

14.2

Формирование гидрогелевых частиц из полиакриламида и PEGDA в микрофлюидном генераторе эмульсий с фокусировкой потока

© Д.В. Ноздрюхин,^{1,2} Н.А. Филатов,¹ А.А. Евстапов,^{1,3,4} А.С. Букатин^{1,4}

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН, 194021 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

³ Университет ИТМО, 197101 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: DaniN1909@yandex.ru

(Поступило в Редакцию 15 января 2018 г.)

Монодисперсные полимерные микрочастицы имеют большой потенциал для биомедицинских и физических применений. Современные высокопроизводительные технологии „капельной“ микрофлюидики позволяют формировать монодисперсные макроэмульсии „вода в масле“ с заданными параметрами. Проведение в макроэмульсии реакции полимеризации позволяет ее трансформировать в суспензию микрочастиц. Эти частицы могут рассматриваться как контейнеры для целевой доставки лекарственных средств, а также в качестве „биочернил“ для 3D-печати тканей и органов. Проведено исследование режимов формирования микрочастиц из PEGDA и полиакриламида в микрофлюидном генераторе макроэмульсий с фокусировкой потока. Для характеристики микрочастиц были измерены их геометрические размеры и механические свойства. Кроме того, была исследована динамика диффузионного выхода из микрочастиц малых молекул на примере флуоресцентного красителя Rhodamine B.

DOI: 10.21883/JTF.2018.09.46423.21-18

Введение

В настоящее время монодисперсные полимерные микрочастицы находят широкое применение в биологических и медицинских исследованиях. Они рассматриваются в качестве перспективных кандидатов для создания таргетных средств доставки лекарственных препаратов [1,2], кодирования фрагментов ДНК при секвенировании генома отдельных клеток [3], специфических маркеров для обнаружения и выделения онкомаркеров [4,5], микрореакторов для проведения генетических исследований методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6], упаковки отдельных клеток для регенерации поврежденных тканей [7].

Одним из способов формирования монодисперсных микрочастиц является использование методов „капельной микрофлюидики“ (droplet microfluidic), которые позволяют формировать монодисперсную макроэмульсию (капли) „воды в масле“ за счет возникновения неустойчивости в области контакта двух несмешивающихся жидкостей. Получающуюся таким способом эмульсию широко используют в качестве капле-микрореакторов для проведения разнообразных биохимических реакций. В связи с возможностью формировать капли-микрореакторы с частотой до нескольких кГц, этот подход находит широкое применение при скрининге перспективных лекарственных препаратов [8], проведении генетических исследований методом цифровой капельной ПЦР [9], а также синтезе полимерных

микрочастиц [10]. Также в настоящее время изучается потенциал „капельной микрофлюидики“ для изготовления новых „умных“ материалов [11], оптических систем [12] и идентификационных меток [13].

Актуальным применением полимерных гидрогелевых микрочастиц является их использование для создания „биочернил“, позволяющих осуществлять 3D-печать тканей и органов [14]. Микрочастицы из биоразлагаемых материалов, например алгината натрия, применяются для упаковки клеток, а микрочастицы из биологически инертных материалов, таких как PEGDA и полиакриламид, — для создания поддерживающих структур (скаффолдов) [15]. Кроме того, в эти полимеры могут быть упакованы биологически активные молекулы или лекарственные средства, выделение которых в заданном пространстве позволит управлять формированием и развитием ткани или оказывать необходимое воздействие на участок организма.

Поэтому целью настоящей работы являлось определение условий и режимов воспроизводимого формирования монодисперсных гидрогелевых частиц из полиакриламида и полиэтиленгликоль диакрилата (Poly (ethylene glycol) diacrylate — PEGDA) в микрофлюидном генераторе эмульсий с фокусировкой потока. При этом важными задачами исследования были: а) оценка модуля упругости полимеризованных частиц; б) изучение кинетики выхода низкомолекулярных компонентов (на примере диффузии молекул флуорофоров) из гидрогелевых частиц.

