

ФИЛАТОВ Никита Алексеевич

**РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СИНТЕЗА
МОНОДИСПЕРСНЫХ МАКРОЭМУЛЬСИЙ И ГИДРОГЕЛЕВЫХ
МИКРОЧАСТИЦ**

1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук»

Научный руководитель:

Букатин Антон Сергеевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Возобновляемых Источников Энергии» СПбАУ РАН им. Ж. И. Алфёрова.

Официальные оппоненты:

Смирнов Евгений Михайлович, доктор физико-математических наук, профессор Высшей школы прикладной математики и вычислительной физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

Яценко Алексей Михайлович, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Центра фотоники и фотонных технологий Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)».

Защита состоится 7 октября 2022 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения (ИАП РАН) по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, г. Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26, ИАП РАН, а/я 207.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, витаминов, 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 конструкции чипа, увеличению его габаритов. Кроме того, исследователи указывают, что не существует общего и универсального технического решения, поэтому остается актуальным вопрос 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 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 ее 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 характеристика 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

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. Букатин, Н.А. Филатов, Д. В. Ноздрыхин.

— 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 5–25 кПа).
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 монодисперсные капли в течении более 4 часов с коэффициентом вариации диаметра менее 0,5%. Диаметр капель при уровнях отрицательного давления от -30 кПа до -80 кПа 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, 2х глав, заключения, списка литературы из 170 наименований. Работа содержит 66 рисунков и 1 таблицу. Полный объем диссертации – 167 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются цель и задачи исследования, излагаются практическая значимость и научная новизна работы, а также положения, выносимые на защиту.

Первая глава является литературным обзором. В ней описано развитие микрофлюидных систем/чипов для исследования и анализа биообъектов и клеток в каплях. Отмечены перспективные тенденции и существующие сложности, а также ограничения, накладываемые на капельные системы. Указываются основные методы и условия формирования стабильных макроэмульсий в микрофлюидных чипах методами «капельной» микрофлюидики. А также особенности конструкции и материалов для изготовления чипов. Отдельно обсуждаются проблемы перемешивания реагентов в микрокаплях, и описываются методы создания гидрогелевых микрочастиц в микрофлюидных чипах. Обосновывается актуальность создания таких микрочастиц, которые можно сочетать с живыми клетками для 3D биопечати тканей и органов, создания систем «орган-на-чипе». Дополнительно обсуждается основное периферийное оборудование для генерации капель. В частности, указывается важность развития микрофлюидных контроллеров давлений и разработки простых методов по формированию капель в микрофлюидных чипах с помощью отрицательного давления.

Вторая глава посвящена экспериментальным исследованиям и состоит из 6 разделов.

В разделе 2.1 рассматриваются теоретические основы формирования монодисперсных капель эмульсии в микрофлюидных чипах (устройствах), состав дисперсной и непрерывной фаз, а также управление гидрофильными и гидрофобными свойствами поверхности микроканалов чипа.

В разделе 2.2 описываются методы изготовления микрофлюидных чипов с генераторами капель с фокусировкой потока (Рисунок 1). Было разработано 25 вариантов конструкций чипов с апертурой $a = 15$ мкм и с разной шириной (60 – 200 мкм) и глубиной (40 – 120 мкм) выходного канала. Средняя глубина микроканалов в области генерации капель ≈ 45 мкм. Микрофлюидные

чипы изготавливались методом «мягкой» литографии с использованием полидиметилсилоксана (ПДМС, PDMS Sylgard 184) и предметных стекол. Для отливки ПДМС реплик чипов с системой микроканалов применялись изготовленные методом фотолитографии Si/SU-8 мастер-формы.

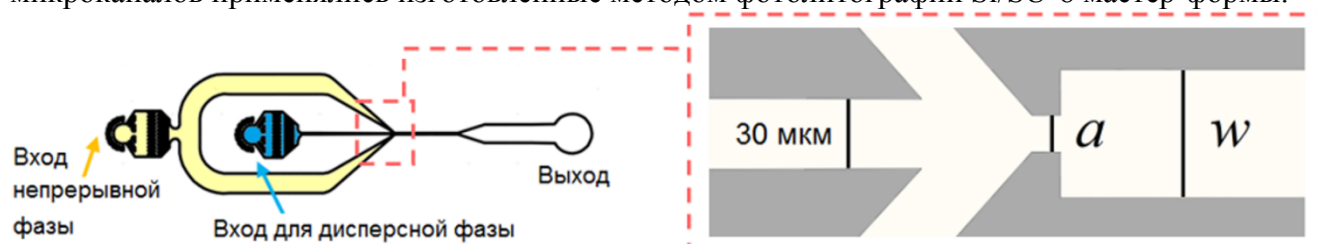


Рисунок 1 – Схема микрофлюидного чипа с фокусировкой потока для формирования монодисперсных эмульсий «вода-в-масле».

В разделе 2.3 представлена разработка и характеристика микрофлюидного контроллера давления (МФКД) с «открытым исходным кодом» для ввода жидкостей в микрофлюидные чипы при постоянном давлении (Рисунок 2). Контроллер основан на 4х электропневматических регуляторах серии SMC ITV00X0 (SMC Pneumatics, Япония). В работе использовались регуляторы ITV-0010 и ITV-0030 с диапазоном выходного давления 0–100 кПа и 0–500 кПа соответственно. МФКД подключается к микрофлюидным чипам через пневмоинтерфейсы для лабораторных пластиковых пробирок объемом 1,5 мл, 15 мл или 50 мл, разработанные в САПР AutoCAD и изготовленные методами 3D печати (принтеры FormLab 2, Picasso X Pro). Дополнительно МФКД имеет вакуумный насос для ввода жидкостей при отрицательном давлении, релейные выходы, аналоговые входы, шину I2C и UART для подключения внешних функциональных элементов (клапаны, расходомеры, нагреватели, источники высокого напряжения и т. д.).

