



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
АКАДЕМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Ж.И. АЛФЕРОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

194021, С.-Петербург, ул. Хлопина, 8, корп. 3, лит. А

Телефон (факс): (812) 297-2145

www.spbau.ru

ОКПО 59503334, ОГРН 1027802511879

ИНН/КПП 7804161723/780401001

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук»

д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН



А.Ю. Егоров

М.П.

« 1 » марта 2022 г.

Заключение организации, в которой выполнена работа

федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук»
о диссертационной работе **Филатова Никиты Алексеевича «Разработка микрофлюидной платформы для синтеза монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц»**, представляемой на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики»

Диссертация «Разработка микрофлюидной платформы для синтеза монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц» выполнена в СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова.

В период подготовки диссертации соискатель Филатов Никита Алексеевич являлся младшим научным сотрудником лаборатории Нанобиотехнологий (с 2016 по 2021 год) и в лаборатории Возобновляемых источников энергии (с 2021 года) федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования и науки «Санкт-

Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук».

В 2016 г. Филатов Н.А. защитил диссертацию на соискание степени магистра по направлению подготовки 03.04.01 «Прикладные математика и физика» в Санкт-Петербургском Академическом университете – научно-образовательном центре нанотехнологий РАН. В 2020 г. Филатов Н.А. закончил очную аспирантуру по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки», по профилю «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», в Санкт-Петербургском национальном исследовательском Академическом университете Российской академии наук. Научный руководитель – Букатин А.С., к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории Возобновляемых источников энергии в Академическом университете им. Ж.И. Алфёрова и исполняющий обязанности заместителя директора по научной работе в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук.

Актуальность диссертационной работы.

Работа Филатова Н.А. посвящена развитию микрофлюидных технологий для решения биологических и биомедицинских задач. Как наука, микрофлюидика изучает процессы, связанные с протеканием жидкостей в микроканалах или микрообъемах (микрогидродинамика), а как технология – является перспективным инструментом для создания микрофлюидных устройств или чипов, базирующихся на уникальных принципах микрогидродинамики, и подходящих для решения задач химии, биологии, скрининга лекарств, систем высокочувствительной диагностики заболеваний и т. д. Основное преимущество, которое делает перспективным использование и развитие микрофлюидных технологий, состоит в том, что большинство лабораторных операций (ввод пробы, очистка пробы, манипуляция с пробой, анализ и детектирование) можно выполнить в одном микрофлюидном устройстве (Lab-on-a-chip). Такие компактные системы требуют небольших объемов реагентов и призваны увеличить воспроизводимость и скорость анализа. Согласно, различным аналитическим сводкам, особо важным направлением считается развитие устройств для оказания медицинской помощи на месте (Point-Of-Care Testing), а также высокопроизводительных и высокочувствительных систем скрининга биообъектов.

Диссертационная работа Филатова Н.А. лежит в плоскости «капельной микрофлюидики», где основное внимание уделяется формированию микрокапель водной эмульсии в потоках непрерывной фазы (как правило, разные виды масел) с управляемыми свойствами: контроль диаметра микрокапель, скорости их образования, состава и внутренней структуры. Такие микрокапли имеют характерные диаметры от 50 мкм (объем

≈520 нл) до 500 мкм (объем ≈520 нл), что позволяет их использовать в роли микрокапсул, микрореакторов и при определенных условиях как базис для создания микрочастиц. Также работа посвящена разработке современных приборов и принципов управления потоками жидкости в микрофлюидных устройствах для формирования микрокапель и обеспечения эффективного перемешивания в них.

Кроме этого, технологии капельной микрофлюидики находят широкое применение в синтезе микрочастиц с контролируемыми свойствами и сложной морфологии (например, микрочастицы ядро-оболочка). Такие микрочастицы уже активно применяются при разработке новых типов контейнеров для доставки лекарств, элементов тканевой инженерии, микролинз для фотоники, элементов биодатчиков и т.п. Однако для микрофлюидных каналов, характерная ширина которых составляет 30-300 мкм, а высота 20-60 мкм, доминирующим фактором является ламинарность течения жидкости, что затрудняет перемешивание веществ перед началом биохимических реакций. Поэтому в настоящее время постоянно разрабатываются новые подходы и конструкции микроканалов для эффективного смешивания реагентов внутри микрофлюидного устройства.

