то, что результаты двумерного моделирования процесса формирования капель эмульсии «вода-в-масле» могут использоваться только для качественного анализа.

После того, как капли образовались, они продолжают перемещаться по прямому каналу к выходному отверстию. Во время этого течения реагенты продолжают перемешиваться из-за циркулирующих потоков жидкости и диффузии внутри капель. Это приводит к увеличению индекса перемешивания. Эксперименты показали, что эффективность этого процесса зависит от исходного распределения реагентов сразу после образования капли (Рисунок 2.5.3), в соответствии с предыдущими исследованиями [84]. Таким образом, на него напрямую влияет симметрия области фокусировки потока, глубины канала и объема капли. В случае капель диаметром 42 мкм (объем 39 пл), сформированных в генераторе асимметричных капель с глубиной каналов 40 мкм, частота генерации составляла 50 Гц, а индекс перемешивания 0,85 наблюдался через 60 мс, когда капли проходили 0,55 мм в выходном канале (Рисунок 2.5.3А). Если глубина каналов составляла 60 мкм, то из-за трехмерных потоков время перемешивания достигало уровня 0,85 в каплях размером 51 мкм (объем 69 пл) за 30 мс, когда капли проходили 0,24 мм в выходном канале (Рисунок 2.5.3Б). В случае симметричной конструкции с высотой каналов 40 мкм наблюдались те же результаты только через 200 мс, когда капли диаметром 40 мкм проходили 1,7 мм в выходном канале (Рисунок 2.5.3В). В симметричной конструкции с высотой каналов 60 мкм и после прохождения 2 мм в выходном канале индекс перемешивания составлял всего 0,8 для капель диаметром 47 мкм.

Оптимальный объем капель для эффективного перемешивания можно определить как объем области образования капель в микрофлюидном чипе. При

увеличении размера капле эффективность перемешивания уменьшается независимо от глубины канала (Рисунок 2.5.3Д). Так, при глубине 60 мкм (соотношение сторон 3:2), и при увеличении диаметра капли с 50 до 55 мкм (объем с 62 пл до 83 пл) индекс перемешивания резко снижается для асимметричной геометрии (Рисунок 2.5.3Д). Таким образом, для эффективного перемешивания диаметр капли должен отличаться не более, чем на 10% от оптимального значения. В этом случае изменение объема может составлять 30%. Аналогичные соотношения подтверждаются и для генераторов капле с глубиной канала 40 мкм.

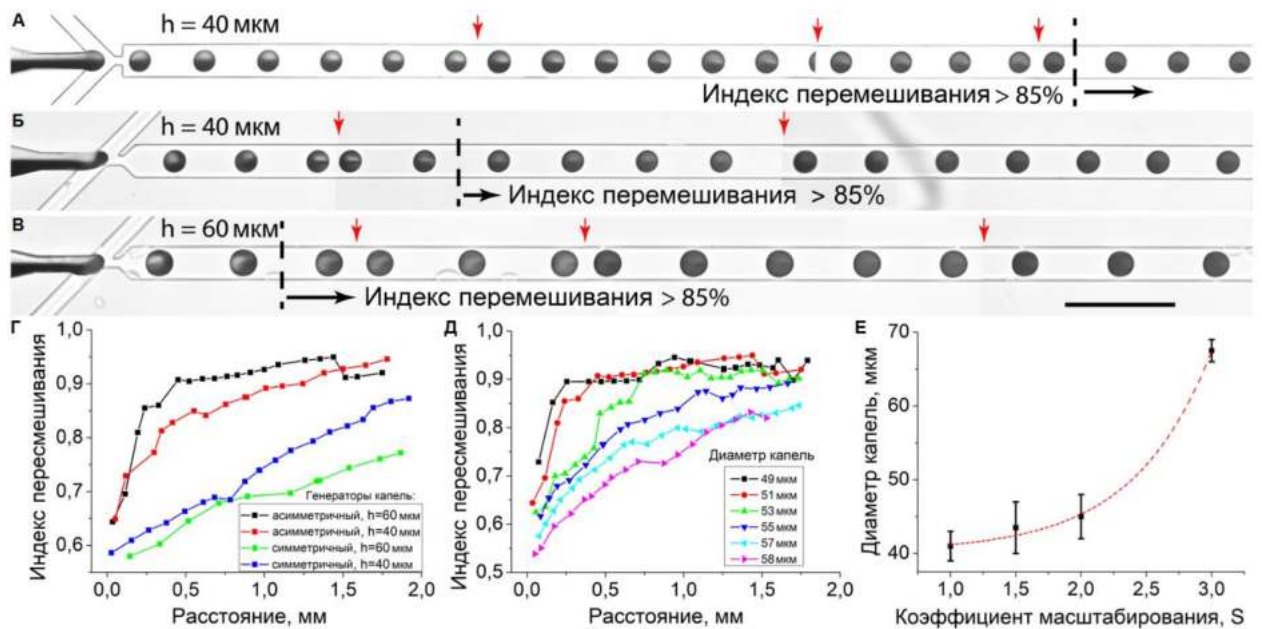


Рисунок 2.5.3 – Изменение распределения красителя во время течения капле в прямом выходном канале. Генерация капле и упаковка красителя в генераторах капле с фокусировкой потока с (А) симметричной геометрией и глубиной канала $h=40 \mu\text{m}$, (Б) асимметричной геометрией и глубиной канала $h=40 \mu\text{m}$, (В) асимметричной геометрией и глубиной канала $h=60 \mu\text{m}$. (Г) Изменение индекса перемешивания во время миграции капле в прямом выходном канале в различных генераторах капле ($Q_c=1 \mu\text{л/мин}$, $Q_d=0,2 \mu\text{л/мин}$). (Д) Изменение показателя перемешивания внутри капле разного диаметра, сформированных в генераторе асимметричных капле с глубиной каналов $h=60 \mu\text{m}$. (Е) Диапазон диаметров капле с эффективностью перемешивания $> 85\%$ после прохождения $0,6 \text{ мм}$ в выходном канале с различным масштабированием области образования капле S. Пунктирная линия является ориентиром для удобного просмотра. Масштаб (А-В) составляет $200 \mu\text{m}$. Изображения (А-В) представляют собой сшитые изображения, снятые одно за другим в одном эксперименте, красные стрелки указывают на точки сшивки.

По сравнению с симметричной геометрией (Рисунок 2.5.3Г), для капель ~40 мкм в диаметре эффективность перемешивания намного выше в асимметричных устройствах, хотя для крупных капель (~60 мкм в диаметре) она становится аналогичной. В соответствии с этим, асимметричная геометрия обеспечивает эффективное перемешивание реагентов в 30%-ном диапазоне возможных объемов капель. Чтобы преодолеть это ограничение, можно использовать масштабирование области генерации капель, в то время как внешние габариты микрофлюидного устройства и расположение микроканалов может оставаться неизменным.

Было протестировано четыре генератора капель с различным масштабированием области образования капель при одинаковой глубине каналов и обнаружено, что диаметры капель, в которых происходит эффективное перемешивание, увеличиваются при увеличении коэффициента масштабирования $S = A_2/A_1$, где A_i – площадь области образования капель (Рисунок 2.5.3Е). Установлено, что масштабирование геометрии в 3 раза приводило к образованию капель с объемом до 4 раз больше с эффективным перемешиванием реагентов. Однако зависимость является нелинейной из-за комплексного влияния соотношения сторон микроканалов и капиллярных чисел на размер капель [124,166]. Таким образом, для каждого диаметра капель геометрия области образования капель должна определяться индивидуально для достижения эффективного перемешивания.

Заключение к разделу 2.5

В работе были проведены экспериментальные исследования влияния асимметричного расположения каналов непрерывной фазы в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока на режим генерации капель эмульсии «вода в масле» и эффективность перемешивания реагентов. Предложенная конструкция позволяет формировать одиночный асимметричный рециркуляционный вихрь в дисперсной фазе на стадии образования капель, что приводит к повышению

скорости перемешивания. Обнаружено, что направление и поле скоростей этого вихря напрямую зависят от аспектного отношения области фокусировки потока. При соотношении 1:1 (глубина каналов 40 мкм) вихрь направлен против часовой стрелки и в основном двумерен, что очень близко к результатам компьютерного моделирования. Если соотношение сторон увеличивается до 3:2 (глубина каналов 60 мкм), то граница раздела между непрерывной и дисперсной фазами меняет свое положение, что приводит к изменению направления потока на противоположное, и поток становится преимущественно трехмерным.

Индекс перемешивания непосредственно после образования капли не зависит от конструкции генератора. Выяснено, что из-за различного начального распределения, вызванного асимметричным вихревым движением, перемешивание реагентов в асимметричном устройстве фокусировки потока происходит до шести раз быстрее, чем в обычном симметричном. Ограничение предлагаемой конструкции состоит в том, что эффективное перемешивание происходит только в узком диапазоне объемов капель, близких к объему области образования капель. Чтобы преодолеть это ограничение, область фокусировки потоков может быть масштабирована для достижения требуемых размеров капель.

Сравнение результатов экспериментальных исследований с данными двумерного численного моделирования показало, что моделирование может предоставить полезную качественную информацию о двухфазных потоках течения жидкости и процессах генерации капель в квазидвумерных микрофлюидных устройствах. Относительная простота такого моделирования позволяет легко применять его к довольно сложным геометриям микрофлюидных устройств.

Такая асимметричная конструкция может найти множество применений и улучшить существующие микрофлюидные устройства для точных кинетических измерений ферментов, мониторинга различных процессов в режиме реального времени и устройств для оказания помощи на месте, где сокращение времени

перемешивания реагентов и простота конструкции устройства имеют решающее значение.

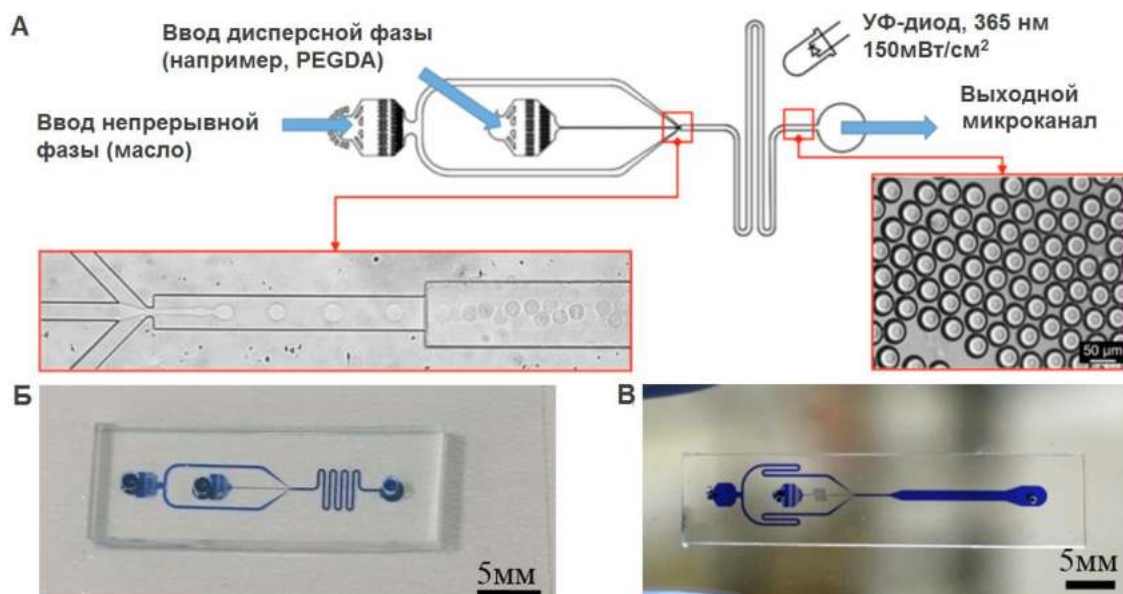
2.6. Синтез и характеристика гидрогелевых микрочастиц в микрофлюидных генераторах капель

На основании литературного анализа (раздел 1.6-1.8) в качестве гидрогелей для разработки методов синтеза микрочастиц с помощью созданной микрофлюидной платформы были выбраны: полиэтиленгликоль диакрилат (PEGDA), полиакриламид, альгинат натрия, желатин метакрилоил (GelMA) и агароза. Такие гидрогели выбраны на основании свойств биосовместимости, инертности и возможности реализовать технологию полимеризации гидрогеля в микрофлюидном чипе. Также выбор зависел от областей использования гидрогелей. PEGDA, GelMA и агарозные микрочастицы могут использоваться для построения 3D каркасов для культивирования клеток в объеме, или создания специфических носителей для клеток. Полиакриламидные микрочастицы могут применяться для капельной ПЦР. Также, микрочастицы из PEGDA и полиакриламида могут служить в качестве микрокапсул для доставки и управляемого выхода лекарств из них. Микрочастицы из альгината натрия могут быть основой как 3D биочернил, так и функциональных элементов систем органа-чипе.

На Рисунке 2.6.1.1А показана принципиальная схема устройства микрофлюидного чипа для синтеза микрочастиц из гидрогеля полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA). С минимальными изменениями схема применима и для синтеза микрочастиц из других гидрогелевых материалов.

На Рисунке 2.6.1.1 указаны места ввода дисперсной и непрерывной фаз, место формирования капель с изображением примера генерации капель. Область изгибающегося микроканала требуется для продолжительной засветки микрокапель УФ-излучением с длиной волны 365 нм для полимеризации PEGDA. На выходе микрофлюидного чипа изображен пример сформированной

монодисперсной макроэмульсии. Примеры готовых чипов для формирования гидрогелевых микрочастиц показаны на Рисунке 2.6.1.1Б, В.



Рисунке 2.6.1.1 – А) Принципиальная схема и изображение процесса формирования гидрогелевых микрочастиц на примере PEGDA; Б), В) изображения микрофлюидных чипов для формирования микрочастиц. Для лучшей визуализации все каналы заполнены синим красителем.

2.6.1. Изучение микрочастиц из PEGDA

Для работы с гидрогелем PEGDA в качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло (330779 light, Sigma-Aldrich) с поверхностно-активными веществами Abil EM 180 и Span 80. Дисперсная фаза – водный раствор PEGDA в концентрации от 10 до 100% в смеси с фотоинициатором Irgacure 2959. Для полимеризации (сшивки) капле применялась ультрафиолетовый светодиод с длиной волны 365 нм и мощностью излучения 150 мВт/см².

Отличительной особенностью микрофлюидных чипов для синтеза гидрогелевых микрочастиц (Рисунок 2.6.1.1Б, В) является длинный изогнутый выходной микроканал. Такой канал обеспечивает возможность увеличить длительность облучения УФ-излучением капли для их лучшей полимеризации. Также экспериментально установлено, что наилучшие результаты по формированию стабильных микрочастиц достигаются в микрофлюидных чипах с

апертурой 15 мкм, шириной выходного канала 60 мкм, которая затем увеличивается до 120 мкм, и глубиной 40 мкм, увеличивающейся до 120 мкм.

Вязкость водного раствора неполимеризованного полиэтиленгликоля (PEG) зависит от его концентрации в широких пределах [167]. Поэтому при увеличении концентрации PEGDA в дисперсной фазе наблюдается изменение режима генерации капель макроэмульсии с капающего на струйный при формировании капель одинакового диаметра (Рисунок 2.6.1.2А, Б), что связано с увеличением капиллярного числа дисперсной фазы [124]. Анализ диаметров микрочастиц показал, что переход с капающего режима на струйный ухудшает коэффициент вариации диаметра с 5% до 30%.



Рисунок 2.6.1.2 – Формирование 50% PEGDA макроэмульсии в капающем режиме (А). Формирование 100% PEGDA макроэмульсии в струйном режиме (Б).

Было обнаружено, что во время отверждения УФ-излучением капли с фотоинициатором и PEGDA изменяют цвет (Рисунок 2.6.1.3), что использовалось для исследования времени полимеризации гидрогеля. Последняя стадия полимеризации (сшивки) происходит, когда цвет перестает меняться.

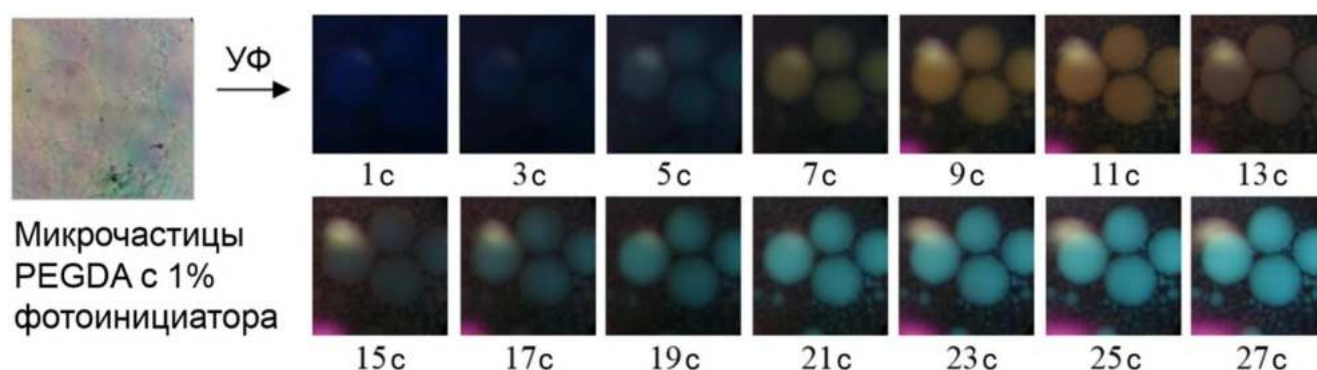


Рисунок 2.6.1.3 – Изображения капель эмульсии PEGDA с добавлением 1% w/w фотоинициатора Irgacure 2959 в процессе облучения УФ излучением с длиной волны 365 нм.

