

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. Плешаков¹, Н. А. Филатов¹, С. В. Шмаков¹, А. С. Букатин^{1,2}

¹*Санкт-Петербургский Академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН*

²*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

P. S. Pleshakov¹, N. A. Filatov¹, S. V. Shmakov¹, A. S. Bukatin^{1,2}

¹*Alferov Saint Petersburg National Research Academic University RAS*

²*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.