Также стоит отметить, что несмотря на указанные сильные стороны микрофлюидных технологий и значительный рост числа публикаций в ведущих научных журналах коммерческих продуктов, использующих микрофлюидные технологии, на рынке присутствует не так много. Это связано с трудоемкостью изготовления микрофлюидных устройств, необходимостью разработки простого и компактного периферийного оборудования, подбора наборов реагентов и т.п. Как указывается докладчиком, многие процессы недостаточно исследованы, например, не изучено влияние геометрии микроканалов и состава фаз на образование стабильных и монодисперсных микрокапель. Дополнительно можно отметить, что также затруднено использование методов теоретического и компьютерного моделирования для расчета потоков жидкостей и распределения веществ в каналах устройства, что требует обязательного проведения экспериментальных исследований.

Резюмируя вышесказанное, исследования, изложенные в диссертации Филатова П.А., несомненно, являются **актуальными**.

Целью представленной работы являлась разработка и апробация микрофлюидной платформы для синтеза монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц.

Для достижения поставленной цели в настоящей диссертации решались следующие задачи:

— Разработка и изготовление экспериментальных образцов микрофлюидных чипов для формирования макроэмульсий «вода-в-масле» и гидрогелевых микрочастиц.

— Разработка и апробация автоматизированной системы управления потоками жидкости в микрофлюидном устройстве. Сравнение режимов формирования монодисперсных эмульсий при вводе жидкостей в чип при постоянном давлении и постоянном расходе.

— Разработка способа формирования монодисперсных макроэмульсий отрицательным давлением с разными регуляторами потока воздуха.

— Исследование эффективности пассивного перемешивания жидкостей в асимметричных генераторах микрокапель.

— Разработка методов формирования и характеристика гидрогелевых микрочастиц из полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA), полиакриламида, желатин метакрилоила (GelMA), альгината натрия и агарозы при помощи разработанной микрофлюидной платформы.

По итогам рассмотрения принято следующее заключение:

1. Личное участие соискателя ученой степени в получении результатов, изложенных в диссертации.

Диссертация Филиатова Н.А. является самостоятельной и оригинальной научно-исследовательской работой, вклад автора диссертации в которую был определяющим. Личный вклад автора состоит в участии в постановке цели и задач исследований, анализе литературных источников по теме диссертации, в разработке и изготовлении микрофлюидных устройств: изготовлении и характеристике автоматизированного микрофлюидного контроллера давлений (МФКД) для управления потоками жидкости в них; исследовании вакуумного метода формирования микрокапель и создании для этого экспериментальной установки; экспериментальных исследованиях параметров микрокапель и перемешивания реагентов в них; обработке и анализе экспериментальных данных; экспериментальных исследованиях по формированию водных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц из полиакриламида, полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA), альгината натрия, агарозы и желатин метакрилоила (GelMA). А также в представлении результатов работы на конференциях и подготовке публикаций по результатам исследований, вклад в которые соизмерим с вкладом соавторов.

Анализ теоретических и экспериментальных данных проведен лично автором или совместно с соавторами. Все важнейшие оригинальные результаты получены либо автором диссертации, либо при его непосредственном участии

2. Степень достоверности результатов, проведенных соискателем ученой степени исследований.

Достоверность полученных методологических и экспериментальных результатов не вызывает сомнений благодаря широкому использованию современного экспериментального оборудования (профессиональные микроскопы Leica и Zeiss, высокоскоростные камеры и т. д.) и методов физического эксперимента, повторяемостью получаемых экспериментальных данных. Достоверность результатов и выводов подтверждается их активным обсуждением на международных конференциях и публикацией в престижных рецензируемых международных журналах. Полученные результаты хорошо согласуются с известными теоретическими и экспериментальными данными.