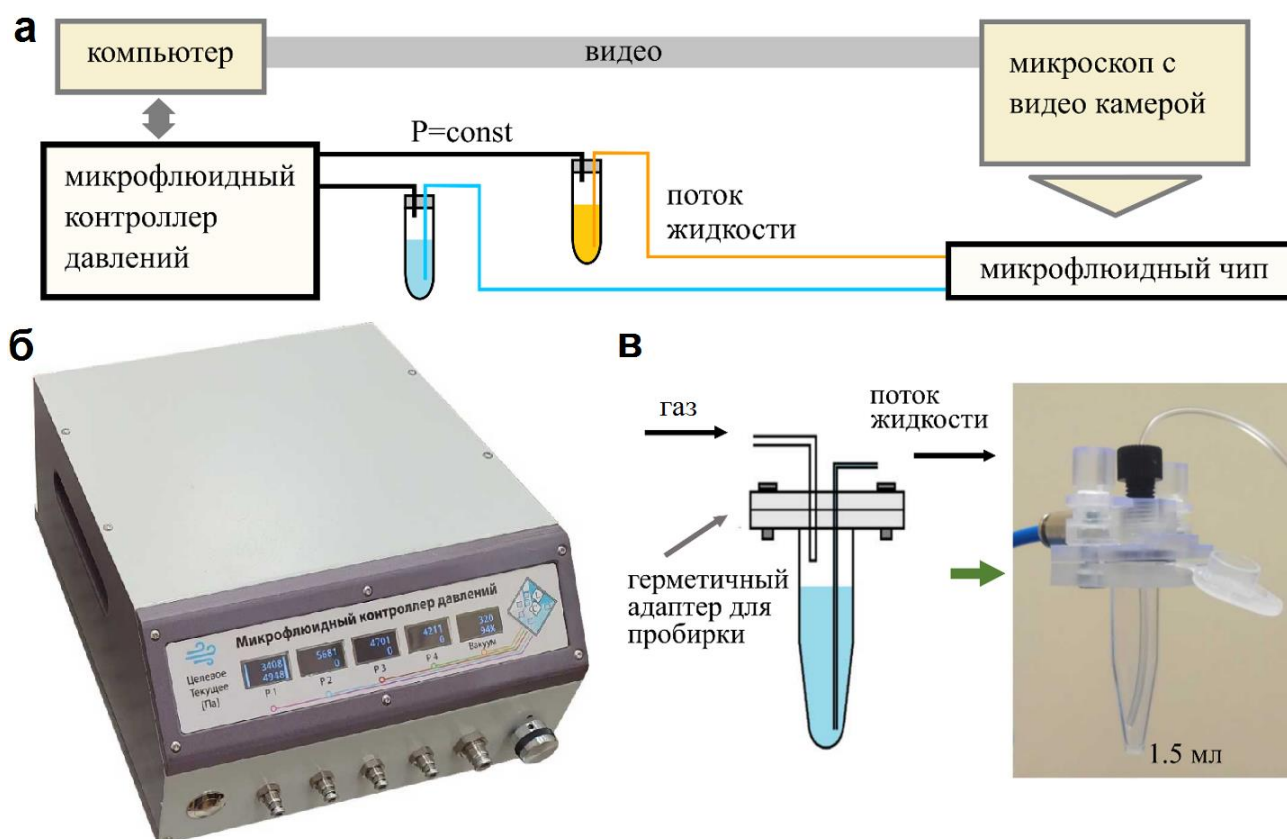


Рисунок 2 – (а) Схема экспериментальной установки для формирования капель эмульсии в микрофлюидном чипе; (б) Общий вид микрофлюидного контроллера давлений; (в) Пневмоинтерфейсы для ввода жидкостей в чип при постоянном давлении.

МФКД управляется с компьютера через приложение, которое было разработано в среде IDE BlackBox Component Builder. Приложение позволяет задавать и контролировать давления на выходах регуляторов ITV, записывать их значения в файл, имеет панели инструментов для управления вакуумным насосом, релейными выходами. В приложении можно управлять функциями контроллера вручную или создавать последовательности операций (протоколы) для автоматического выполнения стадий эксперимента. Кроме того, контроллер содержит 5 дисплеев и энкодер для ручного управления без подключения к компьютеру.

МФКД был использован для формирования капель эмульсии «вода-в-масле» в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока с шириной выходного канала 60 мкм и 200 мкм при постоянной разности давлений ($\Delta P = \text{const}$) между входами и выходами чипа. Было проведено сравнение режимов генерации капель при вводе жидкостей с помощью МФКД и коммерческих шприцевых насосов PND 2000 (Harvard Apparatus, США), которые обеспечивали постоянный расход жидкостей ($Q = \text{const}$). Минеральное масло (№330779, Merck) с добавлением 3,5% поверхностно-активного вещества (ПАВ) ABIL EM 180 и деионизированная вода использовались как непрерывная и дисперсная фазы, соответственно.

В ходе исследований установлено, что образование капель эмульсии в случае МФКД было стабильным в течение более 4 часов (Рисунок 3). Коэффициент вариации диаметра капель не превышал 4,3%, что соответствует монодисперсной эмульсии и сопоставимо с генерацией капель с помощью коммерческих шприцевых насосов. Изменяя входные давления дисперсной и непрерывной фаз, в микрофлюидном чипе с фокусировкой потока с выходным каналом шириной 200 мкм можно получать монодисперсные капли диаметром от 5 мкм до 65 мкм, а при использовании шприцевых насосов – капли диаметром от 20 мкм до 60 мкм (Рисунок 4). Дальнейшие исследования показали, что в режиме контроля давления, диаметры капель линейно зависят от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз, в то время как для режима контроля расходов с помощью шприцевых насосов эта зависимость является нелинейной. При этом частоты генерации капель в этих режимах сильно различаются. При изменении входного давления дисперсной фазы при использовании МФКД происходило изменение концентрации эмульсии в выходном канале (Рисунок 4 д, е).

