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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Санкт-Петербург 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Научный руководитель: Зюзин Михаил Валерьевич – доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Университета ИТМО

Официальные оппоненты: Абакумов Максим Артемович – доктор химических наук, заведующий лабораторией биомедицинских наноматериалов Национального исследовательского технологического университета «МИСИС».

Филатов Никита Алексеевич – кандидат технических наук, младший научный сотрудник лаборатории возобновляемых источников энергии Академического университета имени Ж. И. Алферова

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина).

Защита состоится 5 февраля 2027 г. в 14 часов 30 мин на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения (ИАП РАН) по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте https://www.iairas.ru/ в сети Интернет. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 198095, а/я 140, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

Автореферат разослан «___» _____2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Диссертационная работа посвящена разработке и экспериментальному обоснованию подхода к созданию микрофлюидных устройств на основе конструктивно заданной пространственно-временной организации взаимодействия. В рамках работы микрофлюидное устройство рассматривается как экспериментальный прибор, в котором геометрия функциональных областей задает характерные расстояния переноса, рабочие объемы, последовательность взаимодействия компонентов и продолжительность соответствующих стадий процесса.

В отличие от объемных экспериментальных систем, в микрофлюидном устройстве геометрические параметры выступают не только конструктивными характеристиками, но и средствами формирования условий эксперимента за счет пространственного ограничения рабочих сред и взаимодействующих объектов.

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, время пребывания, контакта или инкубации. Предложенный подход реализован и экспериментально исследован в трех микрофлюидных устройствах различного функционального назначения.

Объединяющим принципом разработки этих устройств является представление микрофлюидной системы в виде функционально организованного рабочего объема, в котором геометрическими параметрами задаются характерные расстояния переноса и взаимодействия, а режимом эксплуатации – продолжительность соответствующей стадии процесса. Базовыми элементами такой функциональной архитектуры являются область ввода рабочих сред, область их взаимодействия и элементы, обеспечивающие последующее выведение среды либо регистрацию ее состояния. В зависимости от назначения устройства базовая архитектура дополняется специализированными функциональными зонами или предусматривает совмещение нескольких функций в одной рабочей области.

В устройстве для синтеза и функционализации $CaCO_3$ общая функциональная архитектура дополнена раздельными входными каналами для прекурсоров, областью их гидродинамического объединения и смешивания, участком формирования частиц и отдельной зоной введения стабилизирующего или функционализирующего компонента. Пространственное расположение этих участков совместно с расходами потоков задает

последовательность стадий соосаждения, характерное время пребывания реагентов в реакционной области и момент ограничения дальнейшего роста частиц.

В микрофлюидном устройстве для модификации Т-лимфоцитов общая функциональная архитектура реализована с совмещением основных операций в пространственно ограниченной инкубационной области. Ее высота, площадь и рабочий объем определяют характерное расстояние между Т-лимфоцитами, активирующими частицами и лентивирусным вектором. В данной конфигурации функции загрузки, пространственного ограничения взаимодействия и инкубации совмещены в одной рабочей области.

В микрофлюидной оптической системе определения относительной влажности общая функциональная архитектура реализована в виде 3D-печатной газовой кюветы, пространственно сопряженной с оптическим трактом регистрации. Конструкция кюветы определяет взаимное расположение области подвода анализируемой газовой среды, подложки с чувствительным материалом $CsPbBr_3@CaCO_3$ и элементов возбуждения и регистрации фотолюминесцентного сигнала. В данной конфигурации рабочая и измерительная функциональные зоны пространственно совмещены.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность работы определяется необходимостью разработки микрофлюидных приборов, в которых геометрия функциональных областей непосредственно связана с физическим процессом, лимитирующим достижение требуемого результата. Для рассматриваемых в диссертации устройств такими процессами являются массоперенос и смешивание реагентов, определяющие условия нуклеации и роста частиц, диффузионное сближение Т-лимфоцитов и лентивирусных частиц, а также подвод влажной газовой среды к чувствительному материалу и регистрация его оптического отклика. Характерные пространственные и временные масштабы указанных процессов определяют выбор геометрических параметров, соответствующих функциональным областям микрофлюидных устройств.

В задачах синтеза и доставки активных соединений микрофлюидные устройства позволяют пространственно разделять стадии подачи прекурсоров, смешивания, формирования частиц и их функционализации. Это представляет интерес для получения частиц $CaCO_3$ как биосовместимых носителей низко- и высокомолекулярных соединений, поскольку размер и морфология продукта определяются условиями смешивания, пересыщения, нуклеации, роста и стабилизации [1, 2].

Для CAR-T клеточных технологий существенным ограничением остается продолжительный ex vivo-этап производства, сопровождающийся фенотипическим сдвигом Т-

лимфоцитов в сторону более дифференцированных субпопуляций. Поэтому разработка устройств, способных ограничивать характерное расстояние между клетками и вирусными частицами и одновременно сокращать продолжительность технологического цикла без снижения жизнеспособности клеток, является актуальной задачей [3–6].

Для оптической сенсорики относительной влажности определяющими являются как свойства чувствительного материала, так и геометрия измерительной системы. Измерение включает подвод и обновление газовой среды в рабочем объеме, взаимодействие водяного пара с чувствительным слоем и регистрацию фотолюминесцентного сигнала. Поэтому для быстродействующей регистрации требуется конструктивное сопряжение газовой кюветы, чувствительного элемента и оптического тракта [7].

Общим для рассматриваемых устройств является то, что требуемые условия взаимодействия формируются за счет конструктивного задания пространственных и временных параметров соответствующей функциональной области. В связи с этим геометрические параметры МФУ целесообразно выбирать не из условия миниатюризации как таковой, а исходя из характерных пространственных и временных масштабов процесса.

Микрофлюидные технологии позволяют объединять транспорт, смешивание, инкубацию и детектирование в одной функциональной архитектуре [8–11], а аддитивное изготовление мастер-форм и 3D-печать расширяют возможности задания геометрии камер, каналов и оптических узлов при быстром прототипировании [12–14].

Таким образом, актуальной приборной задачей является разработка и экспериментальная проверка единого подхода к созданию микрофлюидных устройств различного функционального назначения, в котором функциональная геометрия выбирается с учетом характерных пространственных и временных масштабов реализуемого процесса.