3. Новизна исследований, полученных результатов и выводов заключается в следующем:

- Впервые выявлена линейная зависимость диаметра капель макроэмульсий «вода-в-масле» от соотношения между давлениями дисперсной и непрерывной фаз в пределах значений 0,5-0,9, а также его независимость от их абсолютных значений (в диапазоне давлений 5-25 кПа).
- Частота формирования водных микрокапель в режиме постоянного давления без наличия расходомеров имеет максимальное значение, после которого происходит резкое падение частоты до 3,5 раз, что объясняется увеличением вязкости эмульсии в выходном микроканале.
- Для устройств по формированию капель отрицательным давлением экспериментально установлено, что их диаметр преимущественно определяется гидравлическими сопротивлениями входных микроканалов при уровнях отрицательного давления ниже 30 кПа.
- Впервые экспериментально показано, что распределение реагентов внутри микрокапель, в том числе и во время движения в выходном микроканале, зависит от симметрии каналов в области формирования при условии, что объем капель близок к объему области образования капель.

4. Значимость полученных результатов.

Практическая значимость работы Филагова Н.А. заключается в следующем.

- Создан многофункциональный микрофлюидный контроллер давления с пневмоинтерфейсами для пробирок разного объема для стабильного формирования монодисперсных микрокапель в микрофлюидных устройствах.

— Разработан способ формирования микроканалъ эмульсии «вода-в-масле» отрицательным давлением в микрофлюидном устройстве для создания компактных Point-of-care устройств. Получен патент на полезную модель № 199373 от 28 августа 2020 года. Авторы патента: А.С. Букатин, И.А. Филатов, Д. В. Поздрюхин.

— Предложен генератор микроканалъ с фокусировкой потока с асимметричным дизайном для ускорения перемешивания реагентов в микромасштабе для создания компактных Point-of-care устройств.

Общая оценка диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, двух глав, заключения и списка литературы. Во введении сформулированы цели и задачи диссертационной работы, обосновывается актуальность научного исследования, достоверность полученных результатов, указывается научная новизна и практическая значимость работы. Формулируются основные положения, выносимые на защиту. Приводятся сведения о структуре и объеме диссертации, а также апробации результатов исследования.

В первой главе приведен литературный обзор по теме исследований. Указывается история развития микрофлюидных устройств, перспективные тенденции и существующие сложности, описываются ограничения, накладываемые на них. Обсуждаются вопросы принципиального устройства и материалов для изготовления микрофлюидных чипов, также приводятся основные типы микрофлюидных генераторов микроканалъ и обсуждаются проблемы перемешивания реагентов в них. Отдельное внимание уделяется синтезу гидрогелевых микрочастиц на базе микроканалъ. Показывается актуальность формирования микрочастиц, которые можно применять для инкапсулирования и культивирования живых клеток, для создания 3D биочипов или создания функциональных элементов устройств орган-на-чипе, а также для разработки экпресс систем «Диагностики-на-месте» (Point-of-Care). Также рассматриваются методы исследования биообъектов, молекул и клеток в микроканалъ жидкости и дополнительно описываются уникальные методы использования каналъ: методы регенерации каналъ, способы создания искусственных клеток, методы моделирования микрооргана в микрокапле и создание 3D биочипов на основе гидрогелевых микрочастиц. Обсуждается ключевая приборная база для управления микропотоками жидкостей в микрочипах. Показывается важность развития доступных систем и микрофлюидных контроллеров давлений. Дополнительно раскрывается проблема разработки простых методов по формированию каналъ с помощью отрицательного давления в микрочипе.

Вторая глава посвящена описанию проведенных экспериментальных исследований. Сначала в ней указываются базовые принципы формирования капель макроэмульсии в микрофлюидных устройствах, требования к свойствам поверхности микроканалов и составу дисперсной и непрерывной фаз. Описываются конструкция и основные элементы разработанных микрофлюидных чипов с фокусировкой потока для формирования макроэмульсий, а также основные стадии их изготовления методом мягкой литографии из полидиметилсилоксана (ПДМС).