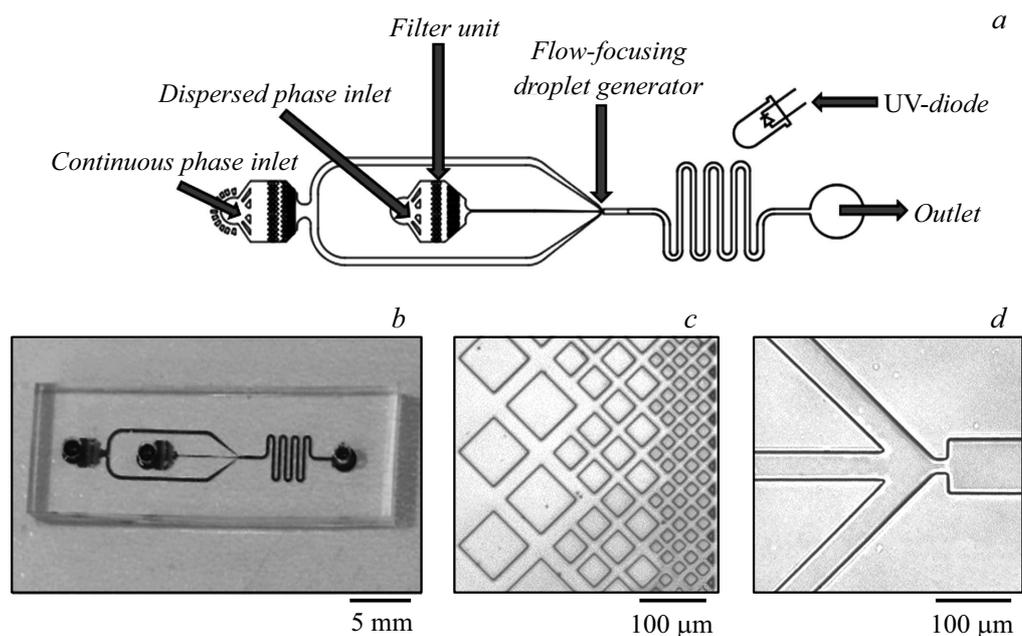


Рис. 1. *a* — принципиальная схема микрофлюидного чипа для формирования монодисперсных гидрогелевых микрочастиц; *b* — изображение микрофлюидного чипа, *c* — изображение фильтра вблизи водного отверстия микрочипа; *d* — изображение области формирования макроэмульсий.

Микрофлюидные чипы с фокусировкой потока

Для формирования монодисперсных макроэмульсий „вода в масле“ существует несколько типов топологий микрофлюидных генераторов, обеспечивающих соосное течение потоков, фокусировку потоков или Т-инжекцию [16]. Одними из основных параметров, определяющими условия формирования эмульсии, являются капиллярные числа непрерывной и дисперсной фаз. В микрофлюидном чипе с фокусировкой потока в зависимости от соотношения между капиллярными числами формирование эмульсии может происходить в каплющем или струйном режиме [17]. Преимуществом использования топологии фокусировки потока являются более широкие возможности управления режимом генерации капель. Кроме того, за счет введения в конструкцию генератора капель, ограничивающей поток апертуры, обеспечивается возможность контроля размеров формируемой эмульсии независимо от частоты ее генерации.

Принципиальная схема использованных в работе микрофлюидных чипов с генератором капель и изображения чипа и его элементов представлены на рис. 1. Микрофлюидный чип содержит по одному входу для непрерывной и дисперсной фаз и один выход для сбора макроэмульсии или микрочастиц. Вблизи входных отверстий сформированы фильтрующие элементы, не допускающие попадания микрочастиц пыли и грязи в рабочие каналы чипа. Область формирования эмульсии представляет собой место соединения двух каналов для непрерывной фазы и одного центрального канала для дисперсной фазы, отделенного от выходного канала

апертурой шириной $15\ \mu\text{m}$. Ширина выходного канала составляет $60\ \mu\text{m}$ вблизи апертуры и увеличивается до $120\ \mu\text{m}$. Глубина всех подводящих микроканалов и области формирования капель составляет $40\ \mu\text{m}$, глубина выходного канала вблизи апертуры также составляет $40\ \mu\text{m}$ и затем увеличивается до $120\ \mu\text{m}$ для предотвращения засорения выходного канала полимеризовавшимися микрочастицами.