Также было обнаружено, что при добавлении поверхностно-активного вещества (ПАВ) Span 80, в непрерывную фазу в концентрации 3-5% изменение

цвета микрочастиц не происходит, в отличие от случая использования в качестве дисперсной фазы чистого минерального масла или минерального масла с добавлением 3-5% ПАВ Abil EM 180.

В результате исследований была предложена следующая схема процесса полимеризации каплей PEGDA (Рисунок 2.6.1.4А). Когда УФ включен, происходит первое мгновенное затвердевание (точка резкого схватывания). Значение того, насколько резко будет происходить первое схватывание зависит от концентрации фотоинициатора. В некоторых случаях значение может стремиться к нулю. Далее происходит постепенное изменение цвета PEGDA или созревание. На основании изучения изменения цвета этот процесс разделяется на три этапа. На первом этапе цвет плавно меняется от темно-синего до светло-коричневого. Затем на втором этапе цвет меняется от светло-коричневого до синего. Наконец, на третьем этапе нет цветового изменения. Важно отметить, что у PEGDA проявляются три доминирующих цвета, которые соответствуют трем этапам полимеризации. Сами цвета могут зависеть от условий эксперимента (например, срок хранения PEGDA, состав ПАВа). Время начала третьего этапа называется t_s . На последнем этапе цвет меняется слабо, и полимеризация заканчивается $t_{100\%}$ (Рисунок 2.6.1.4А).

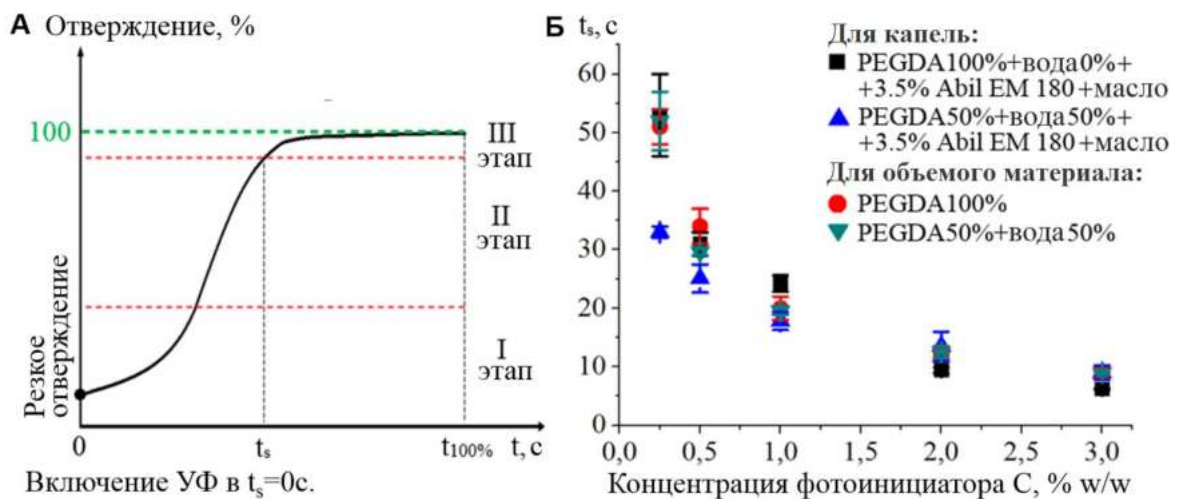


Рисунок 2.6.1.4 – А) Схема процесса полимеризации каплей PEGDA; Б) Зависимости времени полимеризации t_s от концентрации фотоинициатора для каплей диаметром 200 мкм.

Зависимости времени t_s от концентрации фотоинициатора показаны на Рисунке 2.6.1.4Б. Было рассмотрено четыре случая. Первый вариант – объемный раствор 100% PEGDA с фотоинициатором. Второй – капли 100% PEGDA и 0% воды с фотоинициатором в масляной фазе с 3,5% w/w ПАВ Abil EM 180. Третий – объемный раствор 50% w/w воды и 50% w/w PEGDA с фотоинициатором. Четвертый – капли 50% w/w воды и 50% w/w PEGDA с фотоинициатором в масляной фазе с 3,5% w/w ПАВ Abil EM 180. Во всех случаях концентрация фотоинициатора составляла набор значений 0,25%; 0,5%; 1%; 2%; 3% (по весу). Точки значений времени на графике (Рисунок 2.6.1.4Б) представляют собой усредненные значения пяти экспериментов. Чтобы лучше фиксировать изменение цвета в течении УФ-отверждения, были использованы крупные капли диаметром ~ 200 мкм.

Из результатов экспериментов можно сделать вывод, что время полимеризации t_s одинаково меняется для объемного материала и капель диаметром 200 мкм и зависит от концентрации C фотоинициатора. Чем выше концентрация, тем быстрее происходит сшивка гидрогеля. Полученные экспериментальные данные были аппроксимированы экспоненциальной зависимостью $t_s(C)$:

$$t_s = A e^{-\frac{C}{C_0}} + t_0,$$

где C , C_0 – концентрации фотоинициатора (%), а t_0 и A – временные параметры (с). Значения $C_0 = 1,3\%$, $A = 55$ с, $t_0 = 4$ с были получены из аппроксимации. Таким образом, характерная концентрация фотоинициатора для полимеризации PEGDA составляет $\sim 1,3\%$.

Дополнительно проводились исследования механических свойств синтезированных гидрогелевых микрочастиц. Определение модуля Юнга полимеризованного PEGDA осуществлялось с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ, AFM) Bruker Bioscope Catalyst путем измерения силовых кривых подвода/отвода в контактном режиме зондом RTESPA (жесткость 42 Н/м). Анализ силовых кривых проводился с помощью программного обеспечения

NanoScope Analysis. Для оценки модуля Юнга использовалась модель Sneddon (Conical).

Для оценки зависимости модуля Юнга от состава гидрогелевых микрочастиц при формировании капель эмульсии использовались растворы PEGDA в деионизированной воде с концентрацией PEGDA 10-100% с добавлением 1% w/w фотоинициатора. Модуль Юнга капель PEGDA приведен на Рисунке 2.6.1.5А. На основании формы полученных силовых кривых был сделан вывод о том, что в зависимости от концентрации PEGDA полимеризованные микрочастицы могут содержать сплошное ядро и мягкую оболочку или только сплошное ядро (Рисунок 2.6.1.5Б, В). Было обнаружено, что соотношение 50% w/w PEGDA и 50% w/w воды является переходной от одного типа микрочастиц к другим (Рисунок 2.6.1.5Б). Если концентрация PEGDA составляет менее 50% w/w, полимеризация происходит равномерно без образования мягкой оболочки. В противном случае происходит ее возникновение. Кроме того, модуль Юнга оболочки меньше, чем модуль ядра.

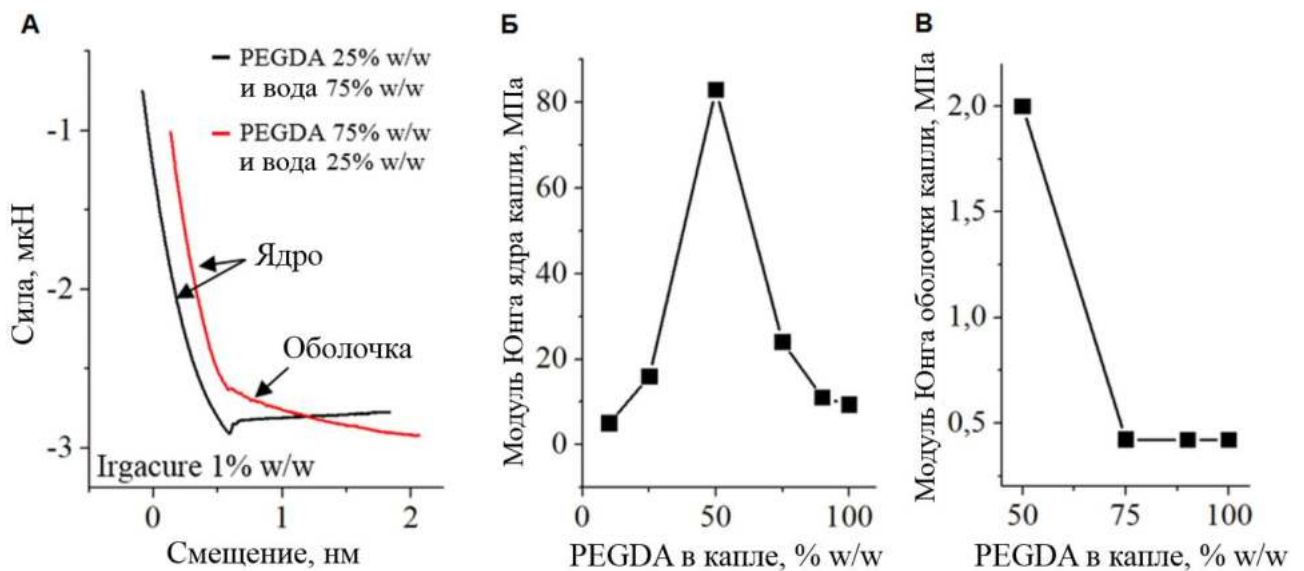


Рисунок 2.6.1.5 – Зависимости силы, действующей на образец от смещения зонда АСМ (А). Зависимости модуля Юнга от содержания PEGDA в растворе: (Б) ядра микрочастицы; (В) оболочки микрочастицы.

Таким образом, было проведено исследование кинетики полимеризации микрочастиц PEGDA, синтезированных в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока. Данные были получены с помощью оптической и атомно-

силовой микроскопии. Был сделан вывод о том, что время полимеризации t_p экспоненциально зависит от концентрации фотоинициатора. Причем оптимальная концентрация составляет $\sim 1\%$.

Модуль Юнга был оценен с помощью измерений силовых кривых методом АСМ. В зависимости от формы полученных кривых можно указать, содержит ли капля сплошное ядро и мягкую оболочку или только сплошное ядро. Получено, что максимальный модуль Юнга микрочастиц составляет 83 МПа, состав которых составляет 50% w/w PEGDA и 50% w/w воды. В зависимости от концентрации PEGDA модуль Юнга ядра частиц изменяется в диапазоне от 5 до 83 МПа и от 0,4 до 2 МПа для оболочки.

Таким образом, были исследованы режимы формирования монодисперсных микрочастиц из PEGDA в микрофлюидном генераторе макроэмульсий. Измерения модуля Юнга микрочастиц показали, что их упругими свойствами можно управлять путем изменения концентрации полимера.

2.6.2. Формирование микрочастиц из полиакриламида

При формировании полиакриламидных гидрогелевых микрочастиц в качестве дисперсной фазы использовался водный раствор акриламида/бис-акриламида (Bio-Rad) в концентрации 5–30% с добавлением инициатора полимеризации пероксодисульфата аммония в концентрации 0,3%. В непрерывную фазу, состоящую из минерального масла с ПАВ 3,5% Abil EM 180 добавлялся катализатор полимеризации TEMED (Тетраметилэтилендиамин N,N,N',N') в концентрации 1%. Ввод жидкостей в микрофлюидный чип осуществлялся с помощью МФКД.

Формирование гидрогелевых микрочастиц с помощью микрофлюидных генераторов эмульсий осуществлялось в два этапа: на первом этапе формировалась монодисперсная макроэмульсия, в которой на втором этапе проводилась реакция полимеризации, в результате чего происходило преобразование макроэмульсии в суспензию микрочастиц. За счет использования

апертуры шириной 15 мкм диапазон размеров макроэмульсии составил 15–80 мкм.

Полимеризация полиакриламида начинается сразу после формирования эмульсии за счет диффузии катализатора TEMED из непрерывной фазы в дисперсную. В связи с тем, что концентрация TEMED в непрерывной фазе была 1%, время реакции составляло менее 1 мин, и на выходе из чипа микрочастицы были уже полимеризованными.

Вязкость неполимеризованного полиакриламида близка к вязкости воды и не зависит от его концентрации, поэтому формирование полиакриламидной эмульсии осуществлялось только в капяющем режиме (Рисунок 2.6.2.1). При этом разброс размеров микрочастиц, сформированных в капяющем режиме не превышает 5%, в то время как в струйном режиме разброс размеров зависит от диаметра микрочастиц и может достигать до 30% в случае формирования частиц диаметром 15–20 мкм.

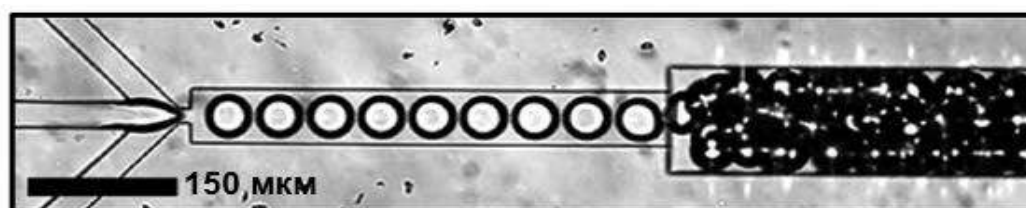


Рисунок 2.6.2.1 – Формирование 10% полиакриламидной макроэмульсии в капяющем режиме.

Модуль Юнга для полиакриламидных микрочастиц в зависимости от его концентрации в растворе дисперсной фазы был определен способом аналогичным исследованию модуля упругости микрочастиц PEGDA (раздел 2.6.1). Измерения показали, что модуль упругости полиакриламидных частиц зависит от концентрации полимера и составляет от 2 до 7 кПа в водной среде. При помещении частиц в воздушную среду и выдерживании в течение 1 часа при комнатной температуре происходит уменьшение их диаметра примерно в 2 раза и увеличение модуля упругости до 25–180 кПа в зависимости от концентрации полимера вследствие процесса дегидратации (Рисунок 2.6.2.2А, Б). После

помещения обезвоженных микрочастиц в водную среду происходит восстановление их размеров до первоначальных значений.

Таким образом, исследованы режимы формирования монодисперсных микрочастиц из полиакриламида в микрофлюидном чипе. Измерения модуля Юнга микрочастиц показало, что их упругими свойствами можно управлять путем изменения концентрации полиакриламида. В качестве сравнения, можно указать, что модуль Юнга PEGDA-частиц в водной среде находится в диапазоне 5-80 МПа (Рисунок 2.6.1.4Б), а полиакриламидных частиц в диапазоне 2-7 кПа. Также при концентрации PEGDA выше 50% у микрочастиц образуется мягкая оболочка с модулем Юнга от 0,5 до 2 МПа (Рисунок 2.6.1.4В), в отличие от полиакриламидных микрочастиц. Такое сравнение показывает важность исследований различных гидрогелей, так как их свойства могут кардинально отличаться друг от друга.

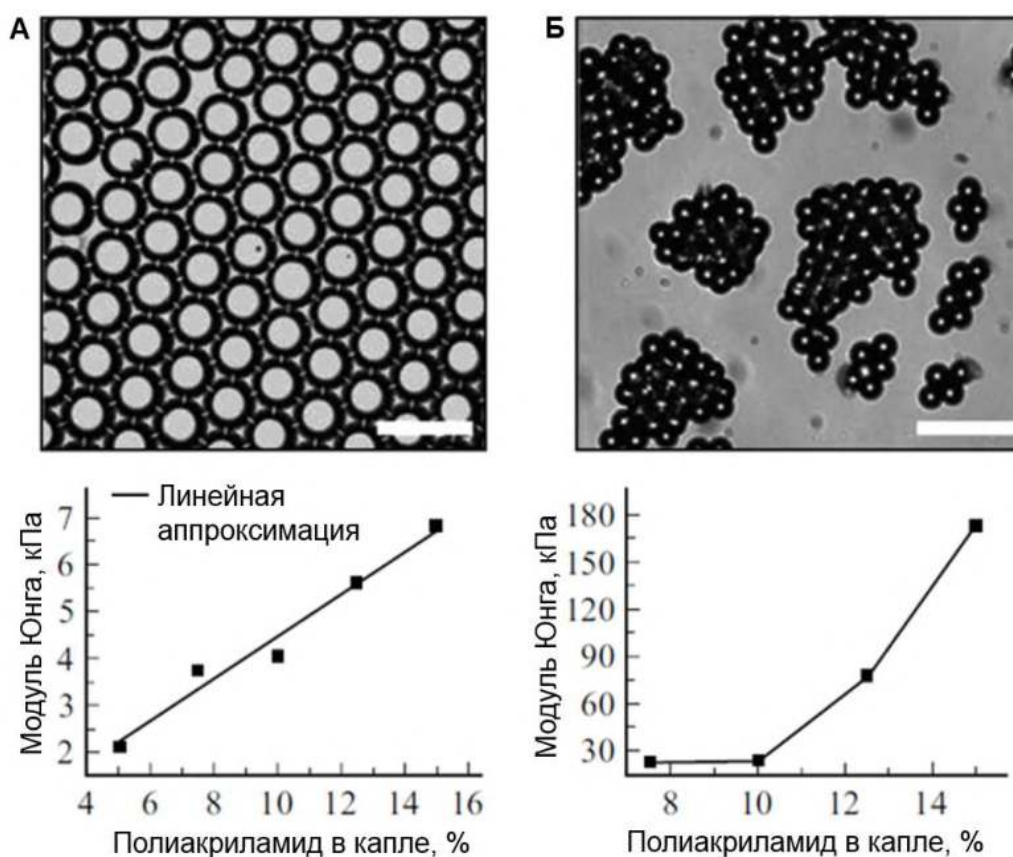


Рисунок 2.6.2.2 – Изображения и модуль Юнга гидрогелевых микрочастиц из: А) — 10% полиакриламида в воде, Б) — 10% полиакриламида в высушенном состоянии. Каждое значение модуля Юнга получено путем усреднения по трем измерениям. Масштаб 100 мкм.