СТЕПЕНЬ ПРОРАБОТАННОСТИ ПРОБЛЕМЫ

Микрофлюидные технологии широко применяются для анализа и культивирования клеток, синтеза частиц, доставки веществ и интеграции многостадийных аналитических операций [2, 10]. При этом в большинстве работ геометрия устройства оптимизируется под конкретную отдельную операцию: смешивание, инкубацию, разделение или детектирование.

Аддитивные технологии, включая стереолитографию и фотополимерную 3D-печать, существенно расширили доступный диапазон трехмерных геометрий и сократили длительность прототипирования микрофлюидных систем [14]. Однако сама технологическая возможность изготовления сложной формы не определяет, какие геометрические параметры должны быть выбраны для конкретного физического процесса.

Анализ литературы, выполненный в диссертации, показывает необходимость связывать каждый функциональный участок МФУ с характерными пространственными и временными масштабами процесса: гидравлическим диаметром и временем пребывания для проточных зон, диффузионным расстоянием и временем инкубации для клеточных систем, а для сенсорных систем – также с расположением чувствительного элемента и оптического тракта.

Поэтому недостаточно рассматривать микрофлюидное устройство только как уменьшенный аналог объемной системы. Требуется подход, в котором функциональное зонирование, геометрия каналов и камер, режим подачи среды и расположение измерительных элементов выбираются с учетом пространственных и временных масштабов определяющего механизма переноса или взаимодействия. Экспериментальное обоснование такого подхода для трех устройств различного функционального назначения составляет предмет настоящей работы.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 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.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проектирование микрофлюидных устройств выполнялось средствами трехмерного моделирования; мастер-формы изготавливались методом фотополимерной 3D-печати, а ПДМС-устройства – методом «мягкой» литографии с плазменным соединением со стеклом. Для расчетного описания функциональных зон использовались геометрические параметры каналов и камер, средняя скорость потока, время пребывания, число Рейнольдса, числа Пекле и характерное время диффузии. Морфологию, структуру и элементный состав $CaCO_3$ и $CsPbBr_3@CaCO_3$ исследовали методами сканирующей электронной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, энергодисперсионной спектроскопии, рентгеновской дифракции и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии; термические свойства – методами термогравиметрического анализа и дифференциальной сканирующей калориметрии; удельную поверхность и пористость $CaCO_3$ – методами BET и BJH. Оптический отклик оценивали спектроскопией фотолюминесценции и измерением квантового выхода. Загрузку соединений анализировали спектрофотометрически и методом гель-электрофореза. Биологическую валидацию проводили с использованием MTT-теста, конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, анализа трансфекции и функциональных тестов CAR-T-клеток.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Практическая значимость работы состоит в создании трех экспериментально реализованных микрофлюидных приборных конфигураций. Устройство проточного синтеза обеспечивает получение частиц $CaCO_3$ размером 66±15 нм без использования полиакриловой кислоты, применяемой в известных подходах для получения наноразмерного $CaCO_3$, и сокращает продолжительность синтеза до 5 мин, что в 24 раза меньше по сравнению с приведенным в литературе 120-минутным протоколом. Конструкция устройства позволяет также осуществлять последующую загрузку низко- и высокомолекулярных соединений в рамках одного технологического цикла.

Инкубационное МФУ с высотой канала 150 мкм при объеме загружаемой клеточной суспензии 110 мкл обеспечивает одноэтапную активацию и трансдукцию 1.8×10^6 Т-лимфоцитов в течение 24 ч. При MOI = 3 эффективность трансдукции составляет 27±8%

против 17±8% в 48-луночном планшете с тем же рабочим объемом и 8±6% в 6-луночном планшете, при сокращении продолжительности получения клеточного продукта до 24 ч по сравнению со стандартным 9-дневным протоколом.

Проточная оптическая система на основе $CsPbBr_3@CaCO_3$ обеспечивает измерение относительной влажности в диапазоне 15–60% ОВ с временем отклика менее 4 с и временем восстановления менее 2 с. Верхняя граница рабочего диапазона обусловлена необратимой деградацией перовскитной структуры при ОВ выше 60% в присутствии атмосферного CO_2. Достигнутое быстродействие в 60–120 раз превышает быстродействие большинства рассмотренных флуоресцентных сенсоров относительной влажности.

Разработанные устройства могут использоваться как экспериментальные платформы для воспроизводимого проточного получения и функционализации наноразмерных частиц $CaCO_3$, сокращенного протокола модификации Т-лимфоцитов и быстродействующего измерения относительной влажности газовой среды.

НАУЧНАЯ И ТЕХНИЧЕСКАЯ НОВИЗНА

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.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

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 $см^2$ 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.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверность полученных результатов обеспечивается комплексным применением независимых методов структурной, оптической и биологической характеризации, включая сканирующую и просвечивающую электронную микроскопию, рентгеновскую дифракцию, рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию, термогравиметрический и дифференциально-сканирующий калориметрический анализ, спектроскопию фотолюминесценции, проточную цитометрию и функциональные клеточные тесты.

Количественные зависимости получены при варьировании геометрических и режимных параметров разработанных устройств и сопоставлены с результатами независимых методов измерения. Для сравнительного анализа клеточных групп использовалась статистическая обработка экспериментальных данных; для ряда ключевых экспериментов число повторов составляло n = 5, для калибровки прототипа датчика влажности – n = 3.

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:

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

АналитБиоПрибор-2023, Санкт-Петербург, 23 ноября, 2023

Клеточные технологии в онкогематологии, Санкт-Петербург, 30 ноября, 2023

XVIII Raisa Gorbacheva Memorial Meeting Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Gene and Cellular Therapy, Санкт-Петербург, 19–21 сентября, 2024

The 51st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation – EBMT 2025, 30 марта – 2 апреля, 2025

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

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 выполнена автором, включая оценку эффективности трансфекции, цитотоксичности и интернализации. Проведение оптических экспериментов и обработка соответствующих данных выполнены совместно с соавторами. Автор участвовал в подготовке текстов научных статей, основанных на полученных результатах, и лично представлял данные исследования в виде устных докладов на научных конференциях.

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ РАБОТЫ

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулирована концепция конструктивно заданной пространственно-временной организации взаимодействия, определены цель и четыре задачи исследования, приведены научная новизна, положения, выносимые на защиту, сведения об апробации и личном вкладе автора.

