

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ МЕТАЛЛУРГИИ И МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ им. А.А.БАЙКОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*



**ПАРФЕНОВ Владислав Александрович**

**ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ТРЕХМЕРНЫХ  
КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ВОЗДЕЙСТВИЕМ  
ФИЗИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ**

Специальность – 2.6.5 «Порошковая металлургия и композиционные материалы»

**Диссертация на соискание ученой степени  
доктора технических наук**

Научный консультант:  
**КОМЛЕВ Владимир Сергеевич**  
доктор технических наук, профессор,  
член-корреспондент РАН

Москва 2024

# Содержание

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>ГЛАВА 1 АДДИТИВНОЕ ПРОИЗВОДСТВО В БИОМЕДИЦИНЕ -<br/>ПРЕИМУЩЕСТВА И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ .....</b>  | <b>19</b> |
| 1.1 Композиционные материалы для восстановления функций<br>поврежденных тканей .....  | 19        |
| 1.2 История развития трехмерной печати композиционных<br>материалов.....  | 23        |
| 1.2.1 Преимущества трехмерной печати для биомедицинских<br>приложений.....  | 26        |
| 1.2.2 Будущие тенденции трехмерной печати в медицинском<br>направлении .....  | 27        |
| 1.2.3 Биопечать на основе биочернил и ее ограничения.....   | 28        |
| 1.2.4 Биоматериально-независимая (без поддержек) биопечать.....   | 30        |
| 1.2.5 Магнитное левитационное формирование как формативный<br>способ производства .....   | 33        |
| 1.3 Трехмерная печать костных трансплантатов из неорганического<br>материала.....   | 36        |
| 1.4 Трехмерная печать композиционных материалов мягких тканей ...   | 37        |
| 1.4.1 Тканевые сфероиды – органические «строительные блоки» для<br>формирования .....   | 37        |
| 1.4.2 Трехмерная биопечать с использованием роботических систем .   | 39        |
| 1.4.3 Формирование мягких тканей с использованием магнитных<br>полей.....   | 42        |
| 1.4.4 Формирование мягких тканей с применением сильных магнитных<br>полей.....  | 46        |
| 1.4.5 Использование условий микрогравитации на борту Российского<br>сегмента Международной космической станции для формирования<br>композиционных материалов медицинского назначения..... | 47        |

|                |  |           |
|----------------|--|-----------|
| 1.4.6          | Формирование композиционных материалов с использованием акустических полей.....                    | 50        |
| 1.5            | Заключение по Главе 1 .....  | 53        |
| <b>ГЛАВА 2</b> | <b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>   | <b>55</b> |
| 2.1            | Материалы и реагенты.....  | 55        |
| 2.2            | Синтез и свойства фосфатов кальция .....   | 55        |
| 2.3            | Клеточные культуры.....  | 58        |
| 2.4            | Подготовка тканевых сфероидов.....   | 61        |
| 2.5            | Определение диаметра и округлости тканевых сфероидов.....  | 62        |
| 2.6            | Оценка жизнеспособности тканевых сфероидов при различных условиях.....                             | 62        |
| 2.7            | Анализ слияния тканевых сфероидов .....  | 63        |
| 2.8            | Морфология тканевых сфероидов.....   | 64        |
| 2.9            | Гистология трехмерных композиционных материалов в виде мягких тканей.....                          | 64        |
| 2.10           | Тест жизнеспособности клеточного материала в трехмерных композиционных материалах.....             | 66        |
| 2.11           | Оценка на биосовместимость трехмерных композиционных материалов из фосфатов кальция .....          | 66        |
| 2.12           | Анализ сокращения трубчатого образца трехмерного композиционного материала.....                    | 67        |
| 2.13           | Сканирующая электронная микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия образцов ..... | 68        |
| 2.14           | Просвечивающая электронная микроскопии образцов .....  | 69        |
| 2.15           | Электроспиннинг полиуретанового матрикса .....   | 69        |
| 2.16           | Определение плотности модельных объектов .....   | 70        |
| 2.17           | Анализ термочувствительного неадгезивного гидрогеля.....   | 70        |
| 2.17.1         | Оценка влияния геля на жизнеспособность тканевых сфероидов   | 70        |
| 2.17.2         | Реологическое тестирование.....  | 71        |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.18 | Механические испытания тканевых сфероидов .....            | 72 |
| 2.19 | Окрашивание альциановым синим .....                        | 72 |
| 2.20 | Иммуногистохимическое окрашивание на коллаген II типа..... | 73 |
| 2.21 | Визуализация бактериальных конгломератов .....             | 74 |
| 2.24 | Анализ данных.....   | 75 |
| 2.25 | Заключение по Главе 2 .....                                | 76 |