Далее, описывается разработка 4х канального контроллера давления (МФКД) для управления течением жидкостей в микрофлюидных чипах при постоянном давлении. Дополнительно представлена разработка герметичных пневматических интерфейсов для ввода жидкостей из пробирок разного объема в микрочипы с помощью разработанного МФКД. Характеризация МФКД проводится на примере генерации микрокапель эмульсии «вода-в-масле» в микрофлюидных устройствах с фокусировкой потока с шириной выходного канала 60 мкм или 200 мкм, и сравнение его работы с коммерческими шприцевыми насосами РИД 2000 (Harvard Apparatus, США), которые обеспечивали ввод жидкостей в микрочипы при постоянном расходе. Для объяснения резкого отличия в зависимостях частоты генерации между режимами ввода жидкостей при постоянном давлении и постоянном расходе была проведена оценка эффективной вязкости эмульсии и гидравлического сопротивления выходного микроканала.

В четвертом разделе второй главы приведено описание исследования режимов образования монодисперсных капель «вода-в-масле» в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока, ввод жидкостей в который осуществляется под действием отрицательного давления в выходном резервуаре. Для этого было предложено использовать недорогой мини-диафрагменный вакуумный насос и контролировать отрицательное давление с помощью: 1) компактного электронепневматического регулятора SMC TV0090-2L, или 2) ручного клапана управления воздушным потоком RFU 482-1/8 (Camozzi). В обоих случаях была проанализирована стабильность образования капель, а также зависимость их диаметра и частоты образования от приложенного давления и гидравлических сопротивлений входных микроканалов.

В пятом разделе приведены результаты численного моделирования (Comsol Multiphysics) и экспериментальных исследований по ускорению перемешивания реагентов в микроканалах «вода-в-масле» в микрочипах с асимметричной фокусировкой потока по сравнению с классическим симметричным вариантом конструкции. Проверка влияния симметрии области фокусировки потока генераторов капель на потоки жидкости и распределение реагентов проводилась путем анализа и сравнения результатов двумерного

численного моделирования процесса образования капель с результатами измерения поля скоростей течения жидкостей и распределения модельного красителя в каплях.

В шестом разделе приводятся результаты апробации разработанной микрофлюидной платформы и микрофлюидных устройств на примере формирования монодисперсных гидрогелевых микрочастиц. В качестве гидрогелей применяются полиэтиленгликоль диакрилат (PEGDA), полиакриламид, альгинат натрия, желатин метакрилоил (GelMA) и агароза. Указывается, что выбор гидрогелей основан на их свойствах биосовместимости, инертности и возможности реализовать их полимеризацию в микрофлюидном чипе. Дополнительно для микрочастиц PEGDA и полиакриламида приводятся результаты исследования их механических свойств, на примере измерения модуля Юнга.

Таким образом, структура и содержание работы свидетельствуют, что диссертация представляет собой завершённое научное исследование, в котором показана актуальность, новизна и перспективность подходов. Выводы и заключения обоснованы и имеют научную и практическую ценность для разработок в области создания новых микрофлюидных платформ и устройств.

Результаты диссертационной работы представлены в публикациях в отечественных и зарубежных рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации научных результатов.

Основные результаты по теме диссертации изложены в 10 печатных работах, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК и 12 печатных работах в сборниках трудов конференций (10 докладов на международных, 2 – с международным участием). Так, результаты работы были опубликованы в профильных журналах по данной тематике исследований: IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, Scientific Reports, MDPI Micromachines, Journal of Physics: Conference Series, Technical Physics и др., индексируемых в Scopus и WoS.

Основные положения и результаты работы докладывались на следующих конференциях: 8th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2021» (IISL: University, St. Petersburg). Вторая российская конференция с международным участием и Третья международная конференция «Физика – наукам о жизни» 2017, 2019 (СПб: ФТИ им. А.Ф. Иоффе), 3th, 4th, 5th, and 6th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN» 2016, 2017, 2018, 2019 (Санкт-Петербург), Skoltech Young Scientists Cross-Disciplinary Conference Gen-Y 2.0 2019 (Sochi, Russia), EMBL Conference Microfluidics 2018 (Heidelberg, Germany), две международные конференции «Физика, СПб» 2015, 2017 (Санкт-Петербург), научная конференция с международным участием «Неделя науки» 2017 (СПбПУ Петра Великого, Санкт-Петербург), 5th International Scientific Conference STRANN 2016 (Saint Petersburg).

