

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-114

**ГЕНЕРАЦИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ КАПЕЛЬ ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ ДАВЛЕНИЕМ  
ДЛЯ СИНТЕЗА АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОГЕЛЕЙ С КЛЕТКАМИ \*****NEGATIVE PRESSURE GENERATION OF MICROFLUIDIC DROPLETS FOR FORMATION  
OF CELL-LADEN ALGINATE MICROGELS**П. С. Плешаков<sup>1</sup>, Н. А. Филатов<sup>1</sup>, С. В. Шмаков<sup>1</sup>, А. С. Букатин<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Санкт-Петербургский Академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН*<sup>2</sup>*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*P. S. Pleshakov<sup>1</sup>, N. A. Filatov<sup>1</sup>, S. V. Shmakov<sup>1</sup>, A. S. Bukatin<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Alferov Saint Petersburg National Research Academic University RAS*<sup>2</sup>*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg*

✉ avekipp@gmail.com

**Аннотация**

Разработана простая и надежная микрофлюидная система для получения альгинатных микрогелей со сложной структурой и живыми клетками под действием отрицательного давления. Метод обеспечивает высокую воспроизводимость, контроль размера (80–120 мкм) и жизнеспособность клеток более 80 %, что перспективно для использования в регенеративной медицине и модели 3D клеточной культуры для тестирования лекарств.

**Abstract**

A simple and reliable microfluidic system has been developed for producing alginate microgels with a complex structure and living cells under negative pressure. The method provides high reproducibility, size control (80–120 μm) and cell viability of more than 80 %, which is promising for use in regenerative medicine and 3D cell culture models for drug testing.

3D-культуры клеток, включая клеточные сфероиды и органоиды, являются отличным инструментом в современных биомедицинских исследованиях благодаря их способности более точно имитировать условия *in vivo* [1–3]. Гидрогели являются наиболее часто используемыми материалами для создания 3D-культур клеток, искусственных тканей и органоидов. Благодаря сходству с нативным внеклеточным матриксом, клетки, загруженные в гидрогель, пролиферируют с его замещением собственным внеклеточным матриксом [4]. Одним из недостатков объемных гидрогелевых структур является ограничение диффузии питательных веществ и кислорода к клеткам и отсутствие удаления токсичных продуктов метаболизма [5]. Для преодоления предела диффузии в последнее десятилетие все больше внимания уделяется гидрогелевым микрочастицам (микрогелям), размер которых обычно не превышает 300 мкм. Такие микрогели воспроизводят внеклеточную среду так же хорошо, как и стандартные гидрогели, при этом скорость диффузии достаточна для длительного культивирования клеток благодаря максимальному пределу диффузии кислорода 200 мкм [6]. Поэтому микрогели находят многочисленные применения в фундаментальных исследованиях клеток в трехмерной среде [7], а также в регенеративной медицине для доставки лекарств и клеточной терапии поврежденных и больных тканей [8, 9].

В настоящее время существует довольно много методов получения микрогелей. Среди них одним из наиболее перспективных методов получения микрогелей является эмульгирование водных растворов прекурсоров гидрогелей в несмешивающемся масле в генераторе микрофлюидных капель [10]. После генерации раствор гидрогеля сшивается внутри капель «вода-в-масле», превращая их в сферические гидрогелевые микрочастицы.

Главным преимуществом такого подхода является идеальный контроль размера и структуры микрогелей в диапазоне от 30 до 300 мкм с относительно низким распределением по размерам и высокой производительностью.

Однако для стабильного получения микрогелей со сложной внутренней структурой и живыми клетками требуется точная регулировка всех потоков жидкости и поддержание их постоянной скорости на протяжении всего процесса. Поэтому установка, обычно основанная на прецизионных шприцевых насосах или регулято-

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10117).

© П. С. Плешаков, Н. А. Филатов, С. В. Шмаков, А. С. Букатин, 2025

рах давления, становится громоздкой и дорогой, требуя высококвалифицированного специалиста в области микрофлюидики [11]. Это является серьезным препятствием для расширения области применения микрогелей для создания трехмерных клеточных культур, тканевой инженерии и биопечати в исследовательских и клинических целях.

В данном исследовании был использован трехэтапный экспериментальный подход для разработки генераторов капель с фокусировкой микрофлюидного потока, в которых жидкости вводятся под действием отрицательного давления в выходной резервуар для получения микрогелей со структурой «ядро — оболочка» и «янус» с живыми клетками. Такие микрофлюидные чипы требуют простой экспериментальной установки, просты в эксплуатации, надежны и дают воспроизводимые результаты. Это происходит потому, что размер и структура генерируемых частиц определяются конструкцией микроканалов, в то время как единственный управляющий параметр — давление в выходном резервуаре — задает частоту генерации микрогелей. Чтобы продемонстрировать широкий спектр применения нашего подхода, были получены альгинатные микрогели со структурой «ядро — оболочка» и «янус» размером от 80 до 120 мкм с инкапсулированными клетками аденокарциномы толстого кишечника мыши CT26 и гепатомы печени HepG2 со скоростью генерации до 200 мкл/ч и жизнеспособностью клеток более 80 % в течение 12–15 дней культивирования. Эти результаты открывают новые перспективы для автоматизации и масштабирования синтеза гидрогелевых микрогелей для применения в тканевой инженерии и 3D-биопечати.

### Литература

1. Pampaloni F., Reynaud E. G., Stelzer E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. Vol. 8, No. 10. P. 839–845.
2. Zhao Z. et al. Organoids // *Nature Reviews Methods Primers*. 2022. Vol. 2, No. 1. P. 94.
3. Kim J., Koo B. K., Knoblich J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 21, No. 10. P. 571–584.
4. Geckil H. et al. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics // *Nanomedicine*. 2010. Vol. 5, No. 3. P. 469–484.
5. Drury J. L., Mooney D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications // *Biomaterials*. 2003. Vol. 24, No. 24. P. 4337–4351.
6. Jiang W. et al. Cell-laden microfluidic microgels for tissue regeneration // *Lab on a Chip*. 2016. Vol. 16, No. 23. P. 4482–4506.
7. Caldwell A. S., Aguado B. A., Anseth K. S. Designing microgels for cell culture and controlled assembly of tissue microenvironments // *Advanced Functional Materials*. 2020. Vol. 30, No. 37. P. 1907670.
8. An C. et al. Continuous microfluidic encapsulation of single mesenchymal stem cells using alginate microgels as injectable fillers for bone regeneration // *Acta Biomaterialia*. 2020. Vol. 111. P. 181–196.
9. Headen D. M., García J. R., García A. J. Parallel droplet microfluidics for high throughput cell encapsulation and synthetic microgel generation // *Microsystems & Nanoengineering*. 2018. Vol. 4, No. 1. P. 1–9.
10. Tumarkin E., Kumacheva E. Microfluidic generation of microgels from synthetic and natural polymers // *Chemical Society Reviews*. 2009. Vol. 38, No. 8. P. 2161–2168.
11. Zeng W., Li S., Wang Z. Characterization of syringe-pump-driven versus pressure-driven microfluidic flows // *2015 International Conference on Fluid Power and Mechatronics (FPM)*. IEEE, 2015. P. 711–715.