Изготовление микрофлюидных чипов для проведения экспериментальных исследований осуществлялось с помощью технологии „мягкой“ литографии [18]. Полученные реплики в полидиметилсилоксане (ПДМС) Sylgard 184 (Dow Corning) затем были соединены со стеклами $25 \times 50\ \text{mm}$ и толщиной $\sim 0.17\ \text{mm}$ после обработки их поверхностей в кислородной плазме на установке Plasma Finish. Для придания внутренним поверхностям микроканалов гидрофобных свойств они были обработаны гидрофобизирующим агентом ClearVue Rain Repellent (Turtle Wax Inc.).

Материалы и методы формирования гидрогелевых частиц в микрофлюидном генераторе макроэмульсий

Для формирования монодисперсных макроэмульсий и гидрогелевых микрочастиц в качестве непрерывной фазы использовалось минеральное масло (каталожный № 330779, Sigma-Aldrich) с добавлением неионного поверхностно-активного вещества (ПАВ) ABIL EM 180 (Evonik Industries). ПАВ стабилизировал эмульсию и

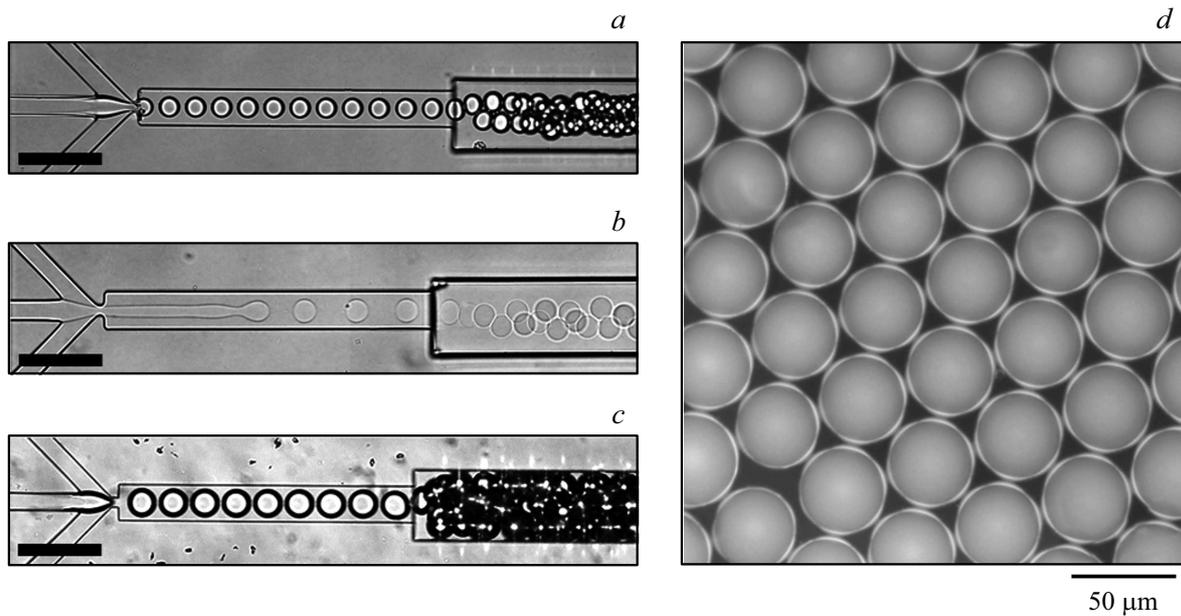


Рис. 2. *a* — формирование 50% PEGDA макроэмульсии в капляющем режиме, *b* — формирование 100% PEGDA макроэмульсии в струйном режиме, *c* — формирование 10% полиакриламидной макроэмульсии в капляющем режиме. Размерная метка соответствует 100 μm ; *d* — изображение полиакриламидных микрочастиц с флуоресцентным красителем.