В первой главе систематизированы физические основы микрофлюидных технологий, методы фабрикации МФУ, подходы к синтезу и применению $CaCO_3$, особенности производства CAR-T-клеточного продукта и оптической сенсорики на основе перовскитных структур. Отдельный раздел посвящен единым физическим принципам проектирования МФУ для задач синтеза, клеточной инженерии и оптической сенсорики.

При рассмотрении гидродинамики разделены продольные и поперечные пространственные масштабы. Для проточных функциональных зон анализируются число Рейнольдса, числа Пекле, время пребывания и характерное время поперечной диффузии. Показано, что безразмерный анализ необходимо связывать с конкретной функциональной зоной и фактическим расстоянием лимитирующего переноса. Для реакционного синтеза обоснована архитектура с раздельным дозированием прекурсоров, зоной их смешивания и нуклеации, зоной контролируемого роста и отдельным вводом стабилизирующего или функционализирующего компонента. Для клеточной модификации рассмотрено геометрическое ограничение инкубационного пространства как способ уменьшения характерного диффузионного расстояния между Т-лимфоцитами и лентивирусными частицами. Для сенсорных систем показана необходимость совместного проектирования газового тракта, положения чувствительного материала и оптической схемы регистрации.

На основании литературного анализа сформулирован общий принцип: проектирование МФУ начинается с выбора пространственного и временного масштаба определяющего механизма переноса, после чего выбираются геометрические параметры функциональной области и режим эксплуатации устройства.

Во второй главе приведена экспериментальная методология и реализованы три конфигурации МФУ. Для конфигурации А выполнены оценки локальных расходов, времени пребывания, Re, Pe и поперечного диффузионного времени; для конфигурации В рассчитано характерное время диффузии лентивирусных частиц при высоте 150 мкм; для конфигурации С описано взаимное расположение газовой камеры, чувствительной подложки, светодиода, фильтра и фотодиода. Также приведены методы структурной, оптической и биологической характеризации.

Третья глава посвящена разработке микрофлюидного устройства для синтеза и загрузки наночастиц $CaCO_3$. Устройство изготовлено методом «мягкой» литографии и содержит два входа для $CaCl_2$ и Na_2CO_3, первый змеевидный пассивный смешивающий элемент, третий вход для декстрансульфата или загружаемого соединения и второй пассивный смешивающий элемент. Участок до третьего входа выполняет функцию зоны нуклеации и роста, а последующий участок – стабилизации или функционализации.

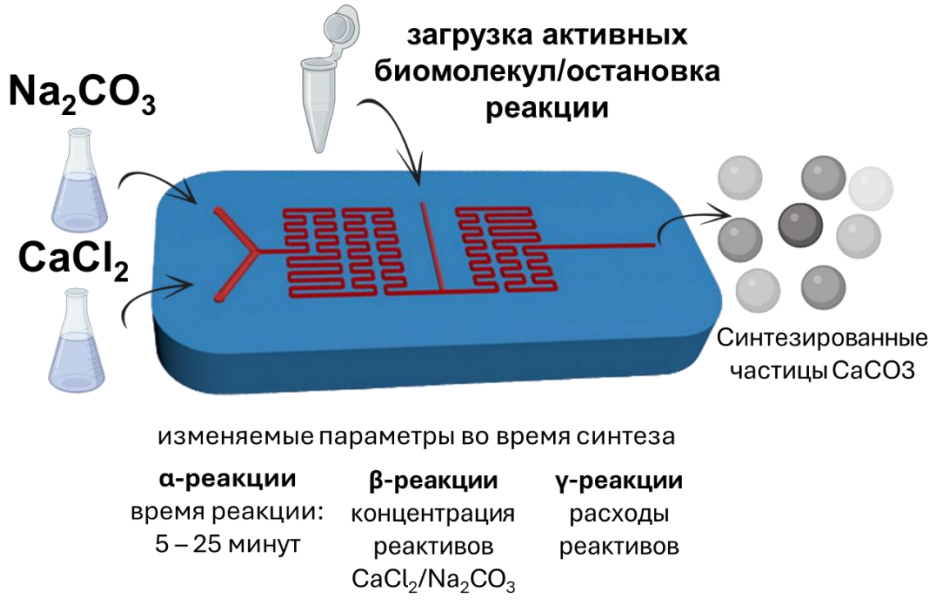

Рисунок 1 – Схема микрофлюидного синтеза наноразмерного карбоната кальция и последовательности варьирования времени реакции, концентраций реагентов и расходов потоков.

При постоянном геометрическом объеме зоны нуклеации 56 мкл увеличение суммарного расхода двух прекурсоров от 0.050 до 0.800 мл/мин сокращало расчетное время пребывания с 67.2 до 4.2 с. Число Рейнольдса изменялось от 0.140 до 2.24, что соответствует ламинарному режиму, а Pe по гидравлическому диаметру – от 1.83×10^4 до 2.93×10^5, подтверждая преобладание продольного конвективного переноса. Расчетное время диффузии через 150 мкм составляло 160.7 с, поэтому отношение времени поперечной диффузии к времени пребывания изменялось от 2.39 до 38.3; завершение смешения связано с уменьшением эффективного поперечного диффузионного пути в змеевидной геометрии. Варьирование концентраций и расходов позволило получить сферические частицы $CaCO_3$ размером 66±15 нм за 5 мин. Удельная поверхность составила 146.43 $м^2/г$, характеристический диаметр пор – 3.528 нм.

