ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИТМО»

На правах рукописи



Арабули Константин Вахтангович

Разработка микрофлюидных устройств на основе конструктивно заданной пространственно-временной организации взаимодействия

Специальность: 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель

Зюзин Михаил Валерьевич – доктор физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. Основы микрофлюидных технологий: дизайн, разработка и биомедицинское применение 13
1.1 Теоретические основы микрофлюидных технологий 13
1.1.1 Физические основы. Уравнение Навье-Стокса. 13
1.1.2 Безразмерные числа и их значение для микрофлюидных устройств 17
1.1.3 Закон Фика и механизмы смешивания в микрофлюидном устройстве . 24
1.1.4 Режимы течения в микрофлюидных устройствах 29
1.2 Материалы и методы фабрикации микрофлюидных устройств 31
1.2.1 Традиционные методы фабрикации 32
1.2.2 Аддитивные технологии в проектировании и создании микрофлюидных устройств 35
1.3 Наночастицы карбоната кальция как системы доставки активных биомолекул 36
1.3.1 Структура и свойства $CaCO_3$ 37
1.3.2 Методы синтеза наночастиц $CaCO_3$ 39
1.3.3 Карбонат кальция как система доставки 41
1.4 CAR-T терапия 43
1.4.1 Основы иммунотерапии с использованием CAR-T клеток 43
1.4.2 Производство CAR-T клеток 47
1.5 Перовскитные структуры для биосенсорных применений 49
1.5.1 Свинцово-галогенидные перовскиты $CsPbX_3$. Кристаллическая структура и оптические свойства 49
1.5.2 Сенсоры влажности на основе перовскитов 51
1.5.3 Неинвазивная диагностика. Биомедицинское применение 53
1.6 Единые физические принципы проектирования МФУ для задач синтеза, клеточной инженерии и оптической сенсорики 55
1.6.1 Характерные пространственные и временные масштабы процессов 55
1.6.2 Функциональное зонирование микрофлюидных устройств 59
ГЛАВА 2. Экспериментальная методология: методы, фабрикация и характеризация 63

2.1 Материалы 65
2.1.1 Материалы для синтеза $CaCO_3$ 65
2.1.2 Материалы для создания CAR-T клеточного продукта 66
2.1.3 Материалы для синтеза гибридной структуры $CsPbBr_3@CaCO_3$ 66
2.2 Фабрикация микрофлюидного устройства 67
2.2.1 Создание модели микрофлюидного устройства 67
2.2.2 «Мягкая» литография 67
2.3 Описание экспериментального стенда 68
2.3.1 Микрофлюидное устройство для синтеза и функционализации $CaCO_3$ 68
2.3.2 Микрофлюидное устройство для производства CAR-T клеток 70
2.3.3 Камера сенсора влажности 71
2.4 Расчетные параметры и физические режимы работы микрофлюидных устройств 73
2.4.1 Конфигурация A. Устройство для синтеза наноразмерных частиц $CaCO_3$ 74
2.4.2 Конфигурация B. Устройство модификации CAR-T клеток 77
2.4.3 Конфигурация C. 3D-печатная камера оптического сенсора влажности 79
2.5 Физико-химическая характеризация 81
2.5.1 Структурная характеризация (СЭМ, ПЭМ) 81
2.5.2 Термогравиметрический анализ $CaCO_3$ (ТГА, ДСК) 81
2.5.3 Рентгеновская дифракция (РД) 82
2.5.4 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия $CsPbBr_3@CaCO_3$ (РФС) 82
2.5.5 Инкапсуляция активных биомолекул в частицы $CaCO_3$ 82
2.6 Измерение флуоресцентного отклика и квантового выхода фотолюминесценции структур $CsPbBr_3@CaCO_3$ 83
2.6.1 Измерение флуоресцентного отклика на относительную влажность (ОВ) 83
2.6.2 Измерение квантового выхода фотолюминесценции (КВФЛ) 84
2.7 Оптическая характеризация 84
2.7.1 Оценка эффективности инкапсуляции в частицы $CaCO_3$ 84
2.8 Биологическая валидация 86
2.8.1 Гель-электрофорез 86

2.8.2 Жизнеспособность 87
2.8.3 Проточная цитометрия 88
2.8.4 Интернализация 88
2.8.5 Функциональность 89
ГЛАВА 3. Разработка микрофлюидного подхода для синтеза и загрузки наночастиц карбоната кальция активными биомолекулами 93
3.1 Микрофлюидный синтез и характеристика наночастиц $CaCO_3$ 94
3.2 Варьирование времени реакции (α-реакции) 98
3.3 Варьирование концентраций реагентов (β -реакции) 101
3.4 Варьирование расходов реагентов (γ - реакции) 103
3.5 Структурная характеризация синтезированных частиц 106
3.6 Функционализация поверхности синтезируемых частиц активными биомолекулами 110
3.7 In vitro исследования 113
ГЛАВА 4. Микрофлюидное устройство для реализации сверхбыстрого протокола производства CAR-T клеточного продукта 118
4.1 Оценка влияния геометрических параметров микрофлюидного устройства на жизнеспособность и эффективность трансдукции 119
4.2 Иммунофенотипирование Т-клеток после трансдукции в МФУ 121
4.3 Сверхбыстрый протокол: результаты одномоментной активации и трансдукции Т-клеток в МФ 123
4.4 Сравнение фенотипа CAR-T продукта, полученного с помощью сверхбыстрого, быстрого и стандартного протоколов 125
ГЛАВА 5. Быстродействующий оптический датчик влажности на основе $CsPbBr_3@CaCO_3$ 130
5.1 Синтез и структурно-морфологическая характеристика $CsPbBr_3@CaCO_3$ 131
5.2 Флуоресцентный отклик $CsPbBr_3@CaCO_3$ на изменение относительной влажности (ОВ) 135
5.3 Механизм флуоресцентного отклика и деградации материала под воздействием влажности 139
5.4 Сенсорное применение $CsPbBr_3@CaCO_3$ 142
Заключение 145
Список сокращений и условных обозначений 149

Список литературы 150

ВВЕДЕНИЕ

Микрофлюидные технологии являются перспективным направлением исследований в области прикладных биомедицинских задач для моделирования сложных биологических систем и их поведения [1], увеличения эффективности разработки клеточных терапевтических продуктов [2], создания новых и усовершенствования существующих протоколов синтеза носителей лекарственных препаратов [3]. Микрофлюидика, как наука, изучающая поведение жидкостей в микромасштабе, характеризуется ламинарными потоками и низкими диффузионными расстояниями. Она позволяет точно контролировать кинетику реакций, создавать градиенты концентраций и имитировать физические условия *in vitro* с помощью моделирования принципов функционирования окружающей среды исследуемых биологических систем. Первые исследования в области микрофлюидики начались в 1980-х годах в рамках развития микротехнологий, однако распространение и развитие эта область получила лишь в 2000-х годах благодаря успехам в биологии, химии и материаловедении. По данным обзоров последних лет, использование микрофлюидных технологий позволяет сократить расход реагентов в химических реакциях внутри устройства до 90% [4] и ускорять биологические реакции, такие как секреция цитокинов, хемотаксис, иммунохимические реакции и реакции трансдукции и трансфекции в 10–100 раз ввиду уменьшения диффузионных расстояний и высокой площади поверхности, которая зависит от геометрии рассматриваемого устройства [5].

В отличие от объемных экспериментальных систем, в микрофлюидном устройстве геометрия непосредственно задает пространственное распределение рабочих сред, характерные расстояния между взаимодействующими объектами, рабочий объем, последовательность функциональных стадий и продолжительность взаимодействия. Поэтому геометрические параметры микрофлюидного устройства выступают не только конструктивными характеристиками, но и средствами формирования условий эксперимента.

Использование аддитивных технологии, таких как 3D-печать, обеспечивает возможность быстрого прототипирования и создания сложных трехмерных микрофлюидных устройств с заданными геометрическими параметрами. Благодаря использованию 3D-печати время от идеи и концепта до готового продукта занимает не более нескольких часов, обеспечивая масштабируемость и возможность персонализации устройства под конкретные биологические задачи. Использование аддитивных подходов позволяет комбинировать существующие методики фабрикации микрофлюидных устройств из полидиметилсилоксана с функциональными частями, в которые интегрированы сенсоры разного типа [6, 7], созданными с использованием 3D-печати. Причем парадигма использования аддитивных технологий может быть различна: они могут являться как дополнением к самому процессу фабрикации, так и совмещать в себе функции микрофлюидного устройства со сложной и многоуровневой геометрией. Объединение методов мягкой литографии и аддитивного изготовления позволяет формировать функциональные области микрофлюидных устройств с различной геометрией и интегрировать в них элементы транспортирования, взаимодействия и регистрации, что расширяет возможности создания экспериментальных устройств различного функционального назначения.

В настоящей работе под конструктивно заданной пространственно-временной организацией взаимодействия понимается способ построения микрофлюидного устройства, при котором его геометрией и режимом эксплуатации задаются последовательность функциональных зон, характерные размеры каналов и камер, взаимное расположение реагентов, клеток и функциональных материалов, характерное расстояние между взаимодействующими объектами и время пребывания, контакта или инкубации.

Таким образом, речь идет не об изменении внутренних физико-химических характеристик взаимодействующих объектов, а о конструктивном формировании граничных условий, характерных расстояний и продолжительности процесса. Геометрия устройства определяет, где происходит взаимодействие, в какой

последовательности реализуются его стадии и в течение какого времени рабочая среда находится в соответствующей функциональной зоне.

Такой подход позволяет рассматривать микрофлюидное устройство как экспериментальный прибор, объединяющий функции транспортирования, локализации, преобразования и, при необходимости, регистрации. Для проточных систем пространственно-временная организация определяется топологией каналов, расходами потоков и временем пребывания. Для инкубационных систем основными параметрами являются высота и площадь камеры, рабочий объем и продолжительность контакта. Для сенсорных систем к указанным параметрам добавляются размещение чувствительного элемента, организация подвода анализируемой среды и геометрическое сопряжение с оптической схемой регистрации.

Цель работы заключалась в разработке и экспериментальном обосновании подхода к созданию микрофлюидных устройств на основе конструктивно заданной пространственно-временной организации взаимодействия и его реализации в устройствах для проточного синтеза, трансдукции Т-лимфоцитов и регистрации относительной влажности газовой среды.

Для достижения данной цели в рамках диссертации были поставлены и решены следующие задачи:

Задача 1. Разработать и экспериментально обосновать подход к проектированию микрофлюидных устройств, основанный на конструктивном формировании последовательных функциональных зон и задании пространственных и временных параметров взаимодействия рабочих сред с функциональными элементами устройства и его адаптации к конкретному процессу.

Задача 2. Разработать микрофлюидное устройство с последовательно расположенными зонами смешивания реагентов, формирования частиц, ограничения их роста и загрузки функциональными соединениями; установить влияние расходов потоков, концентраций реагентов в реакционной зоне на размер

и морфологию частиц $CaCO_3$ и реализовать их загрузку низкомолекулярными соединениями, белками и плазмидной ДНК.

Задача 3. Разработать микрофлюидное устройство с конструктивно заданными высотой канала, площадью и рабочим объемом; установить влияние геометрических параметров устройства, продолжительности инкубации и количества лентивирусных частиц на жизнеспособность, эффективность трансдукции и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов и реализовать одноэтапную активацию и трансдукцию клеток в течение 24 ч.

Задача 4. Разработать микрофлюидную оптическую систему определения относительной влажности, включающую 3D-печатную газовую кювету, чувствительный элемент на основе $CsPbBr_3@CaCO_3$; исследовать механизм изменения фотолюминесценции чувствительного материала и определить рабочий диапазон, чувствительность, время отклика и время восстановления.

Научная новизна диссертации отражена в следующих пунктах:

1) Предложен и экспериментально апробирован подход к созданию микрофлюидных устройств различного функционального назначения, основанный на выборе геометрических параметров функциональных зон с учетом характерных пространственных и временных масштабов реализуемых процессов и конструктивном задании последовательности зон, характерных расстояний взаимодействия, рабочих объемов и продолжительности процессов. Возможность применения подхода показана для проточного синтеза, статической клеточной инкубации и оптической регистрации параметров газовой среды.

2) Разработано микрофлюидное устройство для синтеза и функционализации $CaCO_3$ с последовательным пространственным разделением зон смешивания прекурсоров, формирования частиц и введения стабилизирующего или функционализирующего компонента. Такая организация позволяет конструктивно задавать последовательность стадий соосаждения, время пребывания реагентов в реакционной области и момент ограничения дальнейшего роста частиц. В одном устройстве реализованы получение частиц $CaCO_3$ размером 66±15 нм в рамках 5-минутного цикла и их загрузка DOX, Cy5-BSA, FITC-BSA и pDNA-GFP, включая

совместную двойную загрузку FITC-BSA и Cy5-BSA.

3) Разработано микрофлюидное инкубационное устройство, обеспечивающее одновременную активацию и лентивирусную трансдукцию Т-лимфоцитов в течение 24 ч за счет конструктивного ограничения пространства взаимодействия клеток, активирующих частиц и лентивирусного вектора. Экспериментальное варьирование геометрии позволило выбрать конфигурацию с высотой инкубационной области 150 мкм и площадью 10 $см^2$.

4) Разработана микрофлюидная оптическая система определения относительной влажности, в которой 3D-печатная газовая кювета обеспечивает пространственную интеграцию чувствительного элемента $CsPbBr_3@CaCO_3$ с элементами возбуждения и регистрации фотолюминесцентного сигнала. Установлено, что изменение фотолюминесценции $CsPbBr_3@CaCO_3$ при воздействии влажной среды связано с фазовым превращением $CsPbBr_3 \rightarrow CsPb_2Br_5$ внутри пористой матрицы $CaCO_3$. На основе выявленного механизма реализована обратимая регистрация относительной влажности в диапазоне 15–60% ОВ с временем отклика менее 4 с и временем восстановления менее 2 с.

В качестве итоговых результатов работы на защиту выносятся следующие положения:

1) В микрофлюидном устройстве с последовательно расположенными зонами смешивания растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3, формирования частиц и введения декстрансульфата определен режим ламинарного течения с $Re_h = 0.1 - 2.3$ и конвективно-доминантным продольным массопереносом $Pe_h = 1.8 \times 10^4 - 3 \times 10^5$, при котором концентрации реагентов 0.06 и 0.05 М, расходы потоков 0.4/0.4/4 мл/мин обеспечивают получение сферических частиц $CaCO_3$ размером 66±15 нм при общей продолжительности цикла синтеза и последующей загрузки функциональных соединений в одном устройстве, равной 5 мин. Полученные частицы могут быть предназначены для использования в качестве наноразмерных носителей функциональных соединений, включая лекарственные вещества, белки и генетический материал.

2) Конфигурация микрофлюидного инкубационного устройства с

высотой канала 150 мкм, площадью инкубационной зоны 10 $см^2$ и при объеме загружаемой клеточной суспензии 110 мкл обеспечивает одновременную активацию и лентивирусную трансдукцию 1.8×10^6 Т-лимфоцитов в течение 24 ч. При MOI = 3 эффективность трансдукции, определенная методом проточной цитометрии на 7-е сутки, составляет 27±8% против 17±8% в 48-луночном планшете с тем же рабочим объемом и 8±6% в 6-луночном планшете. Сокращение продолжительности ex vivo-протокола до 24 ч обеспечивает сохранение $CD3^+$ клеток с наивно-подобным фенотипом на уровне 25.1±16.5% против 3.3±2.5% при стандартном 9-дневном протоколе. Разработанное микрофлюидное устройство и реализованный на его основе 24-часовой протокол могут быть использованы как экспериментальная платформа для сокращенного получения CAR-T-клеточного продукта.

3) Разработанная проточная микрофлюидная измерительная система, включающая 3D-печатную газовую кювету с размещенной в ней подложкой $CsPbBr_3@CaCO_3$, светодиодный источник возбуждения с длиной волны 395 нм, длинноволновый оптический фильтр с границей пропускания 500 нм и фотодиод, обеспечивает непрерывное измерение относительной влажности газового потока. В диапазоне 15–60% ОВ система характеризуется временем отклика менее 4 с, временем восстановления менее 2 с и чувствительностью 5.93 мВ/% ОВ при ОВ ниже 30% и 0.78 мВ/% ОВ в диапазоне 30–60% ОВ. Разработанная микрофлюидная оптическая система может быть использована как экспериментальная платформа для быстродействующего мониторинга относительной влажности газовых сред в диапазоне 15–60% ОВ.

На основе материалов диссертации было опубликовано 4 статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК, WoS, Scopus и 5 тезисов.

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

1. XVII Raisa Gorbacheva Memorial Meeting Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Gene and Cellular Therapy, Санкт-Петербург, 14–16 сентября, 2023
2. АналитБиоПрибор-2023, Санкт-Петербург, 23 ноября, 2023

3. Клеточные технологии в онкогематологии, Санкт-Петербург, 30 ноября, 2023
4. XVIII Raisa Gorbacheva Memorial Meeting Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Gene and Cellular Therapy, Санкт-Петербург, 19–21 сентября, 2024
5. The 51st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation –EBMT 2025, 30 марта – 2 апреля, 2025

Личный вклад автора состоит в формулировании подхода к разработке микрофлюидных устройств на основе конструктивно заданной пространственно-временной организации взаимодействия и в его экспериментальной реализации в трех разработанных приборных конфигурациях: устройство микрофлюидного синтеза наноразмерного карбоната кальция с возможностью загрузки функциональных соединений, микрофлюидное устройство для одномоментной активации и трансдукции Т-лимфоцитов, микрофлюидная проточная измерительная система для анализа относительной влажности газовой среды. Автор также участвовал в проведении и интерпретации данных сканирующей и просвечивающей микроскопии, термогравиметрического анализа, проточной цитометрии, большая часть *in vitro* экспериментов была также выполнена автором, в числе которых оценка эффективности трансфекции, цитотоксичности и интернализации. Проведение оптических экспериментов и обработка соответствующих данных выполнена совместно с соавторами. Автор активно участвовал в подготовке текстов научных статей, основанных на полученных результатах, и лично представлял данные исследования в виде устных докладов на научных конференциях.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 164 страницы. В диссертацию включено: 31 рисунок, 5 таблиц, 116 ссылок на литературные источники.

ГЛАВА 1. Основы микрофлюидных технологий: дизайн, разработка и биомедицинское применение

1.1 Теоретические основы микрофлюидных технологий

1.1.1 Физические основы. Уравнение Навье-Стокса.

Микрофлюидное устройство – это устройство, в котором осуществляется управление малыми объемами жидкости в каналах размером от 10 до 100 мкм [8]. Течение в таких каналах практически всегда ламинарное, а перенос массы происходит преимущественно за счет диффузии [9]. Микрофлюидика представляет собой междисциплинарную науку, объединяющую физику, гидродинамику, биологию, химию и инженерию [10], что обуславливает необходимость синергетического подхода при разработке микрофлюидных устройств с учетом тепло- и массообмена, специфики химических взаимодействий и кинетики реакций в микромасштабе.

Математическое описание гидродинамических процессов в микрофлюидных устройствах базируется на уравнениях Навье-Стокса, которые представляют собой непрерывную форму второго закона Ньютона ($F = ma$) применительно к движению жидкостей. В микромасштабных системах эти уравнения приобретают специфический вид, обусловленный доминированием вязких сил над инерционными, что существенно упрощает анализ течений. Полная система уравнений Навье-Стокса для несжимаемой вязкой жидкости записывается в следующем виде:

$$\rho\left(\frac{\partial u}{\partial t} + u \cdot \nabla u\right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 u + f \qquad (1)$$

где:

u – поле скорости жидкости (м/с),

ρ – плотность жидкости (кг/м³),

p – давление (Па),

η – динамическая вязкость (Па·с),

f – плотность объемных сил (Н/м³),

t – время (с).

Это уравнение дополняется уравнением неразрывности. Оно устанавливает, что масса жидкости может только перемещаться и изменять свою плотность:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho u) = 0 \qquad (2)$$

где:

$\partial \rho / \partial t$ – локальное изменение плотности со временем (нестационарный член),

$\nabla \cdot (\rho u)$ – дивергенция потока массы.

С физической точки зрения, если в точке происходит расширение жидкости, т. е. наблюдается отток массы жидкости ($\nabla \cdot (\rho u) > 0$), то локальная плотность с течением времени должна уменьшаться $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ <0. В микрофлюидных системах жидкости чаще всего практически несжимаемы, то есть плотность остается постоянной во всем пространстве и времени, при этом условии уравнение неразрывности упрощается, вынося постоянную плотность из дифференциальных операторов: $\nabla \cdot u = 0$

Это условие ведет к следующим интерпретациям:

1) сохранение объема: любой малый объем сохраняет постоянство объема при его движении.

2) локальный баланс потока: количество жидкости, втекающее в малый элемент (например, канал), равно количеству жидкости, вытекающему из него.

3) в несжимаемой жидкости не может быть локальных источников или стоков массы.

Левая часть уравнения Навье-Стокса описывает изменение импульса жидкости на единицу объема:

$\partial u/\partial t$ – неустановившийся член (изменение скорости со временем),

$u \cdot \nabla u$ – конвективный (нелинейный) член, описывающий ускорение жидкости при ее движении в пространстве.

Правая часть содержит силы, действующие на жидкость:

$-\nabla p$ – градиент давления, создающий объемную силу давления;

$\eta \nabla^2 u$ – вязкая сила, обусловленная сдвиговыми напряжениями (внутренним трением жидкости);

f – внешние объемные силы (гравитация, электромагнитные силы и т. п.).

Ключевым отличием микрофлюидных систем является масштабирование инерционных и вязких сил с характерным размером системы L_0. Для микрофлюидных каналов характерно наличие двух пространственных масштабов: поперечного размера сечения $L_\perp$ и продольной длины рассматриваемого участка $L_\parallel$. В прямоугольном канале в качестве поперечного характерного размера необходимо использовать гидравлический диаметр:

$$D_h = \frac{2\omega h}{\omega + h} \tag{3}$$

где: ω и h – ширина и глубина канала соответственно. Для рассматриваемых микрофлюидных устройств поперечный размер имеет порядок десятков-сотен микрометров, тогда как продольная длина отдельных функциональных участков составляет миллиметры или сантиметры. Поэтому выбор характерного размера должен соответствовать рассматриваемого физическому процессу.

Инерционная сила масштабируется как:

$$f_{\text{ин}} \sim \rho U_0 \frac{U_0}{L_0} = \frac{\rho {U_0}^2}{L_0} \tag{4}$$

В свою очередь, вязкая сила масштабируется как:

$$f_{\text{вяз}} \sim \eta \frac{U_0}{{L_0}^2} \tag{5}$$

Отношение этих сил определяется числом Рейнольдса:

$$Re = \frac{f_{\text{ин}}}{f_{\text{вяз}}} = \rho \frac{U_0 L_0}{\eta} \tag{6}$$

Однако для характеристики режима течения в канале используется $\mathrm{Re}_\perp$, которое рассчитывается именно по гидравлическому диаметру канала D_h подставленного вместо характерного размера системы L_0. В контексте микрофлюидики, работа производится с низкими значениями числа Рейнольдса для поддерживания ламинарного режима течения жидкостей ($\mathrm{Re}_\perp \ll 1$), что ведет к полному доминированию вязких сил над инерционными (Стоксово течение). При низких значениях нелинейный конвективный член в уравнении Навье-Стокса становится пренебрежимо мал и может не учитываться. Таким образом система уравнений упрощается до уравнения Стокса вместе с условием несжимаемости:

$$-\nabla p + \eta \nabla^2 u + f = 0 \tag{7}$$

$$\nabla \cdot u = 0 \tag{8}$$

Исходя из представленной системы линейных уравнений, течения обратимы, отсутствуют турбулентные или хаотические явления.

Решение уравнения Навье-Стокса требует заданий граничных условий на границах расчетной области. Для описания существуют несколько граничных условий:

1) Условие прилипания ($u = 0$). Скорость жидкости на границе раздела с твердым веществом равна нулю.

2) Условие скольжения ($\frac{\partial u_n}{\partial n} = 0$), где n – нормаль к поверхности. Часто используется при моделировании границ раздела жидкость–газ.

Учитывая условия прилипания, а также постоянство скорости на входе $u = const$, а на выходе $\frac{\partial u}{\partial z} = 0$ (развитое течение, отсутствие градиентов), мы можем рассмотреть наиболее часто используемое решение уравнения Навье-Стокса – течение Пуазейля в круглой трубе радиуса r_0. При стационарном течении с постоянным градиентом давления ∇p, аналитическое решение дает параболический профиль скорости:

$$u(r) = U_0 \left(1 - \frac{r^2}{r_0^2}\right) \quad (9)$$

где U_0 – максимальная скорость на оси трубы,

r – расстояние от оси.

Если перейти к объемному расходу, учитывая его связь с градиентом давления через гидравлическое сопротивление, то имеем:

$$Q = \frac{\pi r^4{}_0}{8\eta} \left(-\frac{dp}{dz}\right) \quad (10)$$

где $-\frac{dp}{dz}$ – скорость убывания давления на единицу длины трубы по направлению течения.

1.1.2 Безразмерные числа и их значение для микрофлюидных устройств

Анализ гидродинамических процессов в микрофлюидных системах базируется на использовании безразмерных критериев подобия, которые характеризуют соотношение между различными физическими явлениями в микрофлюидных устройствах. Безразмерные числа формируют параметрическое пространство и позволяют определить, какие силы доминируют в конкретной системе, а какими можно пренебречь. Фундаментальный принцип механики

жидкостей и газов, известный как динамическое подобие, утверждает, что течения в геометрически подобных системах с одинаковыми значениями безразмерных чисел имеют одинаковые гидродинамические характеристики [11]. В числе основных безразмерных критериев, которые определяют гидродинамику микрофлюидных устройств, входят число Рейнольдса (Re), число Пекле (Pe), число Дина (De), число Вебера (We).

Как уже было упомянуто выше, течения при **числе Рейнольдса (Re)** много меньшим 1 характеризуются рядом важных для практики свойств. Во-первых, такие течения всегда остаются ламинарными, упорядоченными, без турбулентных флуктуаций. Во-вторых, линейность описывающих их уравнений означает, что к решениям для различных граничных условий может быть применен принцип суперопозиции решений, что существенно облегчает аналитический анализ. В-третьих, течения обратимы: при изменении знака градиента давления течение меняет направление на противоположное [11].

Число Пекле (Pe) характеризует соотношение характерных скоростей конвективного и диффузионного переноса вещества. Его физическая интерпретация, как и в случае с числом Рейнольдса, зависит от выбора характерного пространственного масштаба:

$$Pe = \frac{U_0 L_0}{D} \tag{11}$$

где:

D – коэффициент диффузии рассматриваемого вещества (м^2/с),

U_0 – характерная скорость течения (м/с),

L_0 – характерный размер (м)

Ввиду этого в длинном канале следует различать продольный размер $l_\parallel$ и поперечное расстояние $l_\perp$. При этом продольное число Пекле:

$$Pe_\parallel = \frac{U L_\parallel}{D} \tag{12}$$

Характеризует соотношение конвективного и диффузионного переноса вдоль канала. При $Pe_{\parallel}$>> 1 продольный перенос определяется преимущественно конвекцией, а продольная диффузия оказывает малое влияние на распределение концентраций. Для оценки смешивания между соседними ламинарными потоками используется поперечное расстояние $l_{\perp}$, равное ширине потока или глубине канала. При этом $Pe_{\perp} \gg 1$ означает, что жидкости быстро переносятся вдоль канала, а поперечная диффузия не успевает выровнять концентрации из-за недостатка длины участка смешивания. Однако при $Pe_{\perp} \ll 1$ поперечная диффузия протекает быстро, поэтому потоки могут смешаться на коротком участке канала, но необходимо учитывать фактическую длину участка смешивания. Следовательно, эффективность смешивания определяется совместно значением $Pe_{\perp}$ и отношением длины канала к ширине потока.

Например, коэффициенты диффузии для различных частиц и молекул в воде при комнатной температуре существенно различаются. Для малых ионов растворенных веществ, таких как NaCl или K^+, коэффициент диффузии составляет порядка $2 \times 10^{-9}\ \frac{м^2}{с}$. Для малых белков, например лизоцима, коэффициент диффузии составляет порядка $4 \times 10^{-11}\ \frac{м^2}{с}$. Для вирусных частиц типичная величина около $2 \times 10^{-12}\ \frac{м^2}{с}$. Для бактериальных клеток коэффициент диффузии снижается примерно до $2 \times 10^{-13}\ \frac{м^2}{с}$. В рамках модели Стокса–Эйнштейна для изолированной сферической частицы коэффициент диффузии обратно пропорционален ее гидродинамическому диаметру. Для частиц и биологических объектов несферической формы упомянутое соотношение применимо только как приближение с использованием эффективного гидродинамического диаметра [12]. По оценке, для достижения эффективной диффузии белков в канале при фиксированных вводных параметрах (коэффициент диффузии примерно $4 \times 10^{-11}\ \frac{м^2}{с}$, протекающий через канал шириной 100 мкм со средней скоростью течения 100 мкм/с) потребуется около 250 ширин канала, при $Pe_{\perp}$~250. Этот

пример ясно демонстрирует фундаментальную проблему смешивания в микрофлюидных системах, обусловленную отсутствием турбулентности и соответственно отсутствием интенсивного хаотического перемешивания. Более того, при ламинарном течении жидкостей в исследуемых геометриях, частицы, расположенные в центре канала, движутся заметно быстрее, чем частицы вблизи стенок из-за классического параболического распределения профиля скорости Пуазейля. Это различие в скоростях приводит к аксиальному растяжению распределения концентрации (дисперсия Тейлора).

Число Дина (De) характеризует интенсивность вторичных течений, возникающих в изогнутых каналах вследствие центробежных эффектов. Число Дина определяется как произведение числа Рейнольдса на корень квадратный из отношения гидравлического диаметра канала к удвоенному радиусу кривизны [3, 4].

$$De = Re\sqrt{\frac{D_h}{2R}} \tag{13}$$

где Re – число Рейнольдса,

D_h – диаметр канала (м),

R – радиус кривизны канала (м).

При течении жидкости через изогнутый канал возникает неоднородное распределение центробежных сил по сечению [13]. Жидкость в центре канала, движущаяся с большей скоростью в соответствии с параболическим профилем течения, испытывает большую центробежную силу, чем жидкость вблизи стенок, движущаяся медленнее. Это неоднородное центробежное воздействие вызывает вторичное течение в плоскости, перпендикулярной основному потоку. Это вторичное течение (течение Дина) представляет собой два вихря: жидкость в центре канала перемещается к наружной стенке изгиба, а вблизи верхней и нижней стенок канала к внутренней стенке изгиба. Таким образом, формируется вторичное

течение, которое может существенно изменить характеристики основного потока (рисунок 1).

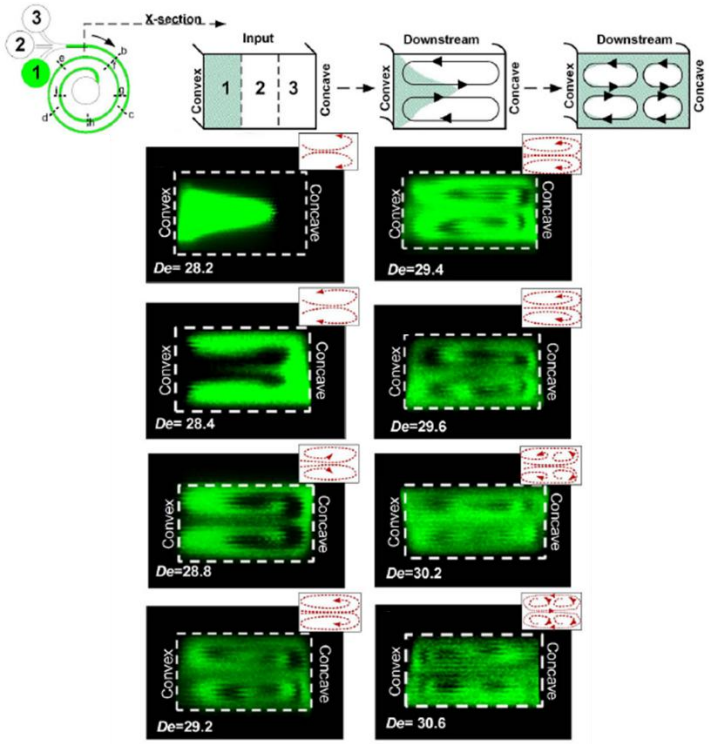


Рисунок 1 – Конфокальные изображения поперечного сечения прямоугольного спирального канала с геометрией для создания вихрей Дина. Изображения, полученные через равные интервалы времени на двух витках, демонстрируют постепенное развитие вторичных вихрей во втором витке спиральной геометрии, тогда как в первом витке наблюдались только первичные вихри [14]

При увеличении числа Дина структура вторичного течения становится более сложной. Экспериментальные и численные исследования показали, что при превышении определенного критического значения числа Дина появляется дополнительная пара вихрей [14, 15]. Критическое число Дина зависит от отношения высоты канала к его ширине и радиусы кривизны.

Для микрофлюидных каналов с низким соотношением ширины к высоте (ширина больше высоты) критические значения числа Дина обычно составляют от 30 до 150 [15]. При значениях выше критических, наблюдается переход к более сложным режимам течения с множественными вихрями, что может привести к нестабильностям и усложнению структуры потока.

Течение Дина активно используется в микрофлюидных устройствах для решения различных задач [15]. Например, для пассивного смешивания: вторичные вихри, возникающие при числе, Дина, близком к критическому, существенно увеличивают площадь контакта между смешиваемыми потоками, ускоряя процесс смешивания без использования дополнительных активных элементов. Также вихри могут использоваться для инерционной фокусировки частиц, создавая баланс между подъемной силой (возникающей при сдвиговом течении) и силой, обусловленной течением Дина, что позволяет концентрировать частицы определенного размера в определенных положениях поперечного сечения канала. Течение Дина может быть рассмотрено как приложение для сепарации клеток по размеру, т. к. различные размеры частиц приводят к различным равновесным положениям в поле течения Дина, что позволяет разделять, например, эритроциты и лейкоциты или клетки различных размеров [16].

Число Вебера (We) характеризует соотношение между инерционными силами и силами поверхностного натяжения в двухфазных системах [17]. Оно определяется как произведение плотности жидкости, квадрата скорости и характерного линейного размера, разделенное на коэффициент поверхностного натяжения:

$$We = \frac{\rho U_0^2 L_0}{\gamma} \tag{14}$$

где ρ – плотность жидкости (кг/м^3),

U_0 – характерная скорость (м/с),

L_0 – характерный линейный размер (диаметр капли) (м),

γ – коэффициент поверхностного натяжения (Н/м).

Экспериментальные исследования, проведенные в последние десятилетия, установили характерные пороговые значения числа Вебера для различных явлений [18]. При We < 1 капля сохраняет сферическую форму благодаря поверхностному натяжению. При We ~ 1–10 начинает проявляться заметная деформация капли,

появляются нарушения сферической формы. При We ~ 12–50 образуются вытянутые капли и происходит разрушение, при котором образуется множество мелких капель. При We > 100 происходит полный распад капли на множество крайне мелких капель [18]. Это число вместе с практическим применением чаще всего встречается в капельной микрофлюидике со специальными геометриями фокусировки потока. Однако чаще используется капиллярное число (Ca), которое характеризируется соотношением вязких и капиллярных сил:

$$Ca = \frac{\eta U_0}{\gamma} \tag{15}$$

где η – динамическая вязкость (Па·с),

U_0 – скорость (м/с),

γ – коэффициент поверхностного натяжения (Н/м).

Также существует связь между числом Вебера и числом Рейнольдса через капиллярное число:

$$We = Re \cdot Ca \tag{16}$$

При ламинарном течении с малыми числами Рейнольдса режим генерации капель в микрофлюидных устройствах определяется преимущественно соотношением вязких сил и сил поверхностного натяжения, характеризуемым капиллярным числом. Однако при высоких скоростях течения, когда инерционные эффекты становятся значимыми, число Вебера становится таким же важным параметром, как и капиллярное число.

Число Онезорге (Oh) связывает вязкие силы с инерционными и капиллярными эффектами. На число Онезорге не влияет скорость течения, оно зависит только от физических свойств жидкости и геометрических параметров системы.

$$Oh = \frac{\eta}{\sqrt{\rho L_0 \gamma}} = \frac{\sqrt{We}}{Re} \quad (17)$$

где ρ – плотность жидкости (кг/м^3),

L_0 – характерный линейный размер (м)

γ – коэффициент поверхностного натяжения (Н/м).

Часто применяется обратная величина, называемая числом Z. Эмпирически установлено:

– При Z < 1 (Oh > 1) жидкость имеет слишком высокую вязкость, и стабильные капли не формируются; жидкость вытекает в виде непрерывного потока.

– При 1 < Z < 10 находится оптимальный диапазон генерации капель, где достигается стабильное формирование монодисперсных капель.

– При Z > 10 (Oh < 0.1) образуются сателлитные капли (дополнительные мелкие капли, отделяющиеся от основной капли), и генерация становится нестабильной.

1.1.3 Закон Фика и механизмы смешивания в микрофлюидном устройстве

Массоперенос веществ и частиц в микрофлюидных устройствах и каналах определяется двумя конкурирующими явлениями: диффузией и конвекцией [19]. В отличие от макроскопических систем, где существует турбулентное перемешивание, микрофлюидные системы, как уже было упомянуто выше, характеризуются ламинарным течением при низких числах Рейнольдса, где перенос компонентов вдоль канала осуществляется преимущественно адвекцией, а выравнивание концентраций между соседними ламинарными потоками – поперечной молекулярной диффузией. Специальная геометрия может дополнительно деформировать границу раздела и создавать поперечную адвекцию, сокращая диффузионный путь. Понимание механизмов диффузионного и конвективного переноса, которые описываются законом Фика, критически важно

для проектирования эффективных микрофлюидных устройств для синтеза, анализа и диагностики.

Закон Фика выражает фундаментальное соотношение между потоком вещества и градиентом концентрации [20]. В одномерном случае первый закон Фика указывает на то, что диффузионный поток пропорционален градиенту концентрации и направлен от областей с высокой концентрации к областям с низкой концентрацией.

$$J = -D\frac{dc}{dx} \tag{18}$$

где J – плотность диффузионного потока (мол/(м^2*с)),

D – коэффициент молекулярной диффузии (м^2/с),

c – концентрация вещества (мол/м^3),

x – направление изменения концентрации.

Знак минус показывает, что поток направлен в сторону убывания концентрации. Диффузия переносит вещество из областей высокой концентрации в области низкой концентрации, противодействуя градиенту. В трехмерном случае первый закон Фика обобщается с использованием векторного градиента:

$$J = -D\nabla c \tag{19}$$

Второй закон Фика получается из первого закона учитывая локальный баланс массы (уравнения неразрывности) для концентрации и постоянстве коэффициента диффузии [20]. В стационарном случае при отсутствии конвекции второй закон Фика принимает форму уравнения диффузии:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \tag{20}$$

Физический смысл второго закона Фика заключается в том, что скорость изменения концентрации в каждой точке пропорциональна второй производной

концентрации по направлению. Это выражает естественную тенденцию системы к выравниванию неоднородностей концентраций, т. е. в точках, окруженных более высокой концентрацией ($\nabla^2 c > 0$), концентрация уменьшается; в точках, окруженных более низкой концентрацией, концентрация увеличивается [21]. Также важно рассмотреть в этом контексте коэффициент молекулярной диффузии, который зависит от физических свойств диффундирующей частицы и среды. Для сферических частиц, диффундирующих в жидкости при температурах, отличных от низких, применяется фундаментальное соотношение Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \tag{21}$$

где k_B – постоянная Больцмана,

T – температура,

η – динамическая вязкость (Па·с),

r – радиус сферической частицы (м).

Соотношение Стокса-Эйнштейна показывает, что коэффициент диффузии:

1) прямо пропорционален температуре (тепловая энергия способствует движению),

2) обратно пропорционален вязкости (высокая вязкость замедляет движение),

3) обратно пропорционален размеру частицы (крупные частицы движутся медленнее).