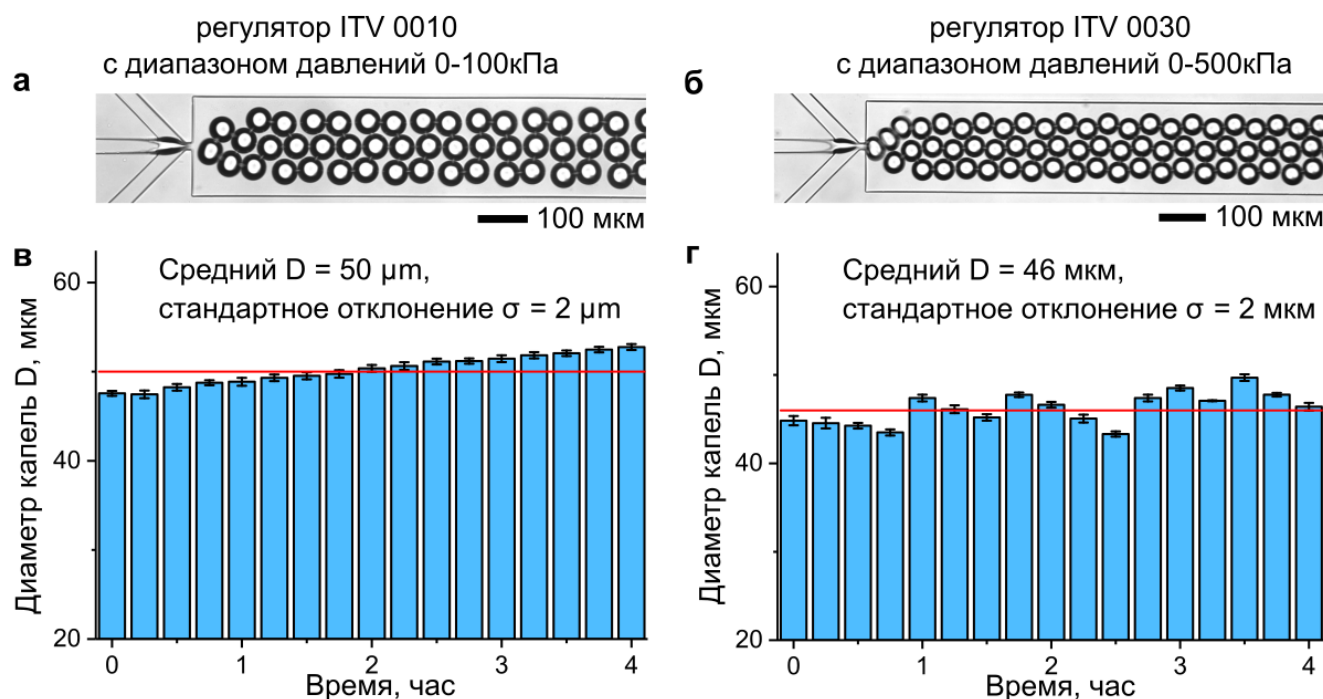


Рисунок 3 – Стабильность генерации капель эмульсии «вода-в-масле» при помощи МФКД. (а, б) Изображения образования капель. (в, г) Зависимости диаметра капель от времени. Планки погрешностей – стандартное отклонение, красные линии – средний диаметр капли. Каждое значение диаметра получено усреднением 10 измерений.