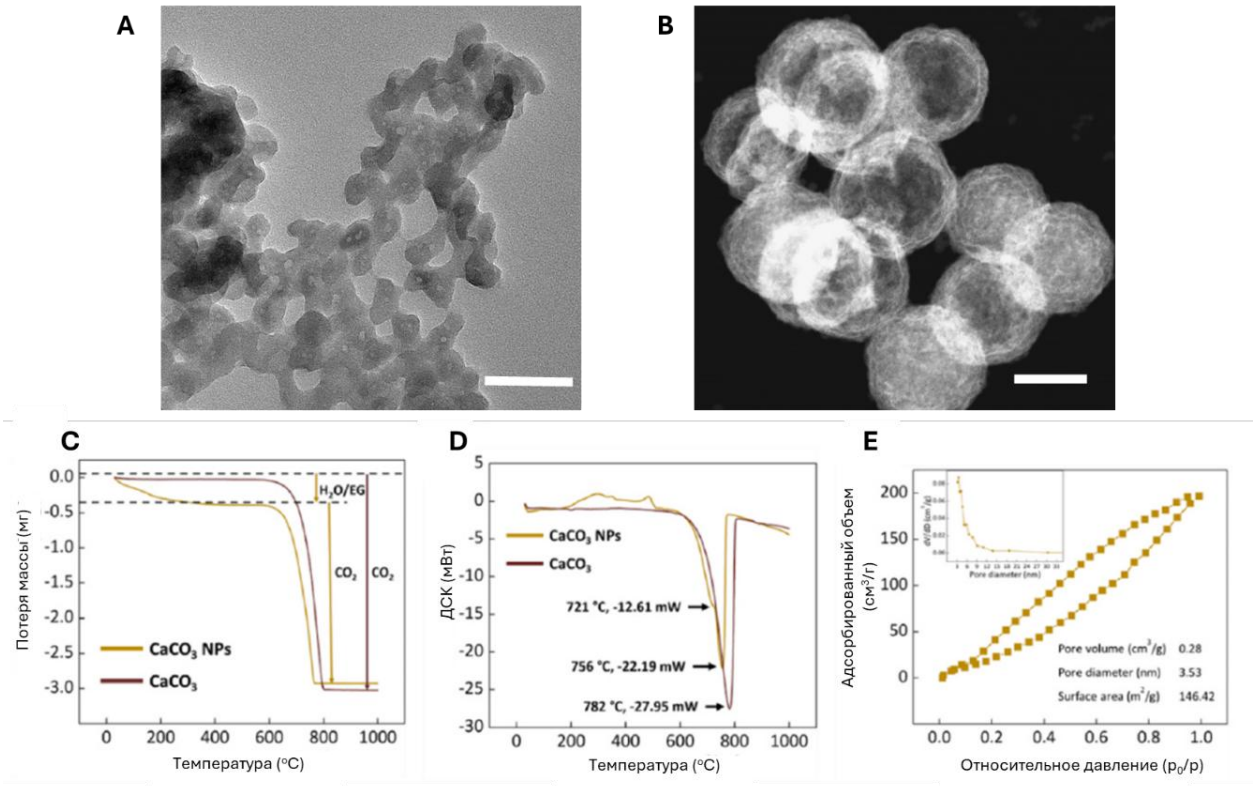

Рисунок 2 - (A) Изображение наночастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ5, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Масштабная линейка: 200 нм.; (B) Изображение наночастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ4, полученное с помощью сканирующей просвечивающей электронной микроскопии. Масштабная линейка: 200 нм.; (C) Кривые ТГА нано- и микрочастиц CaCO3, полученных в реакции γ5 (для наночастиц) и реакции β2 (для микрочастиц); (D) Кривые ДСК нано- и микрочастиц CaCO3, полученных в реакции γ5 (для наночастиц) и реакции β2 (для микрочастиц); (E) Изотермы адсорбции-десорбции азота и соответствующие кривые размеров пор наночастиц $CaCO_3$, полученных в реакции γ5.

Функциональная архитектура с третьим входом позволила проводить загрузку непосредственно после формирования частиц. Продемонстрирована адсорбция доксорубицина и Cy5-BSA, загрузка pDNA-GFP, а также совместная двойная загрузка: FITC-BSA вводился на стадии формирования частиц, а Cy5-BSA адсорбировался на их поверхности после третьего входа.

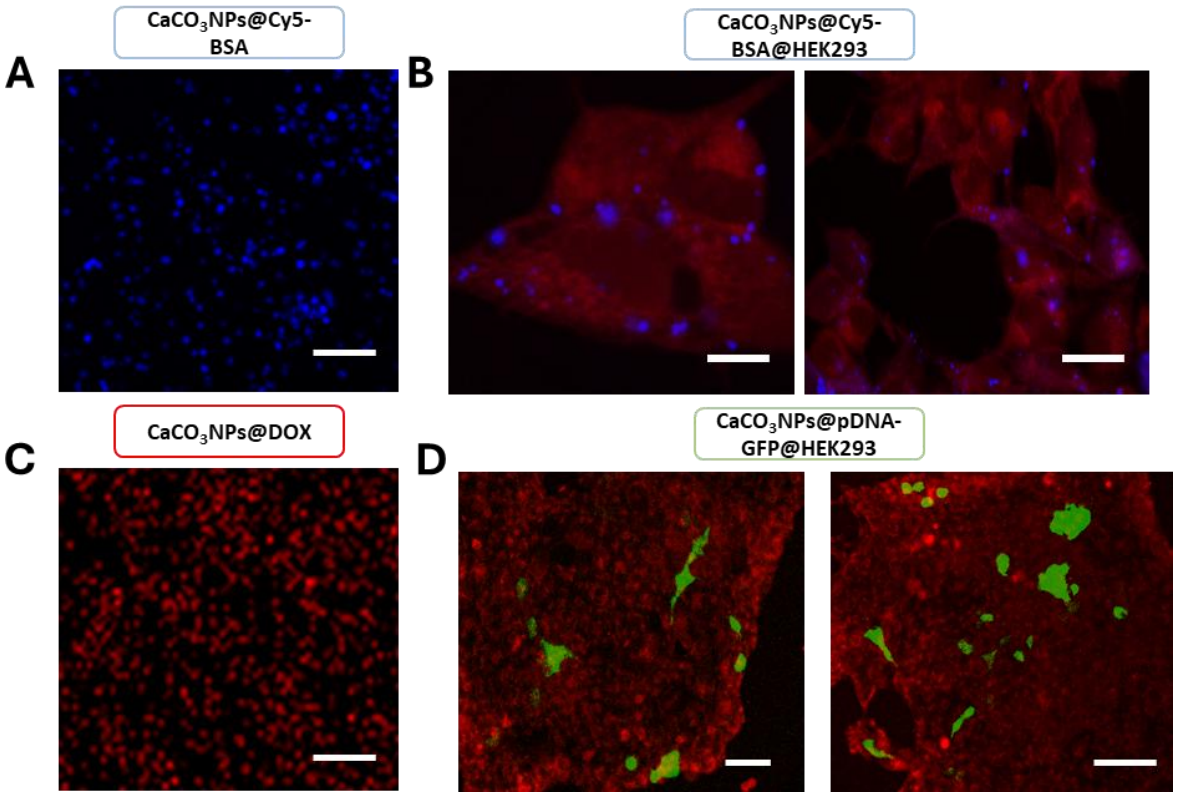

Рисунок 3 – (A) Изображение наночастиц $CaCO_3$, загруженных Cy5-BSA, полученное с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Масштабная линейка: 5 мкм; (B) Эксперименты с клетками. Изображения клеток HEK293, окрашенных Родамином B и инкубированных с наночастицами $CaCO_3$, меченными Cy5-BSA, добавленными в концентрациях 5 мкг/мл. Масштабная линейка 5 мкм; (C) Изображение наночастиц $CaCO_3$, загруженных доксорубицином, полученное с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Масштабная линейка: 5 мкм; (D) Изображения трансфицированных клеток HEK293, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Красный флуоресцентный сигнал исходит от клеток, окрашенных Родамином B, зеленый флуоресцентный сигнал – от pDNA-GFP, экспрессируемого внутри клеток. Масштабная линейка – 100 мкм.