Время необходимое для диффузии вещества на расстояние l, определяется из второго закона Фика в одномерном случае:

$$\tau_D = \frac{l^2}{D} \tag{22}$$

Таким образом, время диффузии растет как квадрат расстояния, что объясняет высокую инерционность процесса.

Локальный баланс концентрации растворенного вещества в элементарном объеме описывается уравнением непрерывности для концентрации [22]. Изменение концентрации со временем в каждой точке пространства равно сумме диффузионного потока, определяемого первым законом Фика, и конвективного переноса, обусловленного движением жидкости. Полное уравнение переноса, называемое уравнением адвекции-диффузии, объединяет оба механизма переноса [22]:

$$\frac{\partial \mathrm{c}}{\partial t} + u \cdot \nabla \mathrm{c} = \mathrm{D}\, \nabla^2 c \qquad (23)$$

В одномерном случае нестационарный член ∂c/∂t описывает локальное изменение концентрации со временем в фиксированной точке пространства. В стационарном течении, когда профиль концентрации не изменяется со временем, этот член равен нулю, и уравнение упрощается. Конвективный (адвективный) член u· ∇c учитывает перенос вещества с жидкостью. Этот член описывает тот факт, что вещество, находящееся в быстро движущейся части потока, перемещается быстрее, чем вещество в медленно движущейся части. Конвективный член обычно доминирует в направлении основного течения (вдоль потока). Диффузионный член D ∇^2 с основанный на втором законе Фика, описывает молекулярное рассеяние вещества вследствие случайных тепловых движений молекул. Этот член пропорционален второй производной концентрации по направлению, что отражает естественную тенденцию системы к выравниванию концентрационных неоднородностей.

В отличие от макроскопических систем, где турбулентное перемешивание происходит естественным путем, микрофлюидные системы с их низкими числами Рейнольдса (Re ≪ 1) характеризуются ламинарным течением. Ламинарное течение естественным образом благоприятствует разделению потоков и препятствует их смешиванию. Это создает фундаментальную проблему для приложений, требующих быстрого и эффективного смешивания: синтез наночастиц, химические

реакции [23]. Время смешивания двух потоков посредством чистой молекулярной диффузии может составлять минуты или даже часы, что неприемлемо для практических приложений.

В микрофлюидных устройствах методы смешивания принято разделять на пассивные и активные. В пассивных элементах смешивание достигается без внешних сил, в активных элементах смешивания используется внешнее поля и дополнительные факторы, инициирующие перемешивание.

Пассивные элементы реализуют усиление смешения за счет модификации геометрии канала, структуры стенок или изменения поверхностных свойств и не требуют внешнего воздействия. Основной механизм увеличения эффективности смешивания состоит в увеличении площади межфазного контакта, уменьшении диффузионного пути, а также в индуцировании поперечных и вторичных течений. К простейшим пассивным решениям относят геометрии на основе последовательного разрушения и рекомбинации потоков (T- и Y-образные миксеры, многократное ветвление потоков [23]). В таких устройствах два или более ламинарных потока многократно разделяются и вновь объединяются, что ускоряет диффузию, хотя полное смешивание по-прежнему требует значительных длин каналов. Более развитые геометрии используют объемные геометрические элементы: гребни и бороздки на стенках, спиральные и волнообразные стенки, создающие вторичные вихри Дина и поперечные течения [24].

Активные методы смешивания используют внешние поля или движущиеся элементы для увеличения эффективности смешивания. Среди них распространены магнитные частицы, которые в магнитном поле создают локальные вихревые потоки. Электрокинетические методы, такие как электроосмос и диэлектрофорез [25], которые генерируют локальные течения под воздействием переменного или постоянного электрического поля, также распространены и обеспечивают управляемое повышение эффективности смешивания. Акустические элементы используют высокочастотные ультразвуковые волны для создания вихревых потоков, которые быстро ведут к смешиванию жидкости даже при низких значениях числа Рейнольдса [26]. Пульсирующие потоки также служат средством

интенсификации, создавая периодические возмущения, которые увеличивают площадь контакта и ускоряют диффузию.

Однако в реальных практических применениях чаще распространены пассивные смешивающие элементы из-за их простоты реализации, интеграции и отсутствия требований к внешнему воздействию. Активные системы более сложны в реализации, требуют дополнительных компонентов и источников энергии, но позволяют управлять степенью смешивания во время использования микрофлюидных устройств без изменения их геометрии.

1.1.4 Режимы течения в микрофлюидных устройствах

Течение жидкостей в микрофлюидных устройствах может быть реализовано в различных режимах, выбор которых определяется задачами конкретного приложения. Принципиально различают однофазное непрерывное течение, при котором единственная жидкость заполняет весь объем канала, и двухфазные режимы, которые включают капельное и сегментированное течение. В них дискретные объемы одной фазы (дисперсной) переносятся потоком несмешивающейся второй фазы (непрерывной) [27]. Понимание физических механизмов, определяющих переход между режимами течения и кинетикой формирования капель, критически важно для проектирования устройств, используемых как для синтеза наночастиц, так и диагностических устройств.

Непрерывное (однофазное течение) представляет собой классический режим работы микрофлюидных устройств, при котором однородная жидкость движется по каналу под действием градиента давления или внешнего поля. При характерных для микрофлюидики низких числах Рейнольдса ($Re \ll 1$) течение является строго ламинарным, с параболическим профилем скорости Пуазейля. Два потока, идущие параллельно в общем канале, сохраняют явную границу раздела на значительном протяжении, и смешение происходит только за счет молекулярной диффузии, если иное не предусмотрено геометрией. Основным недостатком непрерывного течения является дисперсия Тейлора. Молекулы в центре канала движутся быстрее, чем

вблизи стенок, что приводит к аксиальному растяжению зоны аналита и ухудшает разрешение при хроматографических разделениях и химическом анализе [28].

Капельное и сегментированное течение представляют собой двухфазные режимы, в которых дискретные объемы дисперсной фазы (капли воды в масле или капли масла в воде) переносятся потоком несмешивающейся непрерывной фазы [29]. Каждая капля выступает в роли изолированного микрореактора с объемом от фемтолитров до нанолитров. Размер получаемых капель регламентируется режимом течения и соотношением расходов непрерывной и дисперсной фазы и обеспечивает ряд существенных преимуществ [30]. Сегментация потока устраняет проблему дисперсии Тейлора: аналит локализован внутри капли и не может диффундировать в соседние сегменты через несмешивающуюся фазу. Внутри движущейся капли возникает интенсивная рециркуляция, обусловленная сдвиговым взаимодействием со стенками канала и непрерывной фазой, что обеспечивает быстрое и эффективное перемешивание содержимого [31]. В зависимости от соотношения размера капли и поперечного сечения канала различают:

1) дисперсное течение: капли значительно меньше размера канала и движутся вместе с локальным потоком непрерывной фазы, следуя ее линиям тока.

2) «пробковое» течение: капли занимают большую часть поперечного сечения канала, разделенные короткими пробками непрерывной фазы [32].

Для генерации капель в трех основных режимах (режим стабильного совместного течения, капающий режим, струйный режим (рисунок 2)) в микрофлюидных устройствах широко применяются несколько геометрий:

1) в устройствах с соосным течением дисперсная фаза подается через канал, окруженный потоком непрерывной фазы во внешнем канале [32]. Обе фазы движутся в одном направлении, и формирование капель происходит вследствие развития капиллярной неустойчивости Рэлея-Плато в струе дисперсной фазы [32].

2) в устройствах с фокусировкой потока дисперсная фаза сжимается двумя встречными потоками непрерывной фазы и проходит через узкую апертуру, где происходит отрыв капли [32]. Эта геометрия обеспечивает высокую

монодисперсность капель и широкий диапазон регулирования их размера путем изменения расходов фаз.

3) в Т-образном соединении каналов дисперсная фаза подается через боковой канал перпендикулярно основному потоку непрерывной фазы. Формирование капли определяется взаимодействием сдвиговых напряжений от потока непрерывной фазы, давления, создаваемого блокировкой канала растущей каплей, и капиллярного давления на границе раздела фаз [32].

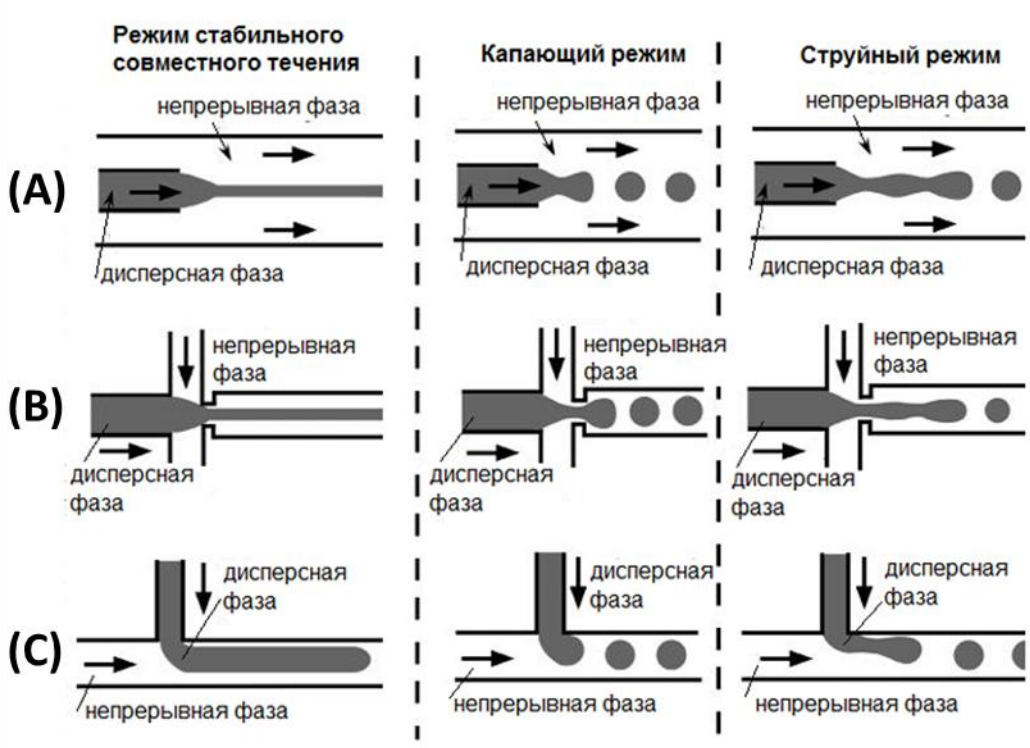


Рисунок 2 – Режимы течения потоков и формирования капель в базовых топологиях генератора капель: (A) – соосных потоков, (B) – фокусировки потока, (C) – Т – образное соединение каналов [32]

1.2 Материалы и методы фабрикации микрофлюидных устройств

Развитие микрофлюидных технологий неразрывно связано с совершенствованием методов фабрикации, позволяющих создавать микрофлюидные устройства с каналами от десятков микрометров до

субмикронных масштабов [33]. История микрофлюидики демонстрирует эволюцию от жестких кремниевых структур, заимствованных из микроэлектроники, к гибким и доступным технологиям на основе полидиметилсилоксана (ПДМС) [34].

1.2.1 Традиционные методы фабрикации

Фотолитография представляет собой один из наиболее развитых методов фабрикации, возникший в индустрии микроэлектроники для производства интегральных схем. Это высокотехнологичный процесс селективного модифицирования поверхности материала с использованием светочувствительных полимеров (фоторезистов) и ультрафиолетового излучения, позволяющий воспроизводить сложные микрометровые структуры по заданному шаблону (фотомаске).

Типичный процесс фотолитографии на кремниевых подложках включает следующие этапы [35]:

1) подготовка подложки: кремниевая пластина очищается и высушивается. Часто применяется обработка в парах триметилхлорсилана для улучшения адгезии фоторезиста;

2) нанесение фоторезиста: жидкий фоторезист (фотопроводящий полимер, чувствительный к УФ-излучению) центрифугируется на подложку, образуя тонкую равномерную пленку толщиной 1–5 мкм. Скорость центрифугирования характеризует толщину наносимого слоя;

3) мягкий нагрев: фоторезист подвергается слабому нагреву для удаления летучих растворителей и укрепления слоя;

4) УФ-экспозиция: покрытая фоторезистом подложка облучается ультрафиолетовым светом через фотомаску. Маска содержит геометрию необходимую для устройства. УФ-излучение изменяет растворимость фоторезиста в облученных областях;

5) проявление: подложка погружается в раствор проявителя, который удаляет либо облученные, либо необлученные области фоторезиста в зависимости от его типа (позитивный или негативный фоторезист);

6) нагрев: оставшийся фоторезист подвергается более интенсивному нагреву для укрепления и подготовки к последующему травлению;

7) травление: подложка обрабатывается травящим реагентом (сухое реактивное травление или влажное химическое травление), который удаляет открытые области подложки, создавая требуемую геометрию на поверхности;

Использование фотолитографии позволяет достичь высокого разрешения (менее 100 нм) при использовании современных оптических систем с одновременным переносом всей заданной геометрии на подложку, что позволяет обрабатывать большие площади единовременно. Более того, отработанные процессы обеспечивают низкую степень дефектности и высокую степень совпадения геометрии на множественных подложках.

Несмотря на достоинства фотолитографии, она имеет ряд существенных недостатков для микрофлюидных приложений [36], в числе которых высокая стоимость оборудования для производства фотомасок и необходимость проведения процесса в чистых комнатах. Также фотолитография генерирует двумерные структуры в плоскости подложки, а создание трехмерных паттернов требует многоэтапных процессов. Эти ограничения приводят к развитию альтернативных, более доступных методов фабрикации на основе аддитивных технологий.

«Мягкая» литография возникла в конце 1990-х годов как ответ на ограничения традиционной фотолитографии. Концептуально, она заменяет жесткую фотомаску и сложное оптическое оборудование фотолитографии на гибкую эластомерную реплику. Ключевым моментов является использование полидиметилсилоксана, который сочетает в себе идеальные свойства для фабрикации: гибкость, оптическую прозрачность и низкую адгезию к большинству материалов [37].

Полидиметилсилоксан один из наиболее распространенных материалов, используемых в микрофлюидных технологиях. Это полимер с неорганическим силиконовым остовом (Si-O-Si) и метильными боковыми группами (CH_3), присоединенным к атомам кремния [38]. Эта комбинация придает ПДМС исключительный набор свойств:

1) ввиду того, что ПДМС оптически прозрачен, он позволяет визуализировать движение жидкостей, поведение клеток и биохимические реакции внутри устройства, используя инвертированный оптический микроскоп [39]

2) газопроницаемость ПДМС очень важна для культур аэробных клеток в микрофлюидных устройствах. Кислород может свободно диффундировать через ПДМС, обеспечивая жизнеспособность клеток при длительном культивировании в замкнутых каналах [40].

3) поверхность ПДМС имеет низкую поверхностную энергию (~21.6 дин/см), что предотвращает необратимую адсорбцию большинства молекул и белков [40].

4) модуль Юнга примерно равен 1 Мпа, что делает ПДМС способным к значительным обратимым деформациям

5) обработка кислородной плазмой превращает гидрофобную поверхность ПДМС в гидрофильную путем создания активированной поверхности с ≡SiOH группами

Процесс «мягкой» литографии начинается с формирования жесткой подложки с рельефной геометрией, обычно созданной с помощью фотолитографии на кремнии или стекле. Таким образом мы получаем мастер-форму, из которой воспроизводятся все последующие микрофлюидные устройства. Используя мастер-форму, жидкий полимер ПДМС помещается внутрь кремниевой мастер-формы и отверждается при температуре 80°C, после отверждения полимеризовавшаяся часть отделятся, представляя собой реплику с заданной геометрией, которая затем соединяется со стеклом при активации обеих поверхностей в плазме кислорода. Таким образом создается неразъемное

соединение, которое является микрофлюидным устройством готовым к использованию.

Несмотря на преимущества, «мягкая» литография с использованием ПДМС имеет ряд недостатков [37], связанных с усадкой, набуханием в неполярных органических растворителях, что может негативно сказываться на геометрии микрофлюидного устройства.

1.2.2 Аддитивные технологии в проектировании и создании микрофлюидных устройств

Аддитивные технологии представляют собой революционный подход к фабрикации, который отличается от традиционных методов (травление, фотолитография) [36]. Если традиционные методы требуют сложных технологических действия для создания мастер-формы, то аддитивное производство создает структуры путем послойного взаимодействия с материалом согласно цифровой 3D-модели [7]. Эта парадигма позволяет непосредственно реализовать сложные трехмерные геометрии микрофлюидных устройств и мастер-форм как для использования технологии «мягкой литографии» без многоэтапных процессов травления и фотолитографии [7], так и для полностью печатных микрофлюидных устройств.

Среди аддитивных методов, фотополимерная 3D-печать, особенно стереолитография с цифровой обработкой света, продемонстрировала наибольший потенциал для микрофлюидных приложений [41]. Стереолитография является первой коммерчески реализованной аддитивной технологией. Процесс основан на послойной полимеризации жидкой смолы под воздействием ультрафиолетового излучения в соответствии с 3D-моделью. Процесс печати представляет собой подготовку трехмерной модели (геометрии) требуемого устройства, которая затем послойной разрезается специализированным программным обеспечением на горизонтальные сечения с настраиваемой толщиной (от 25 до 100 мкм). Затем, в классическом подходе, сфокусированный УФ-луч сканирует контур каждого слоя, вызывая химическую реакцию полимеризации. Более современный подход

заключается в использовании LCD-матриц, которые позволяет полимеризовать весь слой одновременно, что увеличивает скорость печати и снижает вероятность деформации за счет равномерной засветки слоя. После завершения полимеризации слоя, печатающая платформа опускается (либо поднимается, зависит от типа 3D-принтера) на величину одного шага, который задается программно, и процесс повторяется для следующего слоя. Таким образом формируется объемный объект. Эти технологии способны создавать геометрии с разрешением до 50 мкм [41] без необходимости в дорогостоящем оборудовании и чистых комнатах. Одним из главных преимуществ 3D-печати является сокращение времени, требуемого от проектирования до изготовления. В отличие от традиционной фотолитографии, которая требует изготовления фотомасок, 3D-печать может создать устройство или мастер-формы для «мягкой» литографии за несколько часов [42].

В общем случае метод изготовления должен выбираться после определения функциональных зон и характерных размеров устройства. Разрешение технологии, свойства материала, способ герметизации и возможность интеграции чувствительных элементов выступают ограничениями, преобразующими требуемую функциональную архитектуру в реализуемую конструкцию.

1.3 Наночастицы карбоната кальция как системы доставки активных биомолекул

Карбонат кальция ($CaCO_3$) представляет собой один из наиболее изученных материалов для использования их в качестве систем доставки лекарств и активных биомолекул. Выбор $CaCO_3$ обусловлен совокупностью уникальных свойств, сочетающих в себе высокий уровень биосовместимости и возможность к биодеградации, низкую стоимостью производства, доступность, способность к pH-чувствительному высвобождению и возможность функционализации поверхности. Благодаря этим характеристикам, наночастицы $CaCO_3$ нашли широкое применение

в доставке противоопухолевых препаратов, генах, белков и других биоактивных молекул [43].

В данном разделе рассматриваются структурные и физико-химические свойства $CaCO_3$, методы его синтеза и применение в качестве систем доставки.

1.3.1 Структура и свойства $CaCO_3$

Карбонат кальция привлек внимание в области доставки лекарств благодаря своей широкой доступности, дешевизне и биосовместимости. Одной из важнейших особенностей является способность сохранять структуру при pH близких к физиологическим значения. Однако при повышении кислотности среды, он быстро растворяется, высвобождая загруженные биомолекулы и ферменты в клетку. Частицы $CaCO_3$ имеют четыре основные полиморфные модификации: ватерит, кальцит, арагонит и аморфный карбонат кальция (amorphous calcium carbonate, ACC). На сегодняшний день известно большое количество статей направленных на использование частиц $CaCO_3$ в адресной доставке лекарств [44].

Наиболее термодинамически стабильной кристаллической формой $CaCO_3$ является кальцит. Он обладает тригональной кристаллической структурой и является распространенным полиморфом в природе и в лабораторных условиях из-за простых условий получения. В свою очередь, арагонит является метастабильной кристаллической формой с орторомбической кристаллической структурой и образуется при повышенной температуре и давлении, более плотен и менее стабилен при комнатной температуре, чем кальцит [45]. Наиболее метастабильной формой кристаллического $CaCO_3$ является ватерит с гексагональной кристаллической структурой. Ватерит может превращаться в более стабильные полиморфы (кальцит и арагонит) при соответствующих внешних условиях [45]. Напротив, аморфный карбонат кальция является полностью неупорядоченной фазой $CaCO_3$, которая не имеет кристаллической структуры [46]. ACC часто содержит включенную воду (гидратированный ACC) и может служить предшественником кристаллических полиморфов [46].

Каждый из перечисленных полиморфов $CaCO_3$ обладает специфической морфологией и кристаллографическими параметрами:

– кальцит: обычно образует ромбоэдрические кристаллы;

– арагонит: имеет игольчатую или призматическую морфологию; образует вытянутые кристаллы;

– ватерит: образует сферические или квазисферические наночастицы, что делает его предпочтительным для синтеза наночастиц [47];

– ACC: аморфная фаза, обычно формирует сферические наночастицы размером 50–200 нм [46].

Для успешного использования наночастиц карбоната кальция в качестве систем доставки лекарств они должны обладать высокой загружающей способностью, достаточной для включения сразу целого комплекса биоактивных веществ, доставляемых в определенную клеточную линию. После доставки и высвобождения, носители веществ должны быть переработаны внутри клеток без каких-либо побочных эффектов. По примеру естественных систем доставки искусственные системы не должны вызывать иммунный отклик организма. Как уже было упомянуто, наночастицы $CaCO_3$ обладают pH-чувствительностью: при понижении pH ионы (CO_3^{2-}) начинают взаимодействовать с ионами водорода (H^+), вызывая растворение $CaCO_3$ согласно реакции:

$$CaCO_3 + 2H^+ \rightarrow Ca^{2+} + H_2O + CO_2 \qquad (24)$$

Такая реакция может происходить в кислой среде эндосом и лизосом (pH 4–6), что обусловливает высвобождение лекарства внутри клеток [48].

Также, как упоминалось выше, $CaCO_3$ является биодеградируемым материалом т. к. при pH-опосредованном растворении в клеточной среде образуются ионы Ca^{2+} и CO_2, что не является нежелательным эффектом в большинстве случаев и естественным образом метаболизируется организмом [48]. Такой факт является преимуществом по сравнению с другими синтетическими

полимерными системами, т. к. исключает накопление токсичных продуктов метаболизма.

Поверхность наночастиц $CaCO_3$ проявляет высокую адсорбционную способность по отношению к лекарственным веществам, белкам, нуклеиновым кислотам за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженной поверхностью и отрицательно заряженными группами адсорбируемых молекул, а также через ван-дер-ваальсовы взаимодействия [49].

1.3.2 Методы синтеза наночастиц $CaCO_3$

Реакция ионного обмена является наиболее распространенной реакцией для получения наночастиц $CaCO_3$ благодаря своей простоте и воспроизводимости [50]. Процесс предусматривает подготовку раствора с Ca^{2+} (обычно хлорид кальция или нитрат кальция), и раствора, содержащего источник CO_3^{2-} (карбонат натрия или бикарбонат натрия). Оба раствора предварительно охлаждаются или нагреваются до требуемой температуры, после чего раствор карбоната быстро добавляется в раствор кальция при интенсивном перемешивании (обычно 1000–3000 об/мин). Перемешивание продолжается в течение необходимого времени до завершения кристаллизации, после чего осадок отделяется центрифугированием, промывается дистиллированной водой и этанолом для избежания агломерации синтезированных частиц [50]. Размер и морфология полученных структур зависит от множества параметров синтеза, в числе которых начальная концентрация реагентов и температура реакции. При концентрации 0.025–0.1 М обычно достигаются оптимальные размеры наночастиц в диапазоне 100–200 нм. Температура реакции является критическим фактором, определяющим полиморфный состав: при низких температурах (4 °C) преимущественно образуется метастабильный ватерит с узким распределением по размерам, тогда как повышение температуры до комнатной и выше приводит к формированию смеси полиморфов или преобразованию в термодинамически стабильный кальцит [51]. Скорость перемешивания также значительно влияет на кинетику реакции: высокая скорость соответствует образованию более мелких частиц. Для контроля размера, морфологии и

полиморфного состава в процесс синтеза часто добавляют органические или неорганические полимеры. Полимеры, такие как полиэтиленгликоль или глутаминовая кислота, адсорбируются на растущей поверхности кристаллов и препятствуют их агломерации, позволяя получать стабильные наночастицы с контролируемым размером [52].

Альтернативный подход, основанный на методе газовой диффузии, предусматривает диффузию газа CO_2 в раствор, содержащий ионы кальция. В этом методе источник кальция растворяется в безводном органическом растворителе (обычно этаноле), а источник CO_2 (например, карбонат аммония или бикарбонат аммония) помещается в отдельный сосуд в герметичной системе. CO_2 и NH_2 газы медленно диффундируют в раствор $CaCl_2$, где CO_2 взаимодействует с водой, образуя угольную кислоту, которая затем диссоциирует с образованием карбонат-ионов [53]. Реакция проводится при контролируемой температуре (обычно 25–45 °C) в течение продолжительного времени (от 8 часов до 4 дней), в результате чего образуются наночастицы, остающиеся взвешены в органической среде, что предотвращает их агломерацию. Этот метод может применяться для образования аморфного $CaCO_3$ в чистом виде, позволяет получать наночастицы размером 80–100 нм с узким распределением по размерам и обеспечивает синтез в неводной среде, что особенно полезно для последующей загрузки гидрофобных лекарственных веществ [54].

Метод микроэмульсии представляет собой более сложный подход, использующий эмульсионные системы для синтеза наночастиц $CaCO_3$ [55]. При использовании прямых эмульсии (вода в масле) две отдельные микроэмульсии с ионами кальция и ионами карбоната смешиваются, где в процессе происходит обмен ионами между отдельными микрокаплями через межмолекулярные взаимодействия. Размер образующихся наночастиц определяется размером капель (обычно 30–100 нм), что обеспечивает получение материала с исключительно узким распределением по размерам (полидисперсность <1.2) [55].

Наряду с прямой микроэмульсией может быть использована двойная эмульсия (вода в масле в воде), представляющая собой более сложную систему,

позволяющую осуществить одновременную инкапсуляцию как водорастворимых, так и жирорастворимых молекул. Основные преимущества микроэмульсионного метода заключаются в достижении узкого распределения наночастиц по размерам благодаря ограничению реакции объемом микроэмульсионной капли, возможности синтеза в неводной среде и получении частиц размером 70–220 нм [56]. Однако метод требует использования значительного количества органических растворителей, что усложняет процедуру удаления органических остатков и делает его более трудоемким по сравнению с описанными выше методами.

1.3.3 Карбонат кальция как система доставки

Для инкапсуляции небольших молекул (доксорубицин, доцетаксел, метотрексат, этопозид) применяются два основных подхода. Первый предусматривает со-осаждение лекарства во время формирования наночастицы, что особенно эффективно для водорастворимых соединений, когда водный раствор препарата добавляется в одну из исходных фаз перед началом реакции получения $CaCO_3$. Второй подход основан на адсорбции малорастворимых молекул на поверхности $CaCO_3$. Эффективность инкапсуляции для противоопухолевых препаратов часто превышает 90%, в некоторых случаях достигая 96–97% (например, для доцетаксела в арагонитовой форме с размером частиц 37 нм или для доксорубицина в системах кальцит-арагонит с размерами 100 нм) [57]. Размер наночастиц в интервале 5–100 нм обеспечивает минимальное захватывание печенью, почками и селезенкой, что способствует циркуляции в кровотоке и накоплению в опухолевой ткани.

Функционализация поверхности полимерными слоями (полиэтиленгликоль, декстран сульфат) или таргетными лигандами (пептиды, антитела, аптамеры) позволяет одновременно повысить циркуляционную стабильность, снизить неспецифический захват макрофагами и обеспечить специфичность к опухолевым клеткам. Также неагрессивные условия при синтезе $CaCO_3$ создают благоприятную среду для инкапсуляции биологически активных белков без их денатурации. Классическим примером служит доставка факторов роста и

цитокинов (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, G-CSF; эритропоэтин; бетаметазон-фосфат). Исследования *in vivo* показали сохранение биологической активности инкапсулированных белков и пролонгированное их высвобождение в течение нескольких суток [58].

Полые наноструктуры на основе аморфного карбоната кальция также демонстрируют высокий потенциал возможной загрузки благодаря большой удельной поверхности и поровому объему, позволяющим одновременно загружать противоопухолевые препараты (например, доксорубицин) и фотодинамические агенты (индоцианиновый краситель, ICG) [59]. pH-индуцируемое растворение матрицы в лизосомах приводит к локальному высвобождению обоих компонентов и усилению цитотоксического и апоптотического эффектов за счет синергии механизмов действия.

Одним из перспективных направлений применения частиц $CaCO_3$, является использование их в качестве невирусных векторов для трансфекции плазмидной ДНК, siRNA и miRNA [60]. Принцип работы основан на соосаждении ионов кальция с карбонат-анионами в присутствии нуклеиновой кислоты, при этом молярное отношение Ca^{2+}/CO_3^{2-} критически влияет на размер комплекса, эффективность адсорбции ДНК и эффективность трансфекции. Оптимизация этого соотношения позволяет достигать уровней экспрессии генов, сопоставимых для стандартных липофильных реагентов (липофектамин), при меньшей цитотоксичности. Механизм интернализации предусматривает эндоцитоз, где в условиях кислого pH лизосом происходит освобождение генетического материала, позволяющее ему достичь цитоплазмы и проникнуть в клеточное ядро.

Развитие комплексных систем на основе $CaCO_3$ для одновременной доставки нескольких препаратов открывает новые возможности преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолей. Примером служит система Alginate/$CaCO_3$/DNA/DOX, обеспечивающая загрузку плазмиды p53 и доксорубицина с синхронизированным высвобождением в целевой точке и усилением апоптотического эффекта [61].

Несмотря на множество успешных примеров, применение наночастиц $CaCO_3$ сопряжено с рядом нерешенных вопросов, требующих систематического внимания при переходе от лабораторного этапа к клинической реализации. Анализ литературы показывает, что получение частиц $CaCO_3$ требуемого размера определяется взаимосвязанным действием смешивания, пересыщения, зародышеобразования, роста и стабилизации. Поэтому актуальной приборной задачей является создание МФУ, в котором введение исходных реагентов, формирование частиц и введение стабилизирующего компонента пространственно разделены, а продолжительность каждой стадии задается геометрией и расходами потоков.

1.4 CAR-T терапия

Иммунотерапия с помощью Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR-T) продемонстрировала впечатляющие результаты лечения ряда онкогематологических заболеваний [62], став новым стандартом терапии при клеточных лимфомах и лейкозах [63, 64]. Более того данная методика обладает высоким потенциалом в терапии также и аутоиммунных болезней [63].

1.4.1 Основы иммунотерапии с использованием CAR-T клеток

При проникновении патогена в организм запускается каскад иммунных реакций, включающий врожденный (неспецифический) и последующий адаптивный (специфический) иммунный ответ. Эти два пути функционально сопряжены и действуют последовательно, но с различной кинетикой и специфичностью. Неспецифический ответ активируется первым, задействуя все его эффекторные компоненты, которые включают барьерные структуры (эпителий, слизистые), растворимые факторы (комплемент, интерфероны, острофазовые белки) и клетки миелоидного происхождения, в числе которых макрофаги, нейтрофилы, естественные киллеры (NK-клетки) и дендритные клетки.

Например, дендритные клетки, расположенные в периферических тканях, распознают патогены посредством рецепторов распознавания образов, таких как TLR (Toll-like receptors), которые связывают молекулярные структуры микроорганизмов. После захвата патогена путем фагоцитоза или эндоцитоза дендритные клетки деградируют патоген в кислых эндосомах и лизосомах, в результате чего формируются пептидные фрагменты антигенных белков. Параллельно дендритные клетки проходят процесс миграционной и функциональной зрелости. При этом снижается фагоцитарная активность, усиливается экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (MHC-II) и костимулирующих молекул (CD80/CD86), а также хемокиновых рецепторов (например, CCR7), направляющих клетки в лимфатические узлы.

В лимфатических узлах зрелые дендритные клетки представляют обработанные пептидные фрагменты на поверхности в комплексе с MHC-II-молекулами наивным (необученным) $CD4^+$ Т-лимфоцитам. Распознавание пептид-MHC-II комплекса Т-клеточным рецептором (TCR), в сочетании с костимуляцией и цитокиновым сигналом (например, IL-12), инициирует активацию и клональную экспансию антиген-специфических Т-клеток, что является началом адаптивного иммунного ответа.

Адаптивный иммунитет характеризуется высокой специфичностью, иммунологической памятью и временной задержкой. Он включает:

– гуморальный ответ, опосредованный В-лимфоцитами, дифференцирующимися в плазматические клетки и продуцирующими антиген-специфические антитела;

– клеточный ответ, в котором активированные $CD4^+$ Т-хелперы (Th1, Th2, Th17 и др.) регулируют эффекторные функции макрофагов, цитотоксических $CD8^+$ Т-лимфоцитов и других иммунных клеток.

Важно, что эффективность адаптивного ответа напрямую зависит от качества презентации антигена и контекста активации, обеспечиваемого врожденной иммунной системой. Таким образом, врожденный и адаптивный иммунитет образуют единую, иерархически организованную систему защиты, где первая

ступень обеспечивает быстрое сдерживание инфекции и инициацию специфического ответа, а вторая позволяет точечно уничтожать патоген и формировать долгосрочную иммунную память.

В свою очередь химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют искусственно созданные молекулы, которые перенаправляют Т-лимфоциты на распознавание опухолевых клеток из-за связывания поверхностного антигена напрямую через антитело, и, как следствие, без представления через главный комплекс гистосовместимости.

Молекулярная организация CAR включает несколько критических компонентов: внеклеточный лигандсвязывающий домен (обычно scFv), спейсер, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный модуль. Первое поколение CAR содержало исключительно внутриклеточный домен CD3ζ, аналогичный TCR, однако такие конструкции демонстрировали ограниченную функциональность в организме из-за недостаточного сигнала активации [65]. Значительный прогресс произошёл с введением костимулирующих доменов, таких как CD28 или 4-1BB (CD137), создавшим второе и третье поколения CAR. Костимулирующие домены обеспечивают дополнительные сигналы при распознавании антигена, критические для усиленной пролиферации, накопления CAR-T клеток, повышенной секреции цитокинов и долгосрочной персистенции [66].

Выбор костимулирующего домена оказывает существенное влияние на функциональный профиль полученных клеток. CAR-T клетки с CD28 костимуляцией показывают более быструю цитотоксичность и активный ранний терапевтический потенциал благодаря интенсивной активации пролиферативных путей [67]. В противоположность этому, 4-1BB костимуляция способствует генерированию памяти фенотипа и улучшению долгосрочной персистенции CAR-T клеток через активацию различных сигнальных каскадов. Клинически значимо, что достижение высокой концентрации опухоль-инфильтрирующих Т-клеток в микроокружении опухоли существенно коррелирует с терапевтическим успехом [68].

CAR-T клеточная терапия демонстрирует результаты при лечении онкогематологических заболеваний, особенно для пациентов с рецидивирующими и рефрактерными формами болезни. При остром лимфобластном лейкозе типа В достигнуты наиболее значительные показатели с полной ремиссией в пределах 80–93% для взрослых пациентов [69]. Эффективность объясняется использованием CD19 в качестве мишени. Данная молекула экспрессируется на В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях и относительно редко встречающейся на критичных для выживания нормальных клетках. Результаты при диффузной крупноклеточной лимфоме существенно ниже, с полной ремиссией в 39–54% [70], а при хроническом лимфолейкозе показатели составляют 20–30% [71]. Такая вариабельность указывает на сложные взаимодействия между особенностями опухолевого микроокружения и функциональными характеристиками Т-клеток.

Разработка CAR-конструкций, нацеленных на альтернативные антигены, расширяет применимость подхода. Для множественной миеломы разработаны CAR-T клетки, направленные на антиген B-cell maturation antigen (BCMA), показавшие значительную эффективность у пациентов с рефрактерной болезнью [72]. Между тем, вариабельность клинического ответа между пациентами, получающими идентичные продукты, подчеркивает важность понимания индивидуальных факторов, определяющих терапевтический результат.

Применение CAR-T технологии в лечении аутоиммунным заболеваний представляется новый подход к терапии, отличающийся от традиционной иммуносупрессии. Системная красная волчанка служит хорошим примером потенциального применения анти-CD19 CAR-T клеточной терапии. Патофизиология волчанки определяется аутоиммунной В-клеточной активностью и продукцией аутоантител, направленных против двуцепочечной ДНК, что приводит к системному воспалению и разрушению тканей. Доклинические исследования продемонстрировали, что анти-CD19 CAR-T клетки достигают полного снижения количества $CD19^+$ В-клеток, подавления продукции аутоантител и увеличения продолжительности жизни животных моделей, указывая на потенциальную долгосрочную эффективность такого подхода [73]. Первые

клинические применения у пациентов с рефрактерной волчанкой выявили полное и устойчивое исчезновение циркулирующих В-клеток с сопутствующим исчезновением аутоантител.

1.4.2 Производство CAR-T клеток

Производство CAR-T клеток основано на модификации и экспансии Т-лимфоцитов пациента, полученных в результате лейкафереза из периферической крови. Полный производственный цикл обычно занимает 10–14 дней от момента лейкафереза до готового продукта и включает важные стадии активации Т-лимфоцитов и доставки химерного антигенного рецептора в них [74]. Производство CAR-T клеток требует соблюдения строгих нормативов надлежащей производственной практики, являясь высокотехнологичным процессом.

На начальном этапе осуществляется выделение лейкоцитов из периферической крови пациента, после чего проводятся селекция и активация Т-клеток. Активация Т-клеток является критичной фазой, определяющей как эффективность трансдукции, так и потенциал последующей экспансии. Стандартные протоколы предусматривают использование моноклональных антител к CD3 и CD28, сопряженных с магнитными частицами. Оптимальная длительность активации составляет 24–48 часов перед трансдукцией, обеспечивая баланс между достижением высокой экспрессии и сохранением жизнеспособности более 80% [75].

Введение генетической конструкции CAR в активированные Т-клетки осуществляется на этапе активации или в ближайшие часы после ее завершения посредством лентивирусов или частиц. Последующая экспансия трансдуцированных CAR-T клеток происходит в питательной среде с добавлением цитокинов. В стандартных протоколах используются интерлейкин-2 (IL-2), IL-7, IL-15 и IL-21. IL-2, которые стимулируют быструю пролиферацию, однако продолжительное воздействие приводит к дифференцировке в терминально дифференцированные эффекторные клетки. Комбинации IL-7 и IL-15 значительно повышают долю центральных памяти Т-клеток с расширенным потенциалом

персистенции. За 7–14 дней культивирования достигается 100–1000-кратное увеличение числа клеток с сохранением жизнеспособности выше 80% [76]. После завершения экспансии проводится концентрирование клеточной суспензии и фенотипическая, и функциональная характеризация полученного продукта.

Производственный цикл CAR-T терапии характеризуется значительными временными ограничениями. Общая длительность от момента лейкафереза до готовности продукта составляет обычно 10–14 дней, при этом активно развиваются ускоренные протоколы, демонстрирующие возможность сокращения времени культивирования до менее чем 24 часов [77]. Финансовые затраты на производство одной дозы CAR-T терапии составляют приблизительно $350.000–450.000 (по состоянию на 2023 год), из которых значительная доля приходится на оборудование, реагенты и обеспечение соответствия стандартам [78]. Аутологичная природа терапии предусматривает дополнительные логистические расходы, включающие криоконсервацию, транспортировку пациент-специфичных клеток и доставку готового продукта. Документально подтверждено, что примерно 25% пациентов с множественной миеломой, ожидавших CAR-T терапии, скончались, пока их клеточные продукты находились в процессе производства или согласования [79].