предотвращал ее коалесценцию за счет снижения поверхностного натяжения и создания потенциального барьера на границе двух фаз.

В качестве дисперсной фазы для формирования гидрогелевых частиц из PEGDA использовался водный раствор полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA) со средней молекулярной массой 700 Da (каталожный № 455008 Sigma-Aldrich) в концентрации 0–100% с добавлением фотоинициатора Irgacure 2959 (каталожный № 410896 Sigma-Aldrich) с концентрацией 1%. При формировании полиакриламидных гидрогелевых микрочастиц в качестве дисперсной фазы использовался водный раствор акриламида/бис-акриламида (Bio-Rad) в концентрации 5–30% с добавлением инициатора полимеризации пероксодисульфата аммония (Bio-Rad) в концентрации 0.3%. В непрерывную среду добавлялся катализатор полимеризации TEMED в концентрации 1%. Для исследования кинетики выхода веществ из микрочастиц в дисперсную фазу добавлялся флуоресцентный краситель Rhodamine B (каталожный № 83689 Sigma-Aldrich) в концентрации 0.1 mg/ml.

Ввод жидкостей в микрофлюидный чип осуществлялся при постоянном давлении в диапазоне 5–50 кПа с помощью четырехканального контроллера давлений, основанного на электропневматических интерфейсах ITV0001 (SMC, Japan). Наблюдение и регистрация процесса формирования макроэмульсии осуществлялись с помощью оптического микроскопа DM4000 (Leica, Германия) и CCD-камеры Pike 100B (AVT, Германия), обеспечивающей съемку с частотой до 200 fps. Для получения изображений во флуоресцентном режиме использовалась камера DFC 345 FX (Leica). Полимеризация

PEGDA микрочастиц в микрофлюидном чипе проводилась под воздействием УФ излучения лампы оптического микроскопа, сфокусированного объективом 10 \times . Плотность мощности излучения на длине волны 365 nm составляла $\sim 80 \text{ mW/cm}^2$. Исследование механических характеристик микрочастиц осуществлялось с помощью атомно-силового микроскопа Bioscope Catalyst (Bruker) путем измерения силовых кривых подвода/отвода в контактном режиме.

Результаты и обсуждение

Формирование гидрогелевых микрочастиц с помощью микрофлюидных генераторов эмульсий осуществлялось в два этапа: на первом этапе формировалась монодисперсная макроэмульсия, в которой на втором этапе проводилась реакция полимеризации, в результате чего происходило преобразование макроэмульсии в суспензию микрочастиц. За счет использования апертуры шириной 15 μm диапазон размеров макроэмульсии составил 15–80 μm независимо от состава дисперсной фазы.

Время полимеризации PEGDA-микрочастиц экспоненциально зависит от концентрации фотоинициатора и составляет $\sim 30 \text{ s}$ при концентрации 1% [19]. Поэтому топология микрофлюидного чипа и скорость течения эмульсии были подобраны таким образом, чтобы реакция полимеризации PEGDA происходила в процессе ее движения по выходному каналу. Полимеризация полиакриламида начинается сразу после формирования эмульсии за счет диффузии катализатора TEMED из непрерывной фазы в дисперсную. В связи с тем, что концентрация TEMED в непрерывной фазе была 1%,