При максимальном исходном количестве pDNA-GFP 90 мкг на наночастицах было адсорбировано 24.8 мкг ДНК. В экспериментах с HEK293 частицы $CaCO_3$@Cy5-BSA интернализировались клетками, немеченые $CaCO_3$ не проявляли токсичности в исследованном диапазоне концентраций, а эффективность трансфекции при максимальной загрузке pDNA-GFP составила 4.44%.

Четвертая глава посвящена микрофлюидному устройству для реализации сверхбыстрого протокола производства CAR-T-клеточного продукта. После заполнения устройства инкубация проводится в статическом режиме; поэтому определяющим расчетным параметром является не проточное время пребывания, а характерное поперечное диффузионное время. При высоте канала 150 мкм характерный путь до ближайшей ограничивающей плоскости составляет 75 мкм, а расчетное время диффузии лентивирусных частиц – около 36 мин.

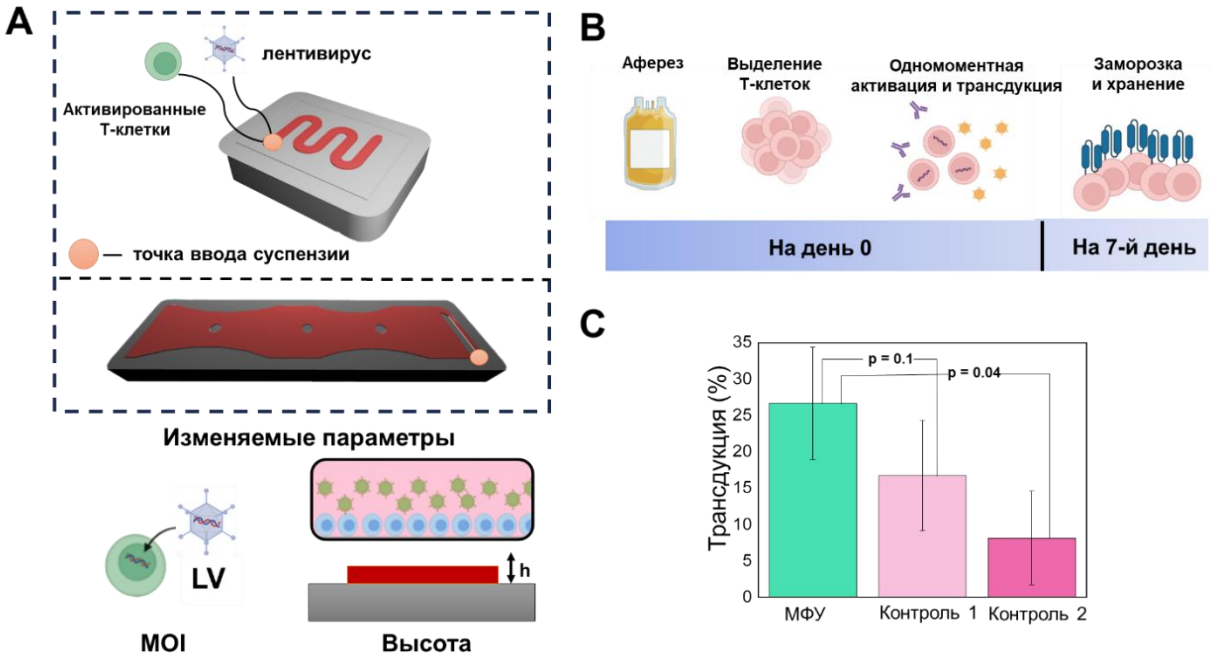

Рисунок 4 – (A) Схематическое изображение используемого МФУ и исследованных параметров, включающих MOI, высоту канала и продолжительность инкубации; (B) Схематическое изображение продолжительности сверхбыстрого протокола, включающего аферез, выделение Т-лимфоцитов, одноэтапную активацию и трансдукцию, а также пролиферацию; (C) Эффективность трансдукции Т-клеток, инкубированных в МФУ и в планшетах с лунками (контроль 1 и контроль 2) на 7-й день.

При MOI = 3 эффективность трансдукции на 7-е сутки составила 27 ± 8 % в МФУ против 17 ± 8 % в 48-луночном планшете с сопоставимым рабочим объемом и 8 ± 6 % в 6-луночном планшете. Сокращение продолжительности *ex vivo*-культивирования сопровождалось сохранением более высокой доли наивно-подобных CAR-T-клеток. Соотношение $CD4^+/CD8^+$ составляло 1.63 ± 0.65 для сверхбыстрого протокола в МФУ и 0.69 ± 0.47 для стандартного 9-дневного протокола. Общий межгрупповой анализ всех исследованных протоколов не достиг принятого уровня статистической значимости (p = 0.124). Вместе с тем дополнительное попарное сравнение сверхбыстрого протокола в МФУ со стандартным 9-дневным протоколом с использованием критерия Уэлча выявило статистически значимое различие (t = 2.62; p = 0.033).

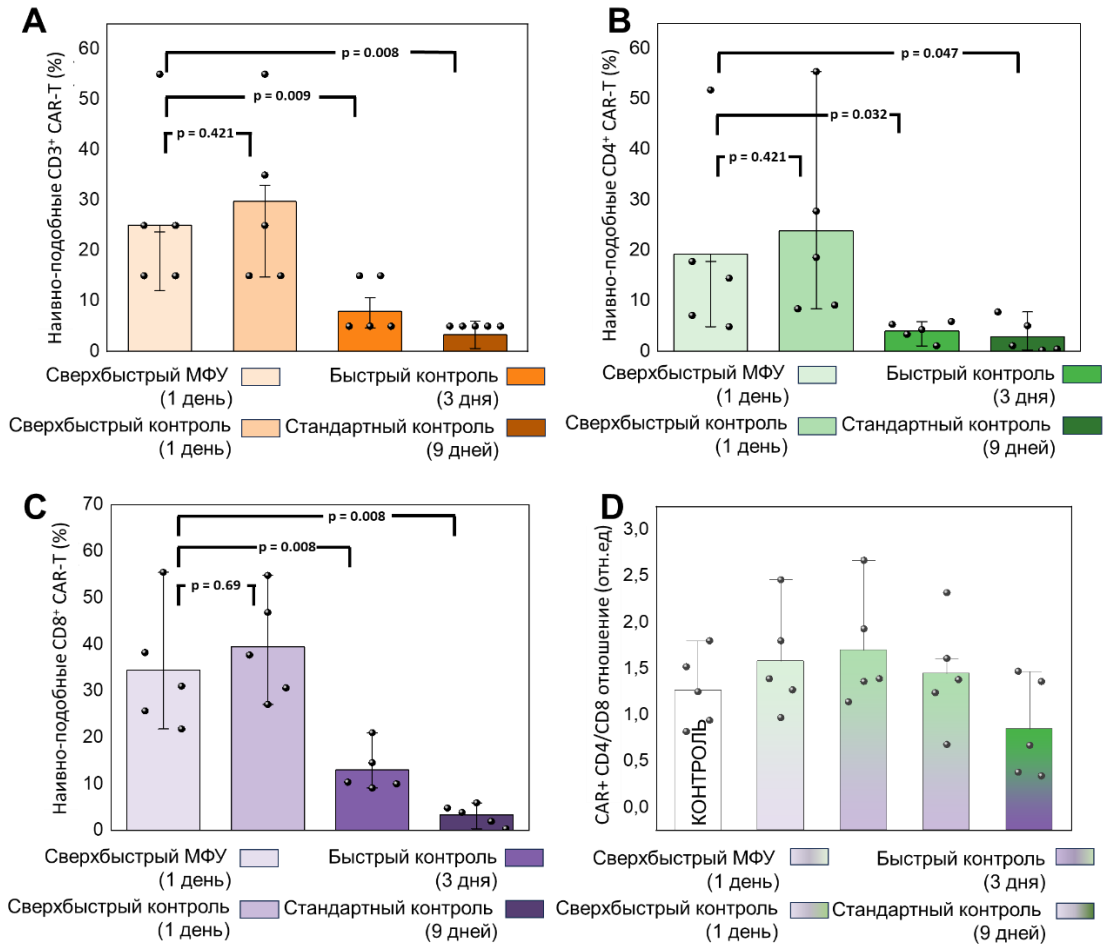

Рисунок 5 – (A) Процент наивных Т-клеток, экспрессирующих $CD3^+$ CAR; (B) Процент наивных клеток, экспрессирующих $CD4^+$ CAR.; (C) Процент наивных клеток, экспрессирующих $CD8^+$ CAR; (D) Соотношение $CD4^+/CD8^+$ CAR-экспрессирующих клеток

В пятой главе реализована микрофлюидная оптическая система определения относительной влажности на основе композита $CsPbBr_3@CaCO_3$. 3D-печатная газовая кювета обеспечивает размещение чувствительного слоя в области взаимодействия с анализируемой атмосферой и его оптическое сопряжение с системой возбуждения и регистрации. В прототипе использованы светодиод с длиной волны 395 нм, длинноволновый фильтр с границей пропускания 500 нм и фотодиод; максимум фотолюминесценции $CsPbBr_3@CaCO_3$ находится около 515 нм. Исследование спектрального отклика чувствительного материала проводилось на отдельной экспериментальной установке с возбуждением при 360 нм.

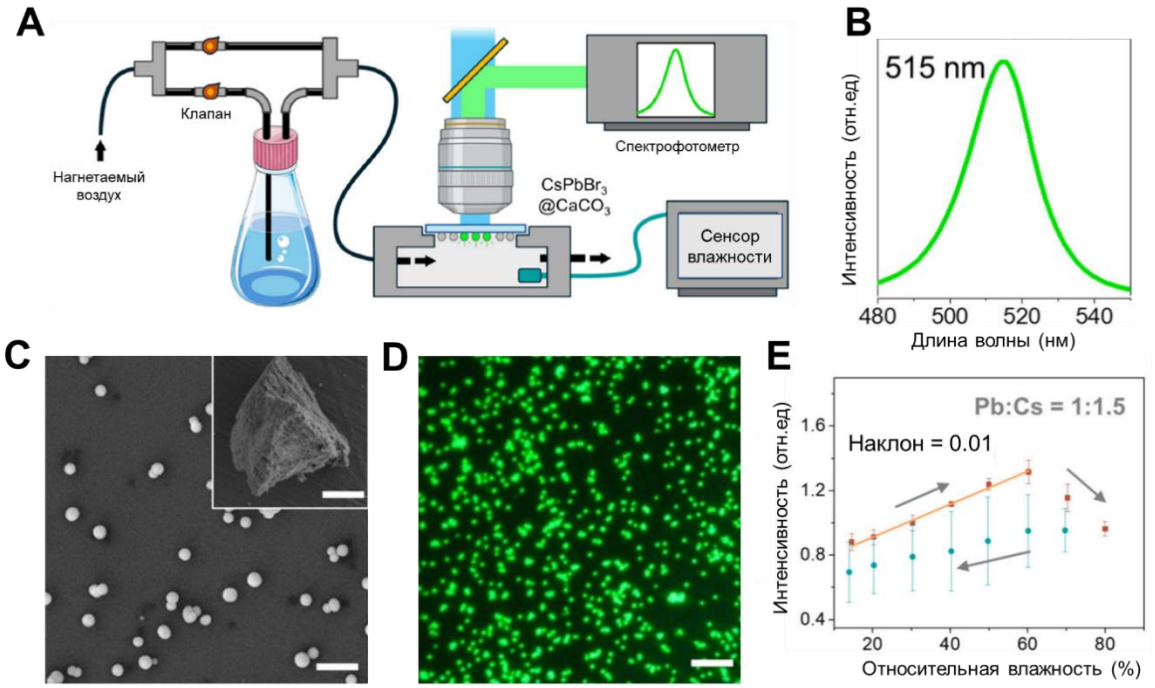

Рисунок 6 – (A) Схематическое изображение экспериментальной установки для постепенного контроля относительной влажности (ОВ) газового потока внутри 3D-печатной кюветы, содержащей стеклянную подложку с частицами $CsPbBr_3@CaCO_3$, одновременно обеспечивая измерение спектров флуоресценции. Флуоресцентный отклик измерялся по мере постепенного увеличения ОВ от 15 % до 80 %, а затем снижения от 80 % до 15 %. Измерения флуоресценции проводились при 24 °C; (B) Спектр фотолюминесценции $CsPbBr_3@CaCO_3$ с максимумом при 515 нм ($\lambda_{воз.}$ = 360 нм); (C) 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; (D) Изображение сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$, полученное с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Масштабная линейка соответствует 25 мкм; (E) Интенсивность фотолюминесценции сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$ с соотношением Pb:Cs = 1:1.5.