Как уже было упомянуто ранее, CAR-T включает продолжительный *ex vivo* культурный этап, который обычно длится более 9 дней, что приводит к сдвигу фенотипа в сторону более дифференцированных Т-клеток [80]. Такая длительная процедура связана с истощением в конечном продукте CAR-T популяции наивных лимфоцитов (Tnlp) и клеток памяти со свойствами стволовых клеток (Tscm). Клетки с этим фенотипом являются необходимыми для обеспечения устойчивого противоопухолевого ответа благодаря своей высокой пролиферативной активности, способности к самовоспроизведению и способности дифференцироваться в эффекторные субпопуляции Т-клеток. В результате Т лимфоциты, лишенные этой популяции, не могут предоставить длительный положительный клинический ответ. Следовательно, разработка новых эффективных протоколов для производства CAR-T с более коротким временем

производства крайне необходима для сохранения или обогащения редкими Tn и Tscm популяциями конечного CAR-T продукта.

Рассмотренные работы показывают, что эффективность трансдукции определяется не только концентрацией вирусного вектора и продолжительностью инкубации, но и условиями его доставки к клеточной поверхности. В связи с этим актуальной является разработка микрофлюидной инкубационной системы, геометрия которой ограничивает расстояние между Т-лимфоцитами, активирующими частицами и лентивирусными носителями, сохраняя при этом жизнеспособность, возможность извлечения клеток и требуемый фенотипический состав.

1.5 Перовскитные структуры для биосенсорных применений

Перовскитные структуры представляют собой класс материалов с настраиваемыми оптико-электронными свойствами, которые открывают новые возможности для использования их в качестве миниатюризированных оптических сенсоров влажности, фотодетекторах и других прикладных областях [81]. Уникальность перовскитов заключается в высоком коэффициенте поглощения света, высокой подвижности заряда [82–84], а также возможности независимого управления их оптическими характеристиками путем варьирования химического состава на всех трех позициях структуры ABX_3, что позволяет достичь высокого квантового выхода фотолюминесценции и получить узкие линии излучения. Механизмы, лежащие в основе оптических откликов перовскитных систем, обусловлены их кристаллической структурой и фазовыми превращениями, которые чувствительны к изменениям внешней среды.

1.5.1 Свинцово-галогенидные перовскиты $CsPbX_3$. Кристаллическая структура и оптические свойства

Наноразмерные кристаллы свинцово-галогенидных перовскитов $CsPbX_3$ (где X = Cl, Br, I), в зависимости от типа и методики синтеза, могут являться кубическими структурами с размерами ребер от 4 до 15 нм [85]. Они имеют две точки фазового перехода между комнатной температурой и точкой плавления. При повышении температуры выше 563 К наблюдается последовательный фазовый переход из орторомбической фазы (пространственная группа Pbmn) в тетрагональную, а затем при достижении температуры 602 К в кубическую фазу (Pm3m). Эти переходы обусловлены термическим расширениями кристаллической решетки и уменьшением влияния искажений, что приводит к повышению симметрии структуры (рисунок 3). Однако в наноразмерных частицах $CsPbX_3$ кубическая фаза может быть стабилизирована благодаря размерным эффектам и преобладанию поверхностной энергии, что предотвращает нежелательные фазовые переходы при комнатной температуре [86]. При достижении критической точки температуры может наблюдаться увеличение напряжений внутри кристалла, которое может вести к большему количеству дефектов, что также сказывается на свойствах материала. Кристаллам $CsPbBr_3$ свойственно 12 типов внутренних точечных дефектов, вакансии, атомы в междоузлии и антиструктурные дефекты, наличие которых может влиять на подвижность зарядов, скорость рекомбинации [87]. Кубическая кристаллическая фаза, наблюдаемая при комнатной температуре, является высокотемпературным состоянием для большинства составов и обладает высокой степенью упорядоченности благодаря значительной разнице в размерах и заряде между ионами цезия и свинца. Это обстоятельство принципиально отличает перовскиты от халькогенидных квантовых точек, которые страдают от наличия поверхностных ловушек с глубокими энергетическими уровнями [88].



Рисунок 3 – Фазы $CsPbBr_3$ [89]

Электронная структура $CsPbX_3$ характеризуется перекрытием орбиталей свинца (Pb p) в нижней части зоны проводимости и преобладанием p-орбиталей галогенидов в верхней части валентной зоны. Ширина запрещенной зоны демонстрирует выраженную зависимость от размера частиц и галогенидного состава [90] и может варьироваться от 1.7 эВ до 2.7 эВ, покрывая весь видимый спектр в диапазоне 500–540 нм)[85].

С точки зрения оптических характеристик, кристаллы $CsPbBr_3$ имеют узкие полосы излучения с шириной <20 нм с настраиваемой длиной волны излучения, которая может варьироваться практически во всем видимом спектральном диапазоне благодаря изменению состава галогенида и квантовым размерным эффектам. Квантовый выход фотолюминесценции (КВФЛ) достигает 90 %, а времена жизни возбужденных состояний находятся в диапазоне 1–29 нс, что обеспечивает высокий спектральный потенциал для оптоэлектронных приложений [91]. При целенаправленном варьировании размера и состава можно добиться модуляции КВФЛ в пределах 50–90 %. Существенное преимущество $CsPbX_3$ проявляется в синих и зелёных спектральных областях (410–530 нм), где традиционные халькогенидные квантовые точки демонстрируют фотодеградацию под воздействием УФ-излучения [85].

1.5.2 Сенсоры влажности на основе перовскитов

Датчики влажности – это устройства, измеряющие влажность окружающей среды при использовании гигроскопичных материалов в качестве основного компонента. Материалы такого класса могут адсорбировать молекулы воды, что ведет к изменению физико-химических характеристик, в т. ч. сопротивления,

емкости и оптического отклика. Вариация этих параметров ведет к регистрации относительной влажности воздуха окружающей среды. Механизмы регистрации влажности на основе перовскитов включают миграцию ионов, изменения структуры кристаллической решетки и изменение состояния поверхностных дефектов [92]. Эти свойства позволяют таким датчикам иметь высокую чувствительность, быстрое время отклика и широкий динамический диапазон детекции. Наблюдаемая чувствительность к влажности у перовскитных структурах возникает благодаря образованию прочных водородных связей между молекулами воды и решеткой галогенидов, что способствует значительно взаимодействию с полярной H_2O [93]. Также, как было отмечено выше, перовскитные структуры демонстрируют свойства светопоглощения, что ведет к ярко-выраженной фотолюминесценции ввиду узкого спектра излучения. Влажность может изменять спектральные характеристики материала, включая длину волны и интенсивность излучения, что может быть использовано для определения относительной влажности. Создание сенсоров влажности на основе перовскитных структур обладает значительным потенциалом в области мониторинга влажности кожи и физиологического применения для анализа дыхательного поведения, которое может сигнализировать о патофизиологических состояниях [94, 95].

Механизм отклика обусловлен двумя процессами: физической адсорбцией воды и последующей химической трансформацией перовскитной структуры [96]. При адсорбции воды на поверхности $CsPbBr_3$ происходит обратимая трансформация в более устойчивую фазу $CsPb_2Br_5$. Этот процесс сопровождается изменением поверхностных дефектов, которые являются основными центрами рекомбинации. Удаление поверхностных ловушек приводит к увеличению интенсивности люминесценции. Однако этот механизм является обратимым: при высушивании образца $CsPb_2Br_5$ восстанавливается в исходную фазу $CsPbBr_3$. Дополнительный механизм отклика связан с CO_2, растворенным в адсорбированной воде. Углекислый газ из воздуха взаимодействует с поверхностью, способствуя стабилизации промежуточных фаз. Кинетика этих

процессов определяет временные характеристики сенсора: время отклика составляет 15–30 секунд для достижения 90% максимального сигнала [97].

Перовскитные сенсоры влажности обладают следующими преимуществами:

1) высокий квантовый выход люминесценции (50–90%), что обеспечивает высокое соотношение сигнала к шуму;
2) узкие полосы излучения (12–42 нм) позволяют использовать простые оптические фильтры;
3) быстрое время отклика и восстановления (2–3 секунды);
4) возможность работы при низких напряжениях возбуждения (20 мВ);
5) полная обратимость отклика с минимальным гистерезисом (менее 5%) [93];

1.5.3 Неинвазивная диагностика. Биомедицинское применение

Концепция сенсора на основе $CsPbBr_3$ может лежать в анализе влажности, которая присуща человеческому телу и дыхательной активности, в т. ч. частоты, глубины и ритма, т. к. это может предоставлять ценную информацию о физиологическом состоянии организма и может служить основой для неинвазивного мониторинга различных патологических процессов [98]. Однако для широкого распространения такого типа датчиков для неинвазивной диагностики им не хватает интеграции с аналитическими функциями и их демонстрацией. Например, в одной из работ [99] представлена концепция «влажность пота как сигнал», которая может быть реализована в простой и незаметной форме ношения «умных» часов. Такой концепт может определять нанолитры влаги, испаряющиеся в течение короткого промежутка времени, тем самым обеспечивая непрерывное измерение таких показателей, как дыхание, частота сердечных сокращений и уровень потоотделения. Также некоторые типы сенсоров, которые были описаны в работе [100] на основе хитозана/полипиррола, могут использоваться для точного определения типа дыхания. Благодаря множеству преимуществ, таких как высокая чувствительность и низкое время отклика (13/2 с). Как указывается в работе, датчик может с высокой точностью

отслеживать различные состояния дыхания, в числе которых тахипноэ и брадипноэ. Также путем обработки экспериментальных и тестовых данных можно получить различные характеристики тахипноэ, брадипноэ, нормального дыхания и дыхания Чейна-Стокса. В другой работе [101], которая описывает сенсор влажности, интегрированный в носимую маску, на основе перовскитной структуры $Cs_3Cu_2I_5$, представлено устройство с многорежимным откликом и реакцией на физиологические параметры организма, характерные при переутомлении. Механизм детекции заключался в обратимом фазовом переходе между фазами $CsCu_2I_3$ и $Cs_3Cu_2I_5$ ввиду сорбции и десорбции водяных паров в широком диапазоне относительной влажности от 40% до 90%. Использование перовскитных структур для его создания позволило достичь быстрое время отклика ~ 2 с и быстрое время восстановления ~ 0.5 с при обратном переходе.

Таким образом, развитие оптических сенсоров на основе перовскитных наноструктур открывает возможность создания портативных и высокочувствительных систем мониторинга, которые могли бы быть интегрированы в компактные медицинские устройства для непрерывного контроля респираторного статуса вне стационарных условий. Более того, анализ литературы показывает, что характеристики оптического сенсора определяются совместно свойствами чувствительного материала и конструкцией измерительной системы. Измеряемое время отклика может включать время обновления газовой среды в кювете, собственную кинетику материала и время регистрации сигнала. Поэтому актуальной приборной задачей является создание проточной оптической системы, обеспечивающей воспроизводимый подвод газовой среды к чувствительному материалу и согласованное расположение источника возбуждения, спектрального фильтра и фотоприемника.

1.6 Единые физические принципы проектирования МФУ для задач синтеза, клеточной инженерии и оптической сенсорики

В ранних работах микрофлюидные системы преимущественно рассматривались как средство миниатюризации отдельных лабораторных операций. Последующее развитие области показало, что уменьшение размеров само по себе не определяет функциональность устройства: результат формируется совокупностью геометрии каналов, граничных условий, свойств среды, способа подачи исследуемых жидкостей и последовательности выполняемых операций [102]. Поэтому проектирование микрофлюидного устройства целесообразно рассматривать как установление связи между требуемым физическим процессом и пространственно-временной организацией переноса внутри устройства.

Для реакционного синтеза такой процесс включает подачу реагентов, формирование межпоточной границы, смешение, нуклеацию, рост частиц и ограничение продолжительности реакции. При клеточной модификации геометрия должна обеспечить сближение клеток и вирусных частиц при сохранении условий питания и жизнеспособности клеток. В оптическом сенсоре необходимо согласовать подачу анализируемого газа в измерительную камеру, перенос водяного пара к чувствительному материалу, кинетику преобразования материала и регистрацию фотолюминесценции. Несмотря на различие выходных величин, конструкция задает характерные длины переноса, времена контакта и последовательность функциональных зон. Это позволяет сформулировать общий принцип: геометрию МФУ следует выбирать по лимитирующему механизму переноса или взаимодействия и по допустимому времени процесса.

1.6.1 Характерные пространственные и временные масштабы процессов

Поскольку числа Рейнольдса и Пекле уже рассмотрены в подразделе 1.1.2, в данном разделе целесообразно сосредоточиться на их применении при проектировании МФУ. Для этого каждый безразмерный критерий необходимо

связать с конкретной функциональной зоной устройства, характерным размером этой зоны и соотношением времен протекающих в ней процессов. Такой подход позволяет использовать безразмерные критерии не только для классификации режимов течения, но и для обоснованного выбора геометрии микрофлюидного устройства [17, 103]. Одно и то же МФУ следует характеризовать несколькими пространственными масштабами. Продольный масштаб L_j соответствует длине j-й функциональной зоны вдоль направления потока. Для описания гидродинамического режима используется гидравлический диаметр $D_{h,j}$. Поперечный масштаб $l_{\perp,j}$ определяется физическим процессом, который необходимо рассчитать. В качестве него могут выступать расстояние от потока до поверхности, половина высоты камеры или толщина пористого слоя.

Для прямоугольного канала шириной w и высотой h площадь поперечного сечения и гидравлический диаметр определяются выражениями

$$A = wh \tag{25}$$

$$D_h = \frac{4A}{P} = \frac{2wh}{w + h} \tag{26}$$

где $P = 2(w + h)$ – смоченный периметр канала.

Помимо гидравлического диаметра, необходимо учитывать отношение высоты канала к его ширине:

$$\beta = \frac{h}{w} \tag{27}$$

Каналы с одинаковым D_h, но различными значениями β, могут иметь разные профили скорости, гидравлическое сопротивление и расстояния поперечного переноса. Поэтому геометрические параметры следует определять отдельно для каждой функциональной зоны.

Средняя скорость потока в j-й зоне рассчитывается по формуле

$$U_j = \frac{Q_{\Sigma,j}}{A_j} \tag{28}$$

где $Q_{\Sigma,j}$ – суммарный расход жидкости или газа через рассматриваемую зону. До объединения потоков он равен расходу соответствующей ветви, а после объединения – сумме расходов всех присоединенных потоков. Это особенно существенно для много-входных МФУ. Если использовать одно значение скорости для участков до и после слияния потоков, расчет времени пребывания и безразмерных критериев будет некорректным.

Время прохождения потоком функциональной зоны можно оценить двумя способами:

$$\tau_{\text{conv},j} = \frac{L_j}{U_j} \tag{29}$$

$$\tau_{\text{res},j} = \frac{V_j}{Q_{\Sigma,j}} \tag{30}$$

где V_j – объем рассматриваемой зоны. В прямом канале постоянного сечения эти оценки совпадают. Для змеевиков, камер и каналов с переменным сечением более корректно использовать отношение $V_j/Q_{\Sigma,j}$

Полученное значение τ_{res} представляет собой среднее время пребывания. В реальном устройстве отдельные элементы жидкости могут находиться в одной зоне разное время из-за параболического профиля скорости, поворотов, локальных рециркуляций и застойных областей.

Для оценки молекулярной диффузии используются характерное время прохождения заданного расстояния и диффузионная длина:

$$\tau_D = \frac{l_\perp^2}{2D} \tag{31}$$

$$l_D(t) = \sqrt{2Dt} \tag{32}$$

где D – коэффициент диффузии компонента, перенос которого ограничивает рассматриваемый процесс. В качестве $l_\perp$ следует использовать не размер устройства в целом, а фактическое расстояние диффузии. Например, при переносе вещества из объема канала к ближайшей стенке предельное расстояние может быть принято равным половине высоты канала: $l_\perp = h/2$.

Коэффициент диффузии следует выбирать для конкретного переносимого компонента и фактического состава среды. Для частиц при отсутствии экспериментальных данных может использоваться соотношение Стокса–Эйнштейна.

Число Рейнольдса необходимо рассчитывать отдельно для каждой проточной зоны:

$$\mathrm{Re}_j = \frac{\rho U_j D_{h,j}}{\mu} = \frac{U_j D_{h,j}}{\nu} \tag{33}$$

где ρ – плотность, μ – динамическая вязкость, ν=μ/ρ – кинематическая вязкость среды.

Для описания массопереноса совместно используются число Шмидта и числа Пекле:

$$\mathrm{Sc} = \frac{\nu}{D} \tag{34}$$

$$\mathrm{Pe}_h = \frac{U D_h}{D} = \mathrm{Re} \cdot \mathrm{Sc} \tag{35}$$

$$\mathrm{Pe}_L = \frac{UL}{D} \tag{36}$$

Число Pe_h характеризует соотношение конвективного и диффузионного переноса на масштабе гидравлического диаметра, тогда как Pe_L относится к полной длине функциональной зоны.

Условие $\mathrm{Pe}_L \gg 1$ означает, что перенос вещества вдоль канала преимущественно осуществляется потоком. Однако большое продольное число Пекле само по себе не показывает, успевают ли смешаться соседние ламинарные потоки. Для этого необходимо сопоставить время диффузии через границу между потоками с временем пребывания в зоне смешения:

$$\Pi_{\mathrm{mix}} = \frac{\tau_D}{\tau_{\mathrm{res}}} = \frac{U l_m^2}{2DL} = \frac{\mathrm{Pe}_L}{2}\left(\frac{l_m}{L}\right)^2 \tag{37}$$

где l_m – расстояние, на которое должно продиффундировать вещество для выравнивания концентрации. Если $\Pi_{\mathrm{mix}} \ll 1$, то диффузионное выравнивание

происходит быстрее, чем поток покидает зону смешения. При $\Pi_{\text{mix}} \gtrsim 1$ поперечное смешение ограничено временем пребывания.

Таким образом, расчет следует выполнять отдельно для каждой функциональной зоны МФУ. Сначала по ее геометрии и локальному расходу определяются D_h, U и τ_{res}. Затем выбирается фактическое расстояние лимитирующего переноса $l_{\perp}$, рассчитывается τ_D, после чего сопоставляются характерные времена и определяются применимые безразмерные критерии. Такая последовательность позволяет непосредственно связать геометрию устройства с условиями смешения, реакции, переноса к поверхности или проникновения вещества в пористый слой.

1.6.2 Функциональное зонирование микрофлюидных устройств

Микрофлюидное устройство может рассматриваться как последовательность элементарных операций, каждая из которых требует собственных граничных условий. Такой подход используется в системах lab-on-a-chip, где транспорт, дозирование, смешение, инкубация, разделение и детектирование объединяются в единую технологическую цепочку [104]. Пространственная область, в которой реализуется одна или несколько согласованных операций, далее рассматривается как функциональная зона. Граница между зонами может совпадать с геометрическим переходом, местом слияния потоков, входом дополнительного реагента, изменением материала стенки или расположением чувствительного элемента.

В обобщенной архитектуре можно выделить входную, гидродинамически формирующую, рабочую, стабилизирующую, измерительную и выходную зоны. Входная зона обеспечивает раздельную подачу сред и задает соотношение расходов. В зоне гидродинамического формирования устанавливается профиль скорости или создается требуемая межпоточная конфигурация. Рабочая зона предназначена для смешения, реакции, инкубации либо взаимодействия аналита с чувствительным материалом. Стабилизирующая зона ограничивает дальнейшее протекание процесса посредством разбавления, изменения состава среды,

разделения фаз или уменьшения времени контакта. Измерительная зона обеспечивает воспроизводимое положение объекта относительно оптического, электрического либо иного преобразователя. Выходная зона служит для извлечения продукта и не должна вносить неконтролируемую задержку, агрегацию или потерю клеток.

Разделение на зоны не требует, чтобы каждая функция выполнялась в отдельной камере. Один змеевидный канал может одновременно обеспечивать перенос, увеличение времени пребывания и изменение ориентации межпоточной границы. Расширенная камера может совмещать загрузку, инкубацию и пространственное ограничение клеток. В проточной оптической кювете рабочая и измерительная зоны совпадают, если чувствительная подложка расположена непосредственно в области контролируемого газового потока. Следовательно, функциональное зонирование описывает физическую роль участка, а не только его внешнюю форму.

Для реакционного синтеза типовая последовательность включает: раздельное дозирование прекурсоров; слияние потоков и образование реакционной границы; смешение и нуклеацию; контролируемый рост; ввод стабилизатора или функционализирующего компонента; сбор продукта. Третий вход в устройстве для синтеза $CaCO_3$ имеет принципиально иную функцию по сравнению с первыми двумя: он формирует границу между зоной синтеза и зоной стабилизации/загрузки. Благодаря этому продолжительность реакции задается не только общей длиной канала, но и точкой ввода третьего потока и отношением расходов.

Для клеточной модификации набор зон сокращается, но требования к ним становятся более жесткими. Вход должен обеспечивать загрузку без значительных потерь клеток; инкубационная зона – малое диффузионное расстояние между клетками и вирусными частицами, достаточный рабочий объем и приемлемые условия питания; выход – извлечение клеток без остаточного удержания в углах, на столбиках или на поверхности. В микрофлюидных устройствах для вирусной трансдукции применяются как проточные камеры с мембранами, так и каналы пространственного ограничения. В первом случае отдельная зона перфузии

поддерживает обмен среды, во втором сокращение высоты канала непосредственно уменьшает путь диффузии [2].

В сенсорном устройстве функциональная цепочка включает формирование газового потока с заданной влажностью, выравнивание потока, экспозицию чувствительной подложки, возбуждение фотолюминесценции, спектральную фильтрацию, фотодетектирование и удаление газа. Здесь зонирование распространяется за пределы микроканала и включает оптические компоненты. Расположение окна, источника возбуждения, фильтра и фотодиода определяет, какая часть чувствительного слоя участвует в измерении и насколько сигнал чувствителен к неоднородности потока. Поэтому кювета является не пассивным держателем образца, а частью измерительного преобразователя [105].

Аналогичный принцип интеграции функциональных зон реализован в оптофлюидной системе на основе плазмонного волоконного чувствительного элемента. В данной конфигурации оптическое волокно с наклонной брэгговской решеткой размещено непосредственно внутри микрофлюидного устройства, содержащего рабочую камеру объёмом 300 мкл, входной и выходной каналы. Микрофлюидная часть обеспечивает контролируемый подвод анализируемой среды к чувствительной области и одновременно выполняет функцию механической фиксации волокна. Дополнительное размещение устройства на элементе Пельтье с контролем температуры термистором позволило поддерживать температуру 27 °C с отклонением ±0.02 °C и уменьшить температурный дрейф спектрального сигнала. Таким образом, функциональное зонирование в интегрированных оптофлюидных системах может включать не только транспорт и область взаимодействия аналита с чувствительным элементом, но и зоны механической и температурной стабилизации измерительного тракта [106].

Литературные данные показывают, что объединение операций уменьшает число ручных стадий и объемы реагентов, однако создает межзонные компромиссы. Геометрия, оптимальная для быстрого смешения, может давать избыточный перепад давления; малая высота инкубации ускоряет диффузионный контакт, но уменьшает запас питательной среды; минимальный объем сенсорной

камеры ускоряет газообмен, но усложняет равномерное размещение подложки и оптическую юстировку. Функциональное зонирование позволяет выявлять такие конфликты до изготовления устройства и назначать каждому участку собственный геометрический критерий.

Проведенный анализ литературы показывает, что определяющим фактором при разработке микрофлюидных устройств является не само уменьшение геометрических размеров системы, а формирование в устройстве заданных пространственных и временных условий взаимодействия компонентов. Следовательно, микрофлюидное устройство целесообразно рассматривать не как пассивную емкость уменьшенного объема, а как физический инструмент пространственно-временной организации взаимодействия. В этом случае проектирование должно начинаться с определения процесса, ограничивающего рассматриваемую систему: смешивания реагентов, времени протекания реакции, диффузионного сближения взаимодействующих компонентов, доставки анализируемой среды к чувствительному элементу либо обеспечения стабильности условий оптического измерения. После определения ограничивающего процесса выбираются характерные размеры функциональной зоны, расходы потоков и время взаимодействия, а затем формируется соответствующая топология устройства. Такой подход соответствует общей направленности работы, в которой геометрические параметры МФУ используются для управления гидродинамическими характеристиками и условиями протекания физико-химических и биологических процессов.

ГЛАВА 2. Экспериментальная методология: методы, фабрикация и характеризация

Реализация поставленной цели диссертации потребовала интеграции методов материаловедения, структурной характеризации, микрофлюидных технологий и клеточной инженерии. При этом единым инструментальным подходом для решения трех рассматриваемых задач являлось использование микрофлюидных устройств, в которых геометрия функциональных областей конструктивно задает пространственные и временные условия взаимодействия объектов. Общими элементами такого подхода являлись ограничение рабочего объема, управление характерными расстояниями переноса, задание времени пребывания или инкубации, а также пространственное совмещение или разделение отдельных функциональных стадий процесса. Таким образом, различающиеся по физической природе задачи решались на основе общего принципа – конструктивно заданной пространственно-временной организации взаимодействия в микрофлюидном устройстве.

Во-первых, для решения задачи синтеза наноразмерного карбоната кальция был использован микрофлюидный подход при проектировании такого типа устройства. В данном случае функциональная геометрия устройства обеспечивала последовательное введение реагентов и пространственное разделение стадий их смешивания, формирования частиц и последующей функционализации. Изменение расходов потоков позволяло управлять скоростью движения реагентов и временем их пребывания между отдельными функциональными зонами. Ключевым конструктивным элементом являлось разделение зон нуклеации, роста и функционализации, позволяющее раздельно варьировать условия отдельных стадий синтеза.

Во-вторых, для преодоления ограничений современных протоколов клеточной терапии микрофлюидный подход был реализован посредством геометрического ограничения инкубационного пространства Т-лимфоцитов и

лентивирусных носителей. В отличие от стандартных методик, предусматривающих продолжительное *ex vivo*-культивирование, разработанное устройство объединяет активацию и трансдукцию Т-лимфоцитов в единой инкубационной области в течение 24 ч. Общий для работы принцип пространственно-временной организации взаимодействия в данном случае реализуется не посредством последовательного расположения реакционных зон, а посредством задания глубины канала, площади и рабочего объема инкубационной области, ограничивающих характерное расстояние между клетками и вирусными частицами. Таким образом, в этой задаче функциональная геометрия используется для управления условиями массопереноса и продолжительностью взаимодействия биологических объектов.

В-третьих, тот же микрофлюидный принцип был использован при разработке оптического сенсора влажности, однако здесь функциональная геометрия предназначена для организации подвода газовой среды к чувствительному материалу и его пространственного сопряжения с системой оптической регистрации. В качестве чувствительного элемента использовались перовскитные нанокристаллы $CsPbBr_3$ сформированные внутри пористой матрицы частиц $CaCO_3$. Для реализации измерительной системы был применен аддитивный подход с изготовлением 3D-печатной микрофлюидной кюветы, обеспечивающей подвод газовой среды к подложке с $CsPbBr_3@CaCO_3$ и оптический доступ к чувствительному слою. В приборной реализации фотолюминесценция возбуждалась светодиодом с длиной волны 395 нм, отделялась от возбуждающего излучения фильтром с границей пропускания 500 нм и регистрировалась фотодиодом.

Таким образом, несмотря на различие исследуемых процессов – соосаждение и функционализация наночастиц, взаимодействие клеток с вирусными носителями и оптический отклик чувствительного материала на влажность, – во всех трех случаях используется единый микрофлюидный подход, основанный на задании геометрией устройства:

- характерного пространства взаимодействия;

- расстояния массопереноса;
- времени пребывания или инкубации;
- последовательности функциональных стадий;
- условий подвода среды и регистрации отклика.

Именно это позволяет рассматривать разработанные системы не как три независимых применения микрофлюидики, а как реализации одного приборного принципа: перехода от требуемого физического взаимодействия к функциональной геометрии микрофлюидного устройства, конструктивно задающей его пространственные и временные характеристики.

2.1 Материалы

2.1.1 Материалы для синтеза $CaCO_3$

Для синтеза наноразмерных частиц карбоната кальция использовались хлорид кальция ($CaCl_2$, ≥99 %, Sigma-Aldrich, Merck Life Science, США), карбонат натрия (Na_2CO_3, ≥99 %, Sigma-Aldrich, Merck Life Science, США), этиленгликоль ($C_2H_6O_2$, ≥99 %, LenReactiv, Россия) для контроля размера частиц и остановки реакции, декстран сульфат (BioFroxx, Германия, 2 мг/мл) для тех же задач.

В качестве загрузки активных биомолекул использовались доксорубицин (DOX, Actavis-group, Исландия), бычий сывороточный альбумин, меченный Cy5 (Cy5-BSA, 66 кДа, CSL Behring, Швейцария), плазмидная ДНК, кодирующая зеленый флуоресцентный белок (pDNA-GFP, Lonza, Базель, Швейцария).

Для биологических исследований использовали следующие среды и растворы: альфа-МЕМ (Biolot, Россия), фосфатно-солевой буфер (Lonza, Швейцария), эмбриональная бычья сыворотка (FBS, HyClone, США), трипсин-EDTA (Capricorn Scientific, Германия), родамин B (≥95 %, Sigma-Aldrich, США), МТТ-реагент (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.2 Материалы для создания CAR-T клеточного продукта

Для производства CAR-T клеток применялись мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), выделенные из аферез-продуктов здоровых доноров.

Для выделения и активации Т-лимфоцитов использовались антитела к TCRα/β, конъюгированные с биотином (Miltenyi Biotec, Германия), антибиотиновые магнитные микрочастицы (Miltenyi Biotec, Германия), наночастицы для активации Т-клеток, покрытые антителами к CD3 и CD28 (Enceed™, GenScript Biotech, США), антитела к CD4/CD8 (GenScript Biotech, США).

Для биологических исследований использовали следующие среды и добавки: X-VIVO 15 (Lonza, Швейцария), инактивированная человеческая сыворотка (5 %, HiMedia, Индия), интерлейкин-7 (IL-7, 10 нг/мл, BioLegend, США), интерлейкин-15 (IL-15, 10 нг/мл, BioLegend, США), протамина сульфат (10 мкг/мл, Ellara, Россия).

В качестве вирусного носителя использовался лентивирусный вектор (ЛВ) третьего поколения, псевдотипизированный гликопротеином везикулярного стоматита (VSV-G), несущий ген химерного антигенного рецептора (CAR) против CD19 (домен связывания FMC63, сигнальные домены 4-1BB и CD3ζ).

Для анализа и проточной цитометрии использовали следующие антитела и красители: anti-CD3-FITC (Elabscience, клон UCHT1), anti-CD45RO-APC (BioLegend, клон UCHL1), anti-CCR7-PE/Cyanine7 (BioLegend, клон G043H7), anti-CD8-Elab Fluor Violet 450 (Elabscience, клон OKT-8), anti-CD4-PerCP/Cyanine5.5 (BioLegend, клон OKT-4), anti-FMC63-PE (ACROBiosystems, Cat. No FM3-PY54G0), LIVE/DEAD Draq7 (BioLegend).

2.1.3 Материалы для синтеза гибридной структуры $CsPbBr_3@CaCO_3$

Для синтеза $CsPbBr_3@CaCO_3$ использовался бромид свинца (II) ($PbBr_2$, 99.998 % по содержанию примесей, TCI Chemicals), бромид цезия (CsBr, 99.9 %, Sigma-Aldrich), бромид кальция ($CaBr_2$, 99.98 %, Sigma-Aldrich), карбонат натрия

(Na_2CO_3, ≥99.0 %, Sigma-Aldrich), диметилсульфоксид (DMSO, ≥99 %, ECOS), этанол (технический, 95 %, Vecton), деионизированная вода Milli-Q (Millipore, США).

2.2 Фабрикация микрофлюидного устройства

2.2.1 Создание модели микрофлюидного устройства

Для проектирования микрофлюидного устройства был применен комбинированный метод цифрового моделирования и аддитивного производства, обеспечивающий высокую точность геометрического исполнения и оперативность прототипирования. На первом этапе разработки была создана трехмерная модель устройства в системах автоматизированного производства (КОМПАС-3D, AutoCAD) с учетом требований к геометрии каналов.

Физическая реализация мастер-формы осуществлялась посредством аддитивного производства на основе фотополимерного материала (Eryone, China) с использованием 3D-принтера Phrozen Sonic Mini 4K, обладающего разрешением печати до 50 мкм.

Применение аддитивных технологий вместо традиционного метода изготовления мастер-формы на основе фотолитографии на кремниевых подложках позволило существенно сократить временные затраты на этапе прототипирования: от нескольких дней (в случае классического литографического цикла) до нескольких часов.

2.2.2 «Мягкая» литография

После печати мастер-формы микрофлюидное устройство изготавливалось по технологии «мягкой» литографии. Для этого применялся полидиметилсилоксан (ПДМС, Sylgard 184, Dow Corning, США), который смешивали в соотношении отвердителя к основному компоненту 1:10. Полученную смесь заливали в пластиковую мастер-форму и подвергали термическому отверждению при

температуре 80 °C в течение 2 часов. После отверждения ПДМС реплика герметично соединялась со стеклянной подложкой под воздействием кислородной плазмы при режиме 80 Вт и 22 с. для создания неразъемного соединения. Выбор ПДМС обусловлен его биосовместимостью, оптической прозрачностью и высокой газопроницаемостью, что делает его удобным материалом для микрофлюидных устройств, используемых в биологических исследованиях

2.3 Описание экспериментального стенда

2.3.1 Микрофлюидное устройство для синтеза и функционализации $CaCO_3$

Разработанная геометрия микрофлюидного устройства включала три входных канала и один выходной канал, предназначенные для точного управления потоками реагентов и последующего сбора синтезированного продукта. Выбор данной конфигурации обусловлен необходимостью обеспечения контролируемого смешивания компонентов, инициации нуклеации частиц и их последующей функционализации в условиях стабильного непрерывного ламинарного течения. Геометрические параметры устройства представлены на рисунке 4. Технологический путь фабрикации МФУ представлен на Рисунке 5

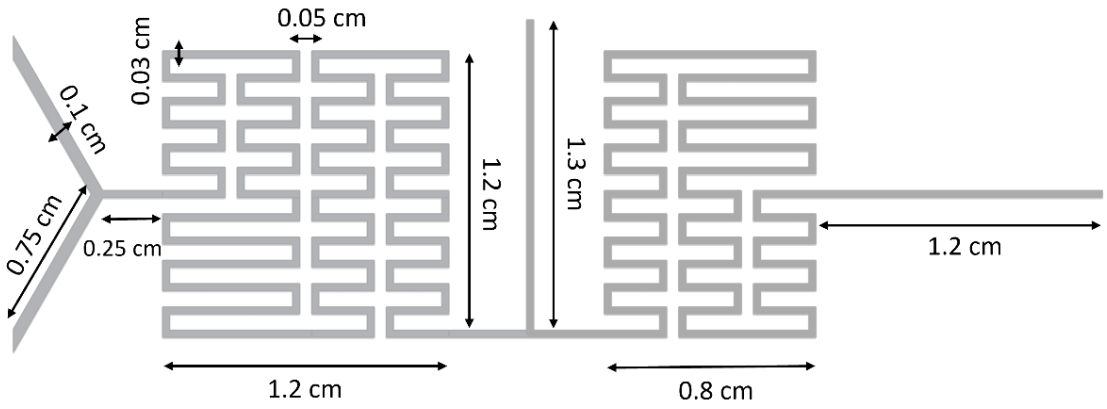


Рисунок 4 – Чертеж микрофлюидного устройства.

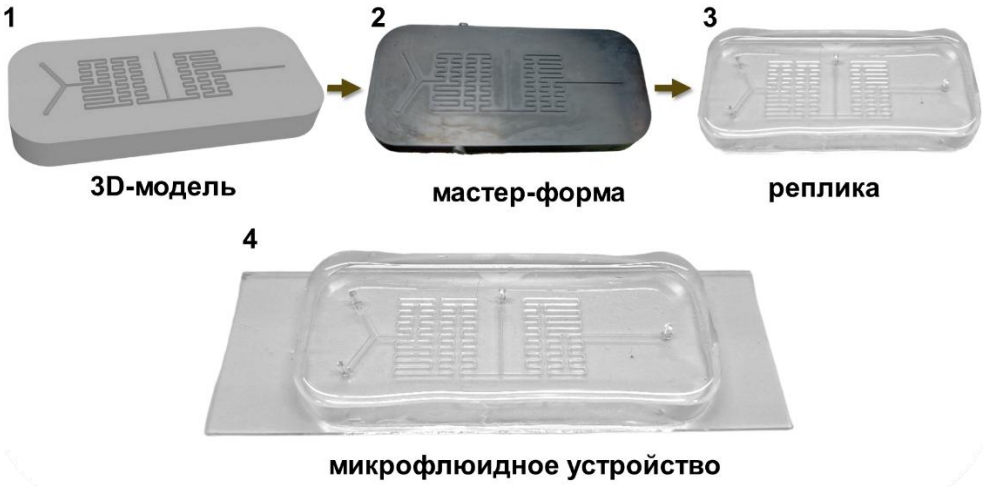


Рисунок 5 – Технологический путь фабрикации МФУ для синтеза и функционализации частиц $CaCO_3$: 1) 3D-модель, используемая для печати мастер-формы, 2) мастер-форма, 3) реплика, полученная методом мягкой литографии, 4) микрофлюидное устройство в сборе

Движение жидкостей и реагентов внутри микрофлюидного устройства осуществлялось с использованием прецизионных шприцевых насосов Harvard Apparatus 11 Pico Plus Elite (рисунок 6), обеспечивающих высокую точность подачи потока в широком диапазоне скоростей. В зависимости от конфигурации (двухканальная или одноканальная версия) насосы позволяют регулировать объемную скорость потока в интервале от 0.54 пЛ/мин до 11.70 мл/мин (для двухканальной модели) или от 0.54 пЛ/мин до 39.77 мл/мин (для одноканальной).



Рисунок 6 – Шприцевой насос Harvard Apparatus 11 Pico Plus Elite

2.3.2 Микрофлюидное устройство для производства CAR-T клеток

В рамках настоящего исследования были рассмотрены две геометрические конфигурации микрофлюидных устройств, предназначенные для инкубации смеси лентивирусных векторов и Т-лимфоцитов: змеевидная геометрия (рисунок 7 – А) и геометрия с увеличенной площадью инкубационной зоны (рисунок 7 – В). Обе топологии обладали структурно идентичной функциональной геометрией: каждое устройство включало один входной канал, центральную инкубационную зону и один выходной канал для сбора продукта. Ключевое различие между устройствами заключалось в размерах инкубационной области: для змеевидной геометрии она составляла 1.66 см^2, тогда как для модифицированной конструкции – 10 см^2, что соответствует значительному увеличению области инкубации.

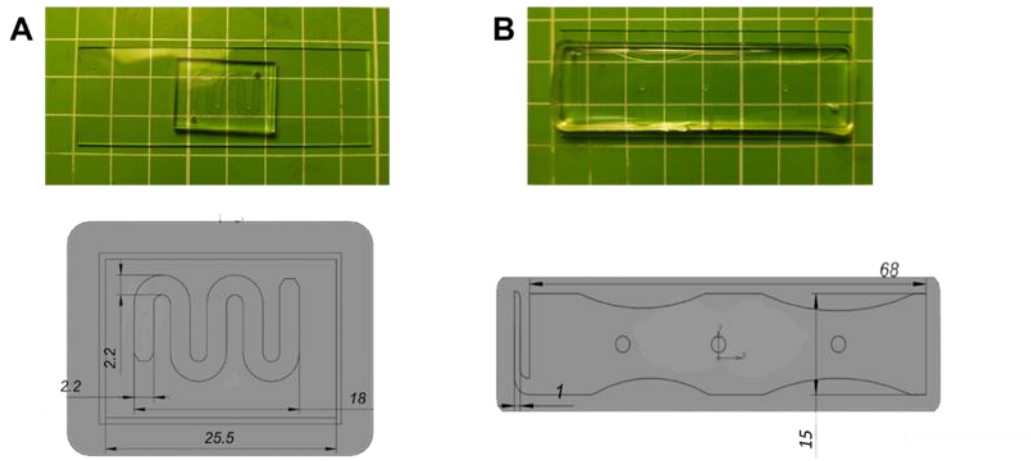


Рисунок 7 – (A) Микрофлюидное устройство со змеевидным каналом; (B) микрофлюидное устройство с увеличенной площадью инкубации [77].