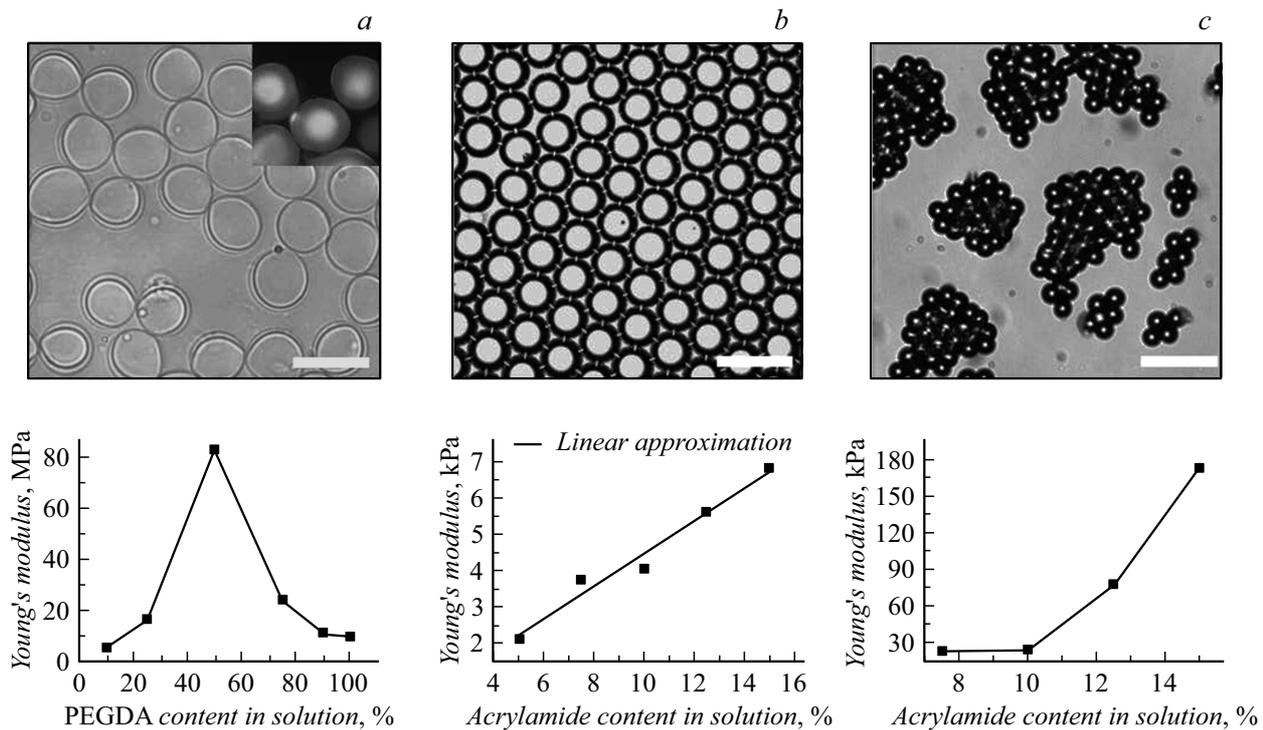


Рис. 3. Изображение и модуль Юнга гидрогелевых микрочастиц из: *a* — 100% PEGDA в жидкости, на вставке изображение микрочастиц с Rhodamine В во флуоресцентном режиме; *b* — 10% полиакриламида в жидкости, *c* — 10% полиакриламида в высушенном состоянии. Каждое значение модуля Юнга получено путем усреднения по трем измерениям.

время реакции составляло менее 1 min и на выходе из чипа микрочастицы были уже полностью полимеризованными.

Вязкость водного раствора неполимеризованного полиэтиленгликоля (PEG) зависит от его концентрации в широких пределах [20]. Поэтому при увеличении концентрации PEGDA в дисперсной фазе наблюдается изменение режима генерации эмульсии с капляющего на струйный при формировании капель одинакового диаметра (рис. 2, *a, b*), что связано с увеличением капиллярного числа дисперсной фазы [17]. Вязкость неполимеризованного полиакриламида близка к вязкости воды и не зависит от его концентрации, поэтому формирование полиакриламидной эмульсии осуществлялось только в капляющем режиме (рис. 2, *c*). При этом разброс размеров микрочастиц, сформированных в капляющем режиме не превышает 5%, в то время как в струйном режиме разброс размеров зависит от диаметра микрочастиц и может достигать до 30% в случае формирования частиц диаметром 15–20 μm . Пример сформированной полиакриламидной макроэмульсии представлен на рис. 2, *d*.

Одной из основных характеристик полимерных микрочастиц является модуль упругости. С помощью метода атомно-силовой микроскопии был определен модуль Юнга микрочастиц в зависимости от концентрации PEGDA в диапазоне 10–100%, который составил от 5 до 80 MPa (рис. 3, *a*). Также было обнаружено, что при концентрации PEGDA выше 50% у микрочастиц

образуется мягкая оболочка с модулем Юнга от 0.5 до 2 MPa [19].