2.6.3. Изучение выхода красителя из микрочастиц полиакриламида и PEGDA

Для понимания возможностей применения разработанных микрочастиц полиакриламида и PEGDA в качестве микрокапсул проводились изучения кинетики выхода из них модельного флуоресцентного красителя Rhodamine B (№ 83689, Sigma-Aldrich) в концентрации 0,1 мг/мл. С помощью этого красителя была исследована кинетика выхода малых молекул из микрочастиц диаметром ~50 мкм в воду при температуре 37°C. В частицах обоих типов интенсивность флуоресценции Rhodamine B экспоненциально уменьшается с течением времени (Рисунок 2.6.3.1).

В случае PEGDA характерное время выхода красителя из микрочастиц сильно зависит от концентрации полимера и составляет от 0,3 до 1,3 часа (Рисунок 2.6.3.1В). Наибольшее время выхода красителя из микрочастиц с 25% содержанием PEGDA, а наименьшее с 50% содержанием PEGDA. Кроме того, остаточная интенсивность флуоресценции частиц составляет более 40%, что говорит о низкой пористости материала. А также у некоторых микрочастиц PEGDA была обнаружена неоднородность интенсивности флуоресценции, что может объясняться разной плотностью материала и зависимостью концентрации PEGDA от центра частицы (Рисунок 2.6.1.5). Это может быть связано с тем, что полимеризация частицы начинается с ее центра, и за время полимеризации может произойти обеднение области вблизи границы.

В случае 10% полиакриламида характерное время выхода красителя составило 4,2 часа (Рисунок 2.6.3.1Б, Г). Для полиакриламидных частиц неоднородности интенсивности флуоресценции красителя отсутствовала (Рисунок 2.6.3.1Б), а также уменьшение концентрации красителя со 100% до 10% в течении 32 часов (Рисунок 2.6.3.1Г).

Исследования упругих свойств гидрогелевых микрочастиц показало, что модуль Юнга зависит от типа материала, что может говорить о его пористости. У PEGDA-частиц в водной среде в зависимости от исходной концентрации мономеров в каплях модуль Юнга может изменяться в диапазоне 5–80 МПа, а у

полиакриламидных частиц, в диапазоне 2–7 кПа. Это вероятно связано с более высокой пористостью полиакриламида в отличие от PEGDA. Это же свойство проявляется при диффузионном выходе малых молекул, упакованных в микрочастицы, в окружающую водную среду. Изучение этого эффекта с помощью флуоресцентного красителя Rhodamine В показало, что у PEGDA-микрочастиц высокая интенсивность остаточной флуоресценции (более 30%). В случае полиакриламидных микрочастиц остаточная флуоресценция составляла ~10%.

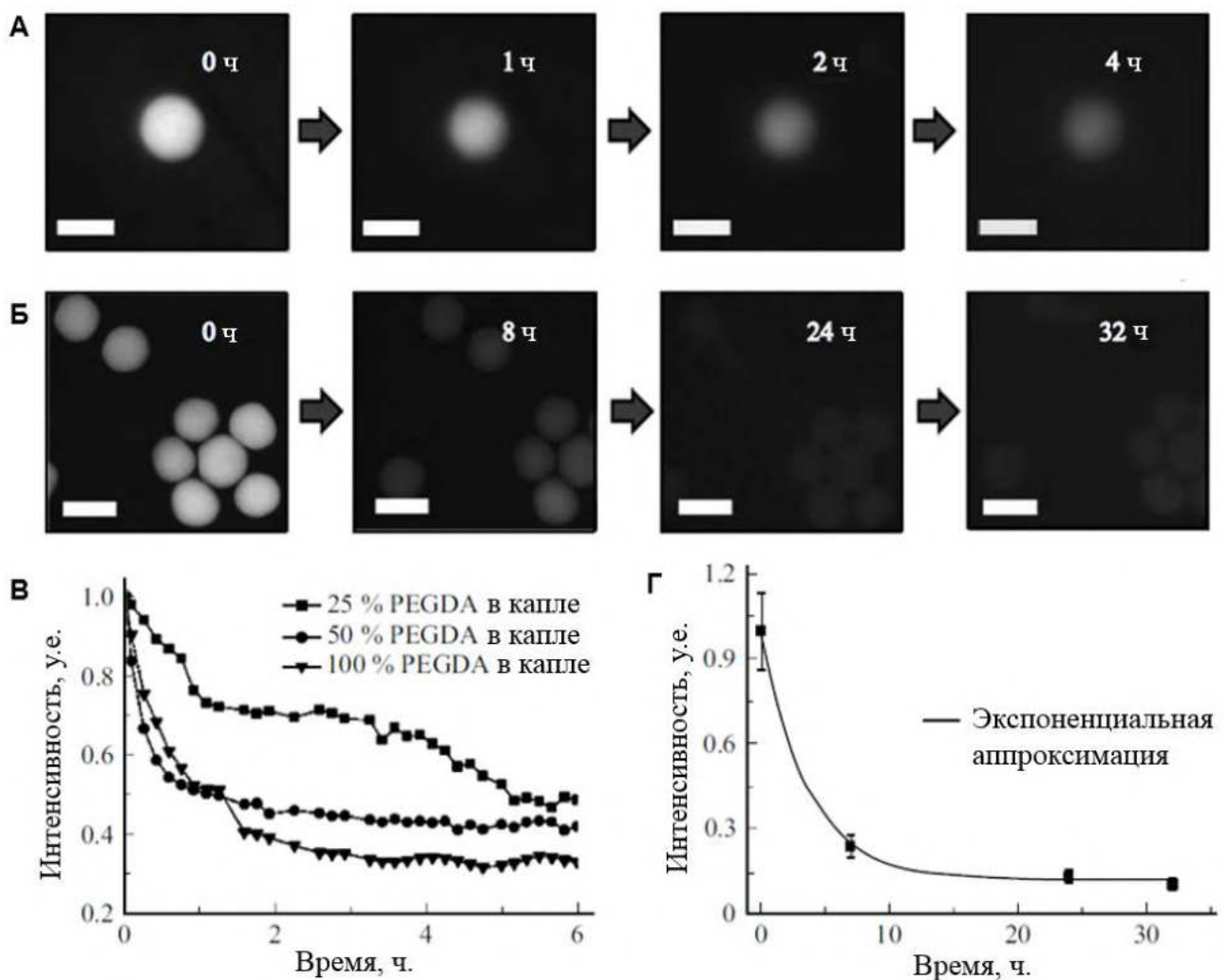


Рисунок 2.6.3.1 – Динамика изменения интенсивности флуоресценции Rhodamine В в микрочастицах: (А) 50% PEGDA; (Б) 10% полиакриламида; (В) Зависимость интенсивности флуоресценции микрочастиц с разной концентрацией PEGDA, (Г) Зависимость интенсивности флуоресценции в микрочастицах с 10% полиакриламида. Каждая точка графиков получена при усреднении интенсивности флуоресценции 5 микрочастиц. Размерная метка соответствует 50 мкм.

Таким образом, PEGDA-микрочастицы более подходят для формирования жестких 3D-каркасов в процессе биопечати, разработке органов-на-чипе, а полиакриламидные частицы для управляемого ввода в растущую культуру биологически активных веществ непосредственно сразу после печати.

2.6.4. Изучение микрочастиц из альгината натрия

Альгинат натрия (пищевая добавка E401) – это полисахарид, получаемый путем щелочной экстракции бурых водорослей. Является безвредным для организма человека, биосовместимым. Альгиновая кислота представляет собой полимерную цепь, состоящую из двух мономеров остатков полиуроновых кислот: D-маннуроновой (M) и L-гулуруновой (G) в разных пропорциях, варьирующихся в зависимости от конкретного вида водорослей. Альгинат натрия можно преобразовать в гидрогель с помощью ионов кальция (Рисунок 2.6.4.1).

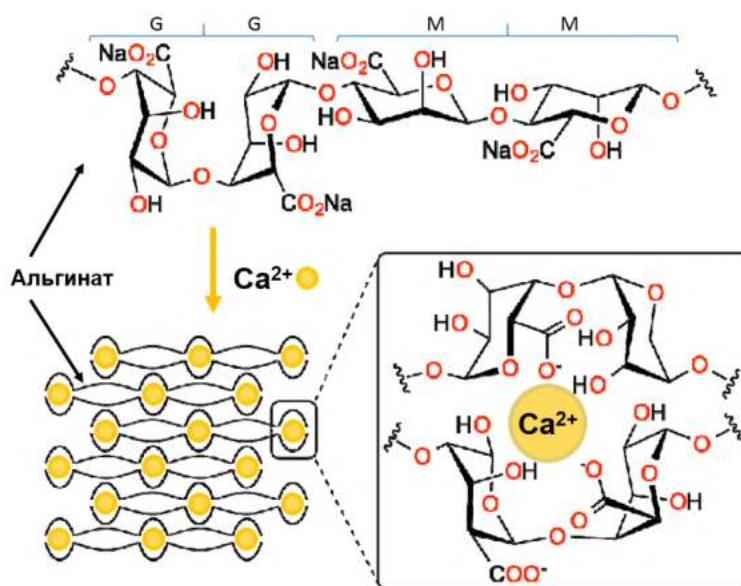


Рисунок 2.6.4.1 – Образование альгинатного гидрогеля ионами кальция. Структура повторяющихся звеньев альгината натрия и образование гидрогеля путем координации катионов Ca^{2+} между соседними альгинатными цепями согласно модели «яичного ящика» (egg-box) [168].

Согласно модели «яичного ящика» (egg-box) [168] ионы кальция связывают L-гулуруновые (G) части повторяющихся звеньев альгината. Таким образом

получаются ячейки, за счет которых по всему объему звенья альгината становятся связанными, и образуется гидрогель.

Сшивка альгината натрия на масштабах нескольких миллиметров и более является простым технологическим процессом. Например, в молекулярной кулинарии используется способ раскапывания миллиметровых капель 1% водного раствора альгината натрия из шприца с высоты в 10-15 см в ванну с 0,5% водным раствором хлорида кальция. Однако при реализации такой методики в микрофлюидных чипах возникает целый ряд проблем: коалесценция капель, закупорка каналов сшитыми частями дисперсного потока альгината натрия. Для их преодоления требуется не только подбор соотношений реагентов, но также поиск альтернативных способов доставки ионов кальция к звеньям альгината.

В данной работе создание гидрогелевых микрочастиц альгината в микрофлюидном чипе было осуществлено с помощью метода выделения ионов кальция из водорастворимого комплекса Ca-ЭДТА. Метод проиллюстрирован на Рисунке 2.6.4.2. Дисперсной фазой выступает раствор альгината натрия и комплекса Ca-EDTA с $\text{pH} \approx 7$. С таким уровнем показателя водорода комплекс устойчив, и кальций не вступает в реакцию с альгинатом натрия. В качестве непрерывной фазы выступает масло (фторуглеродное или минеральное) с ПАВом, в которое добавлена уксусная кислота (1,5 мкл 100% уксусной кислоты на 1 мл). В микрофлюидном чипе после формирования эмульсии происходит диффузия уксусной кислоты внутрь капель, что приводит к разрушению комплекса Ca-EDTA, высвобождению ионов кальция и сшивке цепей альгината.

Для проведения экспериментальных исследований комплекс Ca-EDTA был получен путем смешивания водных растворов CaCl_2 (100 мМ) и $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (100 мМ) в равных частях 1:1. Итоговый раствор приводился к $\text{pH} \approx 7,2$ путем добавления раствора NaOH или HCl. Далее раствор 1,7-2% альгината натрия смешивался с раствором Ca-EDTA (50 мМ) в равных частях. Таким образом, получалась дисперсная фаза. Для непрерывной фазы использовалось минеральное масло с добавлением 3,5% w/w ПАВ Abil EM 180 и 1% v/v уксусной кислоты.

Также в качестве непрерывной фазы использовалось фторуглеродное масло с ПАВ (Bio-Rad) с добавлением 0,05-0,25%v/v уксусной кислоты. Использование этих сред позволило с помощью МФКД в микрофлюидных чипах синтезировать монодисперсные гидрогелевые альгинатные микрочастицы (Рисунок 2.6.4.2).

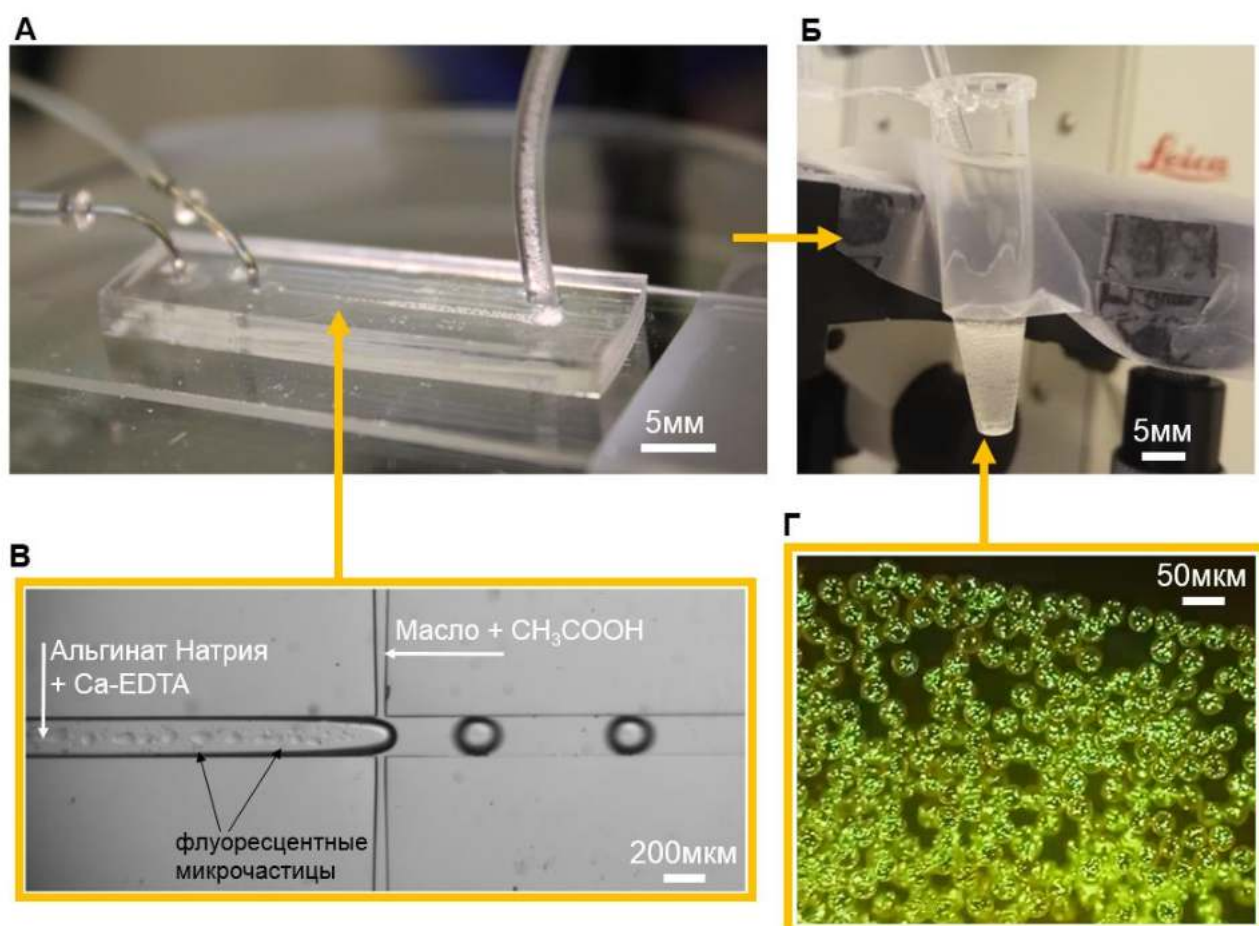


Рисунок 2.6.4.2 – А) Формирование альгинатных микрочастиц в разработанном микрофлюидном чипе. Б) На выходе чипа по капилляру сформированные микрочастицы собираются в пробирке для сбора. В) Пример формирования микрочастиц из альгината натрия диаметром 200 мкм. Г) Пример изображения полученной монодисперсной эмульсии с диаметром капель 32 мкм во флуоресцентном режиме. Капли содержат 1,75 мкм флуоресцентные микрочастицы для определения гелеобразования.

Для подтверждения сшивания альгинатных цепей в синтезированных каплях в дисперсную фазу были добавлены флуоресцентные микрочастицы диаметром 1,75 мкм. Микрочастицы в дисперсной фазе и в каплях несшитого альгината свободно двигаются за счет броуновского движения. Когда происходит образование гидрогеля, то микрочастицы иммобилизуются и их броуновское

движение больше не наблюдается. На Рисунке 2.6.4.2Г показан пример сформированной эмульсии с диаметром капель 32 мкм. Микрочастицы в каплях неподвижны.

Для проведения исследований по формированию двухслойных альгинатных микрочастиц с клетками отрицательным давлением был разработан микрофлюидный чип со встроенными гидравлическими сопротивлениями, 4-мя входами и изогнутым выходным каналом (Рисунок 2.6.4.3).

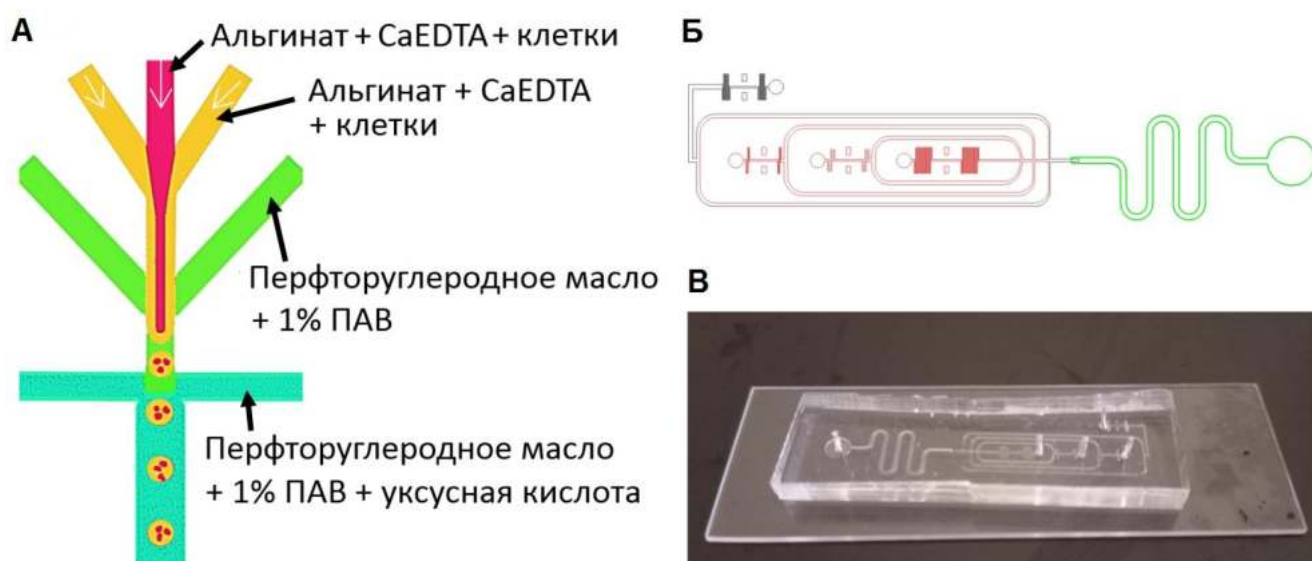


Рисунок 2.6.4.3. Получение альгинатных гидрогелевых микрочастиц. (А)

Принципиальная схема синтеза микрочастиц из альгината натрия в микрофлюидном устройстве. (Б) Эскиз и (В) изображение микрофлюидного устройства с четырьмя входами для синтеза альгинатных микрочастиц.

Для экспериментов по упаковке клеток в двуслойные микрокапли использовались клетки СТ26 и СТ26-EGFP (недифференцированная клеточная линия карциномы толстой кишки мышей, синтезирующие зеленый флуоресцентный белок). Основное преимущество СТ26-EGFP для исследований методами оптической микроскопии состоит в том, что живые клетки имеют интенсивную зеленую флуоресценцию при возбуждении синим светом с длиной волны 488 нм, которая у мёртвых клеток отсутствует.

Для синтеза микрочастиц с клетками использовалась схема с формированием отрицательного давления в выходном резервуаре, который представлял из себя пробирку 40-50 мл с водным 1,5 % раствором хлорида

кальция (Рисунок 2.6.4.4). Добавление хлорида кальция в выходной резервуар обеспечивало полную полимеризацию альгинатных микрочастиц при их переводе из масляной среды в водную. Результаты синтеза микрочастиц с клетками приведены на Рисунке 2.6.4.4Б, В.

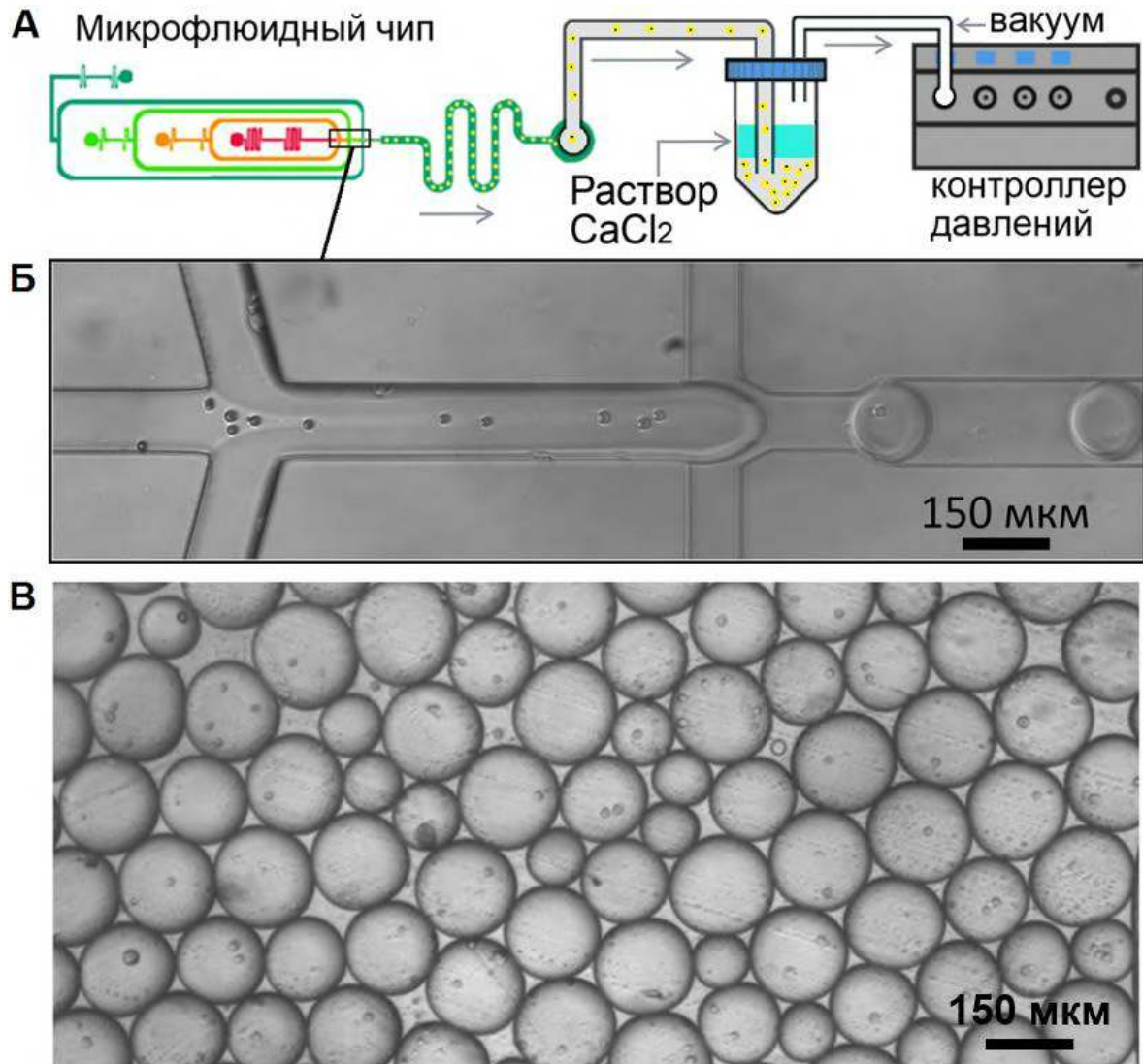


Рисунок 2.6.4.4 – А) Схема экспериментальной установки для формирования гидрогелевых микрочастиц. Б) Упаковка клеток ST26-EGFP в однослойные гидрогелевые микрочастицы. В) Массив микрочастиц с клетками

Разработанный микрофлюидный чип позволяет синтезировать двухслойные микрочастицы ядро-оболочка. Для исследования процедуры синтеза таких частиц в ядро упаковывались клетки ST26-EGFP, а оболочку полистирольные флуоресцентные микрочастицы диаметром 6 μm (Рисунок 2.6.4.5А). Благодаря значительной разнице их размеров анализируя полученные изображения с

оптического микроскопа был сделан вывод о формировании микрочастиц ядро-оболочка, в ядре которых находились только клетки, а в оболочке только микрочастицы диаметром 6 мкм (Рисунок 2.6.4.5Б).

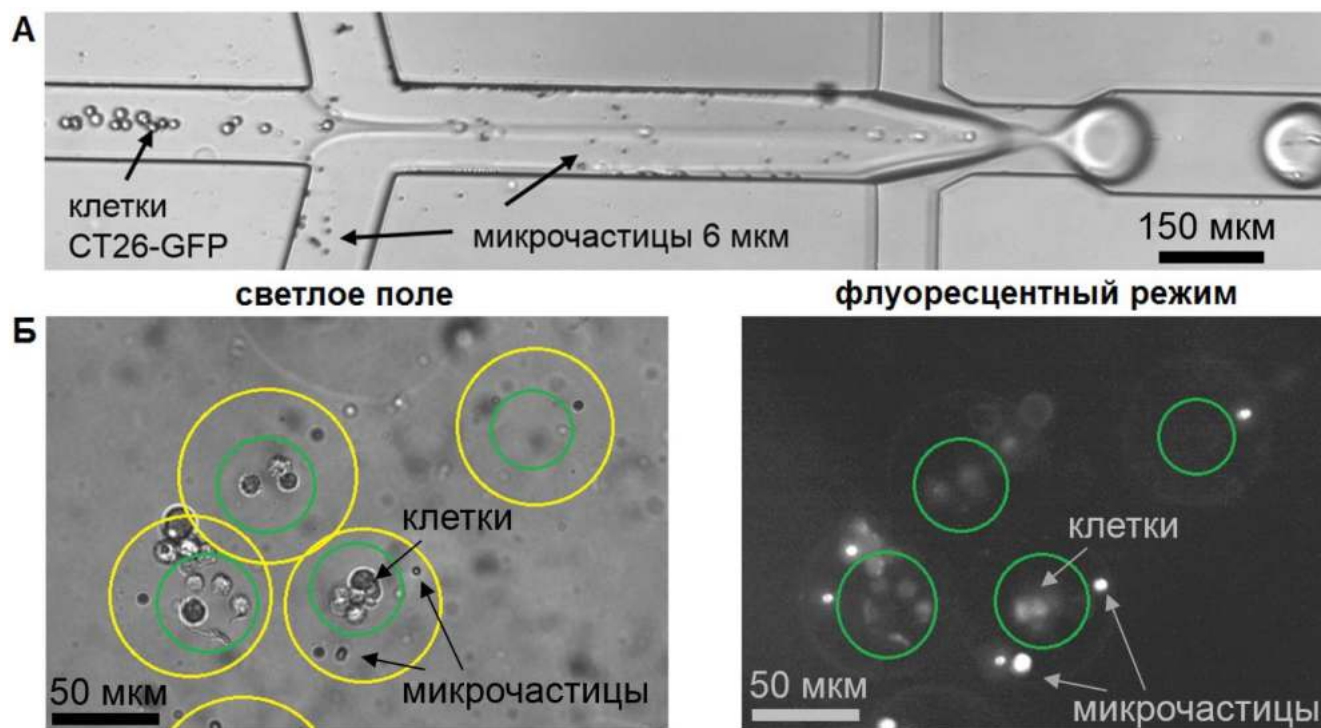


Рисунок 2.6.4.5 – А) Формирование альгинатных микрочастиц ядро-оболочка на связке ядро с клетками ST26-EGFP и оболочка со стирольными флуоресцентными микрочастицами 6 мкм в диаметре. Б) Резкое отличие в размерах между клетками и микрочастицами дает возможность сделать вывод о структуре ядро-оболочка полученных микрочастиц. В том числе микрочастицы 6 мкм ярче светятся во флуоресцентном режиме.

Для создания многослойных микрочастиц ядро-оболочка с двумя типами клеток использовался тот же микрофлюидный чип. В качестве центрального потока (ядро) применялись клетки ST26-EGFP, а в качестве оболочки клетки ST26. Примеры формирования двуслойных микрочастиц с двумя типами клеток показаны на Рисунок 2.6.4.6А. Инкубирование многослойных микрочастиц ядро-оболочка с использованием клеток ST26-GFP в ядре и клеток ST26 в оболочке) проводилось в течении 5 дней при 37°C и 5% CO₂ (Рисунок 2.6.4.6Б). Красные и синие линии на микрочастицах показывают, что структура оболочечная.

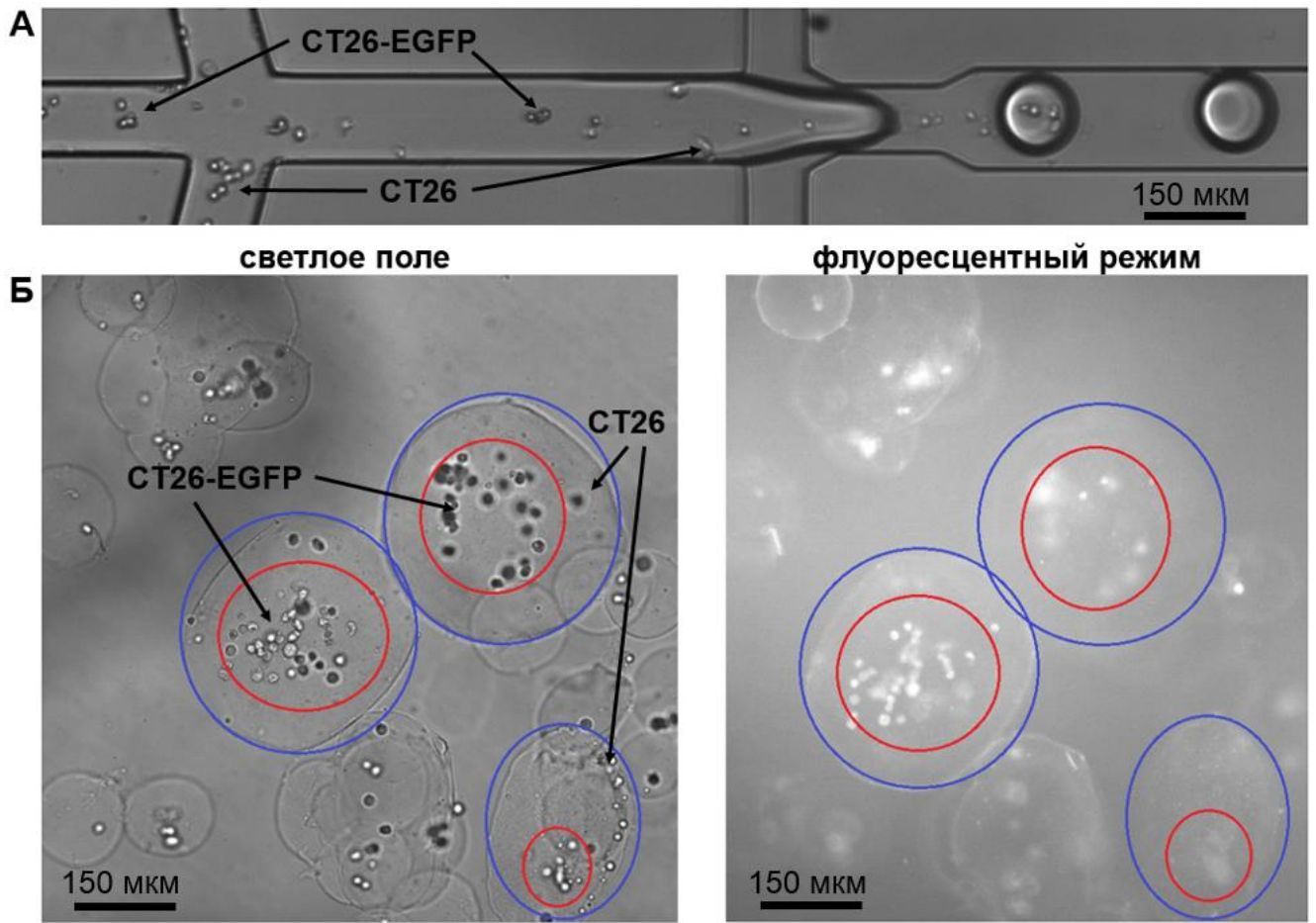


Рисунок 2.6.4.6 – А) Процесс формирования микрокапли ядро-обложка. Б) Двухслойные микрочастицы ядро-обложка с клетками CT26-GFP в ядре (красные линии) и клеток CT26 в оболочке (синие линии). Красные и синие линии на нескольких примерах показывают, что структура оболочечная.