Первое устройство представляло собой канал, выполненный в виде змеевика, который одновременно выполнял роль инкубационной камеры; объем этой зоны варьировался от 8.3 мкл до 33.2 мкл в зависимости от высоты канала, которая устанавливалась на уровнях 50, 100, 150 и 200 мкм соответственно. Вторая геометрия отличалось наличием расширенной инкубационной зоны с фиксированным объемом 120 мкл при высоте канала 150 мкм; в центральной части этой зоны были предусмотрены вертикальные опорные столбики, которые служили технологическим элементом, обеспечивающим механическую стабильность ПДМС реплики при плазменной активации поверхности и последующем соединении с стеклянной подложкой, тем самым снижая риск деформации эластичного полимера и обеспечивая надежное герметичное соединение без образования негерметичных участков или просачивания жидкости по периметру камеры.

2.3.3 Камера сенсора влажности

Для реализации экспериментов, направленных на исследование механизма флуоресцентного отклика гибридных структур $CsPbBr_3@CaCO_3$ при воздействии водяных паров и диоксида углерода, а также для создания прототипа сенсора

влажности использовались два устройства: структурно схожие, однако имеющие некоторые различия.

Часть экспериментов осуществлялись на специально сконструированной установке, обеспечивающей стабильный контроль градиента газового потока и позволяющей регистрировать спектры флуоресценции образцов при постоянной температуре 24 °C (рисунок 8).

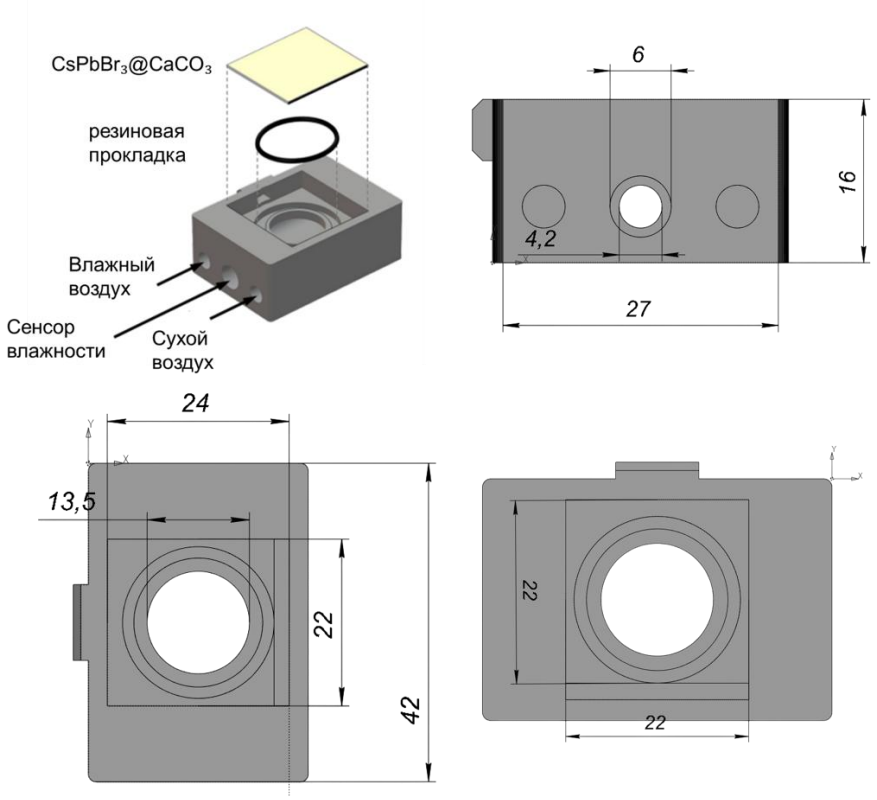


Рисунок 8 – Устройство для контроля градиента потока газа и его геометрические размеры [107]

Устройство выполнено в виде герметичной прямоугольной камеры, оснащенной входными и выходными отверстиями для подачи сухого и влажного воздуха, а также портом для подключения внешнего датчика влажности. Верхняя часть камеры содержит специально спроектированное оптическое окно, обеспечивающее беспрепятственный доступ возбуждающего излучения к образцу и сбор эмиссионного сигнала. На внутренней поверхности окна на стекле размещались композитные пленки на основе $CsPbBr_3@CaCO_3$, функционирующие в качестве активного элемента сенсора и демонстрирующие изменение

интенсивности флуоресценции в ответ на вариации относительной влажности проходящего воздушного/газового потока. Вторая часть экспериментов осуществлялась с использованием несколько видоизменного, но сходного по функциональному признаку, устройства (рисунок 9).

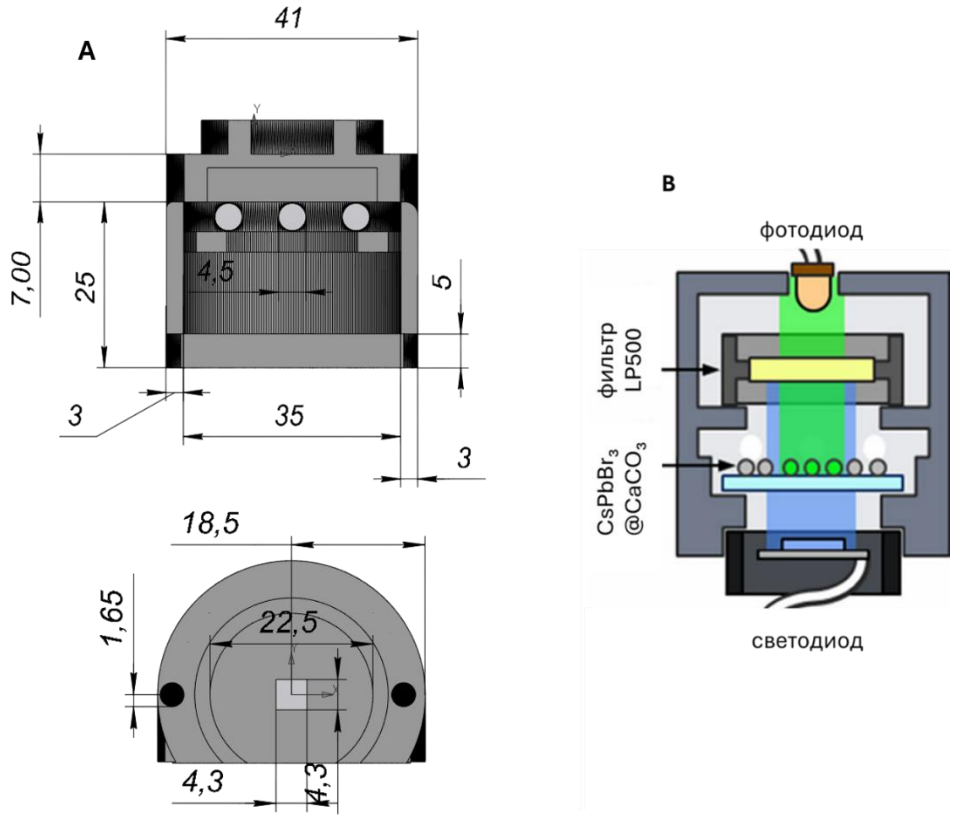


Рисунок 9 – (A) Камера сенсора влажности вид сбоку и сверху; (B) схематическое изображение сенсора влажности в сборе [107]

2.4 Расчетные параметры и физические режимы работы микрофлюидных устройств

Для сопоставления трех разработанных устройств использовали расчетную схему, основанную на разделении характерных пространственных и временных масштабов. Для прямоугольного канала площадью поперечного сечения A и гидравлическим диаметром D_h применяли выражения (25) и (26). Среднюю

скорость потока определяли используя выражение (28), а число Рейнольдса – (33). Для оценки соотношения конвективного и диффузионного переноса использовали Pe_h и Pe_L рассчитанные по формулам (35) и (36). Условие $\mathrm{Pe}_L \gg 1$ означает, что продольный перенос определяется преимущественно конвекцией, но само по себе не доказывает завершение смешения соседних ламинарных потоков. Поэтому поперечное смешение оценивали через диффузионное время согласно формуле (31). Время пребывания рассчитывали по формулам (29) и (30). Отношение расчетного времени поперечной диффузии к времени пребывания определяли по выражению (37) и использовали как критерий достаточности времени для поперечной диффузии. В этом выражении поперечный масштаб входит в квадрате, поскольку диффузионное время пропорционально $l_\perp^2$. При $\Pi_\perp < 1$ расчетное время поперечной диффузии меньше времени пребывания, тогда как при $\Pi_\perp > 1$ оно превышает время пребывания. Поэтому завершение смешения за время прохождения устройства возможно только при уменьшении эффективного поперечного диффузионного пути, обусловленном растяжением и перераспределением границы раздела потоков в змеевидном пассивном элементе смешивания.

2.4.1 Конфигурация А. Устройство для синтеза наноразмерных частиц $CaCO_3$

Устройство включает два входа для растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3, первый змеевидный пассивный элемент смешивания, третий вход для раствора декстрансульфата или загружаемого вещества и второй пассивный элемент смешивания. Нуклеация начинается в месте объединения первых двух потоков; участок до третьего входа является зоной нуклеации и последующего роста частиц. Подача декстрансульфата через третий вход прекращает дальнейшее соосаждение и переводит поток в зону стабилизации или функционализации.

Согласно чертежу, ширина входных каналов 1 и 2 составляет $w_{in} = 0.1$ см = 1 мм, а ширина канала первого пассивного смесителя - $w = 0.03$ см = 300 мкм, $h =$ 1 мм = 1000 мкм.

$$A = wh = 300 \cdot 1000 = 3.0 \cdot 10^5 \text{ мкм}^2 = 3.0 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2,$$

$$D_h = \frac{2 \cdot 300 \cdot 1000}{300 + 1000} = 461.5 \text{ мкм} = 4.615 \cdot 10^{-4} \text{ м}.$$

В серии $\gamma_1 - \gamma_5$ расходы каждого из двух прекурсоров равны $q = 0.025 - 0.4$ мл/мин, а расход третьего потока - $Q_3 = 10q$. Поэтому локальный расход в зоне нуклеации и роста до третьего входа равен

$$Q_{nuc} = Q_1 + Q_2 = 2q,$$

а после третьего входа

$$Q_{post} = Q_1 + Q_2 + Q_3 = 12q.$$

Такое разделение необходимо, поскольку размер частиц определяется временем до введения декстрансульфата, тогда как нагрузка на второй смеситель определяется суммой трех потоков.

При $L_\Sigma = 186{,}7$ мм и высоте $h = 1$ мм геометрический объем зоны до третьего входа равен:

$$V_{nuc} = whL_\Sigma = 0.300 \cdot 1 \cdot 186.7 = 56 \text{ мм}^3 = 56 \text{ мкл}.$$

Полученный геометрический объём позволяет рассчитать время пребывания в зоне нуклеации:

$$\tau_{\text{res}} = \frac{V_{nuc}}{Q_{\text{nuc}}} \tag{38}$$

Для режимов γ_1–γ_5 время пребывания рассчитывается как

$$\tau_{\gamma_i} = \frac{60 \cdot 0{,}056}{Q_1 + Q_2}$$

Таблица 1 – Расход, расчетное время пребывание в зоне нуклеации до третьего входа.

Режим	**Q1+Q2, мл/мин**	**τ_res, с**	**V_nuc, мкл**
γ_1	0.050	67.2	56
γ_2	0.100	33.6	
γ_3	0.200	16.8	
γ_4	0.400	8.4	
γ_5	0.800	4.2	

Для оценки Re_h в зоне до третьего входа использовали литературную оценку свойств смеси вода-этиленгликоль 15:85 об. % при 298 К: $\rho = 1102$ кг/м^3 и $\mu = 1.01 \cdot 10^{-2}$ Па·с [108]. Для числа Пекле производили оценку согласно:

$$D_{i,mix} \approx D_{i,\omega} \frac{\mu_\omega}{\mu_{mix}} \quad (39)$$

где $\mu_\omega = 0.890 \cdot 10^{-3}$ Па · с, $D_{Ca,\omega} = 0.793 \cdot 10^{-9}$ м^2/с, $\mu_{mix} = 1.01 \cdot 10^{-2}$ Па · с [109]. Коэффициент диффузии при такой оценке порядка величины был равен $D = 7 \cdot 10^{-11}$ м²/с.

Таблица 2 – Безразмерные параметры в зоне нуклеации и роста.

Режим	Re_h	Pe_h	Pe_L
γ_1	0.140	$1.83 \cdot 10^4$	$7.41 \cdot 10^6$
γ_2	0.280	$3.66 \cdot 10^4$	$1.48 \cdot 10^7$
γ_3	0.560	$7.33 \cdot 10^4$	$2.96 \cdot 10^7$
γ_4	1.12	$1.47 \cdot 10^5$	$5.93 \cdot 10^7$
γ_5	2.24	$2.93 \cdot 10^5$	$1.19 \cdot 10^8$

Полученный диапазон $Re_h = 0.14 - 2.24$ количественно подтверждает ламинарный режим в зоне нуклеации и роста. Число Pe_h изменяется от $1.83 \cdot 10^4$ до $2.93 \cdot 10^5$. Диапазон $Pe_L = 7.41 \cdot 10^6 - 1.19 \cdot 10^8$ показывает, что продольный перенос на длине реакционного змеевика определяется конвекцией.

Для оценки поперечного смешения двух соседних потоков принимали

$$l_\perp = \frac{w}{2} = 150 \text{ мкм.}$$

При принятом $D = 7.0 \cdot 10^{-11}$ м²/с

$$\tau_D = \frac{(150 \cdot 10^{-6})^2}{2 \cdot 7.0 \cdot 10^{-11}} = 160.7 \text{ с.}$$

Таблица 3 – Сопоставление времени поперечной диффузии и времени пребывания

Режим	τ_D, **с**	τ_{res}, **с**	$\Pi_\perp = \tau_D/\tau_{res}$
γ_1	160.7	67.2	2.39
γ_2	160.7	33.6	4.78
γ_3	160.7	16.8	9.57
γ_4	160.7	8.4	19.1
γ_5	160.7	4.2	38.3

Во всех режимах $\gamma_1 - \gamma_5$ выполняется условие $\Pi_\perp > 1$: расчетное время диффузии через половину ширины канала превышает время пребывания. Следовательно, чистой молекулярной диффузии через 150 мкм недостаточно во всей серии расходов. Поэтому завершение смешения за время прохождения устройства возможно только при уменьшении эффективного поперечного диффузионного пути, обусловленном растяжением и перераспределением границы раздела потоков в змеевидном пассивном смесителе. Уменьшение времени пребывания от 67.2 до 4.2 с при сохранении ламинарного режима остается аппаратным параметром управления продолжительностью соосаждения частиц $CaCO_3$.

2.4.2 Конфигурация B. Устройство модификации CAR-T клеток

Для инкубации смеси Т-лимфоцитов, активирующих частиц и лентивирусного вектора использовали две топологии: змеевидный канал с площадью инкубационной области 1.66 см^2 и устройство с увеличенной площадью инкубации 10 см^2. Обе топологии включают один вход, центральную

инкубационную область и один выход. В отличие от конфигурации А, основная стадия трансдукции протекает после заполнения устройства в статическом режиме; поэтому расход, скорость, Re_h и проточное время пребывания не являются определяющими параметрами 24-часовой инкубации.

Для змеевидной топологии геометрический объем вычисляется как

$$V_{inc} = S_{inc}h \tag{40}$$

Таблица 4 – Связь высоты и рабочего объема змеевидной геометрии.

Высота, см	**Объем, см^3**	**Рабочий объем, мкл**
0.005	0.0083	8.3
0.010	0.0166	16.6
0.015	0.0249	24.9
0.020	0.0332	33.2

Высота 150 мкм соответствует рабочему объему 25 мкл и была выбрана как компромисс между сокращением диффузионного пути и воспроизводимостью дозирования. При высоте 50 мкм объем уменьшается до 8.3 мкл, что повышает относительный вклад инструментальной ошибки при загрузке образца.

Для увеличенной топологии произведение площади 10 см^2 и высоты 0.015 см дает номинальный объем 150 мкл:

$$V_{ext} = 10 \cdot 0.015 = 0.150 \text{ см}^3 = 150 \text{ мкл}.$$

Однако в итоговом протоколе в устройство загружали 110 мкл, что связано с тем, что площадь 10 см^2 характеризует планарную область устройства, тогда как открытый объем уменьшается за счет опорных столбиков, периферии и незаполняемых участков. Эффективная открытая площадь, соответствующая 120 мкл, равна

$$S_{eff} = \frac{120 \text{ мкл}}{0.015 \text{ см}} = 8 \text{ см}^2$$

Ключевой расчетный параметр конфигурации B – поперечное диффузионное время. При равномерном распределении объектов по высоте характерный путь до ближайшей ограничивающей плоскости принимается равным половине высоты:

$$l_{\perp} = \frac{h}{2} = 75 \text{ мкм}.$$

При оценочном коэффициенте диффузии лентивирусного вектора $D_{LV} = 1.3$ мкм^2/с [110], поперечное диффузионное время равно:

$$\tau_D = \frac{l_{\perp}^2}{2D_{LV}} = \frac{75^2}{2 \cdot 1.3} = 2163 \text{ с} = 36.1 \text{ мин}.$$

2.4.3 Конфигурация C. 3D-печатная камера оптического сенсора влажности

Конфигурация C представляет собой 3D-печатную газовую кювету с двумя вводами – сухой и увлажненной газовых ветвей, портом контрольного датчика влажности и оптическим окном. На стеклянной подложке в зоне оптического контроля размещен композит $CsPbBr_3@CaCO_3$. Возбуждение в прототипе осуществлялось светодиодом 395 нм, возбуждающее излучение отсекалось длинноволновым фильтром 500 нм, а фотолюминесценция регистрировалась фотодиодом.

Внутренние размеры камеры составляли 22 × 22 мм при высоте 5 мм. Номинальный геометрический объем был равен:

$$V_{ch} = 22 \cdot 22 \cdot 5 = 2420 \text{ мм}^3 = 2.42 \text{ мл}.$$

Фактический свободный газовый объем меньше вследствие размещения стеклянной подложки, контрольного датчика, уплотнения и элементов корпуса, выступающих внутрь камеры.

Оба газовых ввода и контрольный датчик сообщались с общей рабочей полостью, поэтому представленная геометрия не соответствовала последовательному проточному каналу постоянного сечения. Размещение контрольного датчика между портами сухой и увлажненной атмосфер обеспечивало измерение параметров среды в том же объёме, в котором находился чувствительный материал.

Геометрия сенсора влажности обеспечивала взаимное центрирование источника возбуждения, образца, спектрального фильтра и фотоприёмника. По конструктивному чертежу внешний поперечный размер корпуса составлял 41 мм, внутренний размер – 35 мм, а толщина боковых стенок – 3 мм.

В прототипе светодиод, стеклянная подложка с $CsPbBr_3@CaCO_3$, длиннопропускающий фильтр LP500 и фотодиод располагались на общей оптической оси. Светодиод находился со стороны прозрачной подложки и возбуждал чувствительный слой излучением с длиной волны 395 нм. Фильтр располагался после образца, непосредственно в канале регистрации перед фотодиодом. Поэтому свет возбуждения достигал чувствительного материала, а излучение, поступавшее на фотодиод, предварительно подвергалось спектральной селекции.

Спектральное сопряжение элементов описывалось следующими значениями:

$$\lambda_{exc} = 395\ \text{нм}, \quad \lambda_{cut} = 500\ \text{нм}, \quad \lambda_{PL,max} \approx 515\ \text{нм}.$$
$$395 < 500 < 515\ \text{нм}.$$

Спектральное расстояние между длиной волны возбуждения и максимумом фотолюминесценции составляло:

$$\Delta\lambda_{PL-exc} = 515 - 395 = 120\ \text{нм}.$$

Граница пропускания фильтра находилась на 105 нм выше длины волны светодиода и на 15 нм ниже максимума фотолюминесценции:

$$500 - 395 = 105\ \text{нм},$$
$$515 - 500 = 15\ \text{нм}.$$

Таким образом, граница пропускания LP500 была расположена между длиной волны возбуждения и максимумом фотолюминесценции $CsPbBr_3@CaCO_3$. Такая спектральная конфигурация обеспечивала подавление возбуждающего излучения 395 нм в канале регистрации и пропускание фотолюминесценции в области максимума около 515 нм.

Сопоставление показывает, что общий принцип проектирования состоит не в выборе одного универсального безразмерного числа, а в согласовании функциональной геометрии с лимитирующим временем конкретного процесса. В

конфигурации A геометрия задает время пребывания и толщину смешиваемых ламелл; в конфигурации B высота ограничивает поперечный диффузионный путь в статической инкубации; в конфигурации C пространственное сопряжение газоподающей, газоконтактной, контрольной и оптической зон обеспечивает размещение чувствительного слоя $CsPbBr_3@CaCO_3$ одновременно в области взаимодействия с анализируемой атмосферой и на общей оси возбуждения и регистрации фотолюминесценции. Таким образом, химические, клеточные и оптические результаты в соответствующих конфигурациях рассматриваются как следствия взаимного расположения функциональных зон, задающего последовательность и условия взаимодействия реагентов, клеток или анализируемой среды с исследуемым образцом.

2.5 Физико-химическая характеризация

2.5.1 Структурная характеризация (СЭМ, ПЭМ)

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) частиц $CaCO_3$ и композитов $CsPbBr_3@CaCO_3$ была выполнена на установке MERLIN (Carl Zeiss) при ускоряющем напряжении 1.5 кВ. Для проведения анализа 3 мкл исследуемого образца наносили на поверхность кремниевой подложки. Полученные изображения подвергались количественному анализу с целью определения среднего размера частиц с использованием специализированного программного обеспечения ImageJ.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) частиц $CaCO_3$ была проведена на установке Zeiss Libra 200 FE при ускоряющем напряжении 200 кВ. Для подготовки образцов 3 мкл исследуемой суспензии наносили на медные сетки, покрытые углеродной пленкой.

2.5.2 Термогравиметрический анализ $CaCO_3$ (ТГА, ДСК)

Термогравиметрия (ТГА) и дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) проводились с использованием термоанализатора NETZSCH STA 449 F1 Jupiter. Измерения выполнялись в атмосфере азота при скорости нагрева 10 К/мин с применением тиглей из сплава платины–родия. Масса навески для образцов составляла 6 мг.

2.5.3 Рентгеновская дифракция (РД)

Для проведения рентгенофазового анализа образцы $CaCO_3$ и структуры $CsPbBr_3@CaCO_3$ наносили на кремниевую подложку. Измерения осуществлялись на рентгеновском дифрактометре Shimadzu 7000-Maxima, оснащенном источником излучения Cu-Kα (Kα$_1$, λ = 1.54059 Å) мощностью 2 кВт. Геометрия съемки соответствовала конфигурации Брегга–Брентано. Угловое разрешение установки составляло 0.01°, скорость сканирования – 1.5°/мин.

2.5.4 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия $CsPbBr_3@CaCO_3$ (РФС)

Измерения элементного состава и химического состояния проводились на спектрометре Escalab 250Xi с AlKα излучением (энергия фотона 1486.6 эВ). Для спектров высокого разрешения, собранных с области 600 мкм, использовался режим постоянной энергии анализатора с энергией пропускания 50 эВ с энергетическим разрешением ≈0.1 эВ.

2.5.5 Инкапсуляция активных биомолекул в частицы $CaCO_3$

Для загрузки доксорубицина в наночастицы $CaCO_3$ готовили водные растворы DOX в декстран сульфате (концентрация основного раствора – 2 мг/мл), разбавленные до конечных концентраций: 0.1; 0.3; 0.5; 0.75 и 1.0 мг/мл. Полученные растворы подавали через третий вход микрофлюидного устройства.

Аналогичным образом осуществляли загрузку флуоресцентно меченого бычьего сывороточного альбумина (Cy5-BSA): готовили растворы в декстран

сульфате (основная концентрация – 2 мг/мл), разбавляя до тех же концентраций (0.1–1.0 мг/мл), и подавали через третий вход.

Для загрузки плазмидной ДНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, в наночастицы $CaCO_3$ к раствору декстран сульфата (2 мг/мл) добавляли 9, 18, 27 или 90 мкг pDNA-GFP и подавали раствор через третий вход.

Для одновременной загрузки двух компонентов (FITC-BSA и Cy5-BSA) применяли следующую процедуру: FITC-BSA (концентрация 0.3 мг/мл) предварительно инкубировали с раствором $CaCl_2$ в течение 10 мин, после чего раствор подавали через второй вход. Раствор Na_2CO_3 подавали через первый вход. Второй раствор Cy5-BSA (0.3 мг/мл в декстран сульфате, 2 мг/мл) подавали через третий вход.

2.6 Измерение флуоресцентного отклика и квантового выхода фотолюминесценции структур $CsPbBr_3@CaCO_3$

2.6.1 Измерение флуоресцентного отклика на относительную влажность (ОВ)

Измерения интенсивности флуоресценции проводились с использованием микроскопа Axio Imager A2m, совмещенного со спектрометром OceanOptics QE Pro. Образцы $CsPbBr_3@CaCO_3$ на стеклянных подложках помещались в кювету, напечатанную на 3D-принтере. Использовался 10x объектив (Carl Zeiss EC EpiplanNEOFLUAR). Источником возбуждения служила ртутная лампа HBO-100 с длинноволновым фильтром с отсечкой 420 нм. Поток газа (азот N_2, углекислый газ CO_2 или сжатый атмосферный воздух) разделялся на две части: одна подавалась в кювету в сухом виде, другая проходила через колбу с водой для обеспечения увлажненной атмосферы. Использовалась пустая колба-ловушка для сбора крупных капель воды. Уровень ОВ регулировался путем изменения соотношения потоков увлажненного и сухого газов с помощью двух игольчатых клапанов. В

кювету был интегрирован датчик влажности и температуры; все измерения проводились при постоянной температуре 24°C. Интенсивность флуоресценции нормализовалась относительно ее значения при 30 % ОВ для каждого конкретного образца.

Относительный оптический отклик материала определяли путем нормировки интенсивности фотолюминесценции относительно значения при 30% ОВ:

$$R(RH) = \frac{I_{RH} - I_0}{I_0} \cdot 100\% \quad (41)$$

При 30% ОВ нормированный отклик равен нулю по определению. Чувствительность к относительной влажности определяли как наклон зависимости нормированного оптического отклика от ОВ:

$$S_{RH} = \frac{\Delta R}{\Delta RH} \quad (42)$$

2.6.2 Измерение квантового выхода фотолюминесценции (КВФЛ)

Измерения КВФЛ для структур $CsPbBr_3@CaCO_3$ проводились с использованием интегрирующей сферы (Labsphere) и непрерывного лазера с длиной волны возбуждения 405 нм. Ослабление мощности осуществлялось с помощью нейтральных фильтров FW212 ND от Thorlabs 1.5.

2.7 Оптическая характеризация

2.7.1 Оценка эффективности инкапсуляции в частицы $CaCO_3$

Для количественной оценки загрузки наночастиц $CaCO_3$ доксорубицином (DOX) и альбумином, меченным Cy5 (Cy5-BSA), были построены калибровочные зависимости оптической плотности от концентрации соответствующего вещества. Для построения калибровочных зависимостей готовили контрольные растворы DOX и Cy5-BSA с концентрациями 0.01; 0.03; 0.05; 0.075 и 0.10 мг/мл. Растворы

готовили в 1 мл водного раствора декстрансульфата с концентрацией 2 мг/мл, соответствующего среде, подаваемой через третий вход микрофлюидного устройства при загрузке частиц.

Оптическую плотность контрольных растворов регистрировали спектрофотометрически при длине волны 480 нм для DOX и 651 нм для Cy5-BSA. Полученные зависимости оптической плотности от концентрации использовали в качестве калибровочных кривых (рисунок 10).

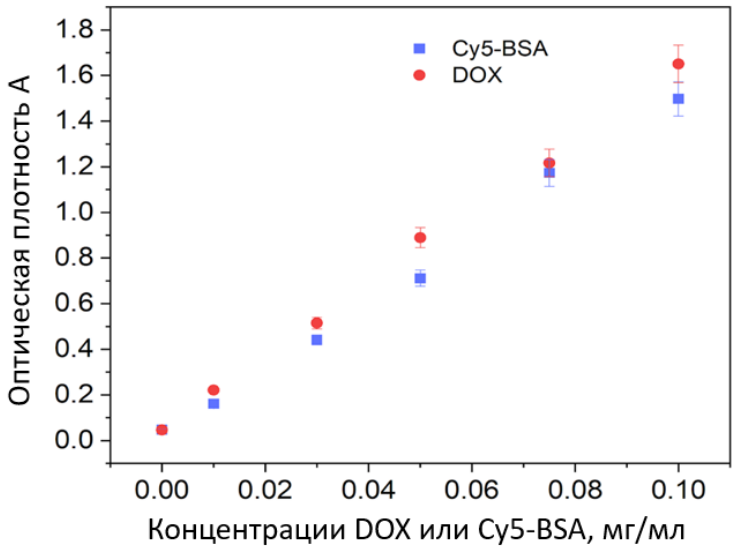


Рисунок 10 – Калибровочные кривые для растворов DOX и Cy5-BSA

Загрузку синтезируемых наночастиц осуществляли непосредственно в микрофлюидном устройстве. Для этого через третий вход МФУ подавали растворы DOX или Cy5-BSA в водном растворе декстрансульфата с концентрацией 2 мг/мл. Концентрация загружаемого вещества составляла 0.1; 0.3; 0.5; 0.75 или 1.0 мг/мл. Таким образом, адсорбция DOX или Cy5-BSA происходила на поверхности формирующихся наночастиц $CaCO_3$ непосредственно в потоке.

Для оценки эффективности загрузки использовали 1 мл суспензии наночастиц $CaCO_3$ с концентрацией 10 мкг/мл, содержащих адсорбированный DOX или Cy5-BSA. Суспензию центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 минут. Содержание неадсорбированного DOX или Cy5-BSA в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически при 480 и 651 нм соответственно.

Для учета фонового поглощения дополнительно регистрировали оптическую плотность суспензии наночастиц $CaCO_3$ и водного раствора декстрансульфата.

Степень адсорбции загружаемого вещества определяли по выражению:

$$\eta_{ads} = \frac{A_{material+NPs} - A_{NPs}}{A_{material} - A_{background}} \times 100\% \quad (43)$$

где η_{ads} – степень адсорбции загружаемого вещества, %; $A_{material+NPs}$– оптическая плотность образца, содержащего загружаемое вещество и наночастицы; A_{NPs} – оптическая плотность суспензии наночастиц; $A_{material}$ – оптическая плотность раствора загружаемого вещества; $A_{background}$ – оптическая плотность фонового раствора декстрансульфата.

Количество адсорбированного вещества рассчитывали по выражению:

$$m_{ads} = \frac{\eta_{ads}}{100}\% \times C_{dil} \times V \quad (44)$$

где m_{ads} – количество адсорбированного вещества, C_{dil} – концентрация разбавленного раствора загружаемого вещества, используемая при спектрофотометрическом определении, V – объем исследуемого раствора.

2.8 Биологическая валидация

2.8.1 Гель-электрофорез

Для качественной и количественной оценки адсорбции плазмидной ДНК (pDNA-GFP) на поверхности наночастиц $CaCO_3$ использовали агарозный гель-электрофорез.

Синтезированные наночастицы (10 мкг/мл) инкубировали с различным количеством pDNA-GFP: 9, 18, 27 и 90 мкг. В качестве контроля использовали 2 мкл чистой pDNA-GFP (концентрация 2 мг/мл). Каждую пробу смешивали с 6× буфером (DNA Gel Loading Dye, Thermo Fisher Scientific), затем наносили на 1%-ный агарозный гель (TopVision), предварительно окрашенный этидий бромидом

(EtBr, 0.1 мкг/мл). Электрофорез проводили в буфере TAE при напряжении 80 В в течение 40 мин. Визуализацию осуществляли с помощью KVANT 312 (Helicon).

Для количественной оценки степени загрузки полученные изображения геля конвертировали в 32-битный формат. В качестве контрольной полосы использовали с чистой pDNA-GFP. Интенсивность сигнала каждой полосы анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ. По соотношению интенсивностей серого цвета относительно контроля рассчитывали количество адсорбированной pDNA-GFP по следующей формуле:

$$m = \frac{A \times m_0}{A_0} \quad (45)$$

где: m – масса адсорбированной pDNA-GFP, мкг

A – значение уровня серого у образца,

m_0 – масса контрольного образца, мкг

A_0 – значение уровня серого у контрольного образца.

2.8.2 Жизнеспособность

Жизнеспособность клеток оценивалась различными методами. Для оценки жизнеспособности эмбриональных почечных клеток человека (HEK293) применяли колориметрический MTT-тест. Клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 5×10^3 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч с наночастицами карбоната кальция, загруженными различными концентрациями доксорубицина или бычьего сывороточного альбумина, меченного Cy5 (0.1, 0.3, 0.5, 0.75 и 1 мг/мл). По окончании инкубации культуральную среду удаляли, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером, после чего в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида, разведенного в 140 мкл культуральной среды, и инкубировали в течение 4 ч. Оптическую плотность образцов регистрировали спектрофотометрически при длине волны возбуждения 495 нм, регистрируя сигнал в диапазоне 500–650 нм.

Жизнеспособность Т-лимфоцитов оценивалась методом проточной цитометрии с использованием красителя DRAQ7.

2.8.3 Проточная цитометрия

Фенотипический профиль исходных Т-лимфоцитов и полученных CAR-T клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Для этого использовали моноклональные антитела, описанные в пункте 2.1.2. Уровень трансдукции Т-клеток определяли с помощью антитела anti-FMC63-PE (ACROBiosystems, каталожный номер FM3-PY54G0), специфичного к химерному антигенному рецептору против CD19.

Клетки инкубировали с anti-FMC63-антителами в течение 30 мин при 4 °C, после чего добавляли остальные антитела и продолжали инкубацию еще 30 мин при 4 °C. Затем клетки дважды промывали в 2 мл фосфатно-солевого буфера и окрашивали клетки с помощью красителя LIVE/DEAD DRAQ7 (BioLegend) в течение 15 мин при 4 °C.

Анализ проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences), а полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis (Beckman Coulter).

2.8.4 Интернализация

Интернализацию $CaCO_3$ клетками анализировали двумя методами:

1) с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Клетки инкубировали 24 часа с разными концентрациями частиц карбоната кальция (2.5, 5, 10, 20, и 30 мкг/мл), загруженных Cy5-BSA, фиксировали формалином и окрашивали мембраны Родамином B. Интернализацию оценивали с использованием Zeiss LSM 710 CLSM (Германия). Апертура была установлена на уровне 1 Эйри, изображения были сняты с использованием 10x и 40x объективов.

2) с помощью проточной цитометрии (BD FACSCanto II). Клетки высевали в 12-луночные планшеты из расчета 1×10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение 12 часов. Затем к клеткам добавляли $CaCO_3$, загруженные

Cy5-BSA, в конечных концентрациях 2.5, 5, 10, 20 и 30 мкг/мл, и инкубировали в течение 24 ч. По окончании инкубации клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером, отделяли с помощью раствора трипсина, ресуспендировали в ПБС и подвергали анализу методом проточной цитометрии.

2.8.5 Функциональность

Для оценки эффективности трансфекции клетки линии HEK293 высевали в 12-луночные планшеты из расчета 1×10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение 12 часов. Затем к клеткам добавляли наночастицы карбоната кальция в фиксированной концентрации 10 мкг/мл, загруженные различными количествами плазмидной ДНК (1.2, 3.4, 5.6 и 24.8 мкг), и инкубировали в течение 48 ч. По окончании инкубации клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером, отделяли с помощью раствора трипсина, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и подвергали анализу интенсивности экспрессии зеленого флуоресцентного белка методом проточной цитометрии на устройстве BD FACSCanto II.

Для оценки цитотоксической активности CAR-T клеток проводили ко-культивирование 50×10^3 CAR-T клеток с 200×10^3 опухолевых клеток линии NALM-6 (B-клеточный острый лимфобластный лейкоз) в объеме культуральной среды, достаточном для инкубации в течение 72 ч. По истечении этого периода проводили второй раунд цитотоксического теста: в культуру дополнительно вносили 200×10^3 клеток NALM-6 и продолжали инкубацию еще 72 ч.

В качестве контрольных групп использовали:

– NALM-6 – культуру, содержащую только опухолевые клетки NALM-6 без добавления CAR-T клеток;

– NALM-6 + T-клетки – культуру, содержащую клетки NALM-6 в сочетании с нетрансдуцированными T-лимфоцитами.

После завершения второго раунда сокультивирования проводили подсчет общего количества клеток и анализ методом проточной цитометрии (BD FACSAria

III) для определения доли опухолевых клеток и CAR-T клеток в общей клеточной популяции. На основании полученных данных оценивали пролиферативную активность CAR-T клеток и остаточную опухолевую нагрузку.

В главе 2 сформирована экспериментально-методическая база для исследования и реализации микрофлюидных систем, предназначенных для решения задач различной физической природы. Основу используемого подхода составляет проектирование функциональной геометрии микрофлюидного устройства, посредством которой задаются пространственные и временные условия протекания исследуемого процесса: характерные расстояния переноса, время пребывания или инкубации, последовательность взаимодействия компонентов и условия подвода анализируемой среды.

Для изготовления микрофлюидных устройств использован комплекс методов, включающий трехмерное проектирование, аддитивное изготовление мастер-форм и технологию «мягкой» литографии с формированием ПДМС-реплик и их плазменным соединением со стеклянной подложкой. Такой технологический подход обеспечивает возможность варьирования геометрии функциональных областей МФУ в зависимости от решаемой экспериментальной задачи.

Для синтеза и функционализации частиц $CaCO_3$ разработана микрофлюидная конфигурация с тремя входами, в которой геометрия каналов и управление расходами потоков обеспечивают последовательное протекание стадий смешивания реагентов, формирования частиц и их последующей функционализации. Таким образом, микрофлюидное устройство используется как инструмент управления пространственно-временными условиями синтеза и позволяет исследовать взаимосвязь между параметрами проведения процесса и характеристиками получаемых частиц. Предложенная схема также обеспечивает возможность загрузки частиц различными соединениями непосредственно в процессе их формирования.

Для получения CAR-T-клеточного продукта применен иной способ реализации того же приборного принципа – ограничение инкубационного

пространства геометрией микрофлюидного канала. Варьирование высоты канала от 50 до 200 мкм, а также площади и объема инкубационной области позволяет изменять характерные расстояния между Т-лимфоцитами и лентивирусными частицами и тем самым управлять условиями их взаимодействия. В данной конфигурации геометрия МФУ выступает уже не средством организации последовательных стадий синтеза, а инструментом управления массопереносом и продолжительностью взаимодействия биологических объектов.

Для исследования оптического отклика $CsPbBr_3@CaCO_3$ разработана микрофлюидная кювета, обеспечивающая подвод газовой среды к чувствительному материалу и его пространственное сопряжение с системой оптической регистрации. Использование регулируемых потоков сухого и увлажненного газа, встроенного контроля относительной влажности и температуры и оптического окна позволяет устанавливать взаимосвязь между параметрами газовой среды и фотолюминесцентным откликом чувствительного материала.

Для независимой характеризации результатов микрофлюидных процессов использован комплекс взаимодополняющих методов. СЭМ и ПЭМ позволяют определять морфологию и размер получаемых частиц; рентгеновская дифракция – их фазовый состав; РФС – элементный состав и химическое состояние компонентов; ТГА и ДСК – термические характеристики материала. Спектрофотометрические измерения и гель-электрофорез применяются для количественной оценки загрузки и адсорбции различных соединений на частицах $CaCO_3$. Спектральные измерения и определение квантового выхода фотолюминесценции обеспечивают характеризацию $CsPbBr_3@CaCO_3$ как оптически активного материала. Биологическая валидация с применением МТТ-теста, конфокальной микроскопии и проточной цитометрии позволяет оценивать жизнеспособность клеток, интернализацию частиц, эффективность трансфекции и трансдукции, фенотип клеточных популяций и функциональную активность полученного клеточного продукта.