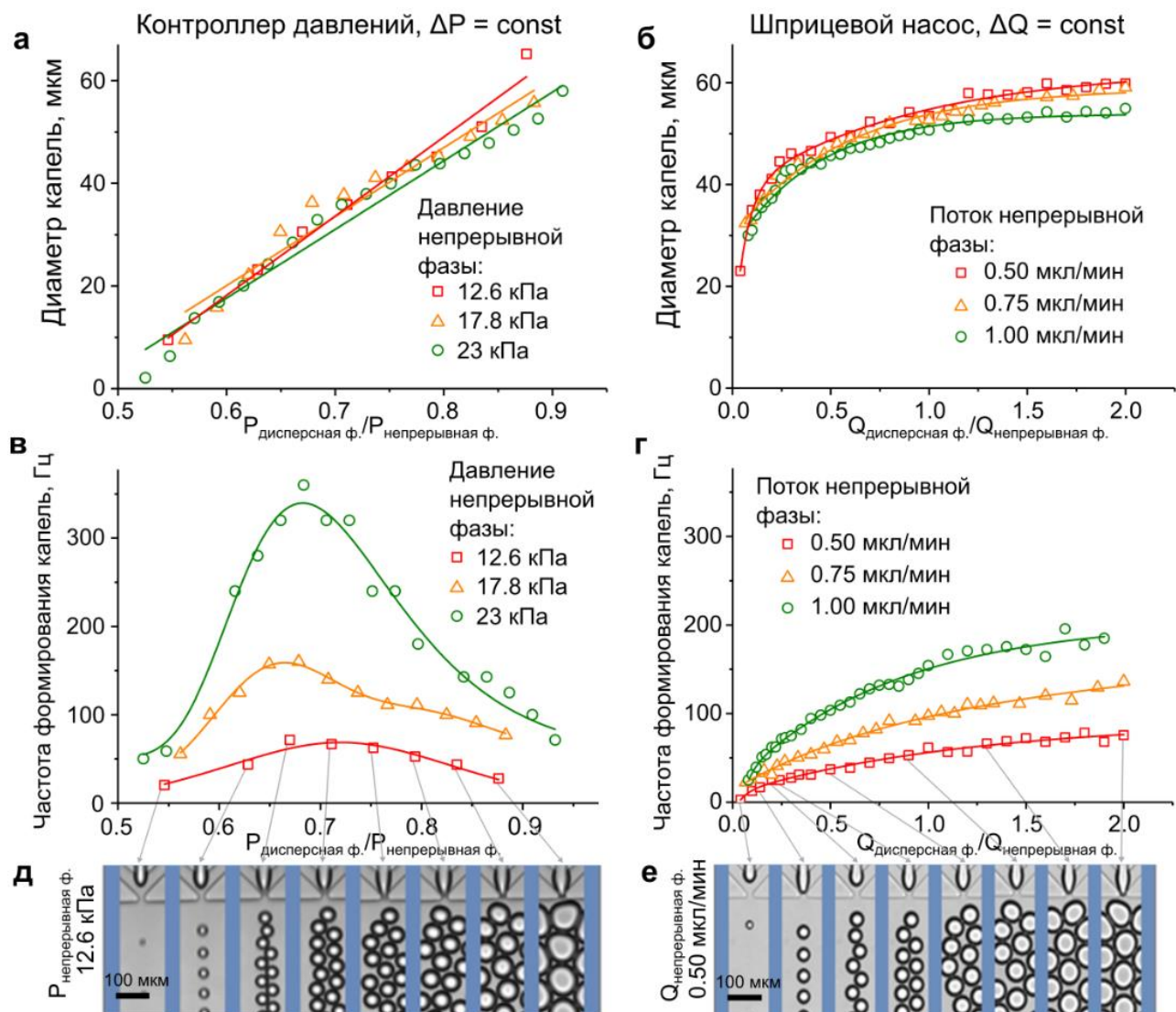


Рисунок 4 – Режимы образования капель в микрофлюидном чипе с использованием режимов контроля давления и контроля расходов. Зависимости диаметра капель (а, б), частоты генерации (в, г) от отношения давлений/расходов фаз. (д, е) изображения образования капель при различных давлениях и расходах фаз. Использовался чип с $w = 200 \text{ мкм}$ и МФКД с регуляторами ITV0010.

Из-за того, что вязкость эмульсии зависит от ее концентрации [Bains U., Pal R., Applied Sciences, 2019], это приводило к изменению гидравлического сопротивления выходного канала и снижению скоростей течения обеих фаз, из-за чего снижалась частота генерации капель. Исследования режимов генерации капель в микрофлюидных чипах с фокусировкой потоков с узким выходным каналом 60 мкм показали аналогичные результаты.

Далее путем сравнения режимов генерации капель эмульсии при постоянном давлении и расходе жидкостей была произведена оценка эффективной вязкости эмульсии и гидравлического сопротивления выходного микроканала (Рисунок 5). Для этого использовалась теория эквивалентных схем и законы Кирхгофа [Bruus H., Theoretical microfluidics, Oxford University Press, 2008]. Проведенный анализ показал, что эффективная вязкость линейно 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 (концентрации) каплями микроканала 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 [Bains U., Pal R., Applied Sciences, 2019; Pal R., Energies, 2016] и показывают, что в режиме

генерации капле при постоянном давлении вязкость эмульсии следует учитывать при выборе подходящих значений давлений дисперсной и непрерывной фаз.

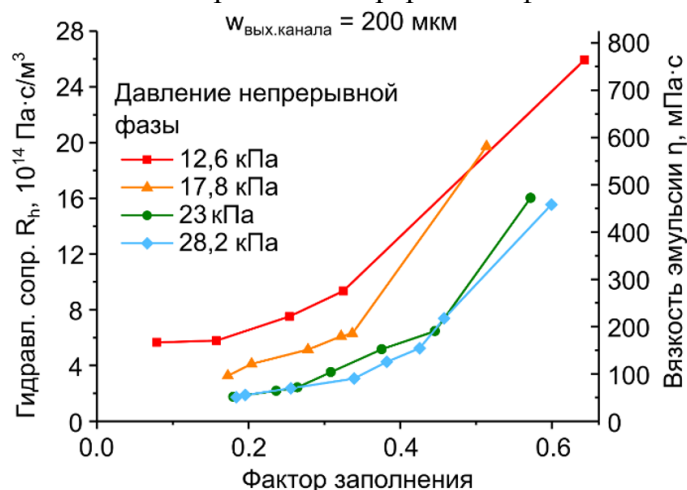


Рисунок 5 – Оценка гидравлического сопротивления и вязкости эмульсии в выходном канале шириной 200 мкм микрофлюидного устройства с фокусировкой потока в зависимости от фактора заполнения эмульсии.

В разделе 2.4 были исследованы режимы образования моодисперсных капле «вода-в-масле» в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока, течение жидкостей в котором было вызвано созданием отрицательного давления в выходном резервуаре, в то время как входные резервуары находились при атмосферном давлении (Рисунок 6). Для этого было предложено использовать встроенный в МФКД, мини-диафрагменный вакуумный насос (KVP8 PLUS-KJ-S, 24 V, 9 W, Kamoer Fluid Tech, China) и контролировать отрицательное давление с помощью: 1) электропневматического регулятора SMC ITV0090-2L, или 2) ручного клапана управления воздушным потоком RFU 482-1/8 (Camozzi, Italy). В обоих случаях была проанализирована стабильность образования капле, а также зависимость диаметра капле и частоты генерации от приложенного давления и гидравлических сопротивлений входных микроканалов. Дополнительно, получен патент на полезную модель [1].

Экспериментальная установка состояла из микрофлюидного чипа с фокусировкой потока с двумя входами со вставленными наконечниками лабораторных пипеток (200 мкл) с необходимыми реагентами (деионизованная вода и минеральное масло с ПАВ), одним выходным резервуаром для сбора, регулятором и вакуумным насосом (Рисунок 6). Экспериментальные данные показали, что с обоими типами регуляторов давления образование эмульсии вода-в-масле является стабильным в течение более 4 часов (Рисунок 7). Коэффициент вариации диаметра капле в обоих случаях составил не более 1,3%. Однако, регулятор ITV лучше подавлял колебания давления в выходном резервуаре, вызванные колебаниями мембраны насоса, что приводило к достижению немного большего диапазона диаметров капле и частот генерации.