Модуль упругости полиакриламидных частиц также зависит от концентрации полимера и составляет от 2 до 7 kPa в водной среде. При помещении частиц в воздушную среду и выдерживании в течение 1 h при комнатной температуре происходит уменьшение их диаметра примерно в 2 раза и увеличение модуля упругости до 25–180 kPa в зависимости от концентрации полимера вследствие процесса дегидратации (рис. 3, *b, c*). После помещения обезвоженных микрочастиц в водную среду происходит восстановление их размеров до первоначальных значений.

С помощью флуоресцентного красителя Rhodamine В была исследована кинетика выхода малых молекул из микрочастиц диаметром $\sim 50 \mu\text{m}$ (рис. 4) в воду. В частицах обоих типов интенсивность флуоресценции Rhodamine В экспоненциально спадает со временем. В случае 10% полиакриламида характерное время выхода красителя составило 4.2 h, а в случае PEGDA характерное время зависит от концентрации полимера и составляет от 0.3 до 1.3 h. Наибольшее время выхода красителя из микрочастиц с 25% содержанием PEGDA, а наименьшее с 50% содержанием PEGDA. Кроме того, остаточная интенсивность флуоресценции частиц составляет более 40%, что говорит о низкой пористости материала. Также у некоторых микрочастиц была обнаружена неоднородность интенсивности флуо-

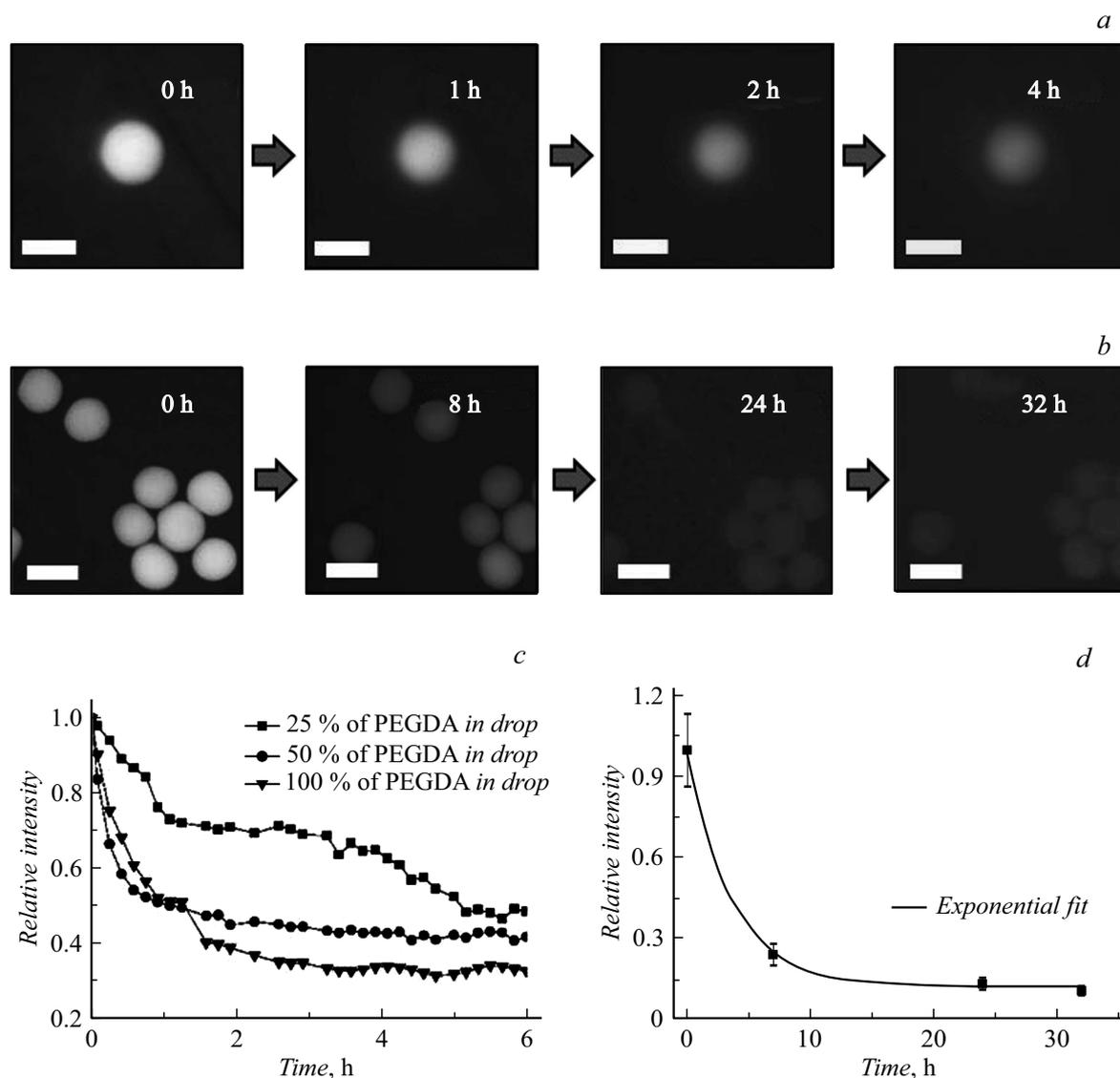


Рис. 4. Динамика изменения интенсивности флуоресценции Rhodamine В в микрочастицах: *a* — 50% PEGDA; *b* — 10% полиакриламида; *c* — зависимость интенсивности флуоресценции микрочастиц с разной концентрацией PEGDA, *d* — зависимость интенсивности флуоресценции в микрочастицах с 10% полиакриламида. Каждая точка графиков получена при усреднении интенсивности флуоресценции 5 микрочастиц. Размерная метка соответствует $50\ \mu\text{m}$.

ресценции, что может объясняться разной плотностью материала и зависимостью концентрации PEGDA от центра частицы (рис. 3, *a*). Это может быть связано с тем, что полимеризация частицы начинается с ее центра, и за время полимеризации может произойти обеднение области вблизи границы.

Заключение

В настоящей работе исследованы режимы формирования монодисперсных микрочастиц из PEGDA и полиакриламида в микрофлюидном генераторе макроэмульсий. Режим генерации определяется вязкостью дисперсной фазы и при увеличении концентрации PEGDA

изменяется с капающего на струйный, ухудшая при этом показатель монодисперсности частиц с 5 до 30%.

Исследование модуля Юнга микрочастиц показало, что их упругими свойствами можно управлять путем изменения концентрации полимера. При этом модуль Юнга PEGDA-частиц в водной среде находится в диапазоне 5–80 МПа, а полиакриламидных частиц — 2–7 кПа, что, вероятно, связано с высокой пористостью полиакриламида в отличие от PEGDA. Это же свойство проявляется при диффузионном выходе малых молекул, упакованных в микрочастицы, в водную среду. Изучение этого эффекта с помощью флуоресцентного красителя Rhodamine В показало, что у PEGDA-микрочастиц высокая интенсивность остаточной флуоресценции, а характерное время диффузионного выхода составляет

от 0.3 до 1.3 h. В случае полиакриламидных микрочастиц характерное время составляет 4.2 h. Таким образом, PEGDA-микрочастицы могут быть использованы для формирования 3D-каркаса в процессе биопечати, а полиакриламидные частицы для управляемого ввода в растущую культуру биологически активных веществ непосредственно сразу после печати, а также для целевой доставки лекарственных средств в заданную область организма.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-2131.2017.4.