Таким образом, совокупность представленных методов формирует единую экспериментальную схему, позволяющую последовательно перейти от проектирования функциональной геометрии микрофлюидного устройства к реализации заданного физического процесса и последующей количественной оценке полученного результата. Разработанная методология может быть использована для трех классов задач: управляемого синтеза и функционализации наноразмерных материалов, организации взаимодействия биологических объектов в ограниченном микрофлюидном объеме и создания проточных оптических измерительных систем. Общим для этих задач является использование геометрии МФУ как управляемого инструментального параметра, задающего пространственные и временные характеристики исследуемого взаимодействия.

ГЛАВА 3. Разработка микрофлюидного подхода для синтеза и загрузки наночастиц карбоната кальция активными биомолекулами

Наночастицы карбоната кальция являются перспективным материалом для систем доставки лекарственных препаратов из-за их высокой биосовместимости, биодеградируемости, доступности исходных реактивов и низкой стоимости производства. В частности, аморфный карбонат кальция, являющийся метстабильной модификацей $CaCO_3$, привлекает внимание благодаря своей пористой структуре и способности к контролируемому высвобождению заключенного в него активного вещества в кислых средах, что делает возможным использование такого типа частиц в области доставки лекарств.

Однако, традиционный метод синтеза с помощью соосаждения хлорида кальция и карбоната натрия характеризуется низкой воспроизводимостью и сложностями в получении частиц нанометрового размера. Для реализации синтеза наноразмерных частиц необходимо использование полимеров, что значительно увеличивает время реакции. Более того, загрузка активных соединений в частицы может проводиться несколькими способами: прямое включение в реакцию смесь до синтеза и адсорбция на поверхности готовых частиц. Оба подхода имеют существенные недостатки в виде изменения pH и дополнительных этапов, которые увеличивают общее время синтеза.

Таким образом основной фокус в данной главе был направлен на разработку устройства и методики синтеза наночастиц, которая позволяет точно контролировать размер и форму, получаемых частиц $CaCO_3$, а также реализовать успешную загрузку получаемых частицы различными типами активных биомолекул, в числе которых доксорубицин, флуоресцентно-меченые белки и плазмидная ДНК, кодирующая зеленый флуоресцентный белок.

3.1 Микрофлюидный синтез и характеристика наночастиц $CaCO_3$

Для достижения контролируемого синтеза наночастиц карбоната кальция использовалось микрофлюидное устройство, имеющее три входных канала и один выходной. Два входных канала предназначались для подачи растворов солей $CaCl_2$ и Na_2CO_3 соответственно. Начало процесса нуклеации $CaCO_3$ происходило в месте соединения двух каналов, с последующем прохождением реакционной смеси через змеевидный канал, предназначенный для эффективного и гомогенного смешивания. В третий входной канал подавался водный раствор декстран сульфата (2 мг/мл), который останавливал реакцию и препятствовал агломерации синтезируемых частиц. Схема концепта эксперимента изображена на рисунке 11.

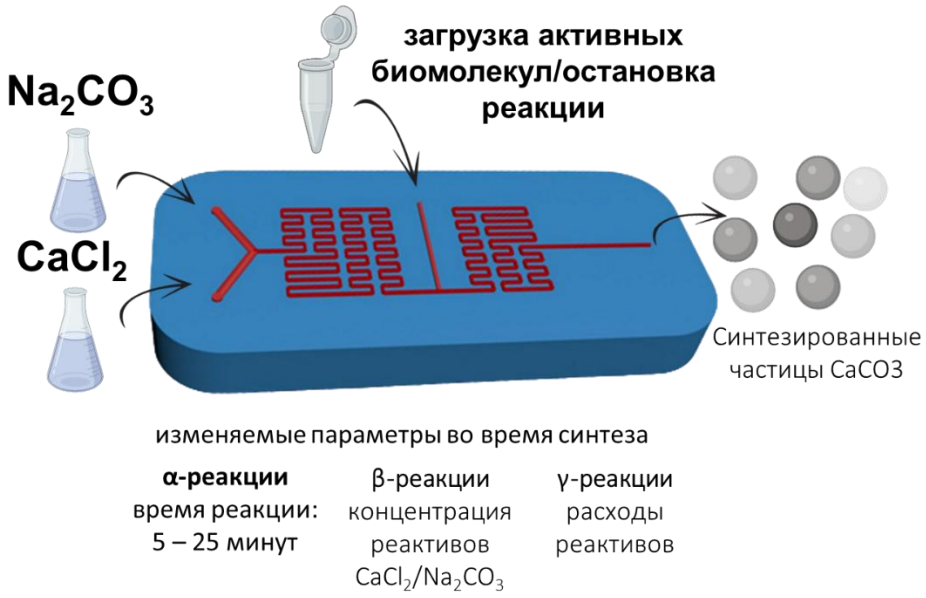


Рисунок 11 – Схема синтеза и инкапсуляции $CaCO_3$ с указанием изменяемых параметров

Для количественного описания гидродинамических и массопереносных условий, формируемых разработанной конфигурацией микрофлюидного устройства, и их связи с продолжительностью соосаждения было проведено численное моделирование полей скоростей (рисунок 12) и концентраций (рисунок 13) растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3. В модели рассматривалась только стадия конвективно-диффузионного переноса двух растворенных компонентов;

нуклеация и рост частиц $CaCO_3$ в расчетную схему не включались. Поэтому результаты моделирования используются для анализа условий смешения и переноса реагентов, а не для прямого расчета кинетики образования или размера частиц.

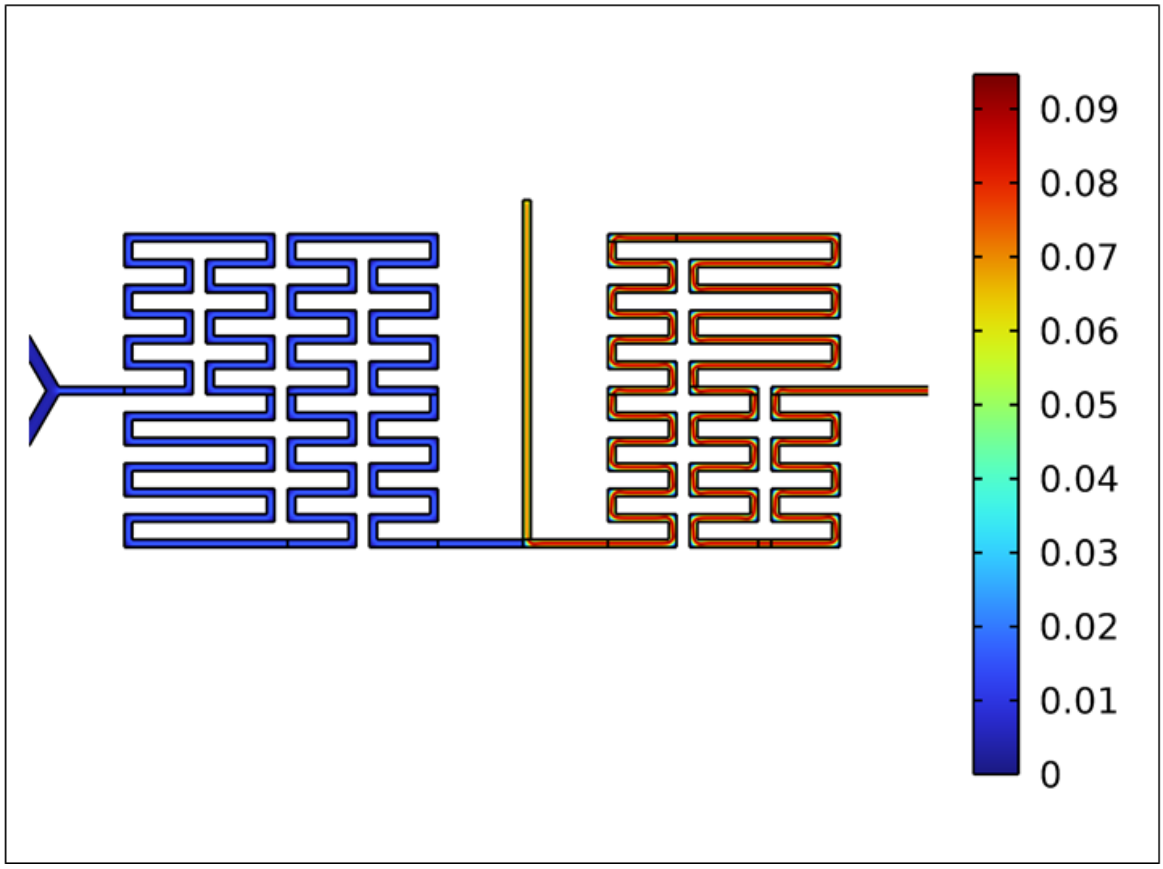


Рисунок 12 – Карта скоростей внутри каналов микрофлюидного устройства. Размерность скорости – м/с [111].

Карта скоростей на рисунке 12 относится к расчетному режиму, в котором расходы первого и второго входов составляли по 0.1 мл/мин, а третьего входа – 1 мл/мин. Поле скоростей следует интерпретировать с учетом функционального разделения устройства на две области. До третьего входа суммарный расход определяется только потоками $CaCl_2$ и Na_2CO_2, и эта часть канала является зоной нуклеации и последующего роста частиц. После введения декстрансульфата суммарный расход возрастает за счет третьего потока; поэтому увеличение скорости во второй части устройства характеризует уже зону стабилизации или функционализации и не должно использоваться для оценки продолжительности

нуклеации. В серии γ1–γ5 гидродинамический режим в зоне до третьего входа оставался ламинарным: рассчитанное число Рейнольдса изменялось от $Re_h = 0.140$ до $Re_h = 2.24$.

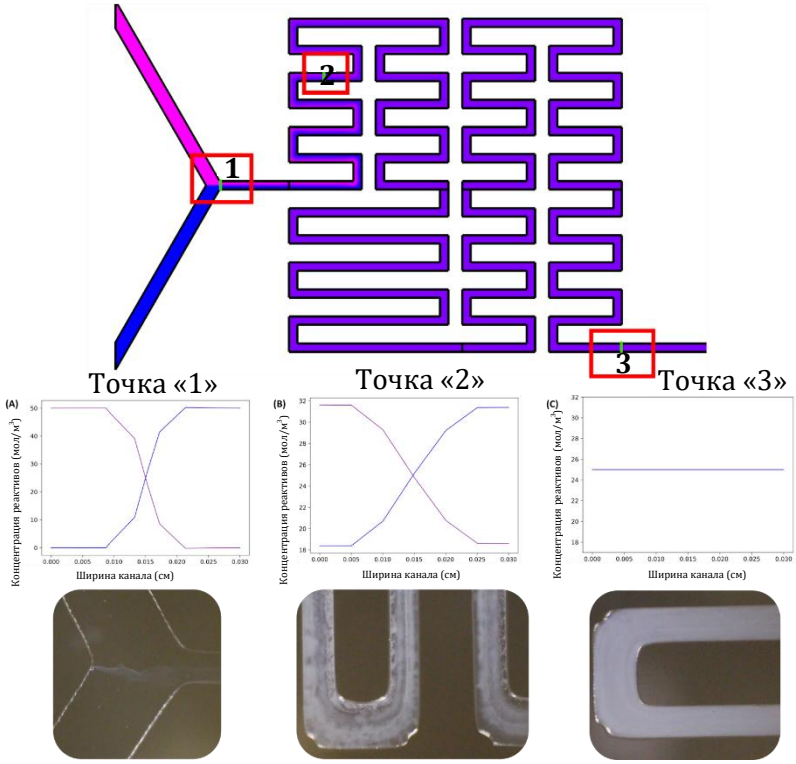


Рисунок 13 – Карта концентраций внутри микрофлюидного устройства, полученная с помощью численного моделирования [111]

Карта концентраций позволяет проследить пространственное развитие смешения растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3 в первом пассивном смешивающем элементе. В точке 1 после объединения входных каналов сохраняются раздельные профили концентраций с областью взаимного проникновения на границе потоков. В точке 2 область перекрывания профилей расширяется. В точке 3 расчетные профили концентраций двух компонентов выравниваются по ширине канала, что соответствует завершению смешения в рамках принятой модели переноса растворенных веществ.

Выравнивание концентрационных профилей к концу первого смесителя не следует трактовать как переход к режиму, в котором перенос вдоль канала определяется молекулярной диффузией. Для серии γ1–γ5 ранее рассчитанное число Пекле по гидравлическому диаметру изменяется от $Pe_h = 1.83\times10^4$ до 2.93×10^5, а по

полной длине реакционного участка – от Pe_L = 7.41×10^6 до 1.19×10^8. Следовательно, во всем диапазоне исследованных расходов продольный перенос реагентов через зону нуклеации определяется преимущественно конвекцией.

Отдельная оценка поперечного переноса показывает, что исходный поперечный диффузионный масштаб остается существенным ограничением. Для расстояния 150 мкм расчетное время молекулярной диффузии составляет τ_D = 160.7 с. В то же время расчетное время пребывания реагентов в зоне от объединения потоков до третьего входа уменьшается от τ_{res} = 67.2 с для γ1 до 4.2 с для γ5. Соответственно, отношение $\Pi_\perp = \tau_D/\tau_{res}$ возрастает от 2.39 до 38.3. Таким образом, во всех режимах γ1–γ5 время, необходимое для диффузии через исходные 150 мкм, превышает фактическое время пребывания реагентов в зоне нуклеации.

Сопоставление этих расчетов с картой концентраций показывает роль змеевидной геометрии пассивного смесителя: завершение смешения за время прохождения первого реакционного участка требует уменьшения эффективного поперечного диффузионного пути за счет последовательного перераспределения границы раздела потоков в криволинейном канале. При этом конвективный перенос обеспечивает перемещение и перераспределение реагентов вдоль канала, а локальная диффузия выравнивает концентрацию на уменьшенном поперечном масштабе.

Для интерпретации серии γ принципиальным является связь расхода с продолжительностью нахождения реагентов в функционально выделенной зоне нуклеации. При постоянном геометрическом объеме этой зоны V_{nuc} = 56 мкл увеличение суммарного расхода двух прекурсоров $Q_1 + Q_2$ от 0.050 до 0.800 мл/мин сокращает τ_{res} от 67.2 до 4.2 с. Следовательно, расход задает временной интервал между контактом растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3 и введением декстрансульфата, который прекращает дальнейшее соосаждение.

Связь между гидродинамическими параметрами и размером устанавливается совместным рассмотрением расчетного времени пребывания и экспериментальных данных серии γ. В результате функциональная роль разработанной конфигурации сводится к заданию объема и длины реакционной зоны, перераспределению

границы раздела реагентов в змеевидном смесителе и пространственному отделению момента начала соосаждения от момента его остановки третьим потоком.

3.2 Варьирование времени реакции (α-реакции)

На первом этапе исследовали влияние общей продолжительности проведения микрофлюидного синтеза на характеристики получаемого продукта. В реакциях серии α концентрации $CaCl_2$ и Na_2CO_3 составляли 0.33 М, реагенты были приготовлены в смеси воды и этиленгликоля в соотношении 9:10 по объему. Расходы обоих солевых растворов поддерживали постоянными на уровне 0.01 мл/мин, а расход водного раствора декстрансульфата с концентрацией 2 мг/мл составлял 0.1 мл/мин. Декстрансульфат подавался через третий вход микрофлюидного устройства и использовался для прекращения дальнейшего соосаждения $CaCO_3$.

При интерпретации α-серии необходимо разграничивать общую продолжительность синтеза и гидродинамическое время пребывания отдельной порции реагентов в реакционной зоне. Общее время реакции определяется как интервал между запуском шприцевых насосов и ручной остановкой эксперимента. Поскольку в реакциях α1–α5 геометрия микрофлюидного устройства и расходы всех трех потоков оставались неизменными, продолжительность 5–25 мин не характеризует время пребывания отдельной частицы или элемента жидкости внутри канала. В настоящем разделе этот параметр далее обозначается как общая продолжительность синтеза.

Были исследованы следующие режимы общей продолжительности синтеза:

1) α1 – 5 мин.
2) α2 – 10 мин.
3) α3 – 15 мин.

4) α4 – 20 мин.

5) α5 – 25 мин.

Структурную характеристику полученных частиц проводили методом сканирующей электронной микроскопии. При увеличении общей продолжительности синтеза наблюдалось увеличение среднего линейного размера частиц: от 0.83±0.18 мкм для режима α1 до 2.9±0.54 мкм для режима. При этом частицы сохраняли нерегулярную морфологию, включавшую удлиненные и квазисферические структуры, а распределения по размерам оставались широкими (рисунок 14 – G). Коэффициент эллиптичности был меньше 1, что указывает на отклонение формы частиц от сферической. Анализ частиц, полученных с использованием сканирующей электронной микроскопии (рисунок 14 – A, B, C, D, E), показал корреляцию между общим временем реакции и средним размером частиц (рисунок 14 – F).

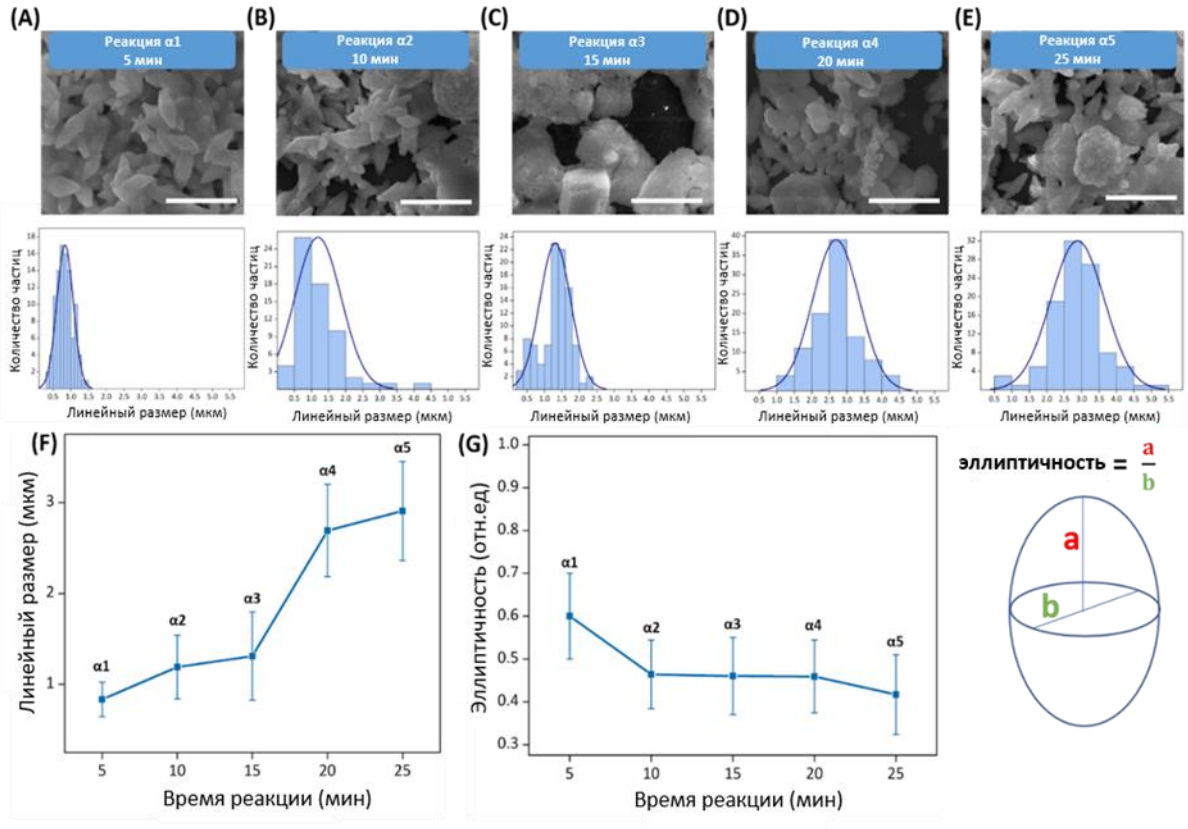


Рисунок 14 – Структурная характеризация частиц $CaCO_3$, полученных в реакциях α. Изображения, полученные с помощью сканирующего электронного

микроскопа, и распределение частиц по размеру, полученных в (A) реакции α1, (B) реакции α2, (C) реакции α3, (D) реакции α4 и (E) реакции α5. Масштабная линейка 5 мкм. (F) Зависимость линейного размера частиц $CaCO_3$ от времени реакции. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. (G) Зависимость эллиптичности частиц от времени реакции. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, количество повторов равно 5 [111].

Полученную зависимость следует рассматривать как экспериментальную характеристику конечного продукта при различной продолжительности работы микрофлюидной установки, а не как прямое свидетельство увеличения времени роста отдельных частиц внутри устройства. При постоянных расходах и неизменной геометрии гидродинамическое время прохождения одной и той же функциональной зоны не изменяется при увеличении общей продолжительности эксперимента. Поэтому на основании α-серии нельзя количественно связать изменение размера частиц с изменением их индивидуального времени пребывания в зоне нуклеации и роста. Механизм, определяющий различия размеров частиц в пробах, собранных после 5–25 мин непрерывной работы установки, в рамках данного эксперимента отдельно не исследовался.

Для дальнейшей оптимизации был выбран режим α1 с общей продолжительностью синтеза 5 мин, поскольку при нем был получен минимальный в данной серии средний линейный размер частиц 0.83±0.18 мкм и одновременно минимизирована длительность проведения эксперимента. Значение 5 мин далее фиксировали при варьировании концентраций прекурсоров в серии β. Количественный анализ аппаратного управления временем пребывания реагентов в зоне нуклеации и роста проводился отдельно при варьировании расходов потоков в серии γ, где изменение расхода непосредственно изменяло гидродинамическое время прохождения реакционной зоны.

3.3 Варьирование концентраций реагентов (β -реакции)

Целью данного этапа было определение соотношения концентрации солей, которое обеспечивало бы дальнейшее уменьшение размеров частиц карбоната кальция. Для реакции серии β фиксировались следующие ключевые параметры:

1) общее время реакции – 5 минут;

2) расходы реактивов – 0.01 мл/мин для солей, 0.1 мл/мин для раствора декстран сульфата;

3) растворитель – смесь воды и этиленгликоля в соотношении 15:85 по объему;

Было исследовано пять пар концентраций $CaCl_2$ и Na_2CO_3: β1 – 0.06/0.05 М, β2 – 0.08/0.06 М, β3 – 0.1/0.08 М, β4 – 0.13/0.1 М, β5 – 0.16/0.12 М. Важной методологической особенностью являлось проведение реакций в присутствии небольшого избытка ионов Ca^{2+}. Частицы, полученные в результате описанных выше реакций, были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии для определения линейного размера и морфологии (рисунок 15 – A, B, C, D, E).

В результате наблюдалась зависимость между концентрацией реагентов и средним линейным размером получаемых структур. При проведении реакции β5, средний размер частиц составил 6.0±0.71 мкм. Постепенное снижение реакции привело к уменьшению среднего размера частиц до 2.8±0.49 мкм (реакция β1) (рисунок 15 – F).

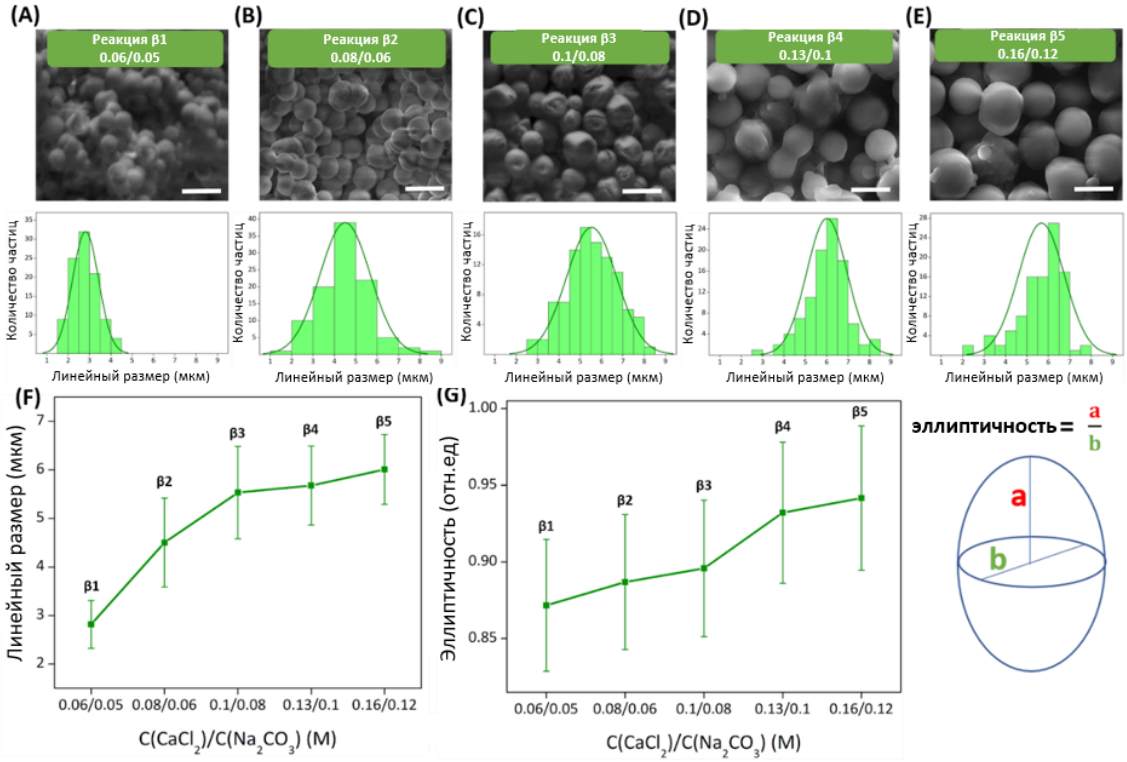


Рисунок 15 – Структурная характеризация частиц $CaCO_3$, полученных в реакциях β. Изображения, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, и распределение размеров частиц $CaCO_3$, полученных в (A) реакции β1, (B) реакции β2, (C) реакции β3, (D) реакции β4 и (E) реакции β5. Масштабная линейка 10 мкм. (F) Зависимость линейного размера частиц $CaCO_3$ от отношения концентраций. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. (G) Зависимость эллиптичности частиц от отношения концентраций. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, количество повторов равно 5 [111]

Использование избытка ионов кальция оказалось эффективным инструментом для контроля морфологии. Все частицы, полученные в ходе реакций β, имели сферическую форму с коэффициентом эллиптичности ~ 1 (рисунок 15 – G).

Поскольку дальнейшая цель заключалась в получении наноразмерного карбоната кальция, были выбраны условия, соответствующие условиям реакций α1 и β1.

3.4 Варьирование расходов реагентов (γ - реакции)

Заключительным этапом микрофлюидного синтеза являлось исследование влияния расходов потоков на гидродинамическое время пребывания прекурсоров в зоне нуклеации и роста и на размер формирующихся частиц $CaCO_3$. В отличие от α-серии, в которой изменялась общая продолжительность проведения синтеза, варьирование расходов в γ-серии непосредственно изменяло время прохождения каждой порции реагентов от места объединения растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3 до третьего входа, через который подавался раствор декстрансульфата для прекращения дальнейшего соосаждения.

На данном этапе фиксировали параметры, выбранные по результатам предыдущих серий: концентрации $CaCl_2$ и Na_2CO_3 составляли 0.06 и 0.05 М соответственно, растворителем служила смесь воды и этиленгликоля в соотношении 15:85 по объему, а общая продолжительность каждого синтеза составляла 5 мин. Расход через третий вход поддерживали в десять раз выше расхода каждого из двух потоков прекурсоров.

Были исследованы следующие режимы расходов:

γ1 – $Q_1 = Q_2 = 0.025$ мл/мин, $Q_3 = 0.25$ мл/мин, $\tau_{res} = 67.2$ с.

γ2 – $Q_1 = Q_2 = 0.05$ мл/мин, $Q_3 = 0.5$ мл/мин, $\tau_{res} = 33.6$ с.

γ3 – $Q_1 = Q_2 = 0.10$ мл/мин, $Q_3 = 1.0$ мл/мин, $\tau_{res} = 16.8$ с.

γ4 – $Q_1 = Q_2 = 0.20$ мл/мин, $Q_3 = 2.0$ мл/мин, $\tau_{res} = 8.4$ с.

γ5 – $Q_1 = Q_2 = 0.40$ мл/мин, $Q_3 = 4.0$ мл/мин, $\tau_{res} = 4.2$ с.

Расчетное описание конфигурации А позволяет интерпретировать эту серию через пространственно-временные параметры первой функциональной зоны устройства. До третьего входа локальный расход определяется только суммой потоков двух прекурсоров и изменяется от 0.050 до 0.800 мл/мин. При постоянном геометрическом объеме зоны нуклеации и роста 56 мкл это соответствует последовательному сокращению времени пребывания от 67.2 до 4.2 с. Следовательно, расход в серии γ является аппаратно задаваемым параметром,

изменяющим длительность нахождения реагентов в зоне соосаждения до введения декстрансульфата.

Увеличение расходов происходило без смены режима течения. В рассчитанном диапазоне число Рейнольдса возрастало от $Re_h = 0.140$ для γ1 до $Re_h = 2.24$ для γ5, что количественно подтверждает сохранение ламинарного течения во всей серии. Одновременно число Пекле по гидравлическому диаметру изменялось от $Pe_h = 1.83\times10^4$ до 2.93×10^5, а по длине реакционного участка – от $Pe_L = 7.41\times10^6$ до 1.19×10^8.

Поперечный массоперенос при этом оставался ограничен характерным диффузионным масштабом. Для расстояния 150 мкм расчетное время молекулярной диффузии составляло 160.7 с и превышало время пребывания во всех режимах γ1–γ5. Отношение времени поперечной диффузии к времени пребывания возрастало от 2.39 до 38.3. Поэтому выравнивание концентраций в первом пассивном смесителе нельзя объяснить молекулярной диффузией через исходные 150 мкм. Сопоставление этого результата с расчетными картами концентраций показывает роль змеевидной геометрии: последовательное перераспределение границы раздела потоков уменьшает эффективный поперечный путь, на котором происходит локальный диффузионный перенос.

Анализ, проведенный с помощью сканирующей электронной микроскопии, подтвердил корреляцию между увеличением расходов и уменьшением линейного размера получаемых частиц (рисунок 16 – A, B, C, D, E). При реакции γ1 были получены сферические наночастицы карбоната кальция со средним размером 178±30 нм. По мере увеличения расхода и уменьшении времени нуклеации средний диаметр составлял 66±15 нм в реакции γ5 (рисунок 16 – F). Все полученные частицы также сохранили сферическую форму с коэффициентом эллиптичности ~ 1 (рисунок 16 – G).

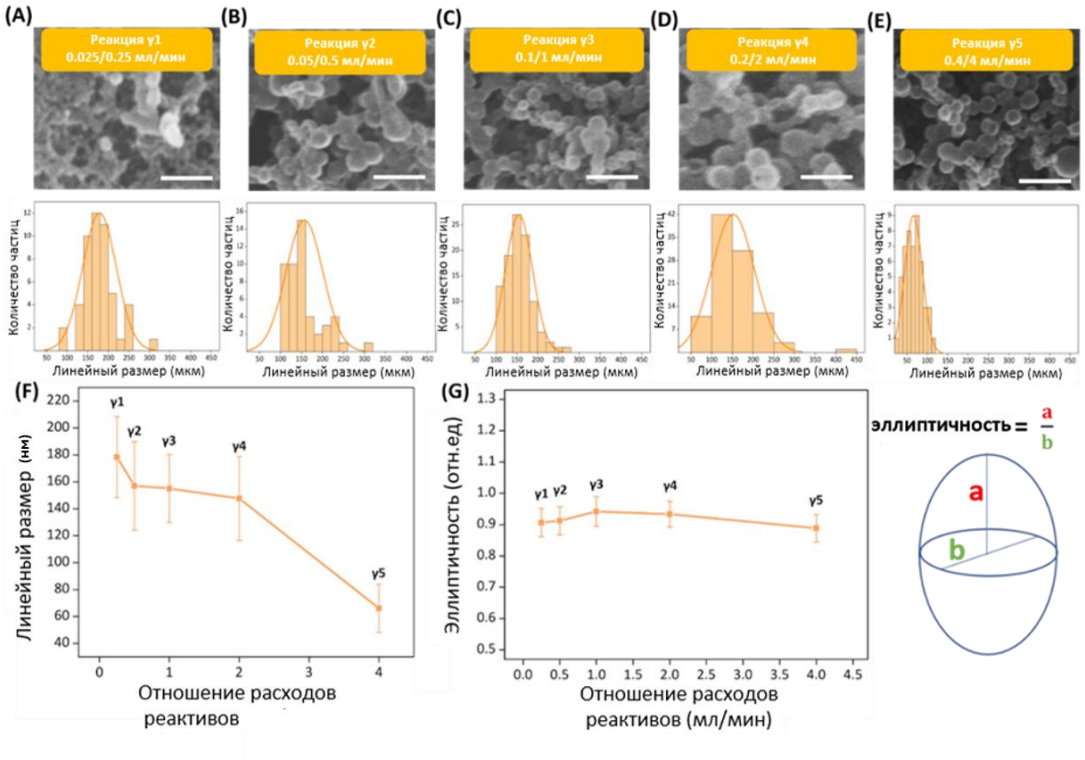


Рисунок 16 – Структурная характеризация частиц $CaCO_3$, полученных в реакциях γ. Изображения, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, и распределение размеров частиц $CaCO_3$, полученных в (A) реакции γ1, (B) реакции γ2, (C) реакции γ3, (D) реакции γ4 и (E) реакции γ5. Масштабная линейка 500 нм. (F) Зависимость линейного размера частиц $CaCO_3$ от отношения скоростей потока. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. (G) Зависимость эллиптичности частиц от отношения скоростей потока. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, количество повторов равно 5 [111]

Условия реакции α1, β1 и γ5 были выбраны в качестве окончательного протокола синтеза, поскольку они позволили получить монодисперсные частицы со средним линейным размером 66±15 нм. Общее время, необходимое для синтеза наночастиц составило 5 минут, что в 24 раза быстрее, чем в описанных ранее традиционных подходах [112].

3.5 Структурная характеризация синтезированных частиц

Структурно-морфологическая характеристика частиц, полученных в ходе синтеза в реакции γ5 осуществлялась с использованием просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Изображения ПЭМ подтвердили сферическую геометрию полученных частиц (рисунок 17 – A, B). Для определения внутренней структуры был применен анализ локальной дифракции электронов, который на основе анализа быстрого преобразования Фурье, подтвердил аморфную структуру полученных частиц (рисунок 17 – C). Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС) была использована для получения информации об элементом составе наночастиц. Спектры ЭДС выявили наличие характеристических пиков кальция (Ca), кислорода (O) и углерода (C), что подтверждает формирование структуры $CaCO_3$ (рисунок 17 - D).

Коллоидная стабильность наночастиц была изучена методом динамического рассеяния света (ДРС) в важных для биомедицинского применения средах: фосфатно-солевой буфер, питательная среда Alpha-MEM и вода с различными значениями pH (4, 7 и 8). Наночастицы продемонстрировали коллоидную стабильность во всех исследованных средах (рисунок 17 – E). Исключение составила среда с pH 4, где наблюдалось незначительное уменьшение гидродинамического диаметра, что было интерпретировано как признак частичной деградации наночастиц в кислой среде [113].

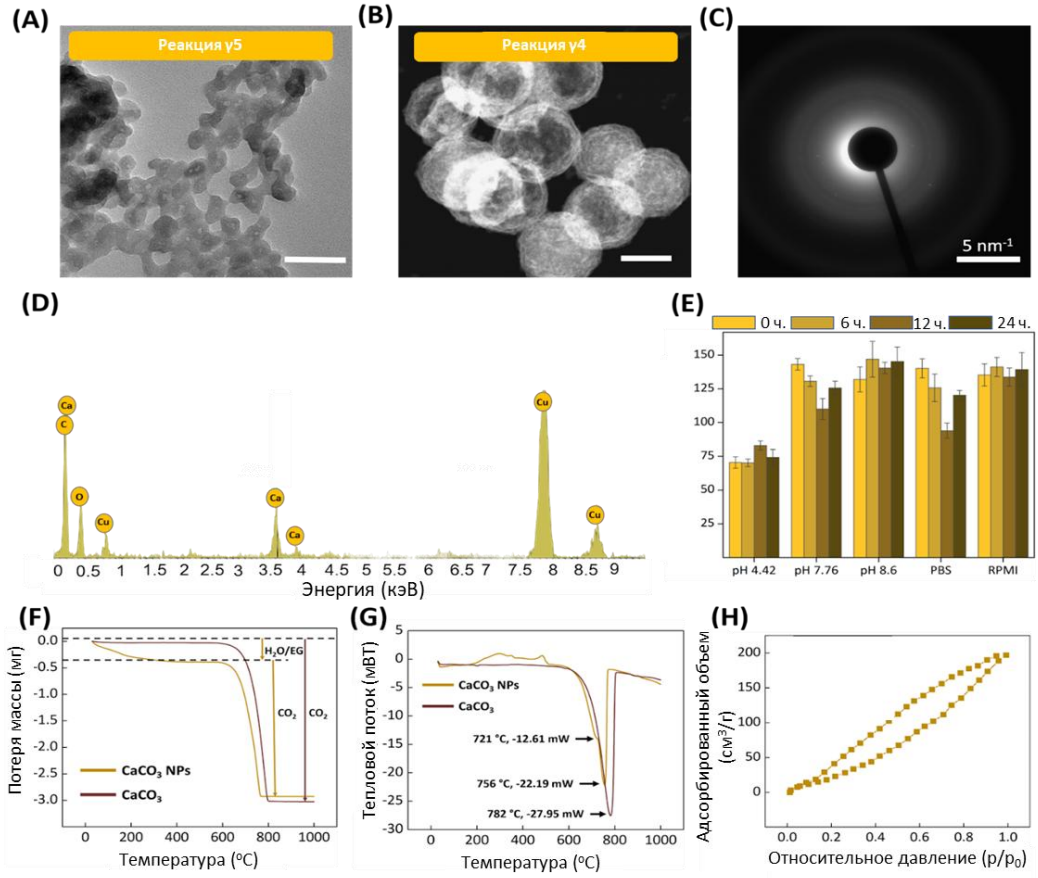


Рисунок 17 – Структурная характеризация наночастиц $CaCO_3$. (A) Изображение наночастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ5, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. Масштабная линейка 200 нм. (B) Изображение наночастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ4, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. Масштабная линейка 200 нм. (C) Рентгенодифракционная картина от одной наночастицы $CaCO_3$, полученной в реакции γ5. (D) Спектр энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, полученный от наночастиц $CaCO_3$. (E) Гидродинамические диаметры наночастиц $CaCO_3$ в различных средах. (F) Кривые термогравиметрического анализа нано- и микрочастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ5 (для наночастиц) и реакции β2 (для микрочастиц). (G) Кривые дифференциальной сканирующей калориметрии нано- и микрочастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ5 (для наночастиц) и реакции β2 (для микрочастиц). (H) Изотермы адсорбции-десорбции азота и соответствующие кривые распределения размеров пор нано- и микрочастиц $CaCO_3$, полученные в реакции γ5 (для наночастиц) и реакции β2 (для микрочастиц) [111]

Был проведен термогравиметрический (ТГА) и дифференциально-сканирующий калориметрический (ДСК) анализ для изучения термодинамических характеристик и различий между нано- и микроразмерным $CaCO_3$ (рисунок 17 – F, G). В результате были сделаны следующие выводы:

1. Потеря массы
    i. Снижение массы на 2.33% при температуре ниже 200°C относится к испарению физически адсорбированной воды
    ii. Дополнительное снижение массы на 2.56% связано с испарением этиленгликоля, используемом в синтезе
    iii. Значительное снижение массы ~ 43.96% при температуре выше 600°C относится к термическому разложению $CaCO_3$ до CaO
2. Фазовые переходы
    i. Кривая ДСК выявила выраженный экзотермический пик при 485°C, который коррелировал с незначительной потерей массы (~0.88%) на кривой ТГА. Это указывает на кристаллическое преобразование аморфных наночастиц $CaCO_3$ из высокоэнергетического состояния в более стабильное кристаллическое состояние, сопровождающееся выделением энергии.
    ii. Температура разложения синтезированных наночастиц ниже (721°C и 756.8°C) по сравнению с микроразмерными частицами, полученными традиционным методом (781.4°C)
3. Анализ пористости и удельной поверхности

    Для количественной оценки пористой структуры синтезированных наночастиц $CaCO_3$ использовали низкотемпературную адсорбцию–десорбцию азота. Полученная изотерма адсорбции–десорбции и распределение пор по размерам представлены на рисунке 17 – H. Изотерма относится к типу IV с петлей гистерезиса H2b, характерной для пористых структур со сложной геометрией пор. Удельную поверхность определяли методом многоточечного Брунауэра–Эмметта–Теллера (BET) по семи экспериментальным точкам адсорбционной ветви в диапазоне

относительных давлений P/P_0 = 0.0574–0.2997. Для расчета использовали линейную форму уравнения BET:

$$\frac{1}{W\left(\frac{P_0}{P}-1\right)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C}\frac{P}{P_0} \quad (46)$$

где W – количество адсорбированного азота при заданном относительном давлении P/P_0; W_m – емкость монослоя; C – константа BET.

При линейной обработке BET-зависимости были получены наклон 18.277 г$^{-1}$, свободный член 5.506 г$^{-1}$ и константа C = 4.319. Емкость монослоя определяли по коэффициентам линейной зависимости:

$$W_m = \frac{1}{k+b} = \frac{1}{18.277+5.506} = 0.04205 \quad (47)$$

Удельную поверхность рассчитывали с учетом площади поперечного сечения молекулы азота $\sigma = 16.2$ Å^2 и молярной массы азота $M_{N_2} = 28.013$ г/моль:

$$S_{BET} = \frac{W_m N_A \sigma}{M_{N_2}} \quad (48)$$

где N_A – число Авогадро.

Рассчитанная удельная поверхность составила S_{BET} = 146.43 м^2/г. Распределение пор по размерам рассчитывали отдельно по десорбционной ветви методом Barrett–Joyner–Halenda (BJH) с использованием поправки de Boer. По результатам обработки суммарный объем пор составил 0.278 см^3/г, а характеристический диаметр Dv(d)=3.528 нм. Максимум дифференциального распределения объема пор dV(d) приходится на область около 3.53 нм.

3.6 Функционализация поверхности синтезируемых частиц активными биомолекулами

Для подтверждения возможностей загрузки синтезированных структур с помощью разработанного устройства, была проведена функционализация наночастиц различными соединениями. В качестве инкапсулируемых материалов, были выбраны соединения с низкой молекулярной массой (доксорубицин, DOX), с высокой молекулярной массой (бычий сывороточный альбумин, меченый Cy5, Cy5-BSA) и плазмидная ДНК (pDNA-GFP), кодирующая зеленый флуоресцентный белок. Для подачи инкапсулируемых соединений использовался третий входной канал МФУ, что позволяло им взаимодействовать с уже сформированными наночастицами. Концепт эксперимента представлен на рисунке 18 – A. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была подтверждена успешная адсорбция Cy5-BSA (рисунок 18 – B) и доксорубицина (рисунок 18 – C). Основным механизмом загрузки этих соединений являлось электростатические взаимодействие между ними и поверхностью наночастиц карбоната кальция. Количественная оценка эффективности загрузки (рисунок 18 – D) продемонстрировала, что увеличение исходной концентрации инкапсулируемого соединения, подаваемого в третий канал, приводило к повышению эффективности загрузки.

Также была продемонстрирована возможность одновременной загрузки двух различных соединений. Для этого краситель флуоресцеин, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином (FITC-BSA), предварительно смешивался с $CaCl_2$ и подавался через второй вход, в то время как Cy5-BSA подавался через третий вход. Анализ с помощью конфокальной микроскопии подтвердил успешную двойную загрузку: FITC-BSA был успешно инкапсулирован внутрь наночастиц карбоната кальция, Cy5-BSA был электростатически адсорбирован на поверхности $CaCO_3$ (рисунок 18 – E, F).

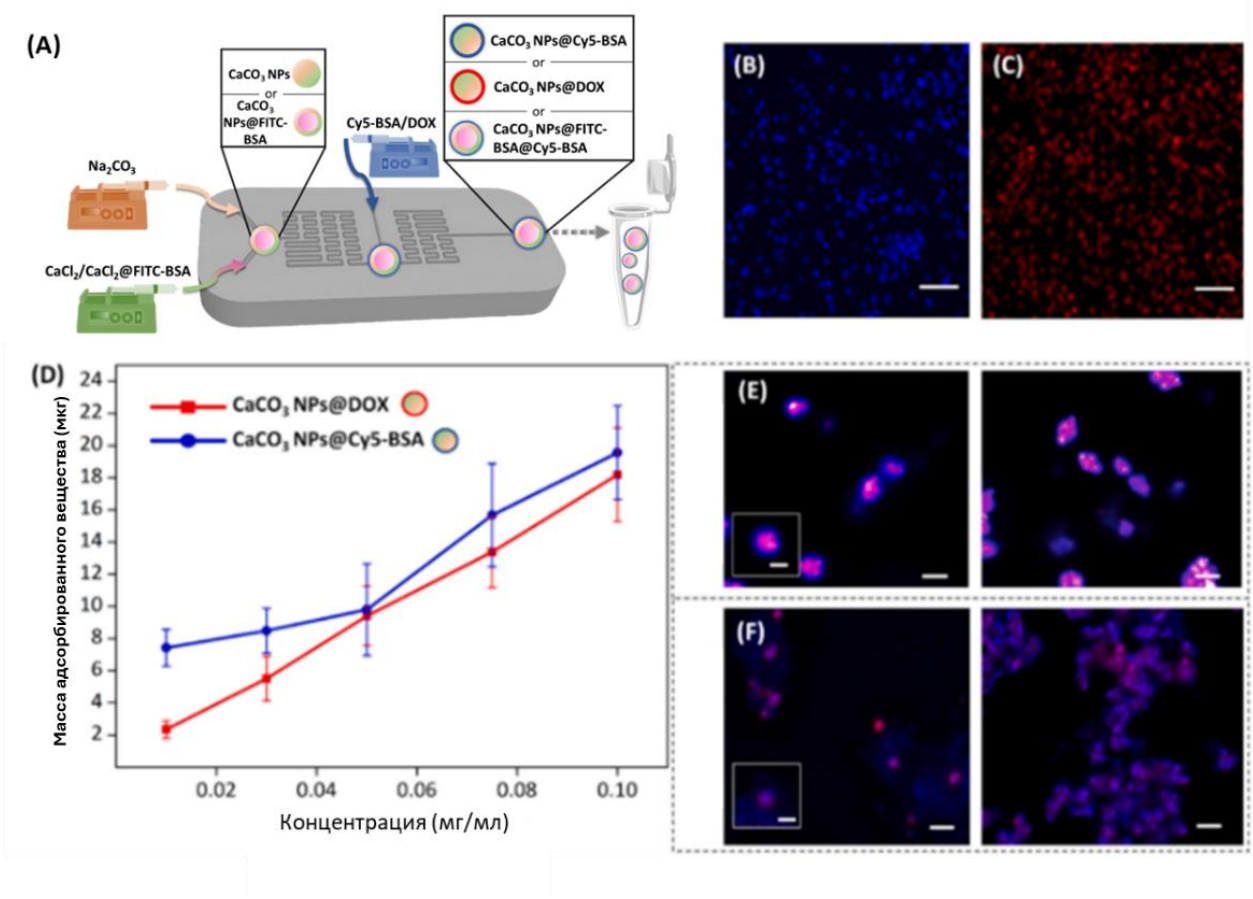


Рисунок 18 - Загрузка активных биомолекул с использованием разработанного микрофлюидного устройства. (A) Схематическое изображение инкапсуляции Cy5-BSA и DOX в наночастицы $CaCO_3$ с использованием микрофлюидного устройства, (B) Эффективность адсорбции Cy5-BSA и DOX на поверхности наночастиц $CaCO_3$ в зависимости от начальной концентрации Cy5-BSA и DOX, подаваемых в третий вход микрофлюидного устройства, (C) Изображения КФЛМ наночастиц $CaCO_3$, загруженных Cy5-BSA. Масштабная линейка 5 мкм, (D) Изображение КФЛМ наночастиц $CaCO_3$, загруженных DOX. Масштабная линейка 5 мкм. (E) Изображения КФЛМ многократной загрузки частиц $CaCO_3$, полученных в результате реакции β2, различными материалами: FITC-BSA был загружен в полость частиц $CaCO_3$, Cy5-BSA был адсорбирован на поверхности частиц $CaCO_3$. Масштабная линейка соответствует 5 мкм, масштабная линейка на вставке соответствует 2 мкм. (F) Изображения КФЛМ множественной загрузки частиц $CaCO_3$, полученных в результате реакции γ4, различными веществами: FITC-BSA был загружен в полость частиц $CaCO_3$, а Cy5-

BSA был прикреплен к поверхности частиц $CaCO_3$. Масштабная линейка соответствует 5 мкм, масштабная линейка на вставке соответствует 1 мкм [111]

В качестве третьего типа загружаемого материала использовалась плазмидная ДНК, кодирующая зеленый флуоресцентный белок (pDNA-GFP). Механизм загрузки был аналогичен способу, описанному выше (рисунок 19 – A). Эффективность загрузки pDNA-GFP, при постоянной концентрации наночастиц (10 мкг/мл), оценивалась с помощью гель-электрофореза (рисунок 19 – B). Была выявлена зависимость между эффективностью адсорбции и количеством добавленной pDNA-GFP: при максимальном добавленном количестве ДНК (90 мкг) в наночастицы было загружено 24.8 мкг ДНК (рисунок 19 – C). Механизм загрузки pDNA-GFP, как и в случае с DOX и Cy5-BSA, основан преимущественно на электростатическом взаимодействии.

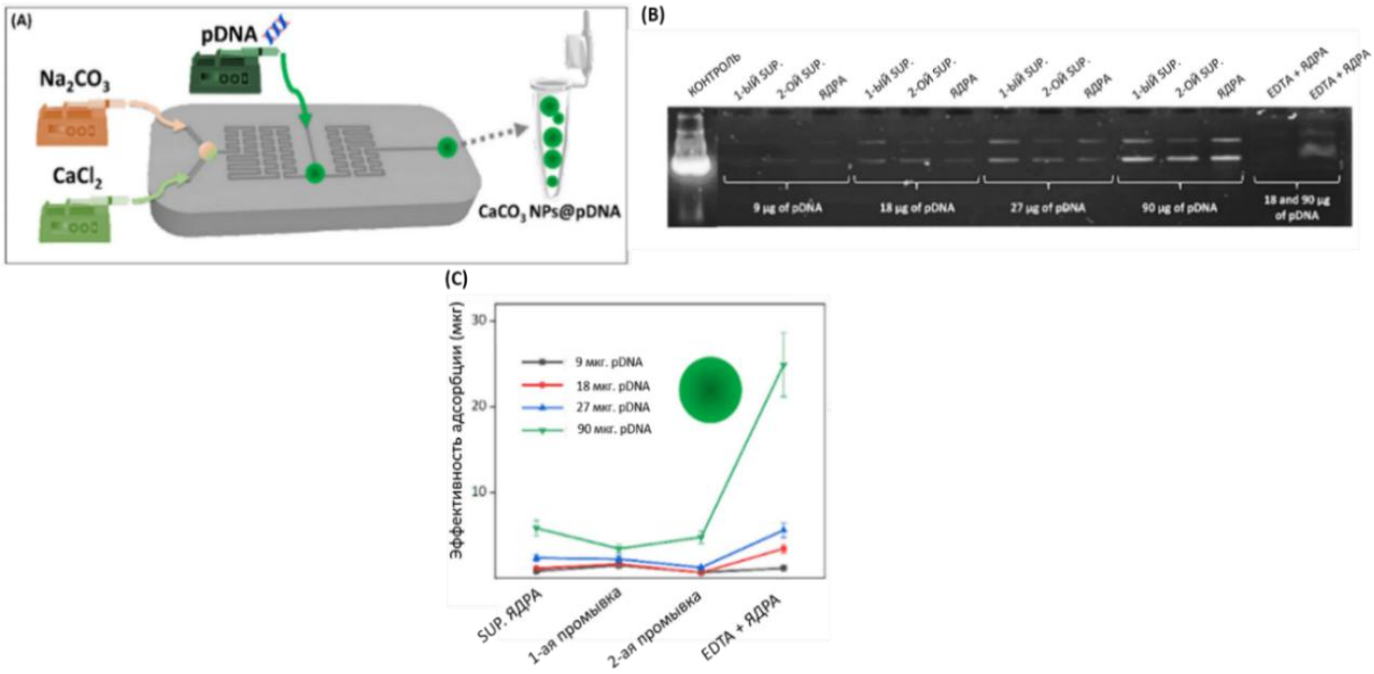


Рисунок 19 - Загрузка pDNA-GFP в наночастицы $CaCO_3$ с использованием разработанного микрофлюидного устройства. (A) Схематическое изображение загрузки pDNA-GFP с использованием микрофлюидного устройства, (B) Иллюстрация измерений загрузочной способности наночастиц $CaCO_3$, (C) Электрофорез pDNA-GFP в агарозном геле в супернатантах, наночастицах $CaCO_3$ и растворенных наночастицах $CaCO_3$, (D) Количество адсорбированной pDNA-GFP, полученное из измерений в агарозном геле, (E) Эффективность адсорбции pDNA-GFP на поверхности наночастиц $CaCO_3$ в зависимости от начальной концентрации pDNA-GFP, подаваемой в третий вход микрофлюидного устройства [111]

3.7 In vitro исследования

Для изучения кинетики взаимодействия $CaCO_3$@Cy5-BSA с клетками HEK293, наночастицы были добавлены в различных концентрациях (2.5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл) и инкубировались с исследуемой клеточной линией в течение 24 часов. С помощью конфокальной лазерной

сканирующей микроскопии было показано, что частицы $CaCO_3$@Cy5-BSA успешно захватывались клетками, причем эффективность захвата росла при добавлении большего количества частиц (рисунок 20 – A-D).

Оценка цитотоксичности немеченых $CaCO_3$@NPs проводилась с использованием МТТ-теста в отношении клеток HEK293. Клетки инкубировали с наночастицами в диапазоне концентраций, указанных выше в течение 24 часов. Было зафиксировано отсутствие токсического воздействия немеченых $CaCO_3$@NPs на клетки HEK293 даже при максимальной добавленной концентрации (30 мкг/мл). Впоследствии был исследован цитотоксический потенциал наночастиц, нагруженных терапевтическими агентами. При добавлении эквивалентного количества $CaCO_3$@NPs (10 мкг/мл), несущих различные концентрации доксорубицина и Cy5-BSA, к 10^5 клеток HEK293, было выявлено, что $CaCO_3$@Cy5-BSA практически не обладали токсичностью. В противоположность этому, $CaCO_3$@DOX, продемонстрировали очевидное токсическое воздействие, что согласуется с литературными данными [114] (рисунок 20 – E).

Ассоциация $CaCO_3$@Cy5-BSA с клетками была количественно оценена методом проточной цитометрии. $CaCO_3$@Cy5-BSA инкубировались с клетками HEK293 в течение 24 часов в концентрациях, указанных ранее. Была установлена прямая корреляция между количеством добавленных наночастиц и процентом клеток, ассоциированных с $CaCO_3$@Cy5-BSA, при этом наблюдался выход на плато при более высоких концентрациях (рисунок 20 – F).

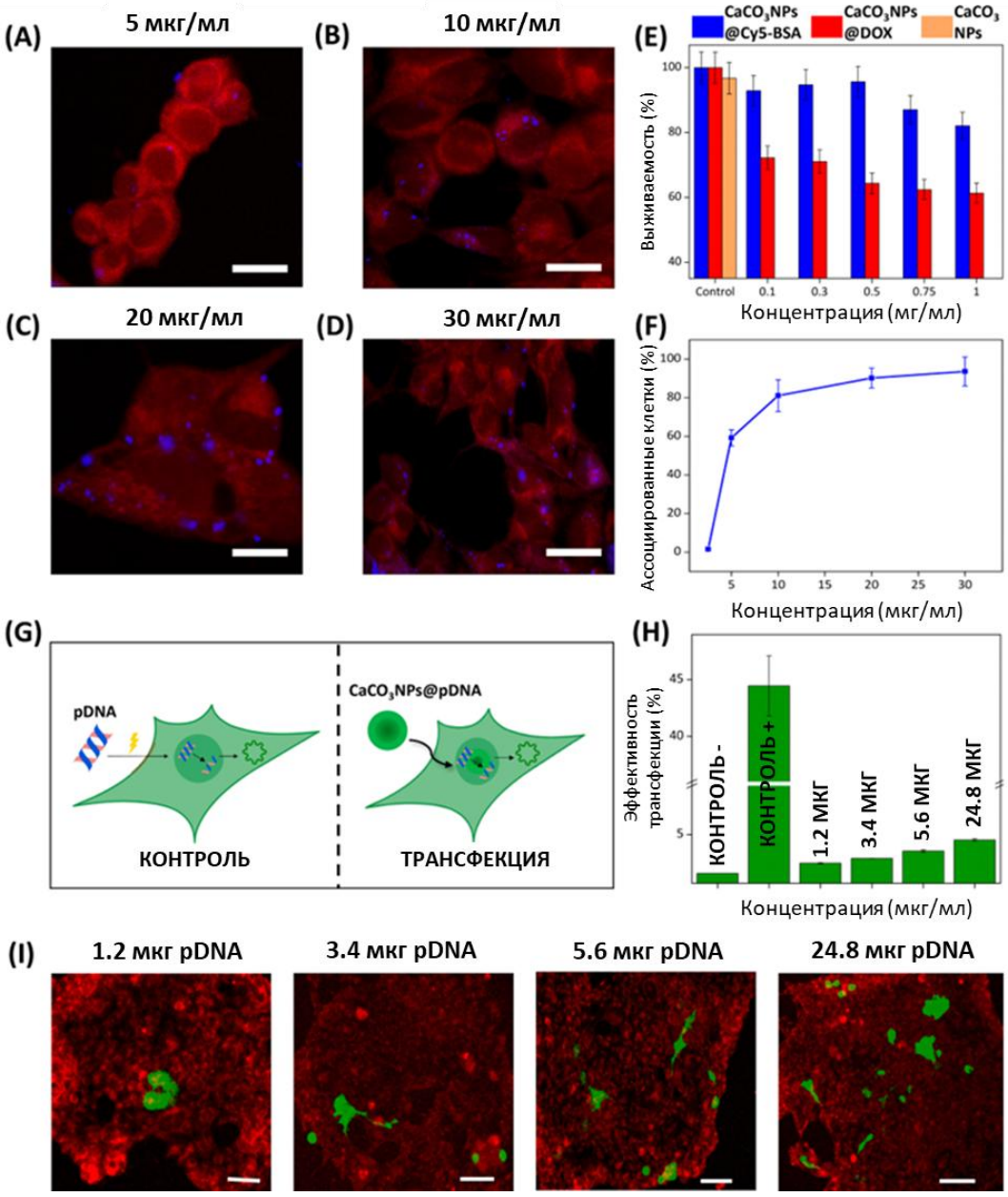


Рисунок 20 – Клеточные эксперименты. Изображения клеток HEK293, окрашенных Родамином B и инкубированных с наночастицами $CaCO_3$, мечеными Cy5-BSA в различных добавленных концентрациях (A) 2.5 мкг/мл, (B) 5 мкг/мл, (C) 10 мкг/мл и (D) 30 мкг/мл. Масштабная линейка 5 мкм. (E) Жизнеспособность клеток после инкубации с наночастицами $CaCO_3$, нагруженными Cy5-BSA или DOX, добавленными в различных концентрациях. (F) Ассоциация клеток HEK293 с наночастицами $CaCO_3$, добавленными в различных концентрациях, полученная на основе измерений методом проточной цитометрии. (G) Схема экспериментов по трансфекции. Электропорация использовалась в качестве положительного контроля для трансфекции клеток

HEK293. (H) Эффективность трансфекции клеток HEK293 после инкубации (48 ч) с наночастицами $CaCO_3$, нагруженными pDNA-GFP, добавленной в различных концентрациях; (I) Изображения трансфицированных клеток HEK293, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Масштабная линейка – 100 мкм [111]

Для исследования эффективности трансфекции, плазмидная ДНК, кодирующая зеленый флуоресцентный белок, была инкапсулирована в частицы в различных концентрациях (1.2, 3.4, 5.6 и 24.8 мкг/мл). Частицы $CaCO_3$@pDNA-GFP инкубировались с HEK293 в течение 48 часов. В качестве положительного контроля использовались клетки, подвергнутые электропорации (15 мкг pDNA-GFP), в качестве отрицательного контроля - клетки без какого-либо воздействия (рисунок 20 – G). Анализ эффективности трансфекции проводился с помощью проточной цитометрии для измерения сигнала флуоресценции клеток, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (рисунок 20 – H). В отрицательном контроле эффективность трансфекции не была зафиксирована, в положительном контроле эффективность составила 44.46 %. Для частиц $CaCO_3$@pDNA-GFP эффективность трансфекции носила дозозависимый характер. При максимальном количестве добавленной pDNA-GFP (24.8 мкг/мл) эффективность трансфекции достигла 4.44%. Трансфицированные клетки были дополнительно визуализированы с помощью конфокальной микроскопии, где экспрессия зеленого флуоресцентного белка соответствовала зеленому сигналу, а красный сигнал был обусловлен окрашиванием клеточной мембраны Родамином B (рисунок 20 – I).

Таким образом было разработано микрофлюидное устройство для синтеза наноразмерного карбоната кальция с возможностью загрузки синтезируемых структур активными биомолекулами в формате единой платформы. Такой методологический подход позволил получить монодисперсные наночастицы $CaCO_3$ с линейным размером 66 нм, исключив при этом необходимость использования полиакриловой кислоты, которая обычно применяется в

традиционном синтезе. Для оценки возможности применения разработанного устройства к соединениям различных классов была исследована загрузка доксорубицина, Cy5-BSA и плазмидной ДНК. Полученные данные подтверждают, что предложенный микрофлюидный подход обеспечивает возможность синтеза наночастиц и их успешной загрузки различными биомолекулами в рамках одного устройства, а также функциональными *in vitro* тестами на клеточной линии HEK293.

ГЛАВА 4. Микрофлюидное устройство для реализации сверхбыстрого протокола производства CAR-T клеточного продукта

Т-клеточная иммунотерапия с помощью химерного антигенного рецептора (CAR-T) стала одним из наиболее перспективных направлений для лечения онкогематологических заболеваний. Несмотря на значительные клинические успехи, широкому применению CAR-T терапии препятствует сложность, длительность и стоимость производства клеточного продукта.

Стандартная методика создания CAR-T заключается в изъятии Т-лимфоцитов из крови пациента, доставки химерного антигенного рецептора с помощью лентивирусного вектора (трансдукция) и инфузия измененных Т-клеток в кровь пациента. Существующие протоколы занимаю до 9–14 дней, что не только ограничивает доступность терапии для пациентов с быстро прогрессирующим заболеванием, но и приводит к нежелательному фенотипическому сдвигу в субпопуляции Т-лимфоцитов с наивно-подобным фенотипом, которые являются основным механизмом долгосрочного противоопухолевого ответа. Сохранение этих популяций в конечном напрямую коррелирует с улучшением клинической картины у больных.

Учитывая описанные выше проблемы, разработка ускоренных протоколов, которые позволяют сократить время ex-vivo культивирования без ущерба эффективности трансдукции и потери функционально важных субпопуляций Т-клеток, представляет собой наукоемкую задачу. Существующие методики сталкиваются с техническими ограничениями ввиду низкой эффективности трансдукции при использовании вирусных носителей, что требует применения высоких титров вируса (MOI), что увеличивает стоимость производства.

Одним из подходов к повышению вероятности взаимодействия лентивирусных частиц с Т-лимфоцитами является использование микрофлюидного устройства с ограниченной высотой инкубационного объема. В данном случае коэффициент диффузии лентивирусных частиц при заданном

составе среды не изменяется; управляемым параметром является характерный пространственный масштаб, на котором должен происходить их диффузионный перенос. Уменьшение высоты канала ограничивает максимальное расстояние между вирусными частицами и клетками и, поскольку характерное время диффузии пропорционально квадрату этого расстояния, сокращает время их диффузионного сближения.

В данной главе представлены результаты разработки микрофлюидного устройства и протокола сверхбыстрого производства CAR-T-клеток, в котором геометрическое ограничение инкубационного объема сочетается с объединением этапов активации и лентивирусной трансдукции в едином 24-часовом технологическом цикле.

4.1 Оценка влияния геометрических параметров микрофлюидного устройства на жизнеспособность и эффективность трансдукции

Одним из ключевых этапов создания протокола сверхбыстрого производства CAR-T клеток, являлось эмпирическое определение геометрических условий, обеспечивающих максимально возможную эффективность трансдукции при сохранении жизнеспособности Т-клеток. Было исследовано влияние высоты микрофлюидного канала на эффективность трансдукции, поскольку уменьшение этого параметра сокращает характерные диффузионные расстояния между лентивирусными векторами (ЛВ) и активированными Т-клетками, что потенциально увеличивает частоту взаимодействия между ними и ведет к повышению эффективности трансдукции.

Для экспериментального анализа были выбраны четыре различных высоты микрофлюидного канала: 50, 100, 150 и 200 мкм с рабочими объемами 8.3, 16.6, 25 и 33 мкл соответственно. Активированные Т-клетки смешивались с ЛВ при высоком отношении числа инфекционных агентов (вирусов) к числу мишеней (Т-

клетки) (MOI = 30) и инкубировались в микрофлюидном устройстве в течение 6 часов.

Результаты анализа (рисунок 21) показали, что микрофлюидное устройство существенно не влияет на жизнеспособность Т-клеток, которая для всех протестированных высот превышала 90 %. Более того эффективность трансдукции при использовании высокого MOI (30) при разных высотах канала микрофлюидного устройства не имела значимой разницы: 47 % для канала высотой 50 мкм, 41 % для канала высотой 100 мкм, 42 % для канала высотой 150 мкм и 43.13 % для канала высотой 200 мкм. Отсутствие существенной разницы в эффективности трансдукции при варьировании высоты канала может быть объяснено использованием высокой концентрации вирусных векторов.

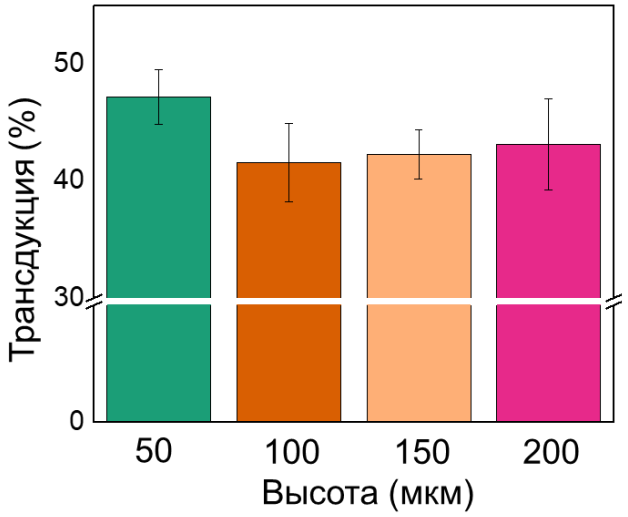


Рисунок 21 – Зависимость эффективности трансдукции от высоты канала МФУ при MOI = 30 [77]

Поскольку после заполнения микрофлюидного устройства смесь Т-лимфоцитов и лентивирусного вектора инкубировалась в статическом режиме, ключевым расчетным параметром массопереноса являлось характерное время поперечной диффузии. Согласно расчетной оценке, приведенной для конфигурации B, при выбранной высоте канала характерное время поперечного диффузионного переноса лентивирусных частиц составляет около 36 мин. Поскольку после заполнения микрофлюидного устройства инкубация смеси Т-

лимфоцитов и лентивирусного вектора протекает в статическом режиме, такой выигрыш в диффузионном переносе обеспечивается непосредственно геометрией устройства, без дополнительного внешнего воздействия и без использования спинокуляции. Следовательно, ограничение высоты инкубационной области до 150 мкм создает условия для сокращения характерного времени сближения лентивирусных частиц и Т-лимфоцитов за счет диффузии.

4.2 Иммунофенотипирование Т-клеток после трансдукции в МФУ

Для оценки влияния геометрии микрофлюидного устройства на свойства полученного клеточного продукта было проведено иммунофенотипирование Т-клеток после трансдукции в МФУ. Данный анализ позволил изучить динамику субпопуляционного состава Т-клеток при различной длительности времени инкубации при фиксированном значении MOI = 3, и сравнить эти результаты с клетками, подвергшимися стандартным условиям трансдукции в планшете.

Фенотипы как исходных Т-клеток, так и CAR-T были охарактеризованы с помощью проточной цитометрии. На основе экспрессии маркеров CD45RO и CCR7 среди $CD3^+$, $FMC63^-$, $CD4^+$, $CD3^+$, $CD8^+$ были проанализированы следующие ключевые популяции (рисунок 22 – A, B):

– Т-клетки наивно-подобного фенотипа (Tnlp);

– центральные Т-клетки памяти (Tcm);

– эффекторные Т-клетки памяти (Tem);

– терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки (Temra).

Анализ субпопуляций проводился на 1-й и 7-й дни после трансдукции. Количество Tnlp, Tcm, Tem и Temra были сопоставимы для всех групп, инкубированных в МФУ (6, 12, 18 или 24 часа), и клеток, трансдуцированных в контрольном планшете. Тем не менее, результаты проточной цитометрии

указывали на более высокое содержание Tnlp в МФУ по сравнению с контрольной группой.

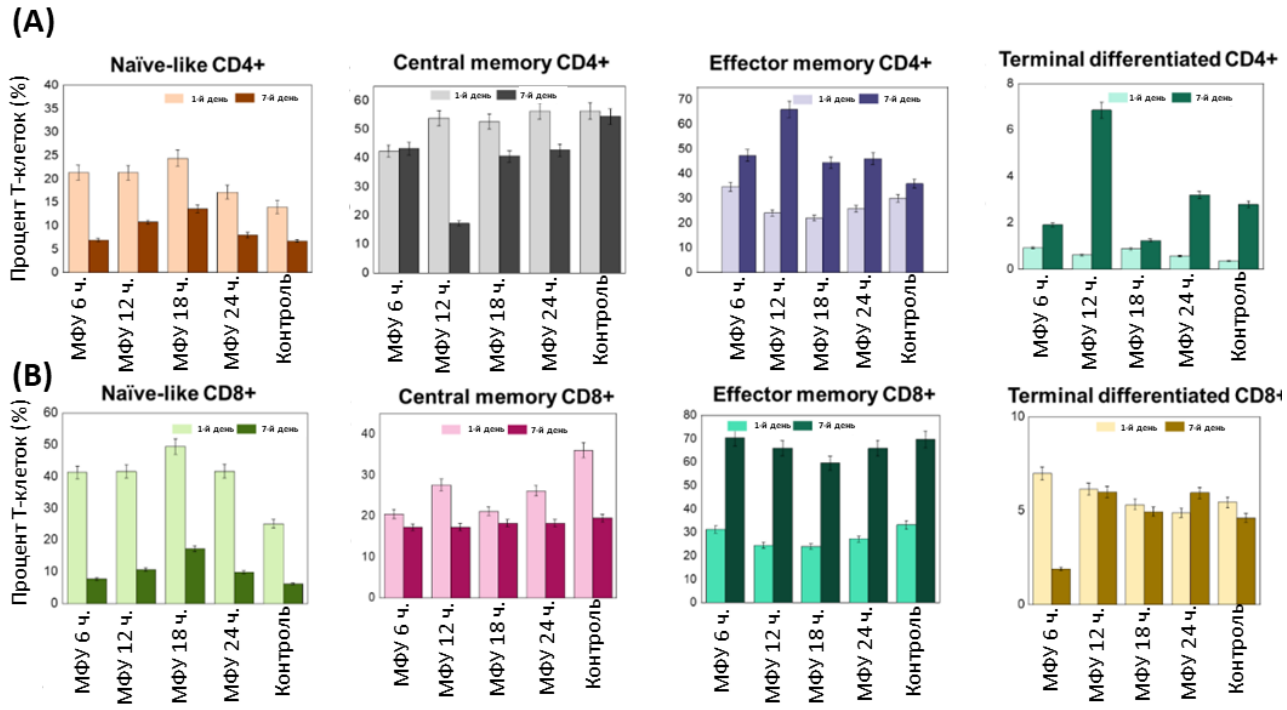


Рисунок 22 – (A) Процент CD4+ Т-лимфоцитов в соответствии с их субпопуляционным составом на 1-й и 7-й день (через 6, 12, 18, 24 ч.) после трансдукции в МФУ; (B) Процент CD8+ Т-лимфоцитов в соответствии с их субпопуляционным составом на 1-й и 7-й день (через 6, 12, 18, 24 ч.) после трансдукции в МФУ. Статистическая обработка экспериментальных данных в работе выполнялась с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса для межгруппового анализа и критерия Манна–Уитни для попарных сравнений. Число повторов для каждой экспериментальной группы было равно 5 [77]

Важным наблюдением, связанным с кинетикой клеточного дифференцирования, стало сокращение наивно-подобной популяции Т-клеток с течением времени: количество Tnlp $CD4^+$ было заметно выше на 1-й день после начала культивирования по сравнению с 7-м днем, для Tnlp $CD8^+$ наблюдалась такая же кинетика. Это снижение объясняется дифференцированием Т-клеток из-за активационных процессов. Активационные сигналы стимулируют созревание

Tnlp в более узкие субфенотипы, такие как Tcm, Tem и Temra, что приводит к наблюдаемому сокращению популяции Tnlp к 7-му дню.

Несмотря на то, что инкубация активированных Т-лимфоцитов в МФУ демонстрировала явление псевдотрансдрукции (временной экспрессии CAR), само МФУ не оказывало негативного влияния ни на выживаемость, ни на фенотип, поддерживая субпопуляционный состав, сравнимый с контролем и показывая тенденцию к сохранению Tnlp.

4.3 Сверхбыстрый протокол: результаты одномоментной активации и трансдукции Т-клеток в МФ

Для данной части исследования было использовано МФУ с увеличенной площадью инкубации и высотой канала 150 мкм. $1.8x10^6$ Т-клеток, полученных после магнитной селекции, смешивали с ЛВ при MOI = 3 и наночастицами для активации, после суспензия помещалась в МФУ на 24 часа при конечном объеме суспензии 110 мкл. Сравнение эффективности проводилось с использованием двух контрольных групп. Для первой контрольной группы (Контроль 1) Т-клетки инкубировались в стандартной лунке 48-луночного планшета при тех же условиях клеточности и объемов, для второй контрольной группы (Контроль 2) Т-клетки инкубировались в 6-луночном планшете с общим объемом суспензии 1.8 мл (рисунок 23 – A). Важным моментом использования сверхбыстрого протокола являлось объединение процесса активации и трансдукции при создании CAR-T (рисунок 23 – B). Данный одностадийный подход направлен на повышение эффективности трансдукции Т-клеток, не подвергшихся предварительной активации. Эффективность трансдукции во всех группах оценивалась методом проточной цитометрии на 7-й день культивирования, что позволило нивелировать эффект псевдотрансдукции, проявляющийся в первые 24 часа трансдукции (рисунок 23 – C) [115].

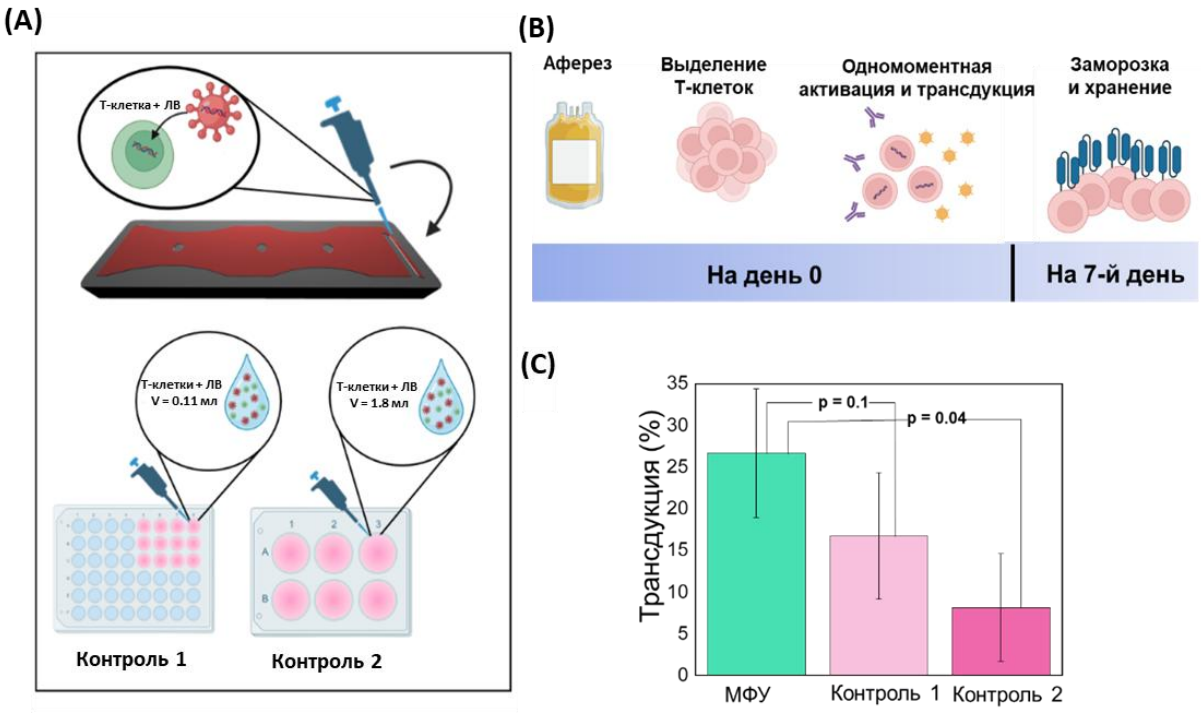


Рисунок 23 – (A) Схематическая иллюстрация эксперимента в МФУ и контрольных образцах; (B) Схематическая иллюстрация сверхбыстрого протокола создания CAR-T, которая включает аферез, выделение Т-клеток, одномоментную активацию, трансдукцию и пролиферацию; (C) Эффективность трансдукции Т-клеток, инкубированных в МФУ и в планшетных лунках (контроль 1 и контроль 2) на 7-й день; (D) Эффективность пролиферации Т-клеток, инкубированных в МФУ и в планшетных лунках (контроль 1 и контроль 2) на 0, 1 и 7-й день. Количество повторов для каждой экспериментальной группы было равно 5 [77]

Полученные данные показали различия эффективности трансдукции при одномоментной активации и трансдукции в МФУ и в планшетных контрольных системах. На 7-й день уровень трансдукции в МФУ составил 27±8%, в первой контрольной группе при том же объеме суспензии – 17±8%, во второй контрольной группе – 8±6%. По сравнению с первой контрольной группой наблюдалась тенденция к увеличению эффективности трансдукции, однако различие не достигало уровня статистической значимости ($p = 0.100$). По сравнению со второй контрольной группой различие было статистически значимым ($p = 0.040$).

Полученные результаты согласуются с предположением о том, что ограничение высоты инкубационной области МФУ и, как следствие, уменьшение характерного расстояния между Т-лимфоцитами и лентивирусными частицами способствует увеличению вероятности их взаимодействия. При этом отсутствие статистически значимого различия с 48-луночным контролем при том же объеме суспензии не позволяет рассматривать влияние геометрии как единственный фактор, определяющий эффективность трансдукции. Таким образом, разработанное МФУ обеспечивает реализацию одноэтапной активации и трансдукции Т-лимфоцитов в течение 24 ч при эффективности трансдукции 27±8% для MOI = 3 и сохранении пролиферативного потенциала клеток.

4.4 Сравнение фенотипа CAR-T продукта, полученного с помощью сверхбыстрого, быстрого и стандартного протоколов

Сравнение иммунофенотипа конечного CAR-T продукта, полученного с использованием МФУ по сверхбыстрому протоколу (24 часа), с клеточными продуктами, полученными с помощью быстрого (3 дня) и стандартного (9 дней) протоколов (рисунок 24 – А), является важным моментом валидации эффективности предложенного подхода. Целью являлось подтверждение гипотезы о том, что сокращение времени культивирования *ex vivo* позволяет сохранить субпопуляции Т-клеток с более высокой пролиферативной активностью и лучшим клиническим потенциалом.

Анализ $CD3^+$ Tnlp (рисунок 24 – В) показал, что сверхбыстрый протокол, реализованный как в планшете, так и в МФУ, обеспечил сохранение значительной более высокой доли Tnlp по сравнению с более длительными протоколами:

– в сверхбыстром протоколе в МФУ (24 часа) содержание $CD3^+$ Tnlp составило 25.05±16.47%;

– в сверхбыстром контроле (24 часа) содержание составило 29.75±16.09%. Статистически значимых различий между и ультрабыстрым контролем не наблюдалось (p = 0.421);

– в быстром протоколе (3 дня) содержание $CD3^+$ Tnlp снизилось до 7.93±2.49%. Это снижение является статистически значимым по сравнению со сверхбыстрым протоколом в МФУ (p = 0.009);

– в стандартном протоколе (9 дней) наблюдалось максимальное истощение рассматриваемой популяции 3.29±2.55%. Разница со значением в МФУ была статистически значимой (p = 0.008).

Таким образом, количество CD3+ Tnlp в продукте, полученном с использованием сверхбыстрого протокола в МФУ, была в ~6 раз выше по сравнению со стандартным 9-дневным протоколом. Аналогичная картина значительного сохранения наивно-подобного фенотипа наблюдалась при анализе $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций (рисунок 24 – C, D).

Таблица 5 – Сравнительная таблица анализа CD4+ и CD8+ субпопуляций

Протокол	CD4+ Tnlp CAR+	p-значение (по сравнению с МФУ)	CD8+ Tnlp CAR+	p-значение (по сравнению с МФУ)
Сверхбыстрый МФУ (1 день)	19.21±18.95 %	—	34.46±13.28 %	—
Быстрый контроль (3 дня)	4.01±1.89 %	0.032	13.04±4.92 %	0.008
Стандартный контроль (9 дней)	2.94±3.35 %	0.047	3.42±2.23 %	0.008

Данные демонстрируют факт сдвига фенотипа при длительном культивировании. Через 72 часа (быстрый протокол) уровень CAR^+ Tnlp значительно снижается, тогда как сверхбыстрый протокол (24 часа) эффективно сохраняет 25% Tnlp, в то время как стандартный протокол всего 4%. Это подтверждает, что сокращение времени культивирования *ex vivo* является эффективной стратегией для предотвращения дифференцировки в более зрелые и менее пролиферативные субпопуляции (Tem и Temra).

Соотношение $CD4^+/CD8^+$ в конечном продукте (рисунок 24 – E) также является важным параметром, который может коррелировать с клинической эффективностью. Исходное соотношение в Т-лимфоцитах составляло 1.20±0.44.

Сравнение соотношений в различных протоколах показало следующее:

– сверхбыстрый протокол в МФУ (24 часа): 1.63±0.65;

– сверхбыстрый протокол контроль (24 часа): 1.78±0.68;

– быстрый протокол (3 дня): 1.50±0.68;

– стандартный протокол (9 дней): 0.69±0.47.

Общий межгрупповой анализ не достиг принятого уровня статистической значимости ($p = 0.124$). Вместе с тем данный результат характеризует совокупное сравнение всех исследованных групп и не исключает наличия различий между отдельными парами. Дополнительное попарное сравнение сверхбыстрого протокола в МФУ со стандартным 9-дневным протоколом с использованием обобщенного критерия Стьюдента (критерия Уэлча) показало статистически значимое различие ($t = 2.62$; $p = 0.033$). Таким образом, при принятом уровне значимости $\alpha = 0,05$ более высокое соотношение $CD4^+/CD8^+$ в CAR-T-продукте, полученном по сверхбыстрому протоколу в МФУ, по сравнению со стандартным протоколом является статистически подтвержденным. Полученный результат указывает на то, что сокращение продолжительности *ex vivo*-культивирования в сверхбыстром протоколе сопровождается сохранением более высокого относительного содержания $CD4^+$ клеток по отношению к $CD8^+$ клеткам в конечном продукте.

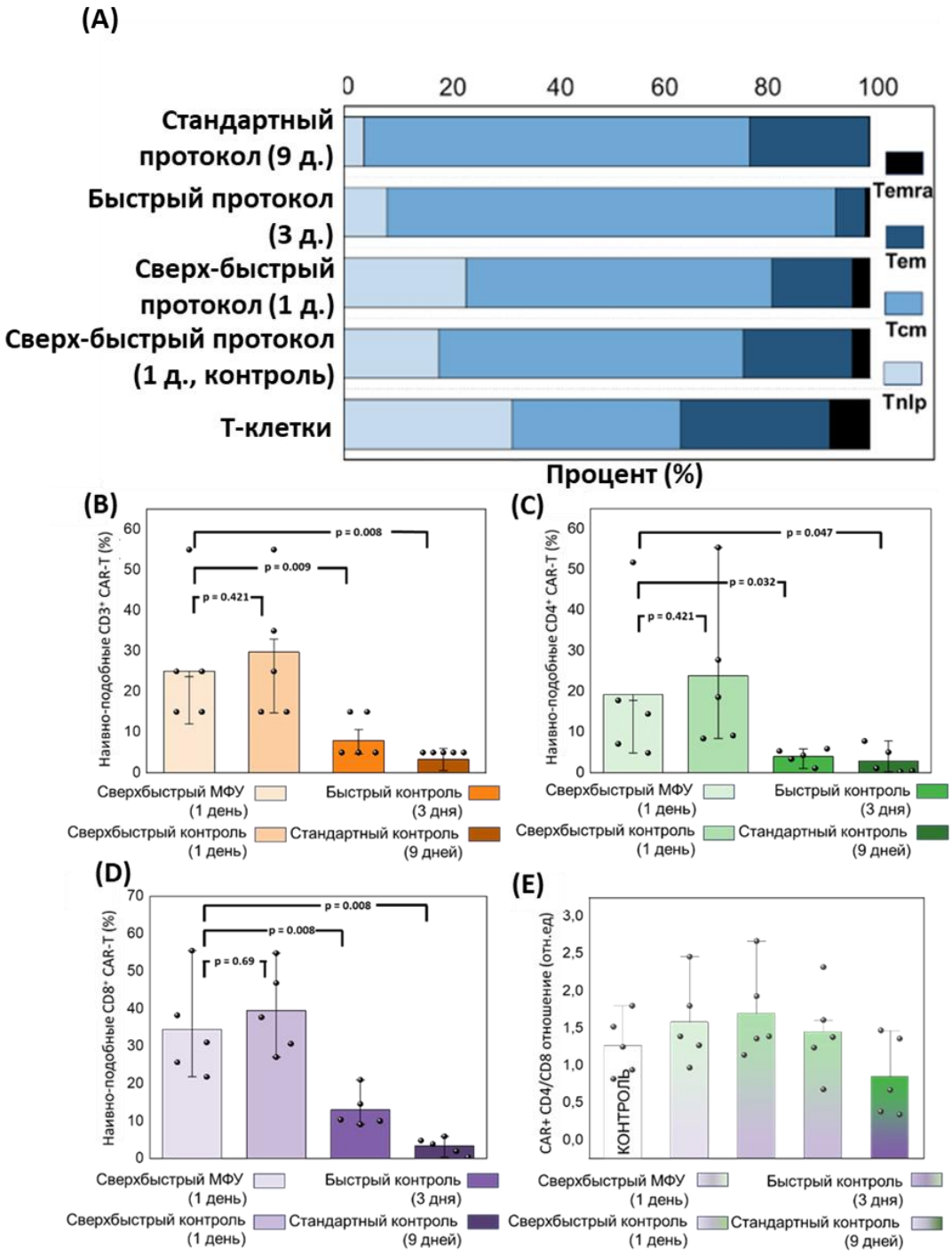


Рисунок 24 – (A) Иммунофенотип CAR Т-клеток в соответствии с используемым протоколом. (B) Процент наивных клеток, экспрессирующих $CD3^+$ CAR. (C) Процент наивных клеток, экспрессирующих $CD4^+$ CAR. (D) Процент наивных клеток, экспрессирующих $CD8^+$ CAR. (E) Соотношение $CD4^+/CD8^+$ CAR-экспрессирующих клеток. Количество повторов для каждой экспериментальной группы было равно 5 [77]

Проведенное иммунофенотипирование показывает, что микрофлюидное устройство, используемое для сверхбыстрого протокола (24 часа), позволяет получить CAR-T продукт с фенотипом, значительно обогащенным наивно-подобными Т-клетками, что является важным фактором в вопросе достижения устойчивого противоопухолевого ответа [77].

В результате было получено микрофлюидное устройство с разработанной геометрией для одномоментной активации и трансдукции, обеспечивающее сверхбыстрое (24 ч.) производства CAR-T клеток. Использование предложенного микрофлюидного устройства позволило достичь повышенной эффективности трансдукции по сравнению с традиционными протоколами, сохранения в конечном продукте значительно более высокую долю Т-клеток с наивно-подобным фенотипом. Полученные результаты подтверждают потенциал микрофлюидных технологий как масштабируемой и технологически эффективной платформы для клеточной терапии и клинической интеграции.

ГЛАВА 5. Быстродействующий оптический датчик влажности на основе $CsPbBr_3@CaCO_3$

Разработанный в настоящей работе подход к проектированию микрофлюидных устройств основан на согласовании геометрии функциональных зон устройства с характерными пространственными и временными масштабами протекающего физико-химического процесса. В предыдущих разделах данный принцип был реализован за счет управления условиями смешивания и временем взаимодействия реагентов при синтезе наночастиц, а также за счет сокращения диффузионного расстояния между клетками и вирусными носителями. Для сенсорных систем этот же подход может быть реализован посредством формирования функциональной области, обеспечивающей контакт анализируемой газовой среды с чувствительным материалом, и ее интеграции с оптической схемой регистрации сигнала. В рамках данной работы такая конфигурация реализована в виде 3D-печатной микрофлюидной кюветы с размещенной внутри подложкой, содержащей чувствительный композит $CsPbBr_3@CaCO_3$.

Галогенидные перовскитные структуры представляют интерес для фотоники, оптоэлектроники и сенсорных применений благодаря выраженному изменению их оптических характеристик под действием внешних факторов. Одним из существенных ограничений их практического применения является чувствительность к влаге. Вместе с тем именно зависимость структурного и оптического состояния перовскита от относительной влажности может быть использована как физический принцип работы сенсорного элемента. В настоящей работе данное свойство рассматривается не как исключительно фактор деградации материала, а как управляемый механизм преобразования изменения влажности газовой среды в регистрируемый оптический сигнал.

В качестве чувствительного материала были использованы нанокристаллы $CsPbBr_3$, сформированные в пористой матрице микронных сфер $CaCO_3$. На их

основе в микрофлюидном устройстве реализована регистрация изменений влажности.

Использование оптического принципа регистрации позволяет пространственно разделить чувствительный материал и электронную часть измерительной системы: изменение состояния CsPbBr3@CaCO3 регистрируется по изменению фотолюминесцентного сигнала, формируемого при оптическом возбуждении. Размещение чувствительного слоя внутри специально спроектированной 3D-печатной кюветы обеспечивает объединение в одном устройстве функциональной зоны взаимодействия с газовой средой и зоны оптической регистрации. Таким образом, сенсорная задача рассматривается в рамках того же общего принципа, что и предыдущие задачи диссертационной работы: требуемый физико-химический процесс задается не только свойствами используемого материала, но и геометрией устройства, определяющей условия его взаимодействия с исследуемой средой.

Разработанная концепция может быть использована для регистрации изменений влажности, в том числе связанных с дыхательной активностью человека. Частота, глубина и ритм дыхания определяют временную последовательность изменений влажности выдыхаемого воздуха, поэтому для такой задачи принципиальным параметром становится быстродействие сенсорной системы.

5.1 Синтез и структурно-морфологическая характеристика $CsPbBr_3@CaCO_3$

В данной части диссертационного исследования использовался метод синтеза нанокристаллов $CsPbBr_3$ внутри сфер $CaCO_3$. Такой подход позволил получить перовскитные нанокристаллы с высокой площадью поверхности, что обеспечивало эффективное взаимодействие с влагой. В качестве матрицы синтеза

были выбраны сферы карбоната кальция в одной из его аллотропных модификаций – ватерита из-за высокой пористости.

Синтез ватерита осуществлялся посредством реакции соосаждения путем смешивания водных растворов Na_2CO_3 и $CaBr_2$. После синтеза сферы карбоната кальция были промыты раствором диметилсульфоксида (ДМСО) для удаления воды и непрореагировавших остатков. Последующий синтез частиц $CsPbBr_3$ проводился непосредственно внутри пор сфер карбоната кальция. Ватеритные частицы смешивались с прекурсорами $PbBr_2$ и CsBr в ДМСО, формируя концентрированную реактивную суспензию. В процессе синтеза варьировалось соотношение Pb:Cs (1:1.0, 1:1.3 и 1:1.5). Суспензия наносилась на стеклянную подложку методом центрифужного нанесения. Кристаллизация $CsPbBr_3$ внутри пор частиц $CaCO_3$ происходила за счет медленного испарения ДМСО при температуре 30°C (рисунок 25).

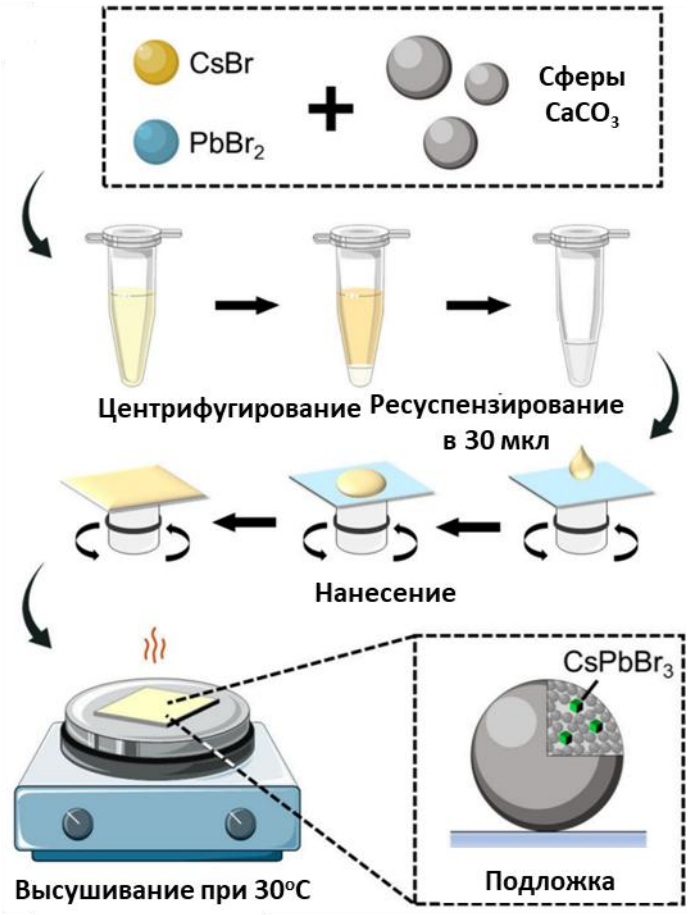


Рисунок 25 – Схематическое изображение процесса синтеза $CsPbBr_3@CaCO_3$

Для детального изучения морфологии и распределения по размерам синтезированных композитов $CsPbBr_3@CaCO_3$ использовалась СЭМ (рисунок 26 – A). СЭМ-изображения показали, что частицы ватерита с интегрированными в них кристаллами $CsPbBr_3$ имеют сферическую форму со средним размером частиц 2.7±0.7 мкм (рисунок 26 – B). Размер пор был измерен с использованием метода Брунауэра-Эммета-Теллера, при этом средний размер составил 14.4 нм. Оптическая идентификация синтезированных частиц $CsPbBr_3$ в матрице $CaCO_3$ была выполнена с помощью флуоресцентной спектроскопии. Синтезированные композиты демонстрируют отчетливый флуоресцентный отклик с максимумом при длине волны 515 нм (рисунок 26 – C, D). Для подтверждения успешной интеграции $CsPbBr_3$ в матрицу $CaCO_3$ была проведена ЭДС (рисунок 26 – E). Карты ЭДС показали, что пространственное распределение составляющих элементов кристаллов $CsPbBr_3$ совпадает с распределением Ca, C и O [107].

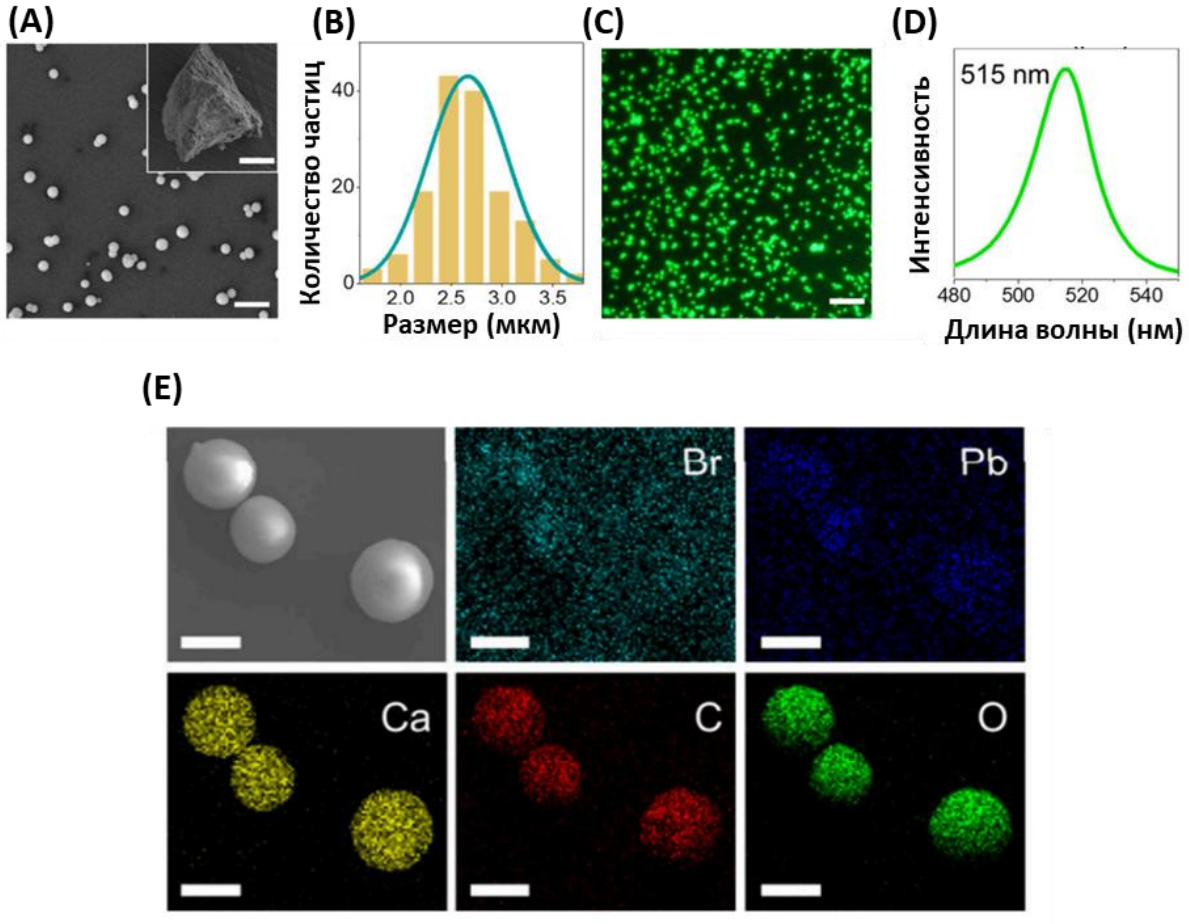


Рисунок 26 – (A) Изображение сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа; на вставке показана одна треснувшая сфера $CsPbBr_3@CaCO_3$. Масштабная линейка соответствует 10 и 1 мкм соответственно. (B) Распределение сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ по размерам, полученное из изображений СЭМ. (C) Изображение сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$, полученное с помощью КЛСМ. Масштабная линейка соответствует 25 мкм. (D) Спектр фотолюминесценции $CsPbBr_3@CaCO_3$ с максимумом при 515 нм ($\lambda_{exc.}$ = 360 нм). (E) Картирование методом энергодисперсионной спектроскопии с соответствующим распределением элементов в сферах $CsPbBr_3@CaCO_3$. Масштабная линейка соответствует 2 мкм [107]

5.2 Флуоресцентный отклик $CsPbBr_3@CaCO_3$ на изменение относительной влажности (ОВ)

Для проведения исследований флуоресцентного отклика на изменение ОВ была использована специально разработанная экспериментальная установка, позволяющая контролировать градиент потока газа и измерять спектры флуоресценции при постоянной температуре 24°C (рисунок 27).

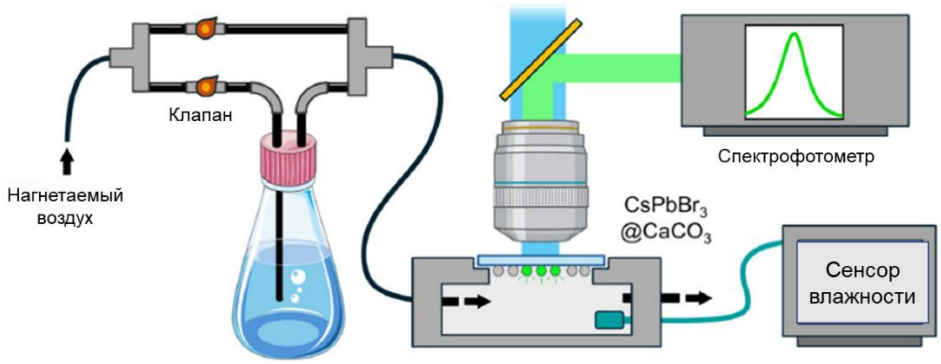


Рисунок 27 – Схематическое изображение экспериментальной установки. Эта установка позволила контролировать относительную влажность газового потока внутри 3D-печатной кюветы, содержащей стеклянную подложку с частицами $CsPbBr_3@CaCO_3$, одновременно обеспечивая измерение спектров флуоресценции. Флуоресцентный отклик измерялся первоначально, по мере постепенного увеличения ОВ от 15% до 80%, а затем снижения от 80% до 15%. Температура внутри кюветы тщательно контролировалась, чтобы все измерения спектром флуоресценции проводились при 24 °C [107].

Для исследования влияния стехиометрии на чувствительность и оптические свойства были синтезированы образцы $CsPbBr_3@CaCO_3$ с тремя различными молярными соотношениями прекурсоров $PbBr_2$:CsBr: 1:1.0, 1:1.3 и 1:1.5. Различия в соотношениях прекурсоров для синтеза перовскитов, по имеющимся данным, могут влиять на квантовый выход фотолюминесценции [116]. В результате анализа, для всех трех образцов наблюдалась общая тенденция: интенсивность

флуоресценции постепенно увеличивалась по мере повышения относительной влажности. Однако, после достижения 60% ОВ интенсивность флуоресценции начинала снижаться. Это значение было определено, как критическое значение ОВ, после которой наблюдается необратимое снижение интенсивности, в результате деградации материала (Рисунок 28 – A, B, C). В исследованном ряду составов наблюдалось последовательное увеличение наклона зависимости интенсивности фотолюминесценции от ОВ при увеличении содержания CsBr.

Наклоны кривых интенсивности в диапазоне от 15% до 60% ОВ были выше для образцов с более высоким содержанием CsBr:

– Pb:Cs = 1:1.0, наклон – 0.004;

– Pb:Cs = 1:1.3, наклон – 0.008;

– Pb:Cs = 1:1.5, наклон – 0.010.

Поскольку более высокие значения наклона коррелируют с большей чувствительность к изменениям ОВ, для всех дальнейших исследований было выбрано соотношение 1:1.5.

Для количественного описания отклика композита $CsPbBr_3@CaCO_3$ интенсивность фотолюминесценции нормировали относительно значения, зарегистрированного при 30% ОВ. Относительный оптический отклик определяли как:

$$R(RH) = \frac{I_{RH} - I_0}{I_0} \cdot 100\% \quad (49)$$

где I_0 — интенсивность фотолюминесценции при 30% ОВ; I_{RH} — интенсивность фотолюминесценции при заданной относительной влажности. При 30% ОВ величина R равна нулю. При ОВ ниже 30% R может принимать отрицательные значения; это отражает только направление изменения сигнала относительно выбранной точки нормировки и не означает отрицательную чувствительность.

Чувствительность композита к относительной влажности определяли как наклон зависимости относительного оптического отклика от ОВ:

$$S_{RH} = \frac{\Delta R}{\Delta RH} \quad (50)$$

Для композита $CsPbBr_3@CaCO_3$ с соотношением Pb:Cs = 1:1.5 наклон зависимости нормированной интенсивности фотолюминесценции составлял около 0.010 на 1% ОВ, что соответствует чувствительности $S_{RH} \approx 1.0\%/\%$ ОВ в обратимом диапазоне 15–60% ОВ. При увеличении ОВ с 15% до 80% наблюдался минимальный сдвиг пика длины волны, составляющий примерно 0.8 нм (рисунок 28 – D).

Для понимания механизма отклика было проанализировано изменение квантового выхода фотолюминесценции (рисунок 28 – E). По мере увеличения ОВ в диапазоне от 20 % до 75 % наблюдалось увеличение квантового выхода с 0.41 до 0.56, что объясняется уменьшением количества дефектов. Необратимая деградация наблюдалась при уровнях ОВ выше 60 %, поэтому была исследована обратимость процесса в диапазоне 15 %–60 % ОВ. В этом диапазоне процесс был определен как полностью обратимый. Дополнительный тесты стабильности включали измерение интенсивности в течение 20 циклов переключения между 15 % и 60 % ОВ (рисунок 28 – F). Интенсивность при этом оставалась неизменной, что подтверждает высокую стабильность $CsPbBr_3$ в указанном диапазоне ОВ. Интенсивность образцов, подвергнутых воздействию 50 % ОВ в течение 60 минут, оставалась неизменной, а образцы, хранившиеся при атмосферных условиях, сохраняли неизменную интенсивность в течение более четырех месяцев.

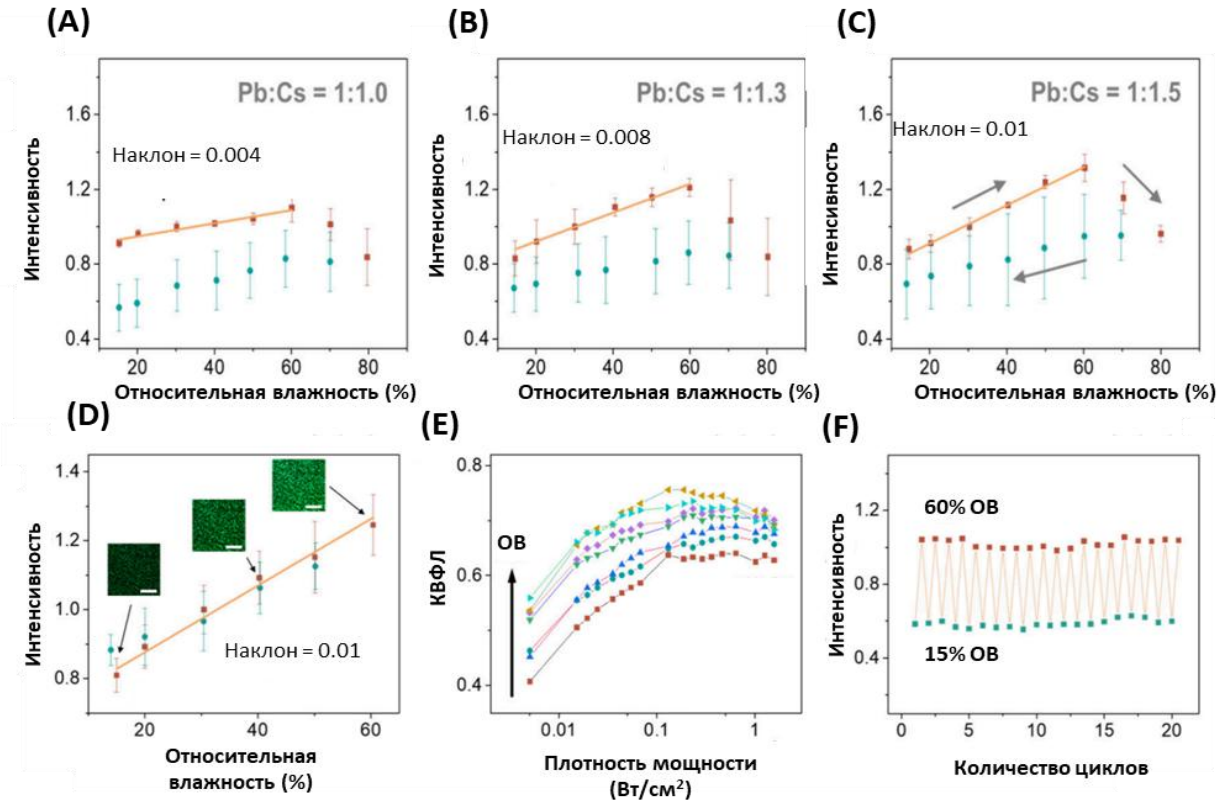


Рисунок 28 – Оптическая характеристика сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ во влажном воздухе. Интенсивность фотолюминесценции сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ с различными соотношениями Pb:Cs при разных значениях относительной влажности (A) 1:1; (B) 1:1.3; (C) 1:1.5 в атмосферных условиях. (D) Интенсивность фотолюминесценции сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ (Pb:Cs = 1:1.5) при разных значениях относительной влажности в атмосферных условиях от 15% до 80% ОВ (E) Квантовый выход фотолюминесценции сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ (Pb:Cs = 1:1.5) при разных значениях относительной влажности в атмосферных условиях. (F) Стабильность интенсивности фотолюминесценции сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ (Pb:Cs = 1:1.5) при изменении влажности (от 15% до 60%) в течение 20 циклов в окружающем воздухе. Погрешности на графике представляют собой стандартные отклонения от измерений, проведенных с различными образцами (n = 3) [107]

5.3 Механизм флуоресцентного отклика и деградации материала под воздействием влажности

Следующим шагом было исследование механизмов, лежащих в основе флуоресцентного отклика и последующей необратимой деградации композитов в условиях повышенной ОВ.

Анализ рентгеновской дифракции образцов, находящихся под воздействием 30% и 80% ОВ, выявил присутствие двух основных фаз: орторомбической фазы $CsPbBr_3$ с пространственной группой Pbnm и фазы ватерита $CaCO_3$. Также дополнительно были обнаружены пики, которые могут быть отнесены к тетрагональной фазе $CsPb_2Br_5$ (рисунок 29). Наблюдались следующие закономерности:

– в образце при 30% ОВ наблюдался сигнал при 37.5°, соответствующий плоскости (211) орторомбической фазы $CsPbBr_3$;

– в образце при 80% ОВ этот сигнал трансформировался в пик при 38°, соответствующий плоскости (312), что является признаком формирования тетрагональной фазы $CsPb_2Br_5$.

Несмотря на то, что фаза $CsPb_2Br_5$ наблюдалась в образце при 30% ОВ, ее количество значительно увеличилось при увеличении ОВ до 80%. Это позволило предположить наличие прямой корреляции между необратимым снижением интенсивности флуоресценции и увеличением содержания фазы $CsPb_2Br_5$.

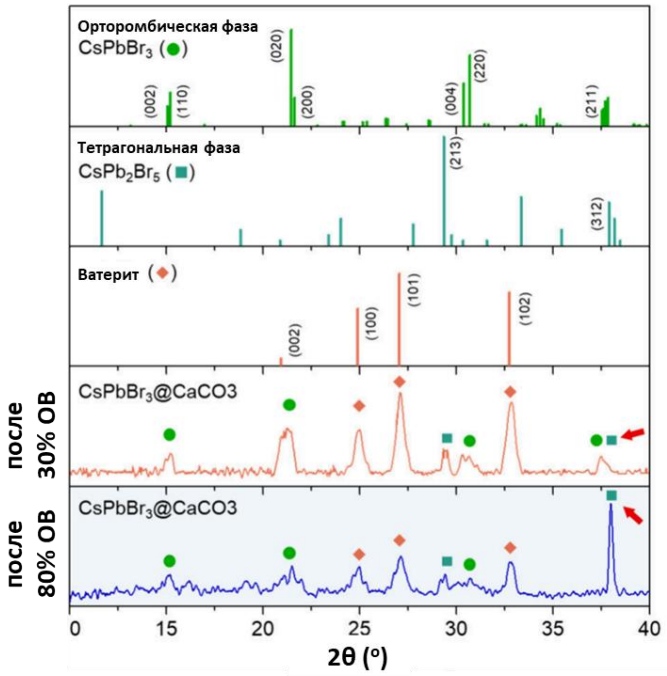


Рисунок 29 – Рентгенодифракционные спектры структур $CsPbBr_3@CaCO_3$ после воздействия относительной влажности 30% и 80%. Кристаллографические плоскости (002), (110), (020), (200), (004) и (220) соответствуют орторомбической фазе $CsPbBr_3$. Кристаллографические плоскости (020), (120) и (211) соответствуют фазе ватерита $CaCO_3$. Кристаллографические плоскости (213) и (312) соответствуют тетрагональной фазе $CsPb_2Br_5$. Красная стрелка указывает на образование тетрагональной фазы $CsPbBr_3$ после обработки при относительной влажности 80% [107]

Для определения, связана ли необратимая деградация только с водой или составом атмосферы, был проведен сравнительный анализ отклика в чистом азоте N_2 (рисунок 30 – А) и чистом углекислом газе CO_2 (рисунок 30 – В). В атмосфере чистого N_2 интенсивность флуоресценции продолжала расти после превышения 60% ОВ вплоть до 80% ОВ, и процесс оставался обратимым.

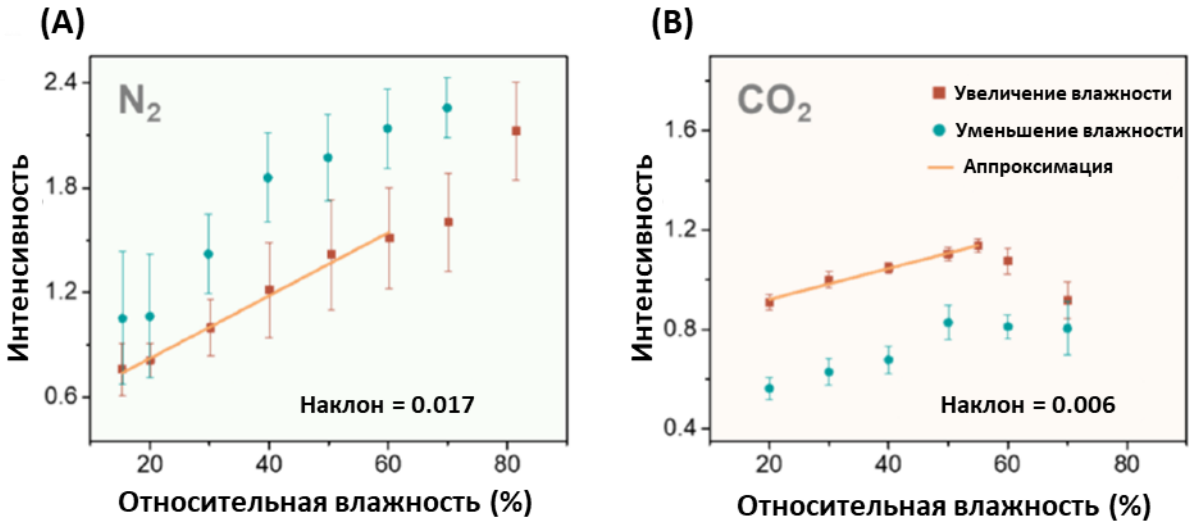


Рисунок 30 – Интенсивность фотолюминесценции сфер $CsPbBr_3$@$CaCO_3$ при различных значениях относительной влажности в атмосфере (A) N_2 (B) CO_2 [107]

Наклон кривой при увеличении интенсивности до 60 % ОВ составил 0,017, что выше, чем в атмосферном воздухе. В атмосфере чистого CO_2 образец показал снижение интенсивности, схожее с наблюдаемым в атмосферном воздухе, но деградация наблюдалась при более низкой ОВ (55 %). Наклон кривой от 15 % до 55 % ОВ в CO_2 составил 0,006. Сравнительный анализ необратимого снижения интенсивности флуоресценции показал, что для атмосферного воздуха разница составила 0.16, тогда как в чистом CO_2 эта разница была почти вдвое выше (0,37). Полученные данные убедительным образом демонстрируют картину снижения интенсивности флуоресценции в присутствии CO_2.

Таким образом, был предложен следующий двухступенчатый механизм отклика:

i.Обратимое улучшение (при ОВ <60 %): при низких уровнях ОВ вода индуцирует диссоциацию ионов Cs^+ и Br^- с поверхности кристаллов $CsPbBr_3$, что способствует фазовой трансформации в $CsPb_2Br_5$. Этот процесс приводит к удалению поверхностных дефектов, что объясняет повышение квантового выхода фотолюминесценции до 0.56 при 75 % ОВ.

ii.Необратимая деградация (при ОВ >60 %): при превышении критической ОВ на пористой поверхности $CaCO_3$ происходит конденсация воды. Присутствие CO_2

приводит к образованию угольной кислоты (H_2CO_3), которая ускоряет растворение $CsPbBr_3$ и способствует формированию $CsPb_2Br_5$ и Cs_2CO_3. Формирование Cs_2CO_3 обеспечивает необратимость фазовой трансформации. При последующем снижении влажности $CsPb_2Br_5$ частично возвращается к $CsPbBr_3$, однако этот процесс происходит с образованием новых поверхностных дефектов, что приводит к постоянному снижению эффективности флуоресценции.

5.4 Сенсорное применение $CsPbBr_3@CaCO_3$

На основе исследованного механизма флуоресцентного отклика был разработан прототип флуоресцентного сенсора влажности. Конструкция включает композит $CsPbBr_3$@CaCO3, нанесенный на стеклянную подложку, светодиод (395 нм) для возбуждения сигнала, длинноволновый оптический фильтр с отсечкой на 500 нм и фотодиод для преобразования оптического сигнала в электрический. Все это было интегрировано в специальный блок, напечатанный на фотополимерном 3D-принтере (рисунок 31 – А).

Ключевым преимуществом разработанного сенсора является его динамика отклика. Было продемонстрировано, что при резком изменении ОВ (25 %–30 %) время отклика составляет менее 4 с, а время восстановления при уменьшении ОВ (44 %–33 % ОВ) составляет менее 2 с (рисунок 31 – В). Эти показатели являются в 60–120 раз быстрее, чем у большинства флуоресцентных сенсоров влажности, описанных ранее. Сенсор продемонстрировал высокую чувствительность, оцениваемую на уровне 1% на % ОВ в рабочем диапазоне от 15 % до 60 %. Для калибровки использовалась кривая, отражающая зависимости выходного напряжения от ОВ. Кривая аппроксимируется двумя кусочно-заданными функциями с точкой перегиба, находящейся при 30% ОВ. Полученные значения наклонов составили 5.93 мВ/%ОВ для влажности ниже 30 % ОВ и 0.78 мВ/%ОВ для влажности выше 30 % ОВ (рисунок 31 – С). Это явным образом указывает на

высокую чувствительность разработанного сенсора при значениях влажности ниже 30 % ОВ.