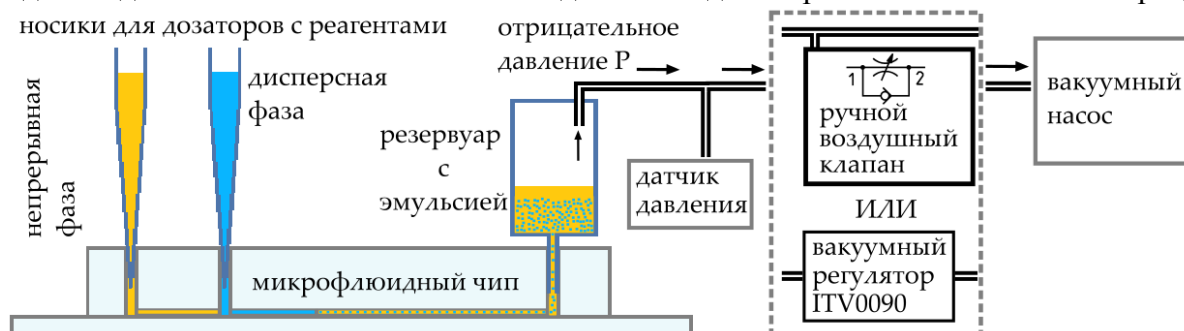


Рисунок 6 – Принципиальная схема установки генерации капле эмульсии «вода-в-масле» в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока за счет приложения отрицательного давления к выходному резервуару.

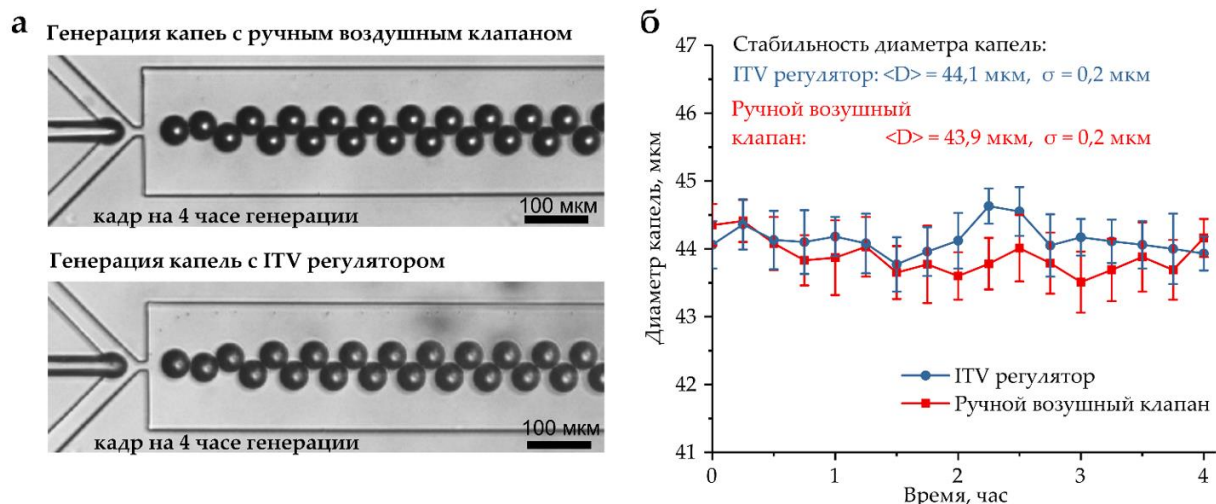


Рисунок 7 – Стабильность режимов генерации капель эмульсии «вода-в-масле» отрицательным давлением. (а) Изображения образования капель в микрофлюидном устройстве с использованием регулятора ITV и ручного клапана управления воздушным потоком; (б) диаметры капель в течении 4-часового испытания на стабильность. Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение. Каждое значение получено усреднением 10 измерений.

Исследование показало, что при уровнях отрицательного давления от -30 кПа до -80 кПа диаметр капель определяется соотношением между гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов. Это происходит 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 8а, б) [Cubaud T., Physics of Fluids, 2008]. Также показано, что при обоих способах регуляции потока 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 сопротивлений входных микроканалов.

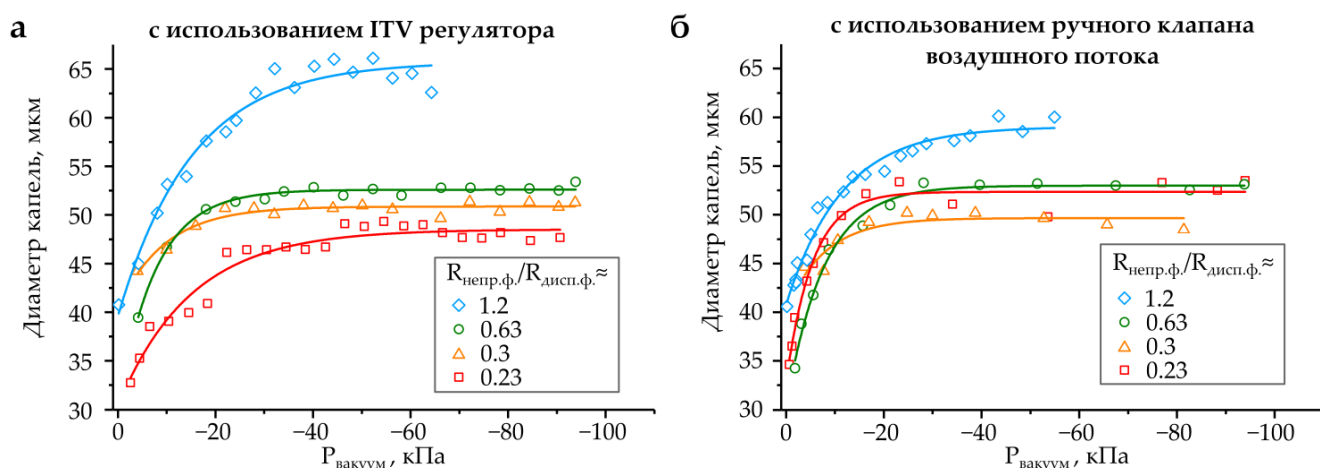


Рисунок 8 – Зависимости диаметров капель от отрицательных давлений в выходном резервуаре и различных гидравлических сопротивлениях входных каналов в установке с регулятором давления ITV (а) или с ручным клапаном управления потоком воздуха (б). Цветные линии – ориентиры для удобного восприятия данных.

Оба типа исследованных регуляторов давления подходят для образования микрокапель и дают сопоставимые результаты. Однако, электропневматический регулятор серии ITV предпочтительнее для более точного контроля давления с помощью внешнего электрического сигнала по сравнению с ручным клапаном управления воздушным потоком.