2.6.5. Изучение микрочастиц из GelMA и агарозы

Для формирования микрочастиц из GelMA и агарозы использовался как разработанный микрофлюидный контроллер давлений, так и метод ввода жидкостей в микрофлюидный чип отрицательным давлением.

Общая схема генерации гидрогелевых микрочастиц отрицательным давлением состояла из двух этапов: на первом этапе осуществлялось формирование макроэмульсии, на втором этапе проводилась реакция полимеризации. Для этого во входные лунки микрофлюидного чипа загружались реагенты, и к выходу подключался вакуумный насос с устройством сбора капель. Готовым продуктом после полимеризации гидрогеля в каплях являлась суспензия монодисперсных полимерных сферических микрочастиц в масляной фазе. На

Рисунке 2.6.5.1А схематично показаны варианты загрузки пробы: через дополнительный ПДМС слой-лунку в микрофлюидном чипе или через пневмоинтерфейс. Для изготовления лунок использовались слои ПДМС высотой 3–5 мм с отверстиями диаметром 4 мм. После обработки в кислородной плазме, дополнительные ПДМС слои соединяются с готовым “однослойным” микрофлюидным чипом так, чтобы лунки оказались над входными отверстиями. Лунки над входными каналами применяются для размещения дисперсной и непрерывной фаз (Рисунок 2.6.5.1Б). В случае необходимости синтеза большого объема микрочастиц для ввода реагентов также можно использовать разработанные пневмоинтерфейсы для стандартных пластиковых пробирок (Рисунок 2.6.5.1А). Сбор частиц может осуществляться в выходную лунку во втором слое чипа (Рисунок 2.6.5.1 метка а) на изображении). В этом случае, ПДМС слой с лункой располагается над выходным отверстием микрофлюидного чипа, а сверху фиксируется герметичная оправа, изготовленная на 3D-принтере FormLab 2 из полимера Clear Resin. К оправе напрямую подключается вакуумный насос. Также сбор капель может осуществляться через выходной капилляр напрямую в пробирку с помощью пневмоинтерфейса, в таком случае оправа не используется (Рисунок 2.6.5.1, метка б) на изображении).

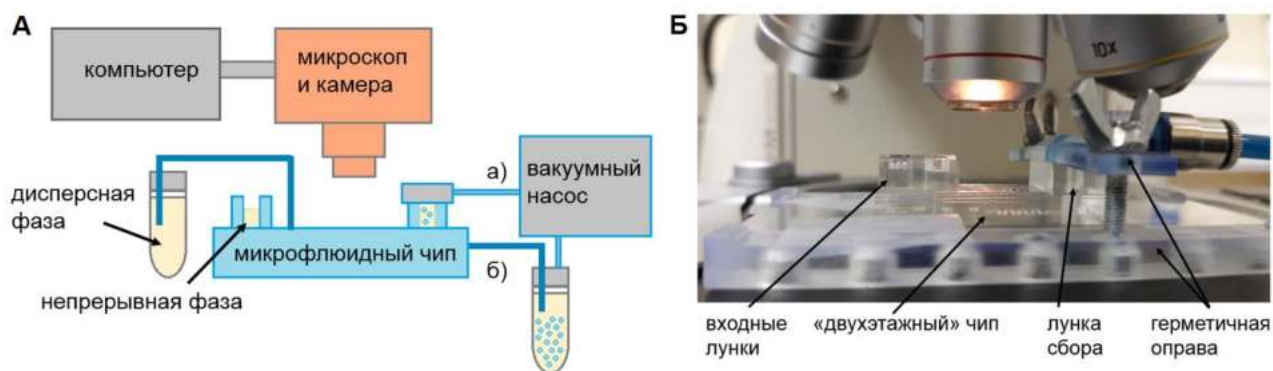


Рисунок 2.6.5.1 – А) Схема экспериментальной установки для генерации капель вакуумным методом. К входным каналам микрофлюидного чипа можно присоединить как пневмоинтерфейс с реагентами, так и второй слой ПДМС с лунками для реагентов. Б) Изображение микрофлюидного устройства в оправе под микроскопом с лунками для реагентов.

Для полимеризации GelMA требуется наличие фотоинициатора

полимеризации – Irgacure 2959 [169]. Реакция полимеризации начинается с момента облучения ультрафиолетом с длиной волны 365 нм. Дополнительно перед генерацией капель проводилась дегазация дисперсной и непрерывной фаз. УФ-облучение происходило в течение 1 мин. Гелеобразование оценивалось с помощью наблюдения за броуновским движением флуоресцентных микрочастиц, которые предварительно добавлялись в дисперсную фазу. Замедление броуновского движения свидетельствовало о сшивке микрочастиц.

Для экспериментов в качестве дисперсной фазы использовалась смесь 6,6% GelMA и 0,4% раствора Irgacure в солевом растворе с фосфатным буфером (PBS 1x). Также в дисперсную среду добавлялось 2 мкл флуоресцентных микрочастиц диаметром 1,75 мкм. В качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло с добавлением 20% ПАВ Span80. Процесс формирования капель осуществлялся как вакуумным методом, так и с помощью контроллера давлений.

Синтез микрочастиц GelMA с помощью отрицательного давления осуществлялся в микрофлюидном чипе с апертурой 15 мкм и выходным каналом шириной 200 мкм (Рисунок 2.6.5.2). При комнатной температуре около 19°C генерация не происходила. При нагреве микрофлюидного чипа с помощью стекла с напылением проводящего слоя оксида индия-олова (ИТО) до 40°C наблюдалась стабильная генерация. Сбор микрочастиц осуществлялся как в лунку «двухэтажного» чипа, так и в пробирку через капилляр и пневмоинтерфейс.

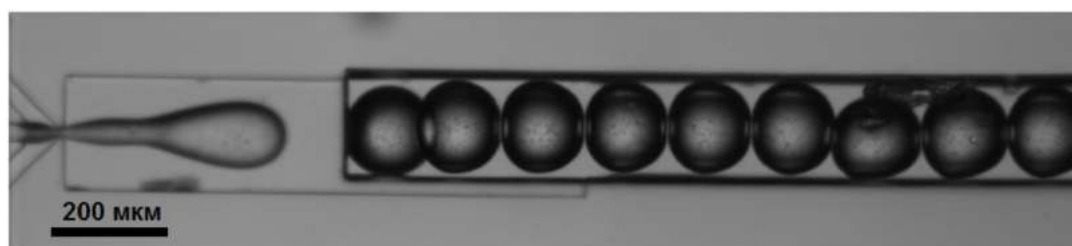


Рисунок 2.6.5.2 – Генерация капель GelMA 6,6% с флуоресцентными микрочастицами при помощи отрицательного давления.

Дополнительно для синтеза GelMA частиц был использован микрофлюидный контроллер давлений с микрофлюидным чипом с апертурой 15 мкм и выходным микроканалом, ширина которого изменялась с 60 мкм до 120

мкм. В этом случае одновременно был отработан метод упаковки клеток K562 в такие частицы, для чего клетки добавлялись к смеси дисперсной фазы (Рисунок 2.6.5.3А). Однако в результате экспериментов наблюдалась нестабильная генерация капель внутри микрофлюидного чипа как с клетками, так и с флуоресцентными микрочастицами и отсутствовала монодисперсность (Рисунок 2.6.5.3Б). После засветки УФ в течение нескольких минут капли полимеризовались, о чем свидетельствовала иммобилизация микрочастиц после облучения.

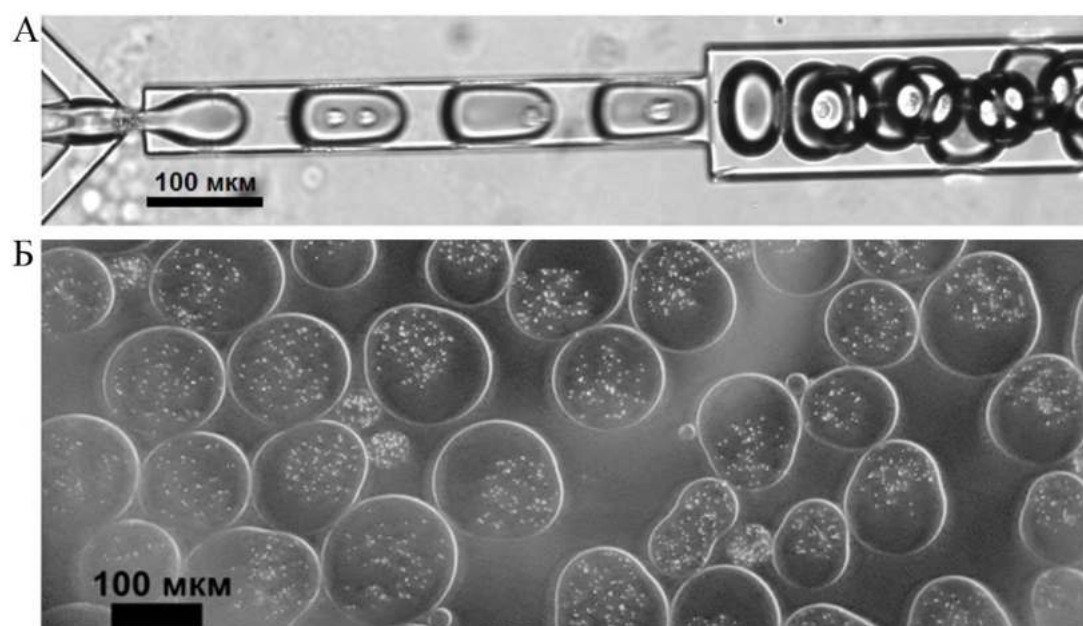


Рисунок 2.6.5.3 – А) Генерация капель 6,6% GelMA в PBS с инкапсуляцией клеток с помощью микрофлюидного контроллера давлений. Б) Полидисперсные капли 6,6% GelMA с флуоресцентными микрочастицами в PBS на стекле после полимеризации.

В результате экспериментов получаемые GelMA микрочастицы обладают следующими свойствами. Средний диаметр 170 мкм. Механическая стойкость к разрушению микрочастиц оценивалась с помощью их центрифугирования в суспензии. Скорость 5 тыс. оборотов в течение 2 минут не разрушает их. Однако на скорости 8 тыс. оборотов в течение 2 минут частицы образовывали кластеры. На 13,4 тыс. оборотов в течение 5 минут микрочастицы разрушались. Тесты на термоустойчивость GelMA микрочастиц показали, что их можно нагревать до

99°C, что позволяет стерилизовать частицы для дальнейшей работы с клетками или бактериями, проводить ПЦР.

Однако, из-за негативного влияния УФ излучения на жизнеспособность клеток в дальнейшей работе стал использоваться раствор агарозы, применяемый в современных лабораториях в качестве твердой среды для культивирования бактерий и дрожжей, а также являющийся одним из основных гелей для биопечати [170]. Агарозный гель является твердым при комнатных условиях и плавится при достижении температуры плавления 65-70°C. В качестве дисперсной фазы использовался 2% водный раствор агарозы. В качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло с добавлением 3,7% ПАВ ABIL EM 180.

Процесс формирования капель осуществлялся вакуумным методом в микрофлюидном чипе с апертурой 15 мкм и шириной выходного микроканала 200 мкм (Рисунок 2.6.5.4).



Рисунок 2.6.5.4 – Генерация капель из 2% раствора агарозы с помощью отрицательного давления.

Агароза переходит в жидкое состояние при 65,5°C, поэтому генерация происходила в микрофлюидном чипе, расположенном на предметном стекле с напылением ИТО. Пленка ИТО при пропускании через нее электрического тока выступает в качестве нагревательного элемента и позволяет осуществлять нагрев чипа до температуры 75°C. При температуре ниже 50°C генерация не наблюдалась. Установлено, что из-за высокой вязкости агарозного геля генерация не является стабильной, капли получаются полидисперсными (Рисунок 2.6.5.5). Поэтому для повышения монодисперсности был использован контроллер давлений, который позволил независимо оптимизировать расходы дисперсной и

непрерывной фаз в микрофлюидном устройстве.

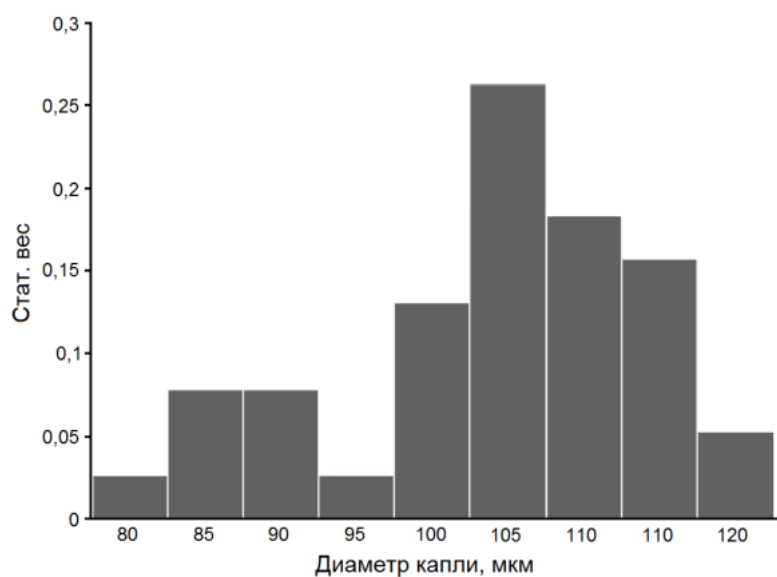


Рисунок 2.6.5.5 – Распределение диаметров капель из 2% агарозы, полученных с помощью отрицательного давления. Средний диаметр 106 мкм. Среднеквадратичное отклонение 10 мкм.

Процесс формирования капель при помощи МФКД осуществлялся в микрофлюидном чипе с апертурой 50 мкм и шириной выходного канала, которая изменяется от 150 мкм до 300 мкм. Чип располагался на стекле с напылением ИТО при температуре 75°C (Рисунок 2.6.5.6). При комнатной температуре около 19°C микрокапли коалесцировали. Поэтому капли охлаждались до 4°C сразу после генерации, в этом случае коалесценция не наблюдалась.

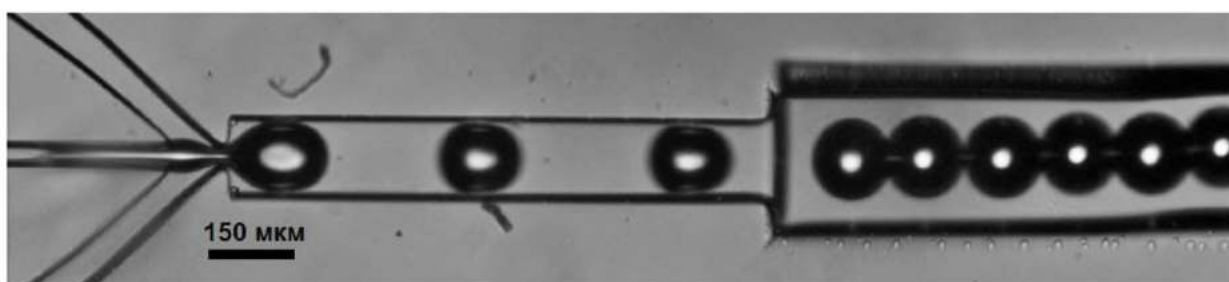


Рисунок 2.6.5.6 – Генерация капель из агарозы 2% с помощью МФКД.

В результате экспериментов получаемые агарозные микрочастицы обладали следующими свойствами. При генерации капель с помощью контроллера давлений наблюдалась монодисперсность. Средний диаметр около 150 мкм. Тесты на термостабильность микрочастиц показали, что их нахождение в течение

5 минут при температуре 65°C не приводит к их разрушению. При нагревании до 99°C наблюдалось плавление агарозы и переход суспензии в эмульсию, что лишало возможности стерилизации микрочастиц тепловой обработкой. Обнаружено, что при переводе микрочастиц из масла в воду с помощью центрифугирования и осаждения в изопропиловом спирте структура частиц не изменяется. Последнее наблюдение позволяет переводить частицы из минерального масла в водный раствор клеточной среды для последующей работы с клетками.

Дополнительно исследовалась возможность синтеза микрочастиц из двух гидрогелей (ядро – агароза, GelMA – оболочка) и возможность культивирования клеток на поверхности таких микрочастиц. Для культивирования была выбрана линия клеток карциномы шейки матки человека HeLa. На Рисунке 2.6.5.7Б показано, что клетки HeLa не распластываются на поверхности из слоя 2% агарозы, в отличие от пластиковой поверхности матраса для выращивания клеток (Рисунок 2.6.5.7А). Поэтому микрочастицы из агарозы выступали в качестве ядра комплексных микрочастиц агароза-GelMA.

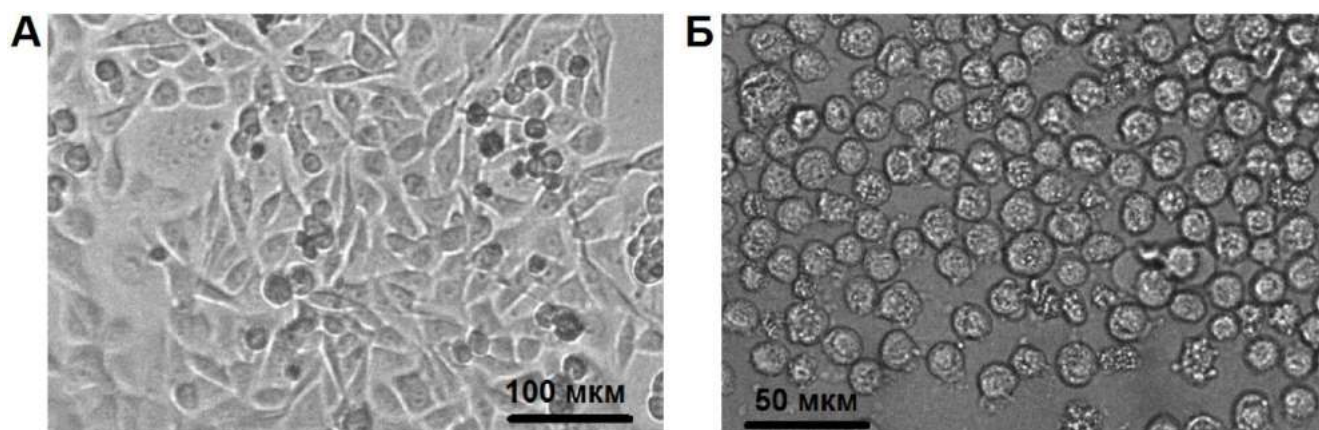


Рисунок 2.6.5.7 – Культивирование клеток HeLa на поверхности культурального флакона (А) и на слое 2% агарозы (Б).

После того, как микрочастицы агарозы были сформированы, они обрабатывались 5% раствором GelMA в PBS с добавлением 0,4% Irgacure 2959. Затем микрочастицы подвергались облучению ультрафиолетом (365 нм) в течение одной минуты для полимеризации GelMA. Обработка ультрафиолетом во время

создания комплексных микрочастиц обеспечивала не только полимеризацию GelMA, но и стерильность самих микрочастиц, что важно в виду невозможности их термической обработки из-за плавления агарозного ядра. Далее суспензия с гидрогелевыми агарозными частицами, покрытыми GelMA, смешивалась с клеточной средой, содержащей адгезивные клетки HeLa, и оставлялась в инкубаторе при 37°C и уровне CO₂ 5% на 24 часа. Для детектирования клеток на поверхности микрочастиц использовался мембранный краситель DIBAC. В результате, было обнаружено успешное закрепление клеток на поверхности микрочастиц (Рисунок 2.6.5.8).

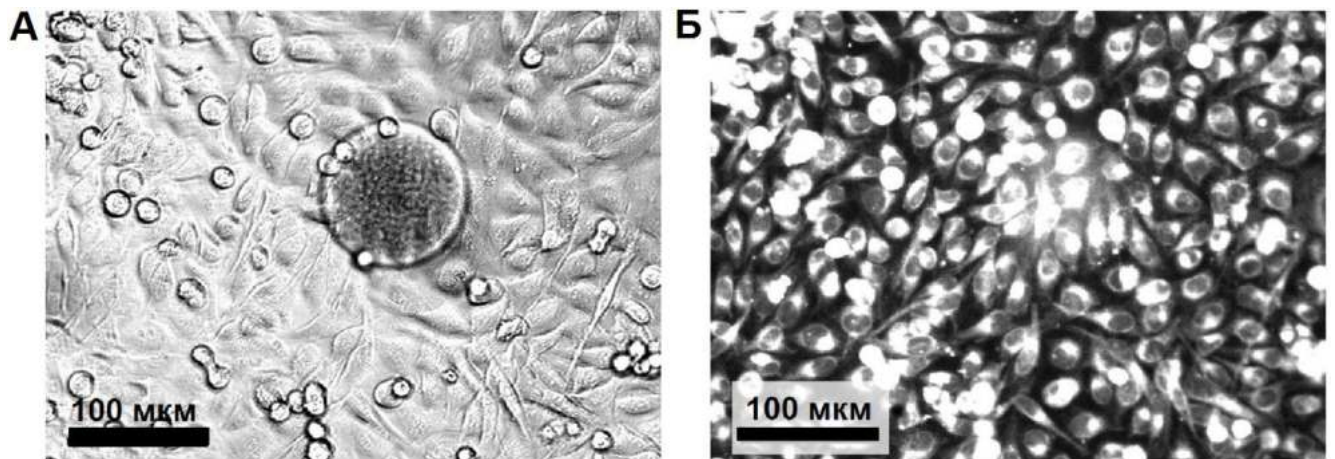


Рисунок 2.6.5.8 – Культивирование клеток HeLa в течении 24 часов на поверхности микрочастиц из 2% агарозы, обработанных 5% раствором GelMA в PBS (А) и после окраски мембраны с помощью DIBAC (Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан и изготовлен экспериментальный образец 4-х канального микрофлюидного контроллера давления на базе коммерчески доступных электропневматических регуляторов SMC ITV00X0. Прибор обеспечивает управление воздушными каналами в ручном или автоматическом режиме по заданным протоколам. Прибор позволяет воспроизводимо формировать стабильную макроэмульсию с каплями заданного объема в диапазоне от 65 фл до 4,2 нл (диаметр 5 - 200 мкм) с коэффициентом вариации диаметра капель не более 9% в чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм.
2. Впервые выявлены зависимости диаметра капель и частоты формирования капель макроэмульсий «вода-в-масле» от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз в микрофлюидном чипе с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм в случае ввода жидкостей с помощью контроля давления во входных резервуарах без обратной связи по расходам. Результаты показывают, что диаметр в пределах от 2 до 60 мкм линейно зависит от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз в пределах значений 0,5-0,9 и не зависит от их абсолютных значений (в пределах 5-25кПа). В отличие от диаметра капель, в тех же диапазонах значений, частота их генерации сильно зависит как от абсолютных значений давлений фаз, так и от их соотношения.
3. Впервые проведено сравнение режимов формирования капель при вводе жидкостей при постоянном давлении или расходе, что позволило оценить эффективную вязкость эмульсии в выходном микроканале шириной 200 мкм в микрофлюидном чипе с апертурой 15 мкм. Эффективная вязкость составила 50 – 750 мПа·с, в зависимости от фактора заполнения, что позволит рассчитывать режимы формирования эмульсий в микрофлюидных устройствах.
4. Разработаны и изготовлены микрофлюидные чипы с фокусировкой потока для формирования макроэмульсий (в том числе двойных эмульсий) и гидрогелевых микрочастиц диаметром 15 – 200 мкм. В исследованиях было использовано 25 различных модификаций микрофлюидных чипов.

5. Показано, что перемешивание реагентов в микрокаплях «вода-в-масле» при помощи асимметричного ввода жидкостей в месте их формирования до 6 раз увеличивает скорость перемешивания в микрокаплях по сравнению с симметричным вводом жидкостей в микрофлюидных чипах с шириной выходного микроканала 60 мкм и с генераторами капель по типу фокусировки потока с апертурой 15 мкм. Указанные микрофлюидные чипы позволяют формировать стабильную эмульсию «вода-в-масле» в диапазоне диаметров 35-70 мкм.

6. Показано, что ввод жидкостей в микрофлюидный чип под отрицательным давлением позволяет формировать стабильную и монодисперсную эмульсию в течении более 4 часов с вариациями диаметра менее 1 мкм как при электропневматическом, так и ручном способе регулирования давления. В микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с апертурой 15 мкм диаметр капель при уровнях отрицательного давления от -30кПа до -80кПа определяется гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов.

7. Отработаны методы создания стабильных гидрогелевых микрочастиц из полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA), полиакриламида, альгината, агарозы, желатина метакрилоила (GelMA) при помощи разработанной микрофлюидной платформы. Основная характеристика микрочастиц состояла в регистрации и анализе диаметра микрочастиц, стабильности их генерации. Обобщая результаты, в зависимости от размеров микроканалов и процесса полимеризации гидрогеля, а также метода подачи жидкостей в микрофлюидный чип, можно получать микрочастицы диаметром в диапазоне 15-200 мкм. Также протестированы методы упаковки клеток млекопитающих и бактерий в капли эмульсии и гидрогелевые микрочастицы. Для микрочастиц из альгината натрия показано, что клетки в них способны жить в течении более 5 дней в инкубаторе при 5% CO_2 и 37°C.

8. Дополнительная характеристика микрочастиц на примере изучения упругих свойств (модуля Юнга) гидрогелевых микрочастиц из полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA) и полиакриламида методом атомно-силовой микроскопии показала, что, изменяя концентрацию исходных мономеров в дисперсной фазе,

можно управлять их упругими свойствами. В случае PEGDA с концентрацией 25 – 100% модуль Юнга микрочастиц в водной среде может варьироваться в диапазоне 5-80 МПа, а в случае полиакриламида с концентрацией 5 – 15% в диапазоне 2-7 кПа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы выражает огромную благодарность своему научному руководителю к.ф.-м.н. Антону Сергеевичу Букатину за всестороннюю помощь, в частности, за помощь в обсуждении и постановке цели и задач диссертации, в обсуждении результатов работы, в написании научных публикаций, в совершенствовании формулировок текста диссертационной работы, за ценные советы и опыт, способствовавшие профессиональному росту автора.

Автор благодарит К.И. Белоусова, Д.Д. Ступина, И.С. Мухина за всестороннюю помощь, обсуждения и ценные советы.

Автор также благодарит ФГБУН Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН) за техническую помощь.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ (AFM) – атомно-силовая микроскопия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кцПЦР – капельная цифровая полимеразная цепная реакция

МФКД – микрофлюидный контроллер давлений

МЧ – микрочастица

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПВС – поливиниловый спирт

ПДМС (PDMS) – полидиметилсилоксан

ПЦР – полимеразная цепная реакция

цПЦР – цифровая полимеразная цепная реакция

УФ – ультрафиолет

CV – coefficient of variation или коэффициент вариации

FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting, или сортировка клеток, активируемая флуоресценцией (вид проточной цитометрии)

GelMA – желатин метакрилоил

LAMP – loop-mediated isothermal amplification, или петлевая изотермическая амплификация

μTAS - Micro Total Analysis Systems или микросистема полного анализа

MI – индекс перемешивания

PEGDA – полиэтиленгликоль диакрилат

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ

1. Патент на полезную модель № 199373 U1 Российская Федерация, МПК G 01 N 1/10 /Микрофлюидное устройство для формирования монодисперсной макроэмульсии вакуумным методом / А. С. Букатин, Н. А. Филатов, Д. В. Ноздриухин; заявитель и патентообладатель ФГБУВОиН СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова. – № 2018143407 ; заявл. 07.12.2018 ; опубл. 28.08.2020, Бюл. №25.
2. **Filatov, N. A.** Open-Source pressure controller based on compact electro-pneumatic regulators for droplet microfluidics applications / **N. A. Filatov**, I. A. Denisov, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // IEEE Tr. On Inst And Meas. – 2022. – Vol. 71. – P. 1-10.
3. **Filatov, N. A.** Negative Pressure Provides Simple and Stable Droplet Generation in a Flow-Focusing Microfluidic Device / **N. A. Filatov**, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // Micromachines. – 2021. – Vol. 12. – № 6. – P. 662.
4. Belousov, K. I. An asymmetric flow-focusing droplet generator promotes rapid mixing of reagents / K. I. Belousov, **N. A. Filatov**, I. V. Kukhtevich, V. Kantsler, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // Scientific reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-10.
5. **Filatov, N. A.** Study of droplet formation regimes in a pressure control mode in microfluidic chip for screening cell libraries / **N. A. Filatov**, A. S. Bukatin // Journal of Physics: Conference Series. – 2020. – Vol. 1695. – № 1. – P. 012053.
6. Nozdriukhin, D. V. Formation and manipulation of polyacrylamide spheroids doped with magnetic nanoparticles in microfluidic chip / D. V. Nozdriukhin, **N. A. Filatov**, A. S. Bukatin // Journal of Physics: Conference Series. – 2018. – Vol. 1124. – № 3. – P. 031026.
7. **Filatov, N. A.** Comparison of step and flow-focusing emulsification methods for water-in-oil monodisperse drops in microfluidic chips / **N. A. Filatov**, D. V. Nozdriukhin, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // Journal of Physics: Conference Series. – 2018. – Vol. 1124. – № 3. – P. 031028.

8. Nozdriukhin, D. V. Formation of Polyacrylamide and PEGDA Hydrogel Particles in a Microfluidic Flow Focusing Droplet Generator / D. V. Nozdriukhin, **N. A. Filatov**, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // *Technical Physics*. – 2018. – Vol. 63. – № 9. – P. 1328-1333.
9. Nozdriukhin, D. V. The study of monodisperse water-in-oil macroemulsion dynamics in a microfluidic chip / D. V. Nozdriukhin, K. I. Belousov, **N. A. Filatov**, A. S. Bukatin // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2017. – Vol. 917. – № 4. – P. 042015.
10. **Filatov, N. A.** The kinetic study of solidification PEGDA microparticles in flow-focusing microfluidic chip / **N. A. Filatov**, D. V. Nozdriukhin, A. S. Bukatin // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2017. – Vol. 917. – № 4. – P. 042024.
11. **Filatov, N. A.** The study of mixing of reagents within a droplet in various designs of microfluidic chip / **N. A. Filatov**, K. I. Belousov, A. S. Bukatin, I. V. Kukhtevich, A. A. Evstrapov // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2016. – Vol. 741. – № 1. – P. 012052.

Труды конференций:

12. Tushkevich, A. A. Investigation of the polymerization rate of hydrogel microparticles in microfluidic device / A. A. Tushkevich, **N. A. Filatov**, A. S. Bukatin // *The Book of Abstracts 8th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2021»* / HSE University. – St. Petersburg, 2021. – P. 435.
13. **Filatov, N. A.** Study of droplet formation regimes in a pressure control mode in microfluidic chip for screening cell libraries / **N. A. Filatov**, A. A. Tushkevich, A. S. Bukatin // *The Book of Abstracts 7th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2020»* / Academic University Publishing. – St. Petersburg, 2020. – P. 149.
14. **Филатов, Н. А.** Гидрогелевые микрочастицы для формирования трехмерных клеточных структур / **Н. А. Филатов**, О. Д. Тапинова, Д.Д. Ступин, А. С. Букатин // Тезисы докладов Третьей международной конференции со школой

- молодых ученых «Физика — наукам о жизни» / ФТИ им. А.Ф. Иоффе. – СПб, 2019. – С. 181.
15. Tapinova, O. D. Synthesis of hydrogel microparticles by droplet microfluidics for 3D cell cultivation / O. D. Tapinova, **N. A. Filatov**, D. D. Stupin, A. S. Bukatin // The Book of Abstracts 6th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2019» / Academic University Publishing. – St. Petersburg, 2019. – P. 216.
 16. Bukatin, A. S. Mixing enhancement during droplet formation in an asymmetric flow focusing droplet generation / A. S. Bukatin., K. I. Belousov, **N. A. Filatov**, I. V. Kukhtevich, A. A. Evstrapov // Proceedings of EMBL Conference Microfluidics 2018: New technologies and applications in biology, biochemistry and single-cell analysis. – Heidelberg, 2018. – P. 55.
 17. Nozdriukhin, D. V. Formation and manipulation of polyacrylamide spheroids doped with magnetic nanoparticles in microfluidic chip / D. V. Nozdriukhin, **N. A. Filatov**, A. S. Bukatin // The Book of Abstracts 5th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2018» / Academic University Publishing. – St. Petersburg, 2018. – P. 156.
 18. **Filatov, N. A.** Study of step-emulsification method for water-in-oil monodisperse drops in microfluidic chips with different nozzle sizes / **N. A. Filatov**, D. V. Nozdriukhin, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // The Book of Abstracts 5th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2018» / Academic University Publishing. – St. Petersburg, 2018. – P. 140.
 19. Ноздрюхин, Д. В. Синтез гидрогелевых микрочастиц методами «капельной» микрофлюидики / Д. В. Ноздрюхин, **Н. А. Филатов**, А. С. Букатин, А. А. Евstrapов // Тезисы докладов Второй российской конференции с международным участием «Физика – наукам о жизни» / ФТИ им. А.Ф. Иоффе. – СПб, 2017. – С. 96.
 20. **Филатов, Н. А.** Исследование монодисперсных PEGDA микрочастиц для контролируемой доставки лекарственных средств / **Н. А. Филатов**, Д. В.