5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.

Основное содержание диссертации опубликовано в 10 статьях в изданиях, индексируемых Web of Science или Scopus, и входящих в перечень ВАК:

1. N.A. Filatov, I.A. Denisov, A.A. Evstrapov, A.S. Bukatin. Open-Source pressure controller based on compact electro-pneumatic regulators for droplet microfluidics applications // IEEE Tr. On Inst And Meas., 2022. Vol. 71. P. 1-10.
2. N. A. Filatov, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin. Negative Pressure Provides Simple and Stable Droplet Generation in a Flow-Focusing Microfluidic Device // Micromachines, 2021. Vol. 12. №. 6. P. 662.
3. K. I. Belousov, N. A. Filatov, I. V. Kukhtevich, V. Kantsler, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin. An asymmetric flow-focusing droplet generator promotes rapid mixing of reagents // Scientific reports, 2021. Vol. 11. №. 1. P. 1-10
4. N. A. Filatov, A. S. Bukatin. Study of droplet formation regimes in a pressure control mode in microfluidic chip for screening cell libraries//Journal of Physics: Conference Series, 2020. Vol. 1695. №. 1. P. 012053.
5. D. V. Nozdriukhin, N. A. Filatov, A. S. Bukatin. Formation and manipulation of polyacrylamide spheroids doped with magnetic nanoparticles in microfluidic chip // Journal of Physics: Conference Series, 2018. Vol. 1124. №. 3. P. 031026.
6. N. A. Filatov, D. V. Nozdriukhin, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin. Comparison of step and flow-focusing emulsification methods for water-in-oil monodisperse drops in microfluidic chips // Journal of Physics: Conference Series, 2018. Vol. 1124. №. 3. P. 031028.
7. D. V. Nozdriukhin, N. A. Filatov, A. A. Evstrapov, A. S. Bukatin. Formation of Polyacrylamide and PEGDA Hydrogel Particles in a Microfluidic Flow Focusing Droplet Generator // Technical Physics, 2018. Vol. 63. №. 9. P. 1328-1333.
8. D. V. Nozdriukhin, K. I. Belousov, N. A. Filatov, A. S. Bukatin. The study of monodisperse water-in-oil macroemulsion dynamics in a microfluidic chip // Journal of Physics: Conference Series, 2017. Vol. 917. №. 4. P. 042015
9. N. A. Filatov, D. V. Nozdriukhin, A. S. Bukatin. The kinetic study of solidification PEGDA microparticles in flow-focusing microfluidic chip // Journal of Physics: Conference Series, 2017. Vol. 917. №. 4. P. 042024.
10. N. A. Filatov, K. I. Belousov, A. S. Bukatin, I. V. Kukhtevich, A. A. Evstrapov The study of mixing of reagents within a droplet in various designs of microfluidic chip // Journal of Physics: Conference Series, 2016. Vol. 741. №. 1. P. 012052.

Таким образом, диссертация Филатова И.А. на тему «Разработка микрофлюидной платформы для синтеза монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц», представленная на соискание учёной степени кандидата технических наук, является законченной научно-квалификационной работой, представляющей научный и практический интерес. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертация полностью отвечает формуле специальности 1.3.2 - «Приборы и методы экспериментальной физики» (ранее 01.04.01), что полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук, а ее автор Филатов Никита Алексеевич заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Диссертационная работа и настоящий отзыв рассмотрены и утверждены на научном семинаре Центра нанотехнологий «Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет Российской академии наук» (Протокол №2 от 24 февраля 2022 г.).

Заключение составил:

Заведующий лабораторией ВИЭ,
профессор СПбАУ РАН им. Ж.И.

Алфёрова

д.ф.-м.н.

Тел.: +7 (812) 297-21-45

e-mail: imukhin@spbau.ru



И.С. Мухин