В разделе 2.5 приведены экспериментальные исследования усиления скорости перемешивания реагентов в микрокаплях «вода-в-масле» в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока, где входные микроканалы в месте образования капель имели симметричную или асимметричную конфигурацию (Рисунок 9). Экспериментальные данные сравнивались с результатами двумерного численного моделирования процесса образования капель, проведенного в программе Comsol Multiphysics, используя подход, аналогичный описанному в [Mamet V., et. al., Physics of Fluids, 2017] (предоставлены К.И. Белоусовым, ИТМО). В экспериментальных исследованиях в качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло (№ M8410, Merck), с добавлением 3,5% w/w ПАВ ABIL EM 180. Для измерения скорости жидкости методом визуализации потока жидкости particle image velocimetry (PIV) в дисперсную фазу (деионизованная вода) добавлялись индикаторные частицы размером 1 мкм (Polysciences Inc., 08226-15). Для изучения перемешивания малых молекул в одну из дисперсных фаз добавлялся краситель Coomassie Brilliant Blue G-250 (№ 1154440025, Merck). Эксперименты проводились в микрофлюидных устройствах ПДМС/стекло. Глубина микроканалов составляла 40 мкм и 60 мкм. Такие глубины соответствовали аспектному соотношению области образования капель 1:1 и 3:2 соответственно и позволили проверить, насколько сопоставимы результаты численного моделирования с экспериментом. Результаты показывают, что двумерное численное моделирование может предоставить полезную качественную информацию о двухфазных потоках и процессах генерации капель в квазидвумерных микрофлюидных устройствах.

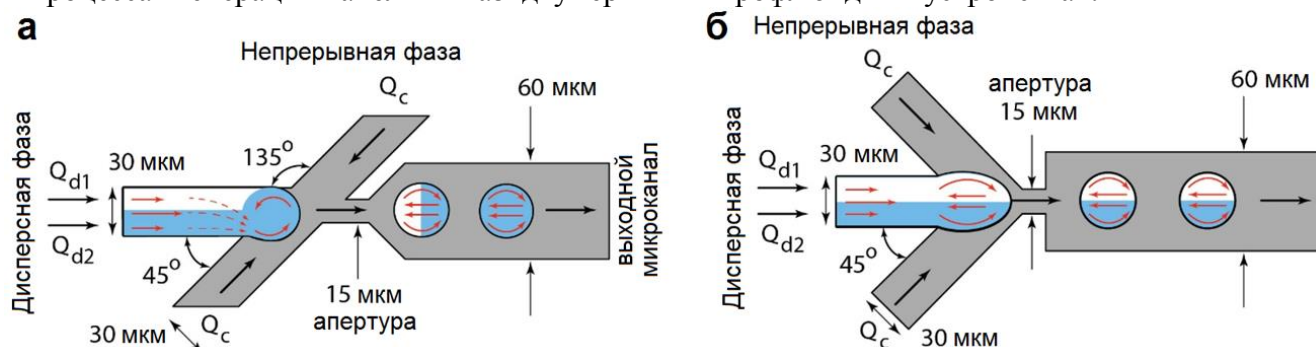


Рисунок 9 – Схема организации потоков жидкости в генераторах капель с фокусировкой потоков. (а) Асимметричная конструкция с боковыми каналами, расположенными под углом 45° и 135° к центральному каналу. (б) Симметричная конструкция с боковыми каналами, расположенными под углом 45° к центральному каналу.

Экспериментально было установлено, что использование асимметричной конструкции микроканалов приводит к формированию одиночного асимметричного рециркуляционного вихря в дисперсной фазе на стадии образования капель, который увеличивает скорость перемешивания. Обнаружено, что направление и структура вихря напрямую зависят от аспектного отношения области фокусировки потока (Рисунок 10 а-в). При соотношении 1:1 (глубина каналов 40 мкм) вихрь имеет преимущественно двумерную структуру, что хорошо согласуется с результатами моделирования. Если аспектное соотношение увеличить до 3:2 (глубина каналов 60 мкм), то граница раздела между непрерывной и дисперсной фазами меняет свое положение, что приводит к изменению направления потока, и структуры вихря, который становится преимущественно трехмерным. Чтобы определить, как изменения геометрии микроканалов и структуры потоков жидкости повлияют на параметры капель, были измерены их диаметр (Рисунок 10 г) и частота генерации при различных расходах дисперсной фазы Q_d , в то время как расход непрерывной фазы Q_c составлял 1 мкл/мин. 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 в симметричном и асимметричном генераторах были близки друг к другу и к результатам моделирования. Для аспектного соотношения 3:2 (глубина канала 60 мкм) диаметры капель и частоты генерации

сильно зависели от симметрии устройства, что приводило к увеличению диаметра капель до 30% и более высоким частотам генерации в симметричной геометрии.