- Ноздрюхин, А. С. Букатин // Сборник тезисов международной конференции «Физика.СПб» / ФТИ им. А.Ф. Иоффе. – СПб, 2017. – С. 51.
21. Ноздрюхин, Д. В. Исследование динамики дисперсных систем в канале микрофлюидного чипа / Д. В. Ноздрюхин, **Н. А. Филатов**, А. С. Букатин // Сборник трудов научной конференции с международным участием «Неделя науки» в СПбПУ Петра Великого / СПбПУ Петра Великого. – СПб, 2017. – С. 279-281.
22. **Filatov, N. A.** The study of mixing of reagents within a droplet in various designs of microfluidic chip / **N. A. Filatov**, K. I. Belousov, A. S. Bukatin, I. V. Kukhtevich, A. A. Evstrapov // The Book of Abstracts 3th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2016» / Academic University Publishing. – St. Petersburg, 2016. – P. 172.
23. **Filatov, N. A.** SERS detection in droplet based microfluidics / **N. A. Filatov**, A. S. Bukatin, A. A. Evstrapov // Proceedings of 5th International Scientific Conference STRANN. – St. Petersburg, 2016. – P. 149-150.
24. **Филатов, Н. А.** Исследование условий воспроизводимой генерации и сортировки эмульсий "вода в масле" в микрофлюидном чипе для скрининга клеточных библиотек / **Н. А. Филатов**, А. С. Букатин // Сборник тезисов Международной конференции «Физика.СПб» / ФТИ им. А.Ф. Иоффе. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 50-51.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weber, M. Ultra-high-throughput screening for antagonists of a Gi-Coupled receptor in A 2.2- μ l 3456-well plate format CyclicAMP assay / M. Weber, et al. // ASSAY and Drug Development Technologies. – 2007. – Vol. 5, – № 1. – P. 117–126.
2. Oldenburg, K. R. Assay miniaturization for ultra-high throughput screening of combinatorial and discrete compound libraries: A 9600-well (0.2 microliter) assay system / K. R. Oldenburg, et al. // J Biomol Screen. – 1998. – Vol. 3, – № 1. – P. 55–62.
3. Berg, M. Evaluation of liquid handling conditions in microplates / M. Berg, et al. // J Biomol Screen. – 2001. – Vol. 6. – № 1. – P. 47–56.
4. Chou, W. -L. Recent advances in applications of droplet microfluidics / W. -L. Chou, et al. // Micromachines. – 2015. – Vol. 6. – № 9. – P. 1249–1271.
5. Nossal, G. J. V. Antibody production by single cells / G. J. V. Nossal, J. Lederberg // Nature. – 1958. – Vol. 181. – № 4620. – P. 1419–1420.
6. Ferrer, M. Interplay of metagenomics and *in vitro* compartmentalization: Interplay of metagenomics and *in vitro* compartmentalization for enzyme discovery / M. Ferrer, et al. // Microbial Biotechnology. – 2009. – Vol. 2. – № 1. – P. 31–39.
7. Mishra, M. K. MEMS Technology: A Review / M. K. Mishra, et al. // JERR. – 2019. – P. 1–24.
8. Terry, S. C. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer / S. C. Terry, J. H. Jerman, J. B. Angell // IEEE Trans. Electron Devices. – 1979. – Vol. 26. – № 12. – P. 1880–1886.
9. Harrison, D. J. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip / D. J. Harrison, et al. // Science. – 1993. – Vol. 261. – № 5123. – P. 895–897.
10. Manz, A. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing / A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer // Sensors and Actuators B: Chemical. – 1990. – Vol. 1. – № 1–6. – P. 244–248.

11. Finishing the euchromatic sequence of the human genome / International Human Genome Sequencing Consortium // *Nature*. – 2004. – Vol. 431. – № 7011. – P. 931–945.
12. Bruus, H. *Theoretical microfluidics* / H. Bruus. – New York: Oxford University Press, 2008. – 346 p.
13. Matuła, K. Single-cell analysis using droplet microfluidics / K. Matuła, F. Rivello, W. T. S. Huck // *Adv. Biosys.* – 2020. – Vol. 4. – № 1. – P. 1900188.
14. Nakano, M. Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion / M. Nakano, et al. // *Journal of Biotechnology*. – 2003. – Vol. 102. – № 2. – P. 117–124.
15. Musyanovych, A. Miniemulsion droplets as single molecule nanoreactors for polymerase chain reaction. / A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol. 6. – № 2. – P. 1824–1828.
16. Rosenfeld, L. Review and analysis of performance metrics of droplet microfluidics systems / L. Rosenfeld, et al. // *Microfluid Nanofluid.* – 2014. – Vol. 16. – № 5. – P. 921–939.
17. Vogelstein, B. Digital PCR / B. Vogelstein, K. W. Kinzler // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96. – № 16. – P. 9236–9241.
18. Dressman, D. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations / D. Dressman, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 15. – P. 8817–8822.
19. Choi, A. Recent advances in engineering microparticles and their nascent utilization in biomedical delivery and diagnostic applications / A. Choi, et al. // *Lab Chip*. – 2017. – Vol. 17. – № 4. – P. 591–613.
20. Pataky, K. Microdrop printing of hydrogel bioinks into 3D tissue-like geometries / K. Pataky, et al. // *Adv. Mater.* – 2012. – Vol. 24. – № 3. – P. 391–396.
21. Chen, Q. Controlled assembly of heterotypic cells in a core–shell scaffold: organ in a droplet / Q. Chen, et al. // *Lab Chip*. – 2016. – Vol. 16. – № 8. – P. 1346–1349.

22. Sackmann, E. K. The present and future role of microfluidics in biomedical research / E. K. Sackmann, A. L. Fulton, D. J. Beebe // *Nature*. – 2014. – Vol. 507. – № 7491. – P. 181–189.
23. Chiu, D. T. Small but perfectly formed? Successes, challenges, and opportunities for microfluidics in the chemical and biological sciences / D. T. Chiu, et al. // *Chem*. – 2017. – Vol. 2. – № 2. – P. 201–223.
24. Mawatari, K. Extended-nanofluidics: fundamental technologies, unique liquid properties, and application in chemical and bio analysis methods and devices / K. Mawatari, et al. // *Anal. Chem*. – 2014. – Vol. 86. – № 9. – P. 4068–4077.
25. MEMS: introduction and fundamentals / ed. M. Gad-el-Hak. – 2nd ed. – Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006. – 469 p.
26. Haile, J. M. Molecular dynamics simulation: elementary methods / J. M. Haile, et al. // *Comput. Phys*. – 1993. – Vol. 7. – № 6. – P. 625.
27. Tu, Q. A Molecular dynamics study on rotational nanofluid and its application to desalination / Q. Tu, et al. // *Membranes*. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 117.
28. Niethammer, C. *ls1 mardyn*: The massively parallel molecular dynamics code for large systems / C. Niethammer, et al. // *J. Chem. Theory Comput*. – 2014. – Vol. 10. – № 10. – P. 4455–4464.
29. Neumann, P. PetaFLOP molecular dynamics for engineering applications / P. Neumann, et al. // *High Performance Computing in Science and Engineering' 18* / Springer International Publishing. – Cham, 2019. – P. 397–407.
30. Tchipev, N. TweTriS: Twenty trillion-atom simulation / N. Tchipev, et al. // *The International Journal of High Performance Computing Applications*. – 2019. – Vol. 33. – № 5. – P. 838–854.
31. Eckhardt, W. 591 TFLOPS Multi-trillion particles simulation on SuperMUC / W. Eckhardt, et al. // *International Supercomputing Conference*. – 2013. – Vol. 7905. – P. 1–12.
32. Pryor, R. W. Multiphysics modeling using COMSOL: a first principles approach / R. W. Pryor. – Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2011. – 852 p.

33. Буляница, А. Л. Математическое моделирование в микрофлюидике: основные положения / А. Л. Буляница // Научное Приборостроение. – 2005. – Т. 15. – № 2. – С. 51–66.
34. Meng, X. Numerical simulation and experimental verification of droplet generation in microfluidic digital PCR chip / X. Meng, Y. Yu, G. Jin // *Micromachines*. – 2021. – Vol. 12. – № 4. – P. 409.
35. Toprakcioglu, Z. Attoliter protein nanogels from droplet nanofluidics for intracellular delivery / Z. Toprakcioglu, et al. // *Sci. Adv.* – 2020. – Vol. 6. – № 6. – P. eaay7952.
36. Elvira, K. S. Droplet dispensing in digital microfluidic devices: Assessment of long-term reproducibility / K. S. Elvira, et al. // *Biomicrofluidics*. – 2012. – Vol. 6. – № 2. – P. 022003.
37. Mazutis, L. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics / L. Mazutis, et al. // *Nat Protoc.* – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. 870–891.
38. Opalski, A. S. Droplet microfluidics as a tool for the generation of granular matters and functional emulsions / A. S. Opalski, T. S. Kaminski, P. Garstecki // *KONA*. – 2019. – Vol. 36. – P. 50–71.
39. Malloggi, F. Monodisperse colloids synthesized with nanofluidic technology / F. Malloggi, et al. // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26. – № 4. – P. 2369–2373.
40. Filatov, N. A. Comparison of step and flow-focusing emulsification methods for water-in-oil monodisperse drops in microfluidic chips / N. A. Filatov, et al. // *J. Phys.: Conf. Ser.* – 2018. – Vol. 1124. – P. 031028.
41. Joensson, H. N. Droplet microfluidics - A tool for single-cell analysis / H. N. Joensson, H. Andersson Svahn // *Angewandte Chem Int Ed Engl.* – 2012. – Vol. 51. – № 49. – P. 12176-12192.
42. Baret, J. -C. Surfactants in droplet-based microfluidics / J. -C. Baret // *Lab Chip*. – 2012. – Vol. 12, – № 3. – P. 422–433.

43. Leshansky, A. M. Obstructed breakup of slender drops in a microfluidic T Junction / A. M. Leshansky, et al. // *Phys. Rev. Lett.* – 2012. – Vol. 108, № 26. P. 264502.
44. Leshansky, A. M. Breakup of drops in a microfluidic T-junction / A. M. Leshansky, L. M. Pismen // *Physics of Fluids.* – 2009. – Vol. 21. – № 2. – P. 023303.
45. Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics / ed. D. Li. – NY: Springer Science & Business Media, 2008. – 2242 p.
46. Anderson, R. R. Transient deflection response in microcantilever array integrated with polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidics / R. R. Anderson, et al. // *Lab Chip.* – 2011. – Vol. 11. – № 12. – P. 2088.
47. Ahn, C. Microfluidics and their applications to Lab-on-a-Chip / C. Ahn, J. -W. Choi ; ed. B. Bhushan // *Springer Handbook of Nanotechnology* / Springer Berlin Heidelberg. – 2007. – P. 523–548.
48. Ren, K. Materials for microfluidic chip fabrication / K. Ren, J. Zhou, H. Wu // *Acc. Chem. Res.* – 2013. – Vol. 46. – № 11. – P. 2396–2406.
49. Saliterman, S. S. Fundamentals of bioMEMS and medical microdevices / S. S. Saliterman // Bellingham, Wash: Wiley-Interscience SPIE Press, 2006. – 610 p.
50. Shiu, P. P. Rapid fabrication of tooling for microfluidic devices via laser micromachining and hot embossing / P. P. Shiu, et al. // *J. Micromech. Microeng.* – 2008. – Vol. 18. – № 2. – P. 025012.
51. Hsieh, Y. -K. Direct micromachining of microfluidic channels on biodegradable materials using laser ablation / Y. -K. Hsieh, et al. // *Polymers.* – 2017. – Vol. 9. – № 12. – P. 242.
52. Mali, P. Facile fabrication of microfluidic systems using electron beam lithography / P. Mali, A. Sarkar, R. Lal // *Lab Chip.* – 2006. – Vol. 6. – № 2. – P. 310.
53. Справочник Шпрингера по нанотехнологиям. В 3-х т. Т.1. / под ред. Б. Бхушана ; пер. с англ. под общ. ред. А. С. Саурова. – 2-е изд. – М.: Техносфера, 2010. – 862 с.

54. Vaezi, M. A review on 3D micro-additive manufacturing technologies / M. Vaezi, H. Seitz, S. Yang // *Int J Adv Manuf Technol.* – 2013. – Vol. 67. – № 5. – P. 1721–1754.
55. Gross, B. C. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences / B. C. Gross, et al. // *Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 86. – № 7. – P. 3240–3253.
56. Yazdi, A. A. 3D printing: an emerging tool for novel microfluidics and lab-on-a-chip applications / A. A. Yazdi, et al. // *Microfluid Nanofluid.* – 2016. – Vol. 20. – № 3. – P. 50.
57. Lebedev, D. Focused ion beam milling based formation of nanochannels in silicon-glass microfluidic chips for the study of ion transport / D. Lebedev, et al. // *Microfluid Nanofluid.* – 2021. – Vol. 25. – № 6. – P. 51.
58. Duffy, D. C. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) / D. C. Duffy, et al. // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70. – № 23. – P. 4974–4984.
59. Lee, S. W. Shrinkage ratio of PDMS and its alignment method for the wafer level process / S. W. Lee, S. S. Lee // *Microsyst Technol.* – 2007. – Vol. 14. – № 2. – P. 205–208.
60. Bukatin, A. S. Fabrication of high-aspect-ratio microstructures in polymer microfluid chips for in vitro single-cell analysis / A. S. Bukatin, et al. // *Tech. Phys.* – 2016. – Vol. 61. – № 10. – P. 1566–1571.
61. Haubert, K. PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system / K. Haubert, T. Drier, D. Beebe // *Lab Chip.* – 2006. – Vol. 6. – № 12. – P. 1548.
62. Chang, C. -C. Electrokinetic mixing in microfluidic systems / C. -C. Chang, R. -J. Yang // *Microfluid Nanofluid.* – 2007. – Vol. 3. – № 5. – P. 501–525.
63. Thiele, M. Combination of microfluidic high-throughput production and parameter screening for efficient shaping of gold nanocubes using Dean-flow mixing / M. Thiele, et al. // *Lab Chip.* – 2017. – Vol. 17. – № 8. – P. 1487–1495.
64. Mao, Z. Label-free measurements of reaction kinetics using a droplet-based optofluidic device / Z. Mao, et al. // *J Lab Autom.* – 2015. – Vol. 20. – № 1. – P. 17–24.

65. Suh, Y. K. A Review on mixing in microfluidics / Y. K. Suh, S. Kang // *Micromachines*. – 2010. – Vol. 1. – № 3. – P. 82–111.
66. Capretto, L. Micromixing within microfluidic devices / L. Capretto, et al. // *Microfluidics Springer Berlin Heidelberg*. – 2011. – Vol. 304. – P. 27–68.
67. Baroud, C. N. Dynamics of microfluidic droplets / C. N. Baroud, F. Gallaire, R. Dangla // *Lab Chip*. – 2010. – Vol. 10. – № 16. – P. 2032.
68. Bui, M. -P. N. Enzyme kinetic measurements using a droplet-based microfluidic system with a concentration gradient / M. -P. N. Bui, et al. // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83. – № 5. – P. 1603–1608.
69. Hassan, S. Continuous measurement of enzymatic kinetics in droplet flow for point-of-care monitoring / S. Hassan, A. M. Nightingale, X. Niu // *Analyst*. – 2016. – Vol. 141. – № 11. – P. 3266–3273.
70. Mashaghi, S. Droplet microfluidics for kinetic studies of viral fusion / S. Mashaghi, A. M. van Oijen // *Biomicrofluidics*. – 2016. – Vol. 10. – № 2. – P. 024102.
71. Tsai, J. -H. Active microfluidic mixer and gas bubble filter driven by thermal bubble micropump / J. -H. Tsai, L. Lin // *Sensors and Actuators A: Physical*. – 2002. – Vol. 97. – P. 665–671.
72. Yaralioglu, G. G. Ultrasonic mixing in microfluidic channels using integrated transducers / G. G. Yaralioglu, et al. // *Anal. Chem.* – 2004. – Vol. 76. – № 13. – P. 3694–3698.
73. Glasgow, I. Electroosmotic mixing in microchannels / I. Glasgow, J. Batton, N. Aubry // *Lab Chip*. – 2004. – Vol. 4. – № 6. – P. 558.
74. Ryu, K. S. Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels / K. S. Ryu, et al. // *Lab Chip*. – 2004. – Vol. 4. – № 6. – P. 608.
75. Nguyen, N. -T. Micromixers—a review / N. -T. Nguyen, Z. Wu // *J. Micromech. Microeng.* – 2005. – Vol. 15. – № 2. – P. R1–R16.
76. Parsa, M. K. Mixing enhancement in a passive micromixer with convergent–divergent sinusoidal microchannels and different ratio of amplitude to wave length / M. K. Parsa, F. Hormozi, D. Jafari // *Computers & Fluids*. – 2014. – Vol. 105. – P. 82–90.

77. Kim, D. S. A serpentine laminating micromixer combining splitting/recombination and advection / D. S. Kim, et al. // *Lab Chip*. – 2005. – Vol. 5. – № 7. – P. 739.
78. Mansur, E. A. A state-of-the-art review of mixing in microfluidic mixers / E. A. Mansur, et al. // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – 2008. – Vol. 16. – № 4. – P. 503–516.
79. Bhagat, A. A. S. Enhancing particle dispersion in a passive planar micromixer using rectangular obstacles / A. A. S. Bhagat, I. Papautsky // *J. Micromech. Microeng.* – 2008. – Vol. 18. – № 8. – P. 085005.
80. Ozcelik, A. An acoustofluidic micromixer via bubble inception and cavitation from microchannel sidewalls / A. Ozcelik, et al. // *Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 86. – № 10. – P. 5083–5088.
81. Garstecki, P. Mixing with bubbles: a practical technology for use with portable microfluidic devices / P. Garstecki, et al. // *Lab Chip*. – 2006. – Vol. 6. – № 2. – P. 207–212.
82. Park, H. Y. Achieving uniform mixing in a microfluidic device: hydrodynamic focusing prior to mixing / H. Y. Park, et al. // *Anal. Chem.* – 2006. – Vol. 78. – № 13. – P. 4465–4473.
83. Yesiloz, G. Effective thermo-capillary mixing in droplet microfluidics integrated with a microwave heater / G. Yesiloz, M. S. Boybay, C. L. Ren // *Anal. Chem.* – 2017. – Vol. 89. – № 3. – P. 1978–1984.
84. Tice, J. D. Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the Reynolds and the capillary numbers / J. D. Tice, et al. // *Langmuir*. – 2003. – Vol. 19. – № 22. – P. 9127–9133.
85. Bringer, M. R. Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets / M. R. Bringer, et al. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. – 2004. – Vol. 362. – № 1818. – P. 1087–1104.