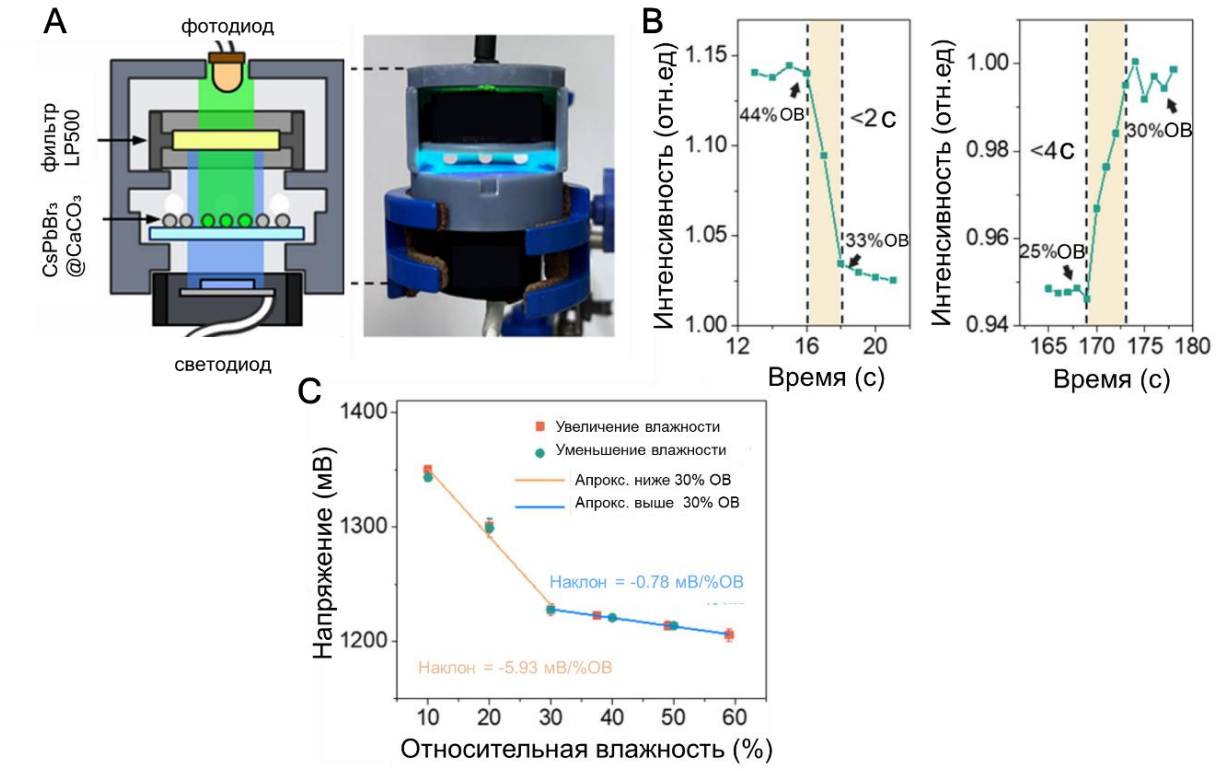


Рисунок 31 – Применение структур $CsPbBr_3@CaCO_3$ для измерения влажности. (A) Схематическое изображение прототипа датчика влажности на основе $CsPbBr_3@CaCO_3$. Датчик влажности был создан путем нанесения сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ на стеклянную подложку. В качестве источника возбуждения для наночастиц $CsPbBr_3$ использовался светодиод с длиной волны 395 нм. Излучаемый сигнал фильтровался через длинноволновый оптический фильтр (500 нм). Фотодиод детектировал флуоресценцию, преобразуя ее в электрический сигнал, который непрерывно контролировался цифровым мультиметром. (B) Время отклика сигнала флуоресценции сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ при переходе между 44% и 33% и 25% и 30% относительной влажности. (C) Калибровочная кривая для прототипа датчика влажности на основе сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$. Погрешности на графике представляют собой стандартные отклонения от различных измерений, проведенных с одним образцом (n = 3) [107]

В результате проведенного исследования реализован микрофлюидный подход к оптической регистрации влажности, основанный на интеграции

чувствительного материала $CsPbBr_3$@$CaCO_3$ в функциональную геометрию 3D-печатной кюветы и оптической схемы регистрации. Пористая матрица $CaCO_3$ обеспечивала взаимодействие нанокристаллов $CsPbBr_3$ с влажной средой, а конструкция устройства – размещение чувствительного слоя в области воздействия анализируемой газовой среды и регистрацию изменения его фотолюминесценции. Установлено, что при увеличении относительной влажности в диапазоне 15–60% ОВ происходит обратимая фазовая трансформация $CsPbBr_3$ → $CsPb_2Br_5$, сопровождающаяся изменением интенсивности фотолюминесценции. На основе выявленного механизма разработан прототип оптического сенсора влажности с временем отклика менее 4 с и временем восстановления менее 2 с; чувствительность устройства по выходному напряжению фотодиода составила 5.93 мВ/% ОВ при влажности ниже 30% ОВ. При ОВ выше 60% в присутствии атмосферного CO_2 наблюдалась необратимая деградация перовскитной структуры, что определяет ограничение рабочего диапазона сенсорного элемента. Таким образом, результаты главы демонстрируют применимость общего для диссертационной работы принципа проектирования, при котором функциональная геометрия микрофлюидного устройства и интеграция чувствительного элемента с системой регистрации обеспечивают заданные условия протекания физико-химического процесса и преобразование его результата в измеряемый сигнал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе разработан и экспериментально обоснован подход к проектированию микрофлюидных устройств, в котором геометрические параметры функциональных областей задаются с учетом характерных пространственных и временных масштабов определяющего физико-химического или биофизического процесса. В рамках данного подхода геометрия микрофлюидного устройства рассматривается не только как средство формирования и транспортировки потока, но и как инструмент управления массопереносом, диффузионным расстоянием, временем взаимодействия компонентов и условиями регистрации измеряемого сигнала. Применимость такого принципа была последовательно исследована для трех различных задач: синтеза и функционализации наночастиц карбоната кальция, модификации Т-лимфоцитов при производстве CAR-T клеточного продукта и оптической регистрации влажности.

Для задачи химического синтеза было разработано микрофлюидное устройство, изготовленное методом «мягкой» литографии и включающее три входных канала, область пассивного смешивания и функциональную область введения декстран сульфата или загружаемого соединения. Управление расходами реагентов, их концентрациями и временем взаимодействия позволило задавать условия соосаждения $CaCl_2$ и Na_2CO_3 непосредственно в микрофлюидном устройстве. Реализованный гидродинамический режим обеспечивал преобладание конвективного переноса вдоль канала при контролируемом поперечном смешивании реагентов. В результате оптимизации были получены наночастицы $CaCO_3$ размером 66±15 нм при общей продолжительности синтеза 5 мин. Функциональная геометрия устройства также позволила объединить синтез и последующую загрузку частиц в рамках одной платформы. Была продемонстрирована загрузка доксорубицина, Cy5-меченного бычьего сывороточного альбумина и плазмидной ДНК, а функциональность полученных

носителей подтверждена in vitro на клеточной линии HEK293. Таким образом, в данной конфигурации геометрия устройства обеспечивала управление кинетикой формирования частиц через заданные условия массопереноса и времени взаимодействия реагентов.

Для задачи клеточной инженерии определяющим параметром проектирования являлось диффузионное расстояние между Т-лимфоцитами и лентивирусными частицами. Ограничение высоты инкубационной области микрофлюидного устройства до 150 мкм позволило сократить максимальный пространственный масштаб диффузионного переноса и получить расчетное характерное время диффузии около 36 мин. Данная величина характеризует именно стадию массопереноса и не эквивалентна общей продолжительности трансдукции. На основе выбранной геометрии был реализован одноэтапный протокол, совмещающий активацию и трансдукцию Т-лимфоцитов в течение 24 ч. При MOI = 3 эффективность трансдукции составила 27±8%. Сокращение продолжительности *ex vivo*-культивирования позволило одновременно ограничить фенотипическую дифференцировку клеточного продукта и сохранить в конечном продукте долю наивно-подобных Т-лимфоцитов на уровне 25.05±16.47%, что превышало значение, полученное после стандартного 9-дневного протокола. Следовательно, в данной задаче функциональная геометрия непосредственно определяла характерный диффузионный масштаб, а сокращение технологического цикла до 24 ч обеспечивало сохранение наивно-подобных субпопуляций Т-лимфоцитов.

Для задачи оптической сенсорики был реализован другой вариант функциональной организации устройства, основанный на интеграции чувствительного материала $CsPbBr_3@CaCO_3$ с 3D-печатной микрофлюидной кюветой и оптической схемой регистрации. В этой конфигурации геометрия обеспечивала размещение чувствительного слоя в области взаимодействия с анализируемой газовой средой и его оптическое сопряжение с системой возбуждения и фотодетектирования. Пористая матрица $CaCO_3$ обеспечивала контакт нанокристаллов $CsPbBr_3$ с влажной атмосферой. Установлено, что

изменение относительной влажности сопровождается фазовым превращением $CsPbBr_3 \rightarrow CsPb_2Br_5$ и соответствующим изменением интенсивности фотолюминесценции. В диапазоне 15–60% ОВ процесс являлся обратимым. На основе выявленного механизма разработан прототип оптического сенсора с временем отклика менее 4 с и временем восстановления менее 2 с. Чувствительность устройства по модулю наклона калибровочной зависимости составила 5.93 мВ/% ОВ при влажности ниже 30% ОВ и 0.78 мВ/% ОВ при ОВ выше 30%. При этом установлено ограничение сенсорного материала: при ОВ выше 60% в присутствии атмосферного CO_2 происходят необратимые структурные изменения, связанные с деградацией перовскитной фазы, что ограничивает рабочий диапазон устройства.

Полученные результаты показывают, что для различных по физической природе процессов может быть использована единая последовательность проектирования микрофлюидного устройства. На первом этапе определяется процесс, ограничивающий достижение требуемого результата, и соответствующие ему пространственные и временные масштабы. На втором этапе выбираются геометрические параметры функциональной области, позволяющие управлять этим процессом. Для синтеза $CaCO_3$ такими параметрами являлись геометрия области смешивания, расходы потоков и определяемое ими время взаимодействия реагентов; для трансдукции Т-лимфоцитов – высота инкубационной области 150 мкм, ограничивающая диффузионный путь; для оптического сенсора – геометрия кюветы и взаимное расположение газового тракта, чувствительного слоя и элементов оптической регистрации. На заключительном этапе экспериментально оценивается влияние выбранной геометрии на целевой измеряемый параметр.

Таким образом, основным результатом диссертационной работы является экспериментальная демонстрация принципа проектирования микрофлюидных устройств, при котором функциональная геометрия выбирается исходя из физического механизма, определяющего работу конкретного устройства. Реализация данного принципа позволила в трех исследованных конфигурациях управлять соответственно кинетикой соосаждения и массопереносом реагентов,

диффузионным расстоянием между биологическими объектами и вирусными носителями, а также взаимодействием чувствительного материала с газовой средой и преобразованием оптического отклика в электрический сигнал. Разработанные устройства демонстрируют, что согласование геометрических параметров с характерными пространственно-временными масштабами процесса может использоваться как общий методологический принцип создания микрофлюидных систем для задач химического синтеза, клеточной инженерии и оптической сенсорики.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КЛСМ конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ЭДС энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

РФС рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

РД рентгеновская дифракция

ПДМС полидиметилсилоксан

SAED selected-area electron diffraction (локальная дифракция электронов)

ДРС динамическое рассеяние света

PBS phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

ТГА термогравиметрический анализ

ДСК дифференциальная сканирующая калориметрия

NPs nanoparticles (наночастицы)

DOX doxorubicin (доксорубицин)

pDNA-GFP plasmid DNA conjugated with green fluorescent protein (плазмидная ДНК, конъюгированная с зеленым флуоресцентным белком)

Cy5-BSA cyanine5 dye labelled bovin serum albumin (флуоресцентный краситель, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином)

FITC-BSA fluorescein isothiocyanate dye labelled bovin serum albumin (флуоресцеинизотиоцианат, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином)

ЛВ лентивирусный вектор

MOI multiplicity of infection (отношение числа инфекционных агентов (вирусы, бактерии) к числу мишеней (клеток) в определенном объеме)

ДМСО диметилсульфоксид

ОВ относительная влажность

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frey N., Sönmez U.M., Minden J., LeDuc P. Microfluidics for understanding model organisms // Nature Communications. — 2022. — Т. 13. — № 1. — С. 3195.

2. Moore N., Chevillet J.R., Healey L.J., McBrine C., Doty D., Santos J., Teece B., Truslow J., Mott V., Hsi P., Tandon V., Borenstein J.T., Balestrini J., Kotz K. A Microfluidic Device to Enhance Viral Transduction Efficiency During Manufacture of Engineered Cellular Therapies // Scientific Reports. — 2019. — Т. 9. — № 1. — С. 15101.

3. Mehraji S., DeVoe D.L. Microfluidic synthesis of lipid-based nanoparticles for drug delivery: recent advances and opportunities // Lab on a Chip. — 2024. — Т. 24. — № 5. — С. 1154-1174.

4. Krauss S.T., Woolf M.S., Hadley K.C., Collins N.M., Nauman A.Q., Landers J.P. Centrifugal microfluidic devices using low-volume reagent storage and inward fluid displacement for presumptive drug detection // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2019. — Т. 284. — С. 704-710.

5. Madariaga-Marcos J., Corti R., Hormeño S., Moreno-Herrero F. Characterizing microfluidic approaches for a fast and efficient reagent exchange in single-molecule studies // Scientific Reports. — 2020. — Т. 10. — № 1. — С. 18069.

6. Gowers S.A., Curto V.F., Seneci C.A., Wang C., Anastasova S., Vadgama P., Yang G.-Z., Boutelle M.G. 3D printed microfluidic device with integrated biosensors for online analysis of subcutaneous human microdialysate // Analytical chemistry. — 2015. — Т. 87. — № 15. — С. 7763-7770.

7. Xu J., Harasek M., Gföhler M. From soft lithography to 3D printing: current status and future of microfluidic device fabrication // Polymers. — 2025. — Т. 17. — № 4. — С. 455.

8. Занавескин М.Л., Миронова А.А., Попов А.М. Микрофлюидика и ее перспективы в медицине // Молекулярная медицина. — 2012. — № 5. — С. 9-16.

9. Keshmiri K., Pourmohammadbagher M., Huang H., Nazemifard N. Microfluidics to determine the diffusive mass transfer of a low viscosity solvent into a high viscosity hydrocarbon // Fuel. — 2019. — Т. 235. — С. 1327-1336.

10. Grenci G., Bertocchi C., Ravasio A. Integrating microfabrication into biological investigations: the benefits of interdisciplinarity // Micromachines. — 2019. — Т. 10. — № 4. — С. 252.

11. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. — Рипол Классик, 1958.

12. Hirschfelder J.O., Curtiss C.F., Bird R.B. Molecular theory of gases and liquids.

13. Ramachandraiah H., Ardabili S., Faridi A.M., Gantelius J., Kowalewski J.M., Mårtensson G., Russom A. Dean flow-coupled inertial focusing in curved channels // Biomicrofluidics. — 2014. — Т. 8. — № 3.

14. Nivedita N., Ligrani P., Papautsky I. Dean flow dynamics in low-aspect ratio spiral microchannels // Scientific Reports. — 2017. — Т. 7. — № 1. — С. 44072.

15. Wong Y.C., Dai C., Xian Q., Yan Z., Zhang Z., Wen W. Flow study of Dean’s instability in high aspect ratio microchannels // Scientific Reports. — 2023. — Т. 13. — № 1. — С. 17896.

16. Sprenger L., Dutz S., Schneider T., Odenbach S., Häfeli U.O. Simulation and experimental determination of the online separation of blood components with the help of microfluidic cascading spirals // Biomicrofluidics. — 2015. — Т. 9. — № 4.

17. Rapp B.E. Microfluidics: modeling, mechanics and mathematics. — William Andrew, 2016.

18. Garstecki P., Gańán-Calvo A.M., Whitesides G.M. Formation of bubbles and droplets in microfluidic systems // Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences. — 2005. — T. 53. — № 4.

19. Song Y., Zhao X., Tian Q., Liang H. Fundamental concepts and physics in microfluidics // Microfluidics: Fundamentals, Devices, and Applications. — 2018.

20. Paul A., Laurila T., Vuorinen V., Divinski S.V. Fick's laws of diffusion // Thermodynamics, diffusion and the kirkendall effect in solids. — Springer, 2014. — C. 115-139.

21. Lowney J.R., Larrabee R.D. The use of Fick's law in modeling diffusion processes // IEEE Transactions on Electron Devices. — 2005. — T. 27. — № 9. — C. 1795-1798.

22. Taigbenu A., Liggett J.A. An integral solution for the diffusion-advection equation // Water Resources Research. — 1986. — T. 22. — № 8. — C. 1237-1246.

23. Ward K., Fan Z.H. Mixing in microfluidic devices and enhancement methods // Journal of Micromechanics and Microengineering. — 2015. — T. 25. — № 9. — C. 094001.

24. Rożeń A., Kopytowski J. Energetic efficiency of mixing in a periodically reoriented Dean flow // Chemical and Process Engineering. — 2021. — T. 42. — № 4.

25. Chang C.-C., Yang R.-J. Electrokinetic mixing in microfluidic systems // Microfluidics and Nanofluidics. — 2007. — T. 3. — № 5. — C. 501-525.

26. Sritharan K., Strobl C.J., Schneider M.F., Wixforth A., Guttenberg Z. von Acoustic mixing at low Reynold's numbers // Applied Physics Letters. — 2006. — T. 88. — № 5.

27. Baroud C.N., Willaime H. Multiphase flows in microfluidics // Comptes Rendus Physique. — 2004. — Т. 5. — № 5. — С. 547-555.

28. Beard D.A. Taylor dispersion of a solute in a microfluidic channel // Journal of Applied Physics. — 2001. — Т. 89. — № 8. — С. 4667-4669.

29. Santra S., Mandal S., Chakraborty S. Phase-field modeling of multicomponent and multiphase flows in microfluidic systems: A review // International Journal of Numerical Methods for Heat & Fluid Flow. — 2021. — Т. 31. — № 10. — С. 3089-3131.

30. Günther A., Jensen K.F. Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis // Lab on a Chip. — 2006. — Т. 6. — № 12. — С. 1487-1503.

31. Tice J.D., Song H., Lyon A.D., Ismagilov R.F. Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the Reynolds and the capillary numbers // Langmuir. — 2003. — Т. 19. — № 22. — С. 9127-9133.

32. Кухтевич И.В., Посмитная Я.С., Белоусов К.И., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Принципы, технологии и устройства" капельной" микрофлюидики. Ч. 1 (Обзор) // Научное приборостроение. — 2015. — Т. 25. — № 3. — С. 65-85.

33. Scott S.M., Ali Z. Fabrication methods for microfluidic devices: An overview // Micromachines. — 2021. — Т. 12. — № 3. — С. 319.

34. Friend J., Yeo L. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane // Biomicrofluidics. — 2010. — Т. 4. — № 2.

35. Martinez-Duarte R., Madou M. SU-8 photolithography and its impact on microfluidics // Microfluidics and nanofluidics handbook. — 2011. — № 2006. — С. 231-268.

36. Au A.K., Huynh W., Horowitz L.F., Folch A. 3D-printed microfluidics // Angewandte Chemie International Edition. — 2016. — T. 55. — № 12. — C. 3862-3881.

37. Kim P., Kwon K.W., Park M.C., Lee S.H., Kim S.M., Suh K.Y. Soft lithography for microfluidics: a review. — 2008.

38. Victor A., Ribeiro J.E., Araújo F.F. Study of PDMS characterization and its applications in biomedicine: A review. — 2019.

39. Schneider F., Draheim J., Kamberger R., Wallrabe U. Process and material properties of polydimethylsiloxane (PDMS) for Optical MEMS // Sensors and Actuators A: Physical. — 2009. — T. 151. — № 2. — C. 95-99.

40. Miranda I., Souza A., Sousa P., Ribeiro J., Castanheira E.M., Lima R., Minas G. Properties and applications of PDMS for biomedical engineering: A review // Journal of functional biomaterials. — 2021. — T. 13. — № 1. — C. 2.

41. Khoo H., Allen W.S., Arroyo-Currás N., Hur S.C. Rapid prototyping of thermoplastic microfluidic devices via SLA 3D printing // Scientific reports. — 2024. — T. 14. — № 1. — C. 17646.

42. Macdonald N.P., Cabot J.M., Smejkal P., Guijt R.M., Paull B., Breadmore M.C. Comparing microfluidic performance of three-dimensional (3D) printing platforms // Analytical chemistry. — 2017. — T. 89. — № 7. — C. 3858-3866.

43. Cai J., Lu M., Huang Q., Bai F., Zhao D., Jiang H., Chen J. A Review of Nano-Calcium Carbonate and Its Applications: Preparation, Necessities, Biomedicine, and Environment // Particle & Particle Systems Characterization. — 2026. — T. 43. — № 1. — C. e00093.

44. Maleki Dizaj S., Barzegar-Jalali M., Zarrintan M.H., Adibkia K., Lotfipour F. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system // Expert opinion on drug delivery. — 2015. — T. 12. — № 10. — C. 1649-1660.

45. Borisov S.V., Magarill S.A., Pervukhina N.V. Crystallographic analysis of three modifications of CaCO3: calcite, aragonite, vaterite // Journal of Structural Chemistry. — 2021. — Т. 62. — № 7. — С. 1027-1037.

46. Blue C.R., Giuffre A., Mergelsberg S., Han N., De Yoreo J.J., Dove P.M. Chemical and physical controls on the transformation of amorphous calcium carbonate into crystalline CaCO3 polymorphs // Geochimica et Cosmochimica Acta. — 2017. — Т. 196. — С. 179-196.

47. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Kovalchuk M.V., Antipina M.N. CaCO3 vaterite microparticles for biomedical and personal care applications // Materials Science and Engineering: C. — 2014. — Т. 45. — С. 644-658.

48. Dong Z., Feng L., Zhu W., Sun X., Gao M., Zhao H., Chao Y., Liu Z. CaCO3 nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nanoplatform enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy // Biomaterials. — 2016. — Т. 110. — С. 60-70.

49. Peng C., Zhao Q., Gao C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO3 and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO3 microparticles // Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects. — 2010. — Т. 353. — № 2-3. — С. 132-139.

50. Fu J., Leo C.P., Show P.L. Recent advances in the synthesis and applications of pH-responsive CaCO3 // Biochemical Engineering Journal. — 2022. — Т. 187. — С. 108446.

51. Babou-Kammoe R., Hamoudi S., Larachi F., Belkacemi K. Synthesis of CaCO3 nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions // The Canadian journal of chemical engineering. — 2012. — Т. 90. — № 1. — С. 26-33.

52. Shen Y., Hao S., Suonan A., Liu Y., Li H., Ma W., Zhao L., Zhang Y. Controllable synthesis of nano-micro calcium carbonate mediated by additive engineering // Crystals. — 2023. — Т. 13. — № 10. — С. 1432.

53. Bang J.-H., Song K., Park S., Jeon C.W., Lee S.-W., Kim W. Effects of CO2 bubble size, CO2 flow rate and calcium source on the size and specific surface area of CaCO3 particles // Energies. — 2015. — Т. 8. — № 10. — С. 12304-12313.

54. Niu Y.-Q., Liu J.-H., Aymonier C., Fermani S., Kralj D., Falini G., Zhou C.-H. Calcium carbonate: controlled synthesis, surface functionalization, and nanostructured materials // Chemical society reviews. — 2022. — Т. 51. — № 18. — С. 7883-7943.

55. Liu L., Fan D., Mao H., Fang X., Hao J. Multi-phase equilibrium microemulsions and synthesis of hierarchically structured calcium carbonate through microemulsion-based routes // Journal of colloid and interface science. — 2007. — Т. 306. — № 1. — С. 154-160.

56. Sugih A.K., Shukla D., Heeres H.J., Mehra A. CaCO3 nanoparticle synthesis by carbonation of lime solution in microemulsion systems // Nanotechnology. — 2007. — Т. 18. — № 3. — С. 035607.

57. Wang C., Chen S., Wang Y., Liu X., Hu F., Sun J., Yuan H. Lipase-Triggered Water-Responsive “Pandora’s Box” for Cancer Therapy: Toward Induced Neighboring Effect and Enhanced Drug Penetration // Advanced Materials. — 2018. — Т. 30. — № 14. — С. 1706407.

58. Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., Mizushima Y. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system // Journal of Controlled Release. — 2005. — Т. 103. — № 1. — С. 93-98.

59. Xue P., Hou M., Sun L., Li Q., Zhang L., Xu Z., Kang Y. Calcium-carbonate packaging magnetic polydopamine nanoparticles loaded with indocyanine green for

near-infrared induced photothermal/photodynamic therapy // Acta Biomaterialia. — 2018. — T. 81. — C. 242-255.

60. He X.W., Liu T., Chen Y.X., Cheng D.J., Li X.R., Xiao Y., Feng Y.L. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer in vivo // Cancer gene therapy. — 2008. — T. 15. — № 3. — C. 193-202.

61. Chen C., Han H., Yang W., Ren X., Kong X. Polyethyleneimine-modified calcium carbonate nanoparticles for p53 gene delivery // Regenerative biomaterials. — 2016. — T. 3. — № 1. — C. 57-63.

62. Cappell K.M., Kochenderfer J.N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far // Nature reviews Clinical oncology. — 2023. — T. 20. — № 6. — C. 359-371.

63. Kanate A.S., Majhail N., DeFilipp Z., Dhakal B., Dholaria B., Hamilton B., Herrera A.F., Inamoto Y., Jain T., Perales M.-A. Updated indications for immune effector cell therapy: 2023 guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy // Transplantation and Cellular Therapy. — 2023. — T. 29. — № 10. — C. 594-597.

64. Snowden J.A., Sánchez-Ortega I., Corbacioglu S., Basak G.W., Chabannon C., de la Camara R., Dolstra H., Duarte R.F., Glass B., Greco R. Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022 // Bone marrow transplantation. — 2022. — T. 57. — № 8. — C. 1217-1239.

65. Hong M., Clubb J.D., Chen Y.Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy // Cancer cell. — 2020. — T. 38. — № 4. — C. 473-488.

66. Grosser R., Cherkassky L., Chintala N., Adusumilli P.S. Combination immunotherapy with CAR T cells and checkpoint blockade for the treatment of solid tumors // Cancer cell. — 2019. — T. 36. — № 5. — C. 471-482.

67. Guedan S., Madar A., Casado-Medrano V., Shaw C., Wing A., Liu F., Young R.M., June C.H., Posey A.D. Single residue in CD28-costimulated CAR-T cells limits long-term persistence and antitumor durability // The Journal of clinical investigation. — 2020. — T. 130. — № 6. — C. 3087-3097.

68. Guedan S., Posey Jr A.D., Shaw C., Wing A., Da T., Patel P.R., McGettigan S.E., Casado-Medrano V., Kawalekar O.U., Uribe-Herranz M. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation // JCI insight. — 2018. — T. 3. — № 1. — C. e96976.

69. Tan J.Y., Low M.H., Chen Y., Lim F.L.W.I. CAR T cell therapy in hematological malignancies: implications of the tumor microenvironment and biomarkers on efficacy and toxicity // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — T. 23. — № 13. — C. 6931.

70. Vercellino L., Di Blasi R., Kanoun S., Tessoulin B., Rossi C., D'Aveni-Piney M., Obéric L., Bodet-Milin C., Bories P., Olivier P., Lafon I., Berriolo-Riedinger A., Galli E., Bernard S., Rubio M.-T., Bossard C., Meignin V., Merlet P., Feugier P., Le Gouill S., Ysebaert L., Casasnovas O., Meignan M., Chevret S., Thieblemont C. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma // Blood Advances. — 2020. — T. 4. — № 22. — C. 5607-5615.

71. Fraietta J.A., Lacey S.F., Orlando E.J., Pruteanu-Malinici I., Gohil M., Lundh S., Boesteanu A.C., Wang Y., O'Connor R.S., Hwang W.-T. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia // Nature medicine. — 2018. — T. 24. — № 5. — C. 563-571.

72. Roex G., Timmers M., Wouters K., Campillo-Davo D., Flumens D., Schroyens W., Chu Y., Berneman Z.N., Lion E., Luo F., Anguille S. Safety and clinical efficacy of BCMA CAR-T-cell therapy in multiple myeloma // Journal of Hematology & Oncology. — 2020. — Т. 13. — № 1. — С. 164.

73. Vukovic J., Abazovic D., Vucetic D., Medenica S. CAR-engineered T cell therapy as an emerging strategy for treating autoimmune diseases // Frontiers in medicine. — 2024. — Т. 11. — С. 1447147.

74. Abou-el-Enein M., Elsallab M., Feldman S.A., Fesnak A.D., Heslop H.E., Marks P., Till B.G., Bauer G., Savoldo B. Scalable manufacturing of CAR T cells for cancer immunotherapy // Blood cancer discovery. — 2021. — Т. 2. — № 5. — С. 408-422.

75. Ghassemi S., Durgin J.S., Nunez-Cruz S., Patel J., Leferovich J., Pinzone M., Shen F., Cummins K.D., Plesa G., Cantu V.A. Rapid manufacturing of non-activated potent CAR T cells // Nature biomedical engineering. — 2022. — Т. 6. — № 2. — С. 118-128.

76. Wang X., Liao Y., Liu D., Zheng J., Shi M. Presetting CAR-T cells during ex vivo biomanufacturing // Molecular Therapy. — 2025. — Т. 33. — № 4. — С. 1380-1406.

77. Markelov V., Arabuli K.V., Gaponenko I., Sergeev V., Shakirova A., Lepik K.V., Kulagin A.D., Zyuzin M.V. Scalable and ultrafast CAR-T cell production using microfluidics // Lab on a Chip. — 2025. — Т. 25. — № 12. — С. 3005-3015.

78. Cliff E.R.S., Kelkar A.H., Russler-Germain D.A., Tessema F.A., Raymakers A.J., Feldman W.B., Kesselheim A.S. High cost of chimeric antigen receptor T-cells: challenges and solutions // American Society of Clinical Oncology Educational Book. — 2023. — Т. 43. — С. e397912.

79. Cordas dos Santos D.M., Tix T., Shouval R., Gafter-Gvili A., Alberge J.-B., Cliff E.R.S., Theurich S., von Bergwelt-Baildon M., Ghobrial I.M., Subklewe M. A systematic review and meta-analysis of nonrelapse mortality after CAR T cell therapy // Nature medicine. — 2024. — T. 30. — № 9. — C. 2667-2678.

80. Gao C., Li X., Xu Y., Zhang T., Zhu H., Yao D. Recent advances in CAR-T cell therapy for acute myeloid leukaemia // Journal of Cellular and Molecular Medicine. — 2024. — T. 28. — № 9. — C. e18369.

81. Shamsi J., Urban A.S., Imran M., De Trizio L., Manna L. Metal halide perovskite nanocrystals: synthesis, post-synthesis modifications, and their optical properties // Chemical reviews. — 2019. — T. 119. — № 5. — C. 3296-3348.

82. Adinolfi V., Peng W., Walters G., Bakr O.M., Sargent E.H. The electrical and optical properties of organometal halide perovskites relevant to optoelectronic performance // Advanced Materials. — 2018. — T. 30. — № 1. — C. 1700764.

83. Lang L., Yang J.-H., Liu H.-R., Xiang H.J., Gong X.G. First-principles study on the electronic and optical properties of cubic ABX3 halide perovskites // Physics Letters A. — 2014. — T. 378. — № 3. — C. 290-293.

84. Ullah M., Ullah N., Tighezza A.M., Bashir B., Batool K., Murtaza G. Bandgap nature transition and the optical properties of ABX3 (A= K, Rb; B= Sr, Ba, Ca; X= Cl, Br, I) perovskites under pressure // Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. — 2025. — T. 35. — № 1. — C. 552-569.

85. Protesescu L., Yakunin S., Bodnarchuk M.I., Krieg F., Caputo R., Hendon C.H., Yang R.X., Walsh A., Kovalenko M.V. Nanocrystals of cesium lead halide perovskites (CsPbX3, X= Cl, Br, and I): novel optoelectronic materials showing bright emission with wide color gamut // Nano letters. — 2015. — T. 15. — № 6. — C. 3692-3696.

86. Simenas M., Gagor A., Banys J., Maczka M. Phase transitions and dynamics in mixed three-and low-dimensional lead halide perovskites // Chemical Reviews. — 2024. — Т. 124. — № 5. — С. 2281-2326.

87. Bhandari S., Pramanik S., Manna M., Singha S., Akhtar F. Surface modification unleashes light emitting applications of APbX 3 perovskite nanocrystals // Chemical Communications. — 2025. — Т. 61. — № 5. — С. 817-840.

88. Aldakov D., Reiss P. Safer-by-design fluorescent nanocrystals: Metal halide perovskites vs semiconductor quantum dots // The Journal of Physical Chemistry C. — 2019. — Т. 123. — № 20. — С. 12527-12541.

89. Bertolotti F., Protesescu L., Kovalenko M.V., Yakunin S., Cervellino A., Billinge S.J., Terban M.W., Pedersen J.S., Masciocchi N., Guagliardi A. Coherent nanotwins and dynamic disorder in cesium lead halide perovskite nanocrystals // ACS nano. — 2017. — Т. 11. — № 4. — С. 3819-3831.

90. Ahmad M., Rehman G., Ali L., Shafiq M., Iqbal R., Ahmad R., Khan T., Jalali-Asadabadi S., Maqbool M., Ahmad I. Structural, electronic and optical properties of CsPbX3 (X= Cl, Br, I) for energy storage and hybrid solar cell applications // Journal of Alloys and Compounds. — 2017. — Т. 705. — С. 828-839.

91. Grisorio R., Conelli D., Fanizza E., Striccoli M., Altamura D., Giannini C., Allegretta I., Terzano R., Irimia-Vladu M., Margiotta N. Size-tunable and stable cesium lead-bromide perovskite nanocubes with near-unity photoluminescence quantum yield // Nanoscale Advances. — 2021. — Т. 3. — № 13. — С. 3918-3928.

92. Kumar M., Singh D.V., Dabas S., Srivastva A.N., Dwivedi D.K., Kumar P. Perspective—Latest Updates and Future Perspectives on Perovskite Materials Based Humidity Sensors // Journal of The Electrochemical Society. — 2024. — Т. 171. — № 12. — С. 127508.

93. Han D., Wang Y., Li J., Gao M., Luan Y., Shao M., Ma N. Perovskite-Based Humidity Sensor // ACS Applied Materials & Interfaces. — 2026.

94. Delipinar T., Shafique A., Gohar M.S., Yapici M.K. Fabrication and materials integration of flexible humidity sensors for emerging applications // ACS omega. — 2021. — Т. 6. — № 13. — С. 8744-8753.

95. Tai H., Duan Z., Wang Y., Wang S., Jiang Y. based sensors for gas, humidity, and strain detections: A review // ACS applied materials & interfaces. — 2020. — Т. 12. — № 28. — С. 31037-31053.

96. Wu Z., Yang J., Sun X., Wu Y., Wang L., Meng G., Kuang D., Guo X., Qu W., Du B. An excellent impedance-type humidity sensor based on halide perovskite CsPbBr3 nanoparticles for human respiration monitoring // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2021. — Т. 337. — С. 129772.

97. Sandeep K. CsPbBr3 perovskite nanocrystals coated paper substrate as atmospheric humidity sensor // Materials Today: Proceedings. — 2021. — Т. 41. — С. 610-612.

98. Güder F., Ainla A., Redston J., Mosadegh B., Glavan A., Martin T.J., Whitesides G.M. Paper-based electrical respiration sensor // Angewandte Chemie International Edition. — 2016. — Т. 55. — № 19. — С. 5727-5732.

99. Li D., Zhuang P., Sun C. Unlocking the potential of perovskite-based nanomaterials for revolutionary smartphone-based sensor applications // Journal of Materials Chemistry C. — 2024. — Т. 12. — № 13. — С. 4544-4561.

100. Zhang D., Song X., Wang Z., Chen H. Ultra-highly sensitive humidity sensing by polydopamine/graphene oxide nanostructure on quartz crystal microbalance // Applied Surface Science. — 2021. — Т. 538. — С. 147816.

101. Xuan W., Chen Y., Hu D., Gao X., Huang S. Smart mask based on lead-free perovskite humidity sensor for labor intensity grading by breath monitoring // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2023. — Т. 397. — С. 134622.

102. Whitesides G.M. The origins and the future of microfluidics // Nature. — 2006. — T. 442. — № 7101. — C. 368-373.

103. Ward K., Fan Z.H. Mixing in microfluidic devices and enhancement methods // Journal of Micromechanics and Microengineering. — 2015. — T. 25. — № 9. — C. 094001.

104. Sackmann E.K., Fulton A.L., Beebe D.J. The present and future role of microfluidics in biomedical research // Nature. — 2014. — T. 507. — № 7491. — C. 181-189.

105. Fan X., White I.M. Optofluidic microsystems for chemical and biological analysis // Nature Photonics. — 2011. — T. 5. — № 10. — C. 591-597.

106. Cherednikova A., Labuntsov V., Arabuli K., Mikhailova L., Gagarinova D., Dolzhenko E.I., Tomyshev K., Zuev D., Bogdanov A., Zyuzin M.V. A thermally and mechanically stabilized plasmonic optical fiber sensor for real-time biomarker monitoring // Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications. — 2026. — C. 101567.

107. Talianov P.M., Mikushina D.D., Rzhevskiy S., Arabuli K.V., Zelenkov L.E., Khubezhov S., Logunov L.S., Gets D.S., Peltek O.O., Zyuzin M.V. Template-Assisted Synthesis of CsPbBr3 Nanocrystals with a Humidity-Induced Fluorescent Response: Mechanism and Sensing Applications // The Journal of Physical Chemistry Letters. — 2025. — T. 16. — № 17. — C. 4205-4213.

108. Bohne D., Fischer S., Obermeier E. Thermal, Conductivity, Density, Viscosity, and Prandtl-Numbers of Ethylene Glycol-Water Mixtures // Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. — 1984. — T. 88. — № 8. — C. 739-742.

109. Iulian O., Ciocirlan O. Viscosity and density of systems with water, 1, 4-dioxane and ethylene glycol between (293.15 and 313.15) KI binary systems // Rev. Roum. Chim. — 2010. — T. 55. — № 1. — C. 45-53.

110. Johnson C., Exell J., Lin Y., Aguilar J., Welsher K.D. Capturing the start point of the virus–cell interaction with high-speed 3D single-virus tracking // Nature Methods. — 2022. — Т. 19. — № 12. — С. 1642-1652.

111. Arabuli K.V., Kopoleva E., Akenoun A., Mikhailova L.V., Petrova E., Muslimov A.R., Senichkina D.A., Tsymbal S., Shakirova A.I., Ignatiev A.I. On-chip fabrication of calcium carbonate nanoparticles loaded with various compounds using microfluidic approach // Biomaterials Advances. — 2024. — Т. 161. — С. 213904.

112. Persano F., Nobile C., Piccirillo C., Gigli G., Leporatti S. Monodisperse and nanometric-sized calcium carbonate particles synthesis optimization // Nanomaterials. — 2022. — Т. 12. — № 9. — С. 1494.

113. Parakhonskiy B., Zyuzin M.V., Yashchenok A., Carregal-Romero S., Rejman J., Möhwald H., Parak W.J., Skirtach A.G. The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO3 particles on their uptake by cells // Journal of nanobiotechnology. — 2015. — Т. 13. — № 1. — С. 53.

114. Pugazhendhi A., Edison T.N.J.I., Velmurugan B.K., Jacob J.A., Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems // Life sciences. — 2018. — Т. 200. — С. 26-30.

115. Galla M., Will E., Kraunus J., Chen L., Baum C. Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation // Molecular cell. — 2004. — Т. 16. — № 2. — С. 309-315.

116. Svanström S., Jacobsson T.J., Sloboda T., Giangrisostomi E., Ovsyannikov R., Rensmo H., Cappel U.B. Effect of halide ratio and Cs+ addition on the photochemical stability of lead halide perovskites // Journal of Materials Chemistry A. — 2018. — Т. 6. — № 44. — С. 22134-22144.