Установлено, что при увеличении ОВ в диапазоне 15–60% происходит обратимая фазовая трансформация $CsPbBr_3 \rightarrow CsPb_2Br_5$, сопровождаемая изменением интенсивности фотолюминесценции. При ОВ выше 60% в присутствии атмосферного CO_2 наблюдается необратимая деградация перовскитной структуры, что ограничивает рабочий диапазон чувствительного элемента. Прототип сенсора характеризуется временем отклика менее 4 с и временем восстановления менее 2 с. Чувствительность по выходному напряжению фотодиода составляет 5.93 мВ/% ОВ при ОВ ниже 30% и 0.78 мВ/% ОВ в диапазоне 30–60% ОВ.

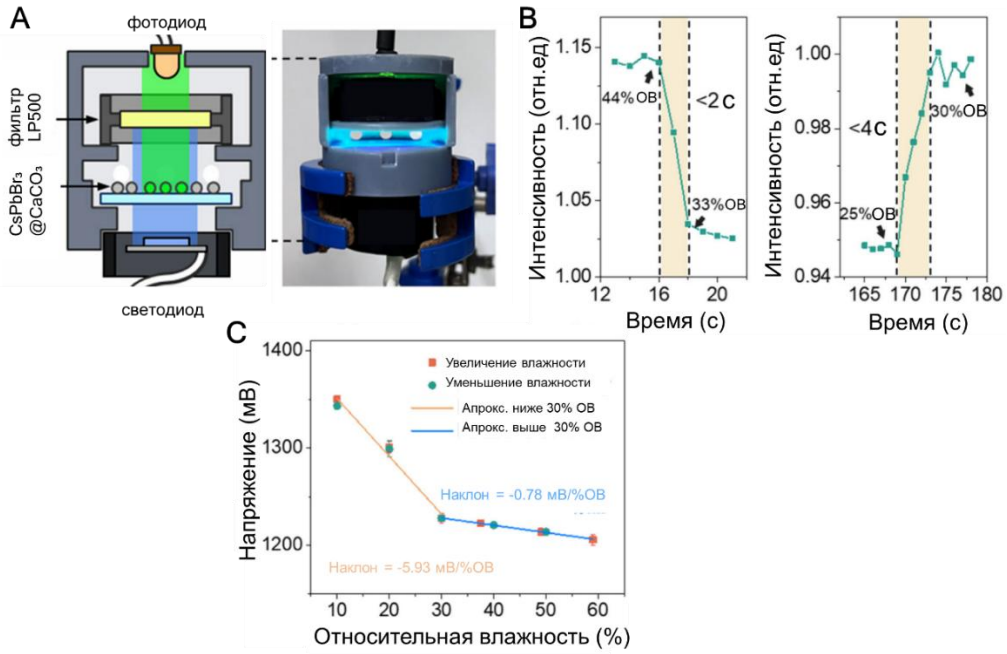

Рисунок 7 - (A) Прототип датчика влажности на основе сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$; (B) Время отклика флуоресценции сфер CsPbBr3@CaCO3 при переходе между 44 % и 33 % и 25 % и 30 % относительной влажности; (C) Калибровочная кривая для прототипа датчика влажности на основе сфер $CsPbBr_3@CaCO_3$. Погрешности представляют собой стандартные отклонения от различных измерений, выполненных с одним образцом (n = 3).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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. Геометрия МФУ рассматривается как инструмент управления массопереносом, диффузионным расстоянием, временем взаимодействия компонентов и условиями регистрации измеряемого сигнала.

Для задачи химического синтеза разработано трехвходовое МФУ с последовательными

зонами смешивания, нуклеации и роста, стабилизации и функционализации. Управление расходами и концентрациями реагентов позволило получить частицы $CaCO_3$ размером 66±15 нм за 5 мин и объединить синтез с загрузкой DOX, Cy5-BSA, FITC-BSA и pDNA-GFP в рамках одной платформы.

Для задачи клеточной инженерии ограничение высоты инкубационной области до 150 мкм сократило характерный пространственный масштаб диффузионного переноса лентивирусных частиц; расчетное время диффузии составило около 36 мин. На основе выбранной геометрии реализован одноэтапный 24-часовой протокол активации и трансдукции Т-лимфоцитов с эффективностью 27±8% при MOI = 3 и сохранением более высокой доли наивно-подобных субпопуляций по сравнению с длительным стандартным протоколом.

Для задачи оптической сенсорики чувствительный материал $CsPbBr_3@CaCO_3$ интегрирован с 3D-печатной газовой кюветой и оптической схемой регистрации. В диапазоне 15–60% ОВ наблюдается обратимое превращение $CsPbBr_3 \rightarrow CsPb_2Br_5$; прототип обеспечивает время отклика менее 4 с, время восстановления менее 2 с и чувствительность 5.93 мВ/% ОВ ниже 30% ОВ и 0.78 мВ/% ОВ в диапазоне 30–60% ОВ. При ОВ выше 60% в присутствии атмосферного CO_2 происходит необратимая деградация перовскитной структуры. Полученные результаты демонстрируют применимость общего принципа проектирования, при котором функциональная геометрия МФУ выбирается исходя из физического механизма, определяющего работу конкретного устройства.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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., Lepik, K.V., Zyuzin, M. V. On-chip fabrication of calcium carbonate nanoparticles loaded with various compounds using microfluidic approach //Biomaterials Advances. – 2024. – Т. 161. – С. 213904.
2. 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.
3. 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., & Makarov, S. V. (2025). Template-Assisted Synthesis of $CsPbBr_3$ Nanocrystals with a Humidity-Induced Fluorescent Response: Mechanism and Sensing Applications. //The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2025. – Т. 16. – №. 17. – С. 4205-4213.
4. Cherednikova, A., Labuntsov, V**., Arabuli, K**., Mikhailova, L., Gagarinova, D., Dolzhenko, E. I., Tomyshev, K., Zuev, D., Bogdanov, A., Zyuzin, M., & Kokhanovskiy, A. A thermally and

mechanically stabilized plasmonic optical fiber sensor for real-time biomarker monitoring // Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications. – 2026. – Т. 71. – С. 101567.