86. Sarrazin, F. Mixing characterization inside microdroplets engineered on a microcoalescer / F. Sarrazin, et al. // *Chemical Engineering Science*. – 2007. – Vol. 62. – № 4. – P. 1042–1048.
87. Zhao, S. Three-dimensional simulation of mixing performance inside droplets in micro-channels by lattice Boltzmann method / S. Zhao, et al. // *Chemical Engineering Journal*. – 2012. – Vol. 207–208. – P. 267–277.
88. Hardt, S. Passive micromixers for applications in the microreactor and μ TAS fields / S. Hardt, et al. // *Microfluid Nanofluid*. – 2005. – Vol. 1. – № 2. – P. 108–118.
89. Utada, A. S. Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device / A. S. Utada, et al. // *Science*. – 2005. – Vol. 308. – № 5721. – P. 537–541.
90. Lorenceau, E. Generation of polymerosomes from double-emulsions / E. Lorenceau, et al. // *Langmuir*. – 2005. – Vol. 21. – № 20. – P. 9183–9186.
91. Nie, Z. Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors / Z. Nie, et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127. – № 22. – P. 8058–8063.
92. Bocanegra, R. Monodisperse structured multi-vesicle microencapsulation using flow-focusing and controlled disturbance / R. Bocanegra, et al. // *Journal of Microencapsulation*. – 2005. – Vol. 22. – № 7. – P. 745–759.
93. Rizkalla, N. Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method / N. Rizkalla, et al. // *Journal of Microencapsulation*. – 2006. – Vol. 23. – № 1. – P. 39–57.
94. Zoldesi, C. I. Synthesis of monodisperse colloidal spheres, capsules, and microballoons by emulsion templating / C. I. Zoldesi, A. Imhof // *Adv. Mater.* – 2005. – Vol. 17. – № 7. – P. 924–928.
95. Koo, H.Y. Emulsion-based synthesis of reversibly swellable, magnetic nanoparticle-embedded polymer microcapsules / H.Y. Koo, et al. // *Chem. Mater.* – 2006. – Vol. 18, № 14. – P. 3308–3313.
96. Okochi, H. Places of emulsions in drug delivery / H. Okochi, M. Nakano // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2000. – Vol. 45. – № 1. – P. 1–4.

97. Vasiljevic, D. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier / D. Vasiljevic, et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2006. – Vol. 309. – № 1–2. – P. 171–177.
98. Weiss, J. Polysaccharide gel with multiple emulsion / J. Weiss, I. Scherze, G. Muschiolik // *Food Hydrocolloids*. – 2005. – Vol. 19. – № 3. – P. 605–615.
99. Lobato-Calleros, C. Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses / C. Lobato-Calleros, et al. // *Food Research International*. – 2006. – Vol. 39. – № 6. – P. 678–685.
100. Yoshida, K. Stability of vitamin A in oil-in-water-in-oil-type multiple emulsions / K. Yoshida, et al. // *J Amer Oil Chem Soc*. – 1999. – Vol. 76. – № 2. – P. 1–6.
101. Lee, M. -H. Preparation of silica particles encapsulating retinol using O/W/O multiple emulsions / M. -H. Lee, et al. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2001. – Vol. 240. – № 1. – P. 83–89.
102. Jo, Y. K. Biopolymer microparticles prepared by microfluidics for biomedical applications / Y. K. Jo, D. Lee // *Small*. – 2020. – Vol. 16. – № 9. – P. 1903736.
103. Jia, J. Engineering alginate as bioink for bioprinting / J. Jia, et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – № 10. – P. 4323–4331.
104. Tanase-Opedal, M. Lignin: A Biopolymer from forestry biomass for biocomposites and 3D printing / M. Tanase-Opedal, et al. // *Materials*. – 2019. – Vol. 12. – № 18. – P. 3006.
105. Jeong, H. -H. Kilo-scale droplet generation in three-dimensional monolithic elastomer device (3D MED) / H. -H. Jeong, et al. // *Lab Chip*. – 2015. – Vol. 15. – № 23. – P. 4387–4392.
106. Hudecova, I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids / I. Hudecova // *Clinical Biochemistry*. – 2015. – Vol. 48. – № 15. – P. 948–956.

107. Rane, T. D. Microfluidic continuous flow digital loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / T. D. Rane, et al. // *Lab Chip*. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 776–782.
108. Wallrapp, A. The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation / A. Wallrapp, et al. // *Nature*. – 2017. – Vol. 549. – № 7672. – P. 351–356.
109. Rotem, A. High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq single Drop-Based Microfluidics / A. Rotem, et al. // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. e0116328.
110. Terekhov, S. S. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity / S. S. Terekhov, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2017. – Vol. 114. – № 10. – P. 2550–2555.
111. Sukovich, D. J. Sequence specific sorting of DNA molecules with FACS using 3dPCR / D. J. Sukovich, S. T. Lance, A. R. Abate // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 39385.
112. Guo, M. T. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays / M. T. Guo, et al. // *Lab Chip*. – 2012. – Vol. 12. – № 12. – P. 2146.
113. Love, J. C. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies / J. C. Love, et al. // *Nat Biotechnol*. – 2006. – Vol. 24. – № 6. – P. 703–707.
114. Nightingale, A. M. Monitoring biomolecule concentrations in tissue using a wearable droplet microfluidic-based sensor / A. M. Nightingale, et al. // *Nat Commun*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 2741.
115. Aubry, G. Droplet array for screening acute behaviour response to chemicals in *Caenorhabditis elegans* / G. Aubry, H. Lu // *Lab Chip*. – 2017. – Vol. 17. – № 24. – P. 4303–4311.
116. Jiang, W. Cell-laden microfluidic microgels for tissue regeneration / W. Jiang, et al. // *Lab Chip*. – 2016. – Vol. 16. – № 23. – P. 4482–4506.

117. Martino, C. Droplet-based microfluidics for artificial cell generation: a brief review / C. Martino, A.J. deMello // *Interface Focus*. – 2016. – Vol. 6. – № 4. – P. 20160011.
118. Ho, K. K. Y. Engineering artificial cells by combining HeLa-based cell-free expression and ultrathin double emulsion template / K. K. Y. Ho, V. L. Murray, A. P. Liu // *Methods in Cell Biology*. Elsevier. – 2015. – Vol. 128. – P. 303–318.
119. Schwanhäusser, B. Global quantification of mammalian gene expression control / B. Schwanhäusser, et al. // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – № 7347. – P. 337–342.
120. Sun, H. Combining additive manufacturing with microfluidics: an emerging method for developing novel organs-on-chips / H. Sun, et al. // *Current Opinion in Chemical Engineering*. – 2020. – Vol. 28. – P. 1–9.
121. Researchers' opinion on droplet generation in microfluidics: syringe pumps or pressure control? [Electronic resource]. – URL: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/droplet-digital-microfluidics/researchers-opinion-on-droplet-generation-in-microfluidics-syringe-pumps-or-pressure-control/>.
122. Korczyk, P. M. Effects of unsteadiness of the rates of flow on the dynamics of formation of droplets in microfluidic systems / P. M. Korczyk, et al. // *Lab Chip*. – 2011. – Vol. 11. – № 1. – P. 173–175.
123. Glawdel, T. Global network design for robust operation of microfluidic droplet generators with pressure-driven flow / T. Glawdel, C. L. Ren // *Microfluid Nanofluid*. – 2012. – Vol. 13. – № 3. – P. 469–480.
124. Cubaud, T. Capillary threads and viscous droplets in square microchannels / T. Cubaud, T. G. Mason // *Physics of Fluids*. – 2008. – Vol. 20. – № 5. – P. 053302.
125. Kong, D. S. Open-source, community-driven microfluidics with Metafluidics / D. S. Kong, et al. // *Nat Biotechnol*. – 2017. – Vol. 35. – № 6. – P. 523–529.
126. Behrens, M. R. Open-source, 3D-printed peristaltic pumps for small volume point-of-care liquid handling / M. R. Behrens, et al. // *Sci Rep*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1543.

127. Zhang, X. A valve-less microfluidic peristaltic pumping method / X. Zhang, Z. Chen, Y. Huang // *Biomicrofluidics*. – 2015. – Vol. 9. – № 1. – P. 014118.
128. Wijnen, B. Open-source syringe pump library / B. Wijnen, et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 9. – P. e107216.
129. Almada, P. Automating multimodal microscopy with NanoJ-Fluidics / P. Almada, et al. // *Nat Commun*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1223.
130. Wagner, S. G. An automated and parallelised DIY-dosing unit for individual and complex feeding profiles: Construction, validation and applications / S. G. Wagner, et al. // *PLoS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 6. – P. e0217268.
131. Gao, R. Z. μ Pump: An open-source pressure pump for precision fluid handling in microfluidics / R. Z. Gao, et al. // *HardwareX*. – 2020. – Vol. 7. – P. e00096.
132. Brower, K. An open-source, programmable pneumatic setup for operation and automated control of single- and multi-layer microfluidic devices / K. Brower, et al. // *HardwareX*. – 2018. – Vol. 3. – P. 117–134.
133. Alistar, M. OpenDrop: An Integrated Do-It-Yourself platform for personal use of biochips / M. Alistar, U. Gaudenz // *Bioengineering*. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 45.
134. Xu, Q. Directly printed hollow connectors for microfluidic interconnection with UV-assisted coaxial 3D Printing / Q. Xu, J. Lo, S. -W. Lee // *Applied Sciences*. – 2020. – Vol. 10. – № 10. – P. 3384.
135. Price, A. J. N. An open source toolkit for 3D printed fluidics / A. J. N. Price, et al. // *J Flow Chem*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 37–51.
136. Chalich, Y. Development of a low-cost, user-customizable, high-speed camera / Y. Chalich, et al. // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – № 5. – P. e0232788.
137. Sun, M. μ droPi: A hand-held microfluidic droplet imager and analyzer built on Raspberry Pi / M. Sun, Z. Li, Q. Yang // *J. Chem. Educ*. – 2019. – Vol. 96. – № 6. – P. 1152–1156.
138. Teo, A. J. T. Negative pressure induced droplet generation in a microfluidic flow-focusing device / A. J. T. Teo, et al. // *Anal. Chem*. – 2017. – Vol. 89. – № 8. – P. 4387–4391.

139. Lee, C. -H. Easy-to-attach vacuum modules with biochips for droplets generation from small sample volumes / C. -H. Lee, C. -C. Hong // *Microfluid Nanofluid.* – 2016. – Vol. 20. – № 12. – P. 158.
140. Abate, A. R. Syringe-vacuum microfluidics: A portable technique to create monodisperse emulsions / A. R. Abate, D. A. Weitz // *Biomicrofluidics.* – 2011. – Vol. 5. – № 1. – P. 014107.
141. Chen, I. -J. A hand-held, power-free microfluidic device for monodisperse droplet generation / I. -J. Chen, T. Wu, S. Hu // *MethodsX.* – 2018. – Vol. 5. – P. 984–990.
142. Кухтевич, И. В. Принципы, технологии и устройства “капельной” микрофлюидики. Ч. 1 (обзор) / И. В. Кухтевич и др. // *Научное Приборостроение.* – 2015. – Т. 25. – № 3. – С. 65–85.
143. Qu, X. Fabrication of PDMS/glass microchips by twofold replication of PDMS and its application in genetic analysis / X. Qu, F. Sang, J. Ren // *J. Sep. Science.* – 2006. – Vol. 29. – № 15. – P. 2390–2394.
144. Pandit, K. R. Assessment of surfactants for efficient droplet PCR in mineral oil using the pendant drop technique / K. R. Pandit, et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2015. – Vol. 126. – P. 489–495.
145. Zhu, Y. A review of the rheological properties of dilute and concentrated food emulsions / Y. Zhu, et al. // *J Texture Stud.* – 2020. – Vol. 51. – № 1. – P. 45-55.
146. Faroughi, S. A. A generalized equation for rheology of emulsions and suspensions of deformable particles subjected to simple shear at low Reynolds number / S. A. Faroughi, C. Huber // *Rheol Acta.* – 2015. – Vol. 54. – № 2. – P. 85–108.
147. Berthet, H. Time-of-flight thermal flowrate sensor for lab-on-chip applications / H. Berthet, et al. // *Lab Chip.* – 2011. – Vol. 11. – № 2. – P. 215–223.
148. Bains, U. In-situ continuous monitoring of the viscosity of surfactant-stabilized and nanoparticles-stabilized Pickering emulsions / U. Bains, R. Pal // *Applied Sciences.* – 2019. – Vol. 9. – № 19. – P. 4044.
149. Pal, R. Influence of droplet size on exergy destruction in flow of concentrated non-Newtonian emulsions / R. Pal // *Energies.* – 2016. – Vol. 9. – № 4. – P. 293.

150. Pal, R. Shear viscosity behavior of emulsions of two immiscible liquids / R. Pal // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2000. – Vol. 225. – № 2. – P. 359–366.
151. Vladisavljević, G. Microfluidic production of multiple emulsions / G. Vladisavljević, R. Al Nuumani, S. Nabavi // *Micromachines*. – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 75.
152. Cai, B. A microfluidic platform utilizing anchored water-in-oil-in-water double emulsions to create a niche for analyzing single non-adherent cells / B. Cai, et al. // *Lab Chip*. – 2019. – Vol. 19. – № 3. – P. 422–431.
153. Firpo, G. Permeability thickness dependence of polydimethylsiloxane (PDMS) membranes / G. Firpo, et al. // *Journal of Membrane Science*. – 2015. – Vol. 481. – P. 1–8.
154. Merkel, T. C. Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane) / T. C. Merkel, et al. // *J. of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2000. – Vol. 38. – № 3. – P. 415–434.
155. Lamberti, A. PDMS membranes with tunable gas permeability for microfluidic applications / A. Lamberti, S. L. Marasso, M. Cocuzza // *RSC Adv*. – 2014. – Vol. 4. – № 106. – P. 61415–61419.
156. Kinoshita, H. Three-dimensional measurement and visualization of internal flow of a moving droplet using confocal micro-PIV / H. Kinoshita, et al. // *Lab Chip*. – 2007. – Vol. 7. – № 3. – P. 338–346.
157. Chen, X. Model of droplet generation in flow focusing generators operating in the squeezing regime / X. Chen, et al. // *Microfluid Nanofluid*. – 2015. – Vol. 18. – № 5–6. – P. 1341–1353.
158. Dupin, M. M. Simulation of a microfluidic flow-focusing device / M. M. Dupin, I. Halliday, C. M. Care // *Phys. Rev. E*. – 2006. – Vol. 73. – № 5. – P. 055701.
159. Mamet, V. Numerical modeling of flow focusing: Quantitative characterization of the flow regimes / V. Mamet, P. Namy, J. -M. Dedulle // *Physics of Fluids*. – 2017. – Vol. 29. – № 9. – P. 093606.

160. Hoang, D. A. Dynamics of droplet breakup in a T-junction / D. A. Hoang, et al. // *J. Fluid Mech.* – 2013. – Vol. 717. – P. R4.
161. Anna, S. L. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels / S. L. Anna, N. Bontoux, H. A. Stone // *Appl. Phys. Lett.* – 2003. – Vol. 82. – № 3. – P. 364–366.
162. Belousov, K. I. An asymmetric flow-focusing droplet generator promotes rapid mixing of reagents / K. I. Belousov, N. A. Filatov, I. V. Kukhtevich, V. Kantsler, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin // *Scientific reports* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 8797.
163. Thielicke, W. PIVlab – Towards user-friendly, affordable and accurate Digital particle image velocimetry in MATLAB / W. Thielicke, E. J. Stamhuis // *Journal of Open Research Software.* – 2014. – Vol. 2. – №1. – P. e30.
164. Georgiou, C. D. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins / C. D. Georgiou, et al. // *Anal Bioanal Chem.* – 2008. – Vol. 391. – № 1. – P. 391–403.
165. Kockmann, N. *Transport Phenomena in Micro Process Engineering* / N. Kockmann. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, – 2008. – 365 p.
166. Chen, J. M. Control of droplet generation in flow-focusing microfluidic device with a converging-diverging nozzle-shaped section / J. M. Chen, M. -C. Kuo, C. -P. Liu // *Jpn. J. Appl. Phys.* – 2011. – Vol. 50. – № 10. – P. 107301.
167. Gonzalez-Tello, P. Density and viscosity of concentrated aqueous solutions of polyethylene glycol / P. Gonzalez-Tello, F. Camacho, G. Blazquez // *J. Chem. Eng. Data.* – 1994. – Vol. 39. – № 3. – P. 611–614.
168. Kühbeck, D. Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates / D. Kühbeck, et al. // *New J. Chem.* – 2015. – Vol. 39. – № 3. – P. 2306–2315.
169. Nichol, J. W. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels / J. W. Nichol, et al. // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31. – № 21. – P. 5536–5544.
170. Ozbolat, I. A review on design for bioprinting / I. Ozbolat, H. Gudapati // *Bioprinting.* – 2016. – Vol. 3–4. – P. 1–14.