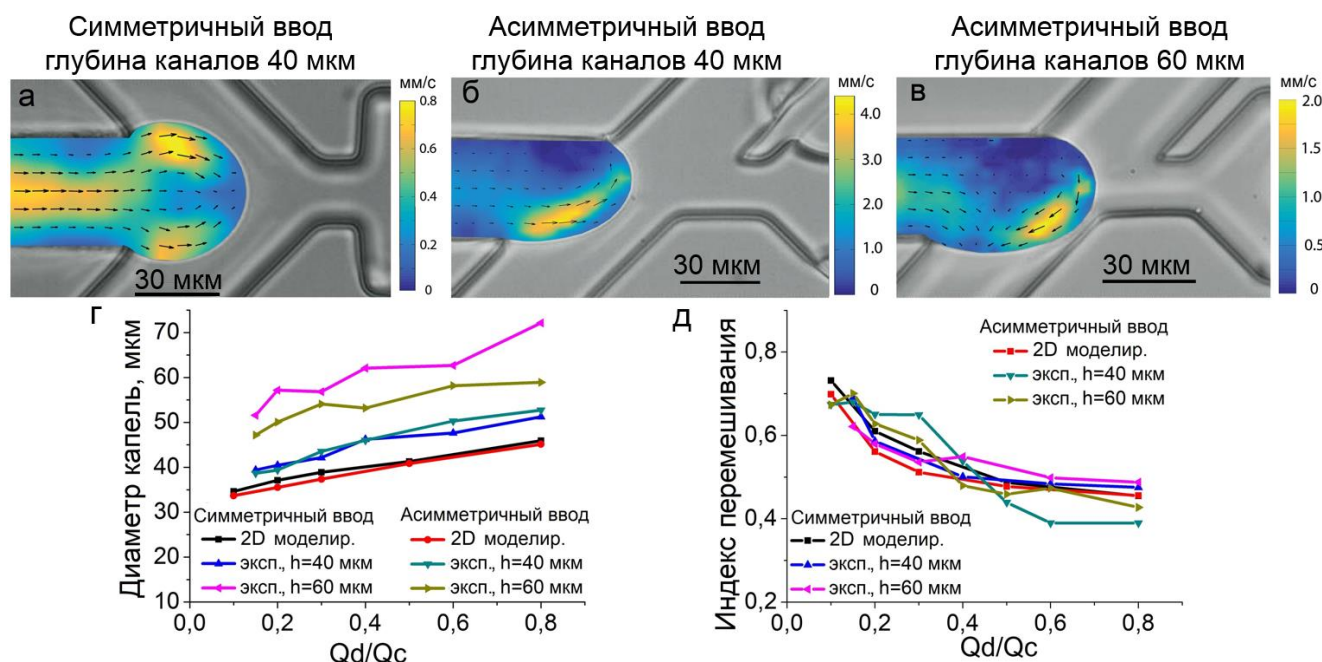


Рисунок 10 – Экспериментальная характеристика процесса образования капель. (а – в) PIV-измерения скорости течения дисперсной фазы на стадии образования капли в симметричном и асимметричных генераторах. (г) Диаметр капель при различных расходах дисперсной и непрерывной фаз. (д) Индекс перемешивания во вновь образованных каплях в различных микрофлюидных генераторах капель. Расходы дисперсной фазы Q_d и непрерывной фазы Q_c составляли (а – в) 0,2 мкл/мин и 1 мкл/мин, (г – д) $Q_c = 1$ мкл/мин.

Чтобы изучить увеличение скорости перемешивания, вызванного асимметричными вихрями в области образования капель, было проведено исследование распределения красителя в каплях во время их движения в выходном канале (Рисунок 11). Оно основано на измерениях интенсивности света внутри капель, соответствующей концентрации красителя, и включало в себя расчет индекса перемешивания (Рисунок 10 д) [N. Kockmann, Transport Phenomena in Microprocess Engineering, Springer, 2008] и коэффициента распределения красителя в верхней и нижней половинах капель. Эксперименты показали, что эффективность этого процесса зависит от исходного распределения реагентов сразу после образования капли (Рисунок 11), что хорошо соотносится с предыдущими исследованиями [Tice J.D. et. al., Langmuir, 2003]. Индекс перемешивания непосредственно после образования капли не зависел от конструкции генератора капель. Однако, было выяснено, что из-за различного начального распределения красителя, вызванного асимметричным вихревым движением, перемешивание реагентов в каплях в асимметричном устройстве в процессе их движения в выходном микроканале происходило до 6 раз быстрее, чем в обычном симметричном (Рисунок 11 г, д). Для эффективного перемешивания диаметр капли должен быть близок к области образования капель и отличаться не более, чем на 10% от оптимального значения (изменение объема ~ 30%). Чтобы преодолеть это ограничение, площадь области образования капель может быть масштабирована для достижения требуемых размеров капель, в то время как полный размер микрофлюидного устройства и расположение входных и выходных интерфейсов могут оставаться неизменными (Рисунок 11е).