Список литературы

- [1] *Choi A., Seo K.D., Kim D.W., Kim B.C., Kim D.S.* // *Lab. Chip.* 2017. Vol. 17. P. 591–613. DOI: 10.1039/C6LC01023G
- [2] *Mazutis L., Vasilaiuskas R., Weitz D.A.* // *Macromol. Biosci.* 2015. 15. P. 1641–1646. DOI: 10.1002/mabi.201570046
- [3] *Zilionis R., Nainys J., Veres A., Savova V., Zemmour D., Klein A.M., Mazutis L.* // *Nat. Protoc.* 2017. Vol. 12. P. 44–73. DOI: 10.1038/nprot.2016.154
- [4] *Hwang H., Kim S.-H., Yang S.-M.* // *Lab. Chip.* 2011. Vol. 11. P. 87–92. DOI: 10.1039/C0LC00125B
- [5] *Gao R.K., Cheng Z.Y., Demello A.J., Choo J.* // *Lab. Chip.* 2016. Vol. 16. P. 1022–1029. DOI: 10.1039/C5LC01249J
- [6] *Zhu Z., Zhang W., Leng X., Zhang M., Guan Z., Lu J., Yang C.J.* // *Lab. Chip.* 2012. Vol. 12. P. 3907–3913. DOI: 10.1039/C2LC40461C
- [7] *Jiang W., Li M., Chen Z., Leong K.W.* // *Lab. Chip.* 2016. Vol. 16. P. 4482–4506. DOI: 10.1039/c6lc01193d
- [8] *Shembekar N., Chaipan C., Utharalaa R., Merten C.A.* // *Lab. Chip.* 2016. Vol. 16. P. 1314–1331. DOI: 10.1039/C6LC00249H
- [9] *Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A.* // *Clin Chem.* 2015. Vol. 61. N 1. P. 79–88. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221366
- [10] *Kim J.H., Jeon T.Y., Choi T.M., Shim T.S., Kim S.-H., Yang S.-M.* // *Langmuir*, 2014, 30 (6), P. 1473–1488. DOI: 10.1021/la403220p
- [11] *Liu S.-S., Wang C.-F., Wang X.-Q., Zhang J., Tian Y., Yin S.-N., Chen S.* // *J. Mater. Chem. C.* 2014. N 2. P. 9431–9438. DOI: 10.1039/C4TC01631A
- [12] *Nisisako T., Suzuki H., Hatsuzawa T.* // *Micromachines.* 2015. Vol. 6. P. 1435–1444. DOI: 10.3390/mi6101428
- [13] *Geng Y., Noh J., Drevensek-Olenik I., Rupp R., Lenzini G., Lagerwall J.P.F.* // *Scientific Reports.* 2016. Vol. 6. DOI: 10.1038/srep26840
- [14] *Vadivelu R.K., Kamble H., Shiddiky M.J.A., Nguyen N.-T.* // *Micromachines* 2017. Vol. 8. P. 94. DOI: 10.3390/mi8040094
- [15] *DeForest C.A., Polizzotti B.D., Anseth K.S.* // *Nat. Mater.* 2009. Vol. 8. P. 659–664. DOI: 10.1038/nmat2473.
- [16] *Кухтевич И.В., Посмитная Я.С., Белоусов К.И., Букатин А.С., Евстрапов А.А.* // *Научное приборостроение.* 2015. Т. 25. Вып. 3. С. 65–85.
- [17] *Cubaud T., Mason T.G.* // *Phys. Fluid.* 2008. Vol. 20. P. 053302. DOI: 10.1063/1.2911716
- [18] *Букатин А.С., Мухин И.С., Малышев Е.И., Кухтевич И.В., Евстрапов А.А., Дубина М.В.* // *ЖТФ.* 2016. Т. 61. Вып. 10. С. 1566–1571. [Bukatın A.S., Mukhin I.S., Malyshev E.I., Kukhtevich I.V., Evstrapov A.A., Dubina M.V.] // *Tech. Phys.* 2016. Vol. 61. N 10. P. 1566–1571.
- [19] *Filatov N.A., Nozdriukhin D.V., Bukatin A.S.* // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2017. Vol. 917. P. 042024. DOI: 10.1088/1742-6596/917/4/042024
- [20] *Gonzalez-Tello P., Camacho F., Blazquez G.* // *J. Chem. Eng. Data.* 1994. Vol. 39. N 3. P. 611–614. DOI: 10.1021/jc00015a050