5. **Арабули К.В**., Акеноун А., Ажаму Г., Зюзин М.В. Разработка технологий синтеза наноразмерного карбоната кальция с возможностью загрузки чувствительных биомолекул на единой микрофлюидной платформе //Тезисы докладов Второй ежегодной всероссийской молодежной конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2023». – 2023. – С. 92-95.
6. Markelov, V. V., **Arabuli, K. V**., Gaponenko, I. N., Sergeev, V. S., Senichkina, D. A., Potanin, A. A., Laushkina, V. O., Zyuzin, M. V., Shakirova, A. I., Lepik, K. V., & Kulagin, A. D. Studying efficiency of T-cell transduction in microfluidic systems for creation of T-lymphocytes with chimeric antigen receptor // Cellular Therapy and Transplantation. – 2023. – Vol. 12. – No. 3, suppl. – Proceedings of the XVII Raisa Gorbacheva Memorial Meeting “Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Gene and Cellular Therapy”, Saint Petersburg, September 14–16, 2023.
7. Маркелов, В. В., **Арабули, К. В**., Гапоненко, И. Н., Сергеев, В. С., Сеничкина, Д. А., Потанин, А. А., Лаушкина, В. О., Зюзин, М. В., Шакирова, А. И., Лепик, К. В., & Кулагин, А. Д. Оптимизация геометрических условий трансдукции Т-клеток с использованием микрофлюидных систем // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2024. – Т. 17. – № S1. – С. 16–17. – EDN WTRZCU.
8. Markelov, V. V., **Arabuli, K. V**., Gaponenko, I. N., Sergeev, V. S., Korotaeva, A. V., Popova, M. O., Zyuzin, M. V., Shakirova, A. I., Lepik, K. V., & Kulagin, A. D. Ultra-fast CAR-T manufacturing using microfluidic devices: enhanced transduction and favorable T cell phenotype // Cellular Therapy and Transplantation. – 2024. – Vol. 13. – No. 3, Supplement. – P. 150. – Proceedings of the XVIII Raisa Gorbacheva Memorial Meeting “Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Gene and Cellular Therapy”, Saint Petersburg, September 19–21, 2024.
9. Markelov, V., Gaponenko, I., **Arabuli, K**., Sergeev, V., Korotaeva, A., Shakirova, A., Popova, M., Moiseev, I., Zyuzin, M., Lepik, K., & Kulagin, A. Next-day CAR-T manufacturing: improving transduction efficiency and cell phenotype with microfluidic systems // Bone Marrow Transplantation. – 2025. – Vol. 60, Suppl. 1. – P. 332–333. – Abstract P175. – The 51st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, 30 March – 2 April 2025, Hybrid Meeting.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Damiati S., Kompella U.B., Damiati S.A., Kodzius R. Microfluidic Devices for Drug Delivery Systems and Drug Screening // Genes. — 2018. — Т. 9. — № 2.

2. Lengert E.V., Trushina D.B., Soldatov M., Ermakov A.V. Microfluidic Synthesis and Analysis of Bioinspired Structures Based on CaCO3 for Potential Applications as Drug Delivery Carriers // Pharmaceutics. — 2022. — Т. 14. — № 1.

3. Cappell K.M., Kochenderfer J.N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far // Nature Reviews Clinical Oncology. — 2023. — Т. 20. — № 6. — С. 359-371.

4. Kanate A.S., Majhail N., DeFilipp Z., Dhakal B., Dholaria B., Hamilton B., Herrera A.F., Inamoto Y., Jain T., Perales M.-A., Carpenter P.A., Hamadani M. Updated Indications for Immune Effector Cell Therapy: 2023 Guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy // Transplantation and Cellular Therapy. — 2023. — Т. 29. — Updated Indications for Immune Effector Cell Therapy. — № 10. — С. 594-597.

5. 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., Lankester A.C., Mohty M., Neven B., de Latour R.P., Pedrazzoli P., Peric Z., Yakoub-Agha I., Sureda A., Kröger N., for the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022 // Bone Marrow Transplantation. — 2022. — Т. 57. — № 8. — С. 1217-1239.

6. Müller F., Taubmann J., Bucci L., Wilhelm A., Bergmann C., Völkl S., Aigner M., Rothe T., Minopoulou I., Tur C., Knitza J., Kharboutli S., Kretschmann S., Vasova I., Spoerl S., Reimann H., Munoz L., Gerlach R.G., Schäfer S., Grieshaber-Bouyer R., Korganow A.-S., Farge-Bancel D., Mougiakakos D., Bozec A., Winkler T., Krönke G., Mackensen A., Schett G. CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease — A Case Series with Follow-up // New England Journal of Medicine. — 2024. — Т. 390. — № 8. — С. 687-700.

7. Rodríguez-Ruiz I., Ackermann T.N., Muñoz-Berbel X., Llobera A. Photonic Lab-on-a-Chip: Integration of Optical Spectroscopy in Microfluidic Systems: The integration of micro-optical elements with microfluidics leads to the highly promising photonic lab-on-a-chip analytical systems (PhLoCs). // Analytical Chemistry. — 2016. — Т. 88. — № 13. —

C. 6630-6637.

8. Luo T., Fan L., Zhu R., Sun D. Microfluidic Single-Cell Manipulation and Analysis: Methods and Applications // Micromachines. — 2019. — T. 10. — № 2.

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

10. 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.

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

12. Xu J., Harasek M., Gföhler M. From Soft Lithography to 3D Printing: Current Status and Future of Microfluidic Device Fabrication // Polymers. — 2025. — T. 17. — № 4.

13. 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.

14. Nelson M.D., Tresco P.A., Yost C.C., Gale B.K. Achieving biocompatibility and tailoring mechanical properties of SLA 3D printed devices for microfluidic and cell culture applications // Lab Chip. — 2024. — T. 24. — № 19. — C. 4632-4638.