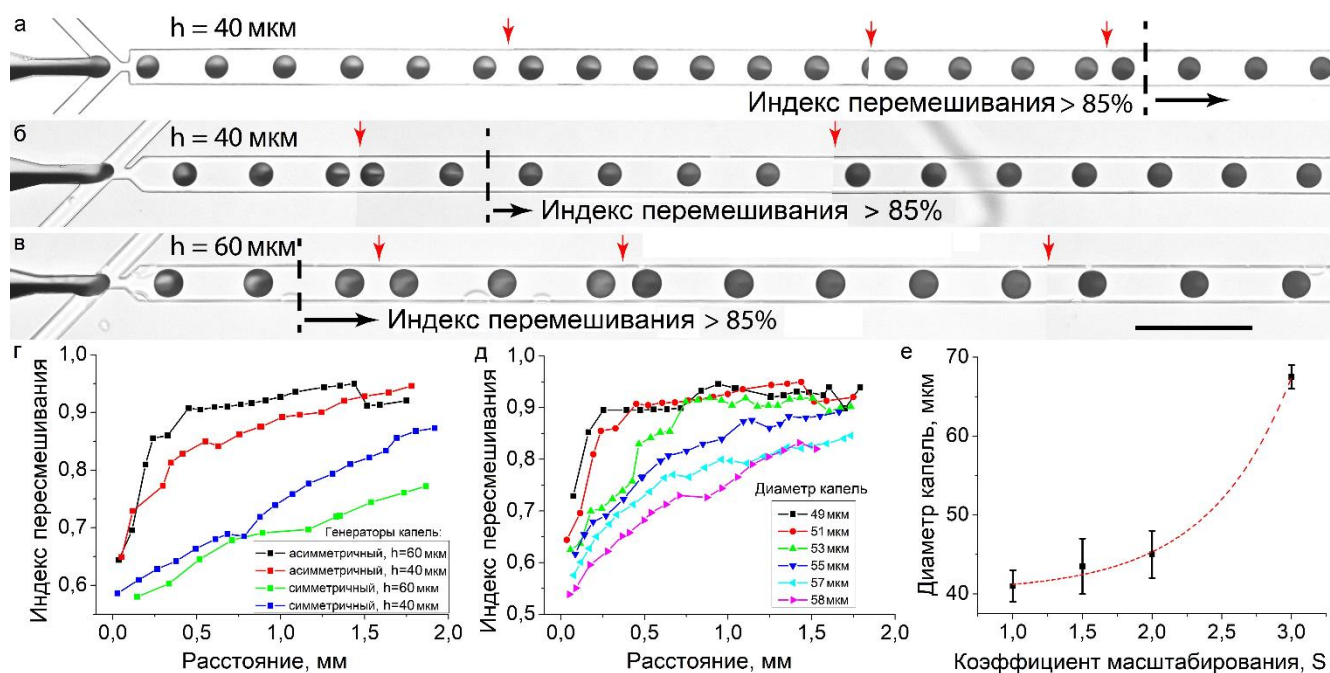


Рисунок 11 – Изменение распределения красителя во время течения капель в прямом выходном канале. Генерация капель и упаковка красителя в генераторах капель с фокусировкой потока с (а) симметричной геометрией и глубиной канала $h=40$ μm , (б) асимметричной геометрией и глубиной канала $h=40$ μm , (в) асимметричной геометрией и глубиной канала $h=60$ μm . (г) Изменение индекса перемешивания во время миграции капель в прямом выходном канале в различных генераторах капель ($Q_c=1$ $\mu\text{L}/\text{min}$, $Q_d=0,2$ $\mu\text{L}/\text{min}$). (д) Изменение показателя перемешивания внутри капель разного диаметра, сформированных в генераторе асимметричных капель с глубиной каналов $h=60$ μm . (е) Диапазон диаметров капель с эффективностью перемешивания $> 85\%$ после прохождения $0,6$ mm в выходном канале с различным масштабированием области образования капель S. Пунктирная линия является ориентиром для удобного просмотра. Масштаб (а – в) составляет 200 μm . Изображения (а – в) представляют собой сшитые изображения, снятые одно за другим в одном эксперименте, красные стрелки указывают на точки сшивки кадров.

В разделе 2.6 для апробации разработанной микрофлюидной платформы (МФКД в сочетании с микрофлюидными чипами) представлены результаты синтеза микрочастиц из гидрогелевых материалов: полиэтиленгликоль диакрилат (PEGDA), полиакриламид, альгинат натрия, желатин метакрилоил (GelMA) и агароза. Такие гидрогели были выбраны исходя из их биосовместимости, инертности и возможности реализовать технологию полимеризации гидрогеля в микрофлюидном чипе. Дополнительно эти гидрогели перспективны для применения в тканевой инженерии и 3D биопечати.

Для PEGDA микрочастиц экспериментально было установлено, что наилучшие результаты достигаются в чипах с апертурой 15 μm , шириной выходного канала 60 μm , которая затем увеличивается до 120 μm , и глубиной 40 μm , увеличивающейся до 120 μm . Было обнаружено, что во время отверждения УФ-излучением капли с фотоинициатором и PEGDA (при добавлении в масло $3,5\%$ ПАВ Abil EM 180) изменяют цвет, что использовалось для изучения времени полимеризации гидрогеля и построения качественной модели полимеризации микрочастиц. Также установлено, что чем выше концентрация PEGDA, тем быстрее происходит полимеризация. По результатам исследования определена оптимальная концентрация фотоинициатора, которая составила $\sim 1\%$. Дополнительно, проводилось изучение механических свойств синтезированных гидрогелевых PEGDA микрочастиц путем измерения модуля Юнга с помощью атомно-силового микроскопа Bruker Bioscope Catalyst методом измерения силовых кривых подвода/отвода в контактном режиме с зондом RTESPA (жесткость 42 N/m). Анализ силовых кривых проводился с помощью программного обеспечения NanoScope Analysis с

использованием модели Снеддона (Sneddon conical model). Для исследования зависимости модуля Юнга от концентрации PEGDA использовались растворы PEGDA в деионизированной воде с концентрацией 10-100% w/w с добавкой 1% w/w фотоинициатора. Полученные результаты показывают, что в зависимости от состава дисперсной фазы модуль Юнга изменяется в диапазоне от 5 до 83 МПа.

Аналогичные исследования были проведены для полиакриламидных гидрогелевых микрочастиц. При их формировании в микрофлюидном устройстве в качестве дисперсной фазы использовался водный раствор акриламида/бис-акриламида (Bio-Rad) в концентрации 5–30% v/v с добавлением 0,3% w/w водного раствора инициатора полимеризации пероксодисульфата аммония (Bio-Rad). В качестве непрерывной среды использовалось минеральное масло с добавлением 3,5% w/w ПАВ Abil EM 180 и 1% w/w катализатора полимеризации TEMED (Тетраметилэтилендиамин N,N,N',N'). Диапазон диаметров получаемых капель макроэмульсии составлял 15–80 мкм с дисперсией не более 5% независимо от состава дисперсной фазы в чипах с апертурой 15 мкм. Исследования показали, что модуль Юнга полиакриламидных микрочастиц зависит от исходной концентрации мономеров в дисперсной фазе и составляет от 2 до 7 кПа.

Дополнительно в подразделе 2.6.3 представлены результаты исследования скорости диффузионного выхода малых молекул из полиакриламидных и PEGDA микрочастиц на примере модельного флуоресцентного красителя Rhodamine B (№ 83689, Merck) в концентрации 0,1 мг/мл для анализа применимости таких микрочастиц в качестве контейнеров для доставки лекарств.

В подразделах 2.6.4 и 2.6.5 показано применение разработанной микрофлюидной платформы на основе МФКД (в том числе метода генерации микрокапель эмульсии «вода-в-масле» отрицательным давлением) для синтеза гидрогелевых микрочастиц из альгината натрия, GelMA и агарозы в диапазонах диаметров 30-200 мкм. Дополнительно проводились исследования культивирования клеток внутри и на поверхности гидрогелевых микрочастиц.

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% CO₂ 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.

Публикации автора по теме диссертации

Основные научные результаты опубликованы в 24 печатных трудах. Далее приведены 11 ключевых работ:

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. Ноздрюхин; 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.