### **ГЛАВА 3     РАЗРАБОТКА СТЕНДОВ ДЛЯ МАГНИТНОГО, АКУСТИЧЕСКОГО И МАГНИТОАКУСТИЧЕСКОГО ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ .....** 77

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.1   | Экспериментальные стенды для генерации магнитных полей .....                                  | 77  |
| 3.1.1 | На базе цилиндрических магнитов.....  | 80  |
| 3.1.2 | На базе концентрических кольцевых магнитов .....  | 84  |
| 3.1.3 | На базе сближенных вплотную кольцевых магнитов .....  | 91  |
| 3.1.4 | На базе магнита Биттера.....  | 99  |
| 3.2   | Экспериментальные стенды по генерации акустических полей....                                  | 103 |
| 3.2.1 | Акустическая радиационная сила .....  | 103 |
| 3.2.2 | Особенности разработки системы для случая с цилиндрическим пьезокерамическим излучателем..... | 109 |
| 3.2.3 | Численный анализ оптимальных параметров излучающего пьезоэлектрического элемента.....         | 111 |
| 3.2.4 | Определение резонансной частоты цилиндрического преобразователя.....                          | 113 |
| 3.2.5 | Зависимость резонансной частоты от параметров пьезокерамики.....                              | 116 |
| 3.2.6 | Структура поля в зависимости от граничных условий .....                                       | 120 |
| 3.2.7 | Зависимость диапазона частот эффективного излучения от толщины излучающего элемента.....      | 122 |
| 3.2.8 | Структура поля акустической радиационной силы.....  | 124 |

|  |  |     |
|--|--|-----|
| 3.2.9  | Особенности разработки системы для случая с плоским пьезокерамическим излучателем.....           | 128 |
| 3.3  | Экспериментальные стенды по генерации магнитоакустических полей.....                             | 132 |
| 3.3.1  | Описание метода.....   | 132 |
| 3.3.2  | Действие силы акустического излучения на малые рассеиватели в цилиндрическом волновом поле.....  | 135 |
| 3.3.3  | Магнитоакустический стенд на основе постоянных магнитов..  | 137 |
| 3.3.4  | Магнитоакустический стенд на основе магнита Биттера .....  | 140 |
| 3.4  | Заключение по Главе 3 .....  | 150 |
| <br>   |  |     |
| <b>ГЛАВА 4    ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ТРЕХМЕРНЫХ КОПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В НЕОДНОРОДНОМ МАГНИТНОМ, АКУСТИЧЕСКОМ ПОЛЯХ И ИХ КОМБИНАЦИИ.....</b> |  |     |
| <b>151</b>   |  |     |
| 4.1  | Формирование трехмерных композиционных материалов твердых тканей на основе фосфатов кальция..... | 152 |
| 4.1.1  | В магнитном поле на базе постоянных кольцевых магнитов ....                                      | 152 |
| 4.1.2  | В акустическом поле от плоского излучателя .....   | 160 |
| 4.2  | Формирование трехмерных композиционных материалов мягких тканей из клеточного материала.....     | 161 |
| 4.2.1  | В магнитном поле на базе постоянных магнитов из хрящевого клеточного материала .....             | 161 |
| 4.2.2  | В сильном магнитном поле на базе магнита Биттера из хрящевого клеточного материала .....         | 171 |
| 4.2.3  | В акустическом поле от плоского излучателя .....   | 177 |
| 4.2.4  | В акустическом поле от цилиндрического излучателя .....  | 178 |
| 4.2.5  | В магнитоакустическом поле на базе постоянных магнитов.  |     |
|  | Формирование кольцеобразного ТКМ из клеточного материала .....                                   | 180 |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 4.2.6   | В магнитоакустическом поле на базе магнита Биттера.  |            |
|   | Формирование трубчатого ТКМ из клеточного материала .....  | 182        |
| 4.3   | Заключение по главе 4 .....  | 188        |
| <b>ГЛАВА 5 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ МАГНИТНОГО</b>       |  |            |
| <b>ФОРМИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА БОРТУ</b> |  |            |
| <b>РОССИЙСКОГО СЕГМЕНТА МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ</b>   |  |            |
| <b>СТАНЦИИ.....192</b>                                  |  |            |
| 5.1   | Разработка научной аппаратуры по космическому эксперименту<br>«Магнитный 3D-биопринтер».....                                       | 192        |
| 5.1.1   | Разработка подхода магнитного формирования в условиях<br>микрогравитации .....   | 192        |
| 5.1.2   | Математическое описание динамики формирования .....  | 195        |
| 5.1.3   | Конструкция магнитного биопринтера и кювет .....   | 199        |
| 5.1.4   | Тепловой расчет системы из укладки и кювет в термостате ТБУ-<br>В.....   | 205        |
| 5.1.5   | Анализ температуры в эксперименте на МКС.....  | 206        |
| 5.1.6   | Методика заправки кюветы .....   | 209        |
| 5.2   | Изучение процесса формирования образцов трехмерных<br>композиционных материалов в условиях микрогравитации на борту РС<br>МКС..... | 214        |
| 5.2.1   | Формирование трехмерных композиционных материалов в виде<br>твердых тканей на основе фосфатов кальция .....                        | 217        |
| 5.2.2   | Формирование трехмерных композиционных материалов из<br>клеточного материала в виде мягких тканей.....                             | 251        |
| 5.3   | Заключение по главе 5 .....  | 269        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>                                 |  | <b>272</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>                                 |  | <b>276</b> |
| <b>ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....</b>                |  | <b>298</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ А. АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>   | <b>300</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б. АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>  | <b>302</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ В. РЕШЕНИЕ СЕКЦИИ № 1 «КОСМИЧЕСКАЯ<br/>БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ» КООРДИНАЦИОННОГО НАУЧНО-<br/>ТЕХНИЧЕСКОГО СОВЕТА РОСКОСМОСА.....</b> | <b>304</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ НА КОСМИЧЕСКИЙ<br/>ЭКСПЕРИМЕНТ .....</b>  | <b>305</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д. ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ НА НАУЧНУЮ<br/>АППАРАТУРУ .....</b>   | <b>307</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ Е. ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ НА НАУЧНУЮ<br/>АППАРАТУРУ .....</b>   | <b>311</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. ЗАКЛЮЧЕНИЕ САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКОЙ<br/>ЭКСПЕРТИЗЫ.....</b>  | <b>313</b> |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Важнейшей задачей является увеличение продолжительности и улучшение качества жизни людей. В связи с этим сегодня предъявляются высокие требования к качеству медицинского обслуживания, что, в свою очередь, требует разработки новых подходов к лечению пациентов, внедрения новых технологий и связанной с этим разработки новых композиционных материалов. Особую значимость представляют разработки композиционных материалов для реконструктивно-восстановительной хирургии, находящиеся в непосредственном контакте со средой живого организма. Еще более востребованы функциональные биосовместимые материалы для сформировавшегося в последние десятилетия нового направления – регенеративная медицина, ориентированного на создание биоэквивалентов тканей. Исследования в этой области являются актуальными и соответствуют указам Президента Российской Федерации № 642 от 1 декабря 2016 г. «Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации», № 204 от 7 мая 2018 г. "О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года" и распоряжению Правительства Российской Федерации от 20 мая 2023 г. №1315-р «Концепция технологического развития на период до 2030 г.».

Разработка новых биосовместимых композиционных материалов и создание на их основе инновационных продуктов становится сегодня лидирующим направлением биомедицинских исследований и их коммерциализации в развитых странах. В Российской Федерации производство медицинских изделий нового поколения находится все еще в зачаточном состоянии, а промышленные технологии изготовления из них тканеинженерных изделий различной этиологии практически отсутствуют. Значительные результаты в разработке композитных биоматериалов для замещения и регенерации тканей были получены различными отечественными группами исследователей (ПМГМУ им. Сеченова, МГУ им. М.В. Ломоносова, ИМЕТ РАН, НМИЦ радиологии, ЗДБио, НИ ТПУ, и др.).

Биологическая ткань является трехмерным композиционным материалом (ТКМ), который состоит из клеток, межклеточного вещества и неклеточных структур, объединенных закономерностями строения и общностью выполняемых функций. Создание таких сложных композитов может базироваться на использовании природоподобных технологий и биомиметического дизайна. Поэтому ключевой проблемой в этой задаче является разработка подходов для формирования функциональных композиционных трехмерных материалов, обеспечивающих эффективный процесс восстановления утраченных функций организма. Формируемые материалы должны обладать сложной геометрией, имитирующей структуру тканей, имеющих множественные физиологические особенности, в том числе обеспечить процессы васкуляризации, т.е. прорастание кровеносных сосудов в ткань для улучшения снабжения кислородом и питательными веществами. Для формирования новых сосудов (ангиогенез) необходимо создать первичные сосудистые сети, необходимые условия, компоненты и т.д.

Существует большое количество способов формирования композитных материалов для тканевой инженерии. Наибольших успехов в решении этих проблем удалось достичь с помощью передовых аддитивных технологий, основанных на способе трехмерной биопечати. Эти подходы позволяют оперативно и с высокой точностью (вплоть до 0,2 мкм), существенно превышающей точность обычных медицинских рентгеновских или ядерно-магнитно-резонансных томографов, изготавливать из композиций объемные изделия практически любой сложности на основе их CAD/CAM (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing) данных. Основными недостатками таких подходов являются временные затраты, необходимость использования дополнительных материалов и т.п., а также недостаточно высокая воспроизводимость пространственных параметров (особенно внутренней микро- и макроструктуры) создаваемых материалов. Существенной проблемой является необходимость использования опорных (поддерживающих) материалов, без

которых клеточные структуры не могут сохранять взаимную ориентацию до момента их слияния.

Данные недостатки могут быть решены путем развития биофабрикационного подхода, который основывается на комбинаторном использовании клеток, материалов, биохимических и физико-химических факторов. Биофабрикация заключается в автоматизированном формировании биологически функциональных продуктов посредством сборки, а именно, создание устойчивых трехмерных аттракторов воздействием физических полей, и последующих процессов регенерации тканей на основе механизмов ремоделирования внеклеточного матрикса.

Работа была направлена на разработку и создание основ формирования функциональных ТКМ для тканевой инженерии в условиях левитации под действием физических полей (магнитных, акустических или их комбинации) и активации механизмов «оживления» функциональных композиций за счет процессов клеточного слияния и перекристаллизации структур.

Часть исследований по тематикам диссертационной работы проводилась в рамках работ по гранту Российского фонда фундаментальных исследований «Разработка фундаментальных основ аддитивной и левитационной фабрикация тканеинженерных конструкций на основе фосфатов кальция» (2018-2021 гг.), грантам Европейской лаборатории магнитного поля: «Изучение магнитной левитации как инновационного принципа биопечати» (2017 г.), «Магнитоакустическая левитационная самосборка» (2018, 2019 гг.) в Лаборатории высокого магнитного поля в г. Неймегене (Нидерланды) и федерального проекта «Передовая инженерная школа «Материаловедение, аддитивные и сквозные технологии» НИТУ «МИСИС» в партнерстве с Госкорпорацией «Росатом».

**Целью работы** является разработка основ научно-технических решений формирования функциональных трехмерных композиционных материалов с использованием магнитных, акустических полей, а также их комбинации.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка магнитных систем для левитационного направленного формирования ТКМ на основе дисперсных фаз фосфатов кальция (ФК) и клеточного материала. Теоретические исследования влияния конфигурации магнитных систем на топологию магнитных полей в аттракторах динамических систем «магнитных ловушек».

2. Экспериментальные исследования формирования ТКМ в «магнитных ловушках».

3. Разработка акустических систем для левитационного направленного формирования ТКМ на основе ФК и клеточного материала в условиях резонансных ультразвуковых колебаний системы.

4. Изучение влияния конфигурации и параметров акустических излучателей на свойства колеблющейся жидкой среды и выявление условий для формирования ТКМ различной пространственной топологии (плоские на основе ФК и трубчатые на основе клеточного материала).

5. Установление расчетных и экспериментальных кинетических закономерностей процесса формирования ТКМ на основе клеточного материала под действием сильных магнитных полей в диапазоне индукции магнитного поля от 1 до 31 Тл.

6. Выявление условий гибридного взаимодействия физических полей (магнитоакустического) для формирования функциональных ТКМ на основе клеточного материала. Изучение структуры и свойств сформированных образцов.

7. Формирование образцов медико-биологического назначения различной этиологии из композиционных материалов на основе ФК и клеточного материала в условиях микрогравитации на борту Российского сегмента Международной космической станции (РС МКС).

### **Научная новизна результатов работы**

1. Выявлены основные закономерности влияния размерных и конструктивных факторов магнитных систем на значения магнитной индукции в «магнитных ловушках» при получении ТКМ из дисперсных фаз в виде полуфабрикатов. Установлено, что новая конфигурация магнитной системы,

которая отличается от известных тем, что постоянные магниты сближены вплотную одноименными полюсами, что позволяет создать «магнитные ловушки» с максимальным локальным градиентом магнитного поля в рабочей зоне до 55 Тл/см. В свою очередь, это позволяет обеспечить условия диамагнитной левитации дисперсной фазы для бесконтактного формирования композиционных материалов из ФК и тканевых сфероидов (ТС).

2. Установлены закономерности образования микроструктуры и свойств керамики на основе ФК в условиях магнитной левитации. В частности, определена минимальная концентрация парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) в среде, необходимая для обеспечения компенсации сил тяготения, действующих на ТКМ, в магнитной системе на базе постоянных магнитов составляющая не менее 25 Моль.

3. Установлено, что минимальная концентрация парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) для формирования ТС с диаметром 150 - 300 мкм в магнитном поле от кольцевых неодимовых магнитов N 52 составляет 50 мМоль, при которой жизнеспособность ТС составляет более 90%, а механические свойства - 100 % по сравнению с контролем. Показано, что концентрация парамагнетика 250 мМоль приводит к снижению механических свойств ТС на 90%, а жизнеспособность достигает уровня 20%.

4. Установлено, что снижение концентрации парамагнетика в питательной среде возможно при увеличении силы магнитного поля. Выявлена на базе магнита Биттера зависимость индукции магнитного поля в диапазоне от 1 до 31 Тл от концентрации парамагнетика в среде в пределах от 0,8 до 100 мМоль для обеспечения условий стабильной левитации ТС в магните Биттера.

5. На основе комплекса теоретических и экспериментальных исследований раскрыт механизм формирования органических материалов на основе ТС с размерами 200-300 мкм плоской и трубчатой топологии под действием ультразвукового поля. Получены зависимости радиационной силы от амплитудно-частотных характеристик акустических систем в диапазоне 1-20 В и 0,4 - 1,2 МГц. Установлена закономерность между радиусом формируемого трубчатого образца и резонансной частотой. Показано, что минимум потенциала Горькова для

объектов достигается в узлах акустического давления. Определено, что амплитуда излучения не должна превышать 10 В во избежание негативного влияния на жизнеспособность клеточного материала.

6. Впервые с использованием комбинации магнитного и акустического полей получены ТКМ на основе клеточного материала в качестве модели кровеносного сосуда. Показано, что для эффективной левитации материала рекомендуется использовать питательную среду, обогащенную парамагнетиком ( $Gd^{3+}$ ) в концентрации 20 мМоль при этом индукция магнитного поля должна составлять 9,5 Тл. Установлено, что использование цилиндрического пьезокерамического излучателя позволяет формировать трубчатый ТКМ, который обладает свойствами вазоконстрикции - сужение просвета (площади поперечного сечения) на 30% под воздействием эндотелина-1 с концентрацией 50 нМоль.

7. Впервые получены ТКМ на основе ФК в условиях микрогравитации на борту РС МКС. Показано, что сочетание космической микрогравитации и магнитных сил приводит к получению ТКМ с прогнозируемыми геометрическими свойствами, фазовым составом и однородной структурой. Установлены закономерности формирования эквивалентов твердых тканей на основе ФК при минимальной концентрации парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) в среде 0,1875 Моль, что в 16 раз меньше, чем требуется в условиях гравитации Земли. Выявлено, что полученный композиционный материал показал высокие остеокондуктивные и остеоиндуктивные потенции по сравнению с образцами, сформированными на Земле.

8. Исследования по получению трехмерных бактериальных конгломератов (ТБК) с ТКМ под действием магнитных сил в условиях левитации показали, что гранулы октакальцийфосфата (ОКФ) были скреплены друг с другом внеклеточным полимерным веществом, которое продуцировано конгломератом бактерий. Установлено, что минимальная ингибирующая концентрация антибиотика (гентамицина) для подавления бактерий в ТБК должна быть более чем в 10 раз выше, чем концентрация, при которой происходит гибель подавляющего большинства клеток в культуре без ТБК.

9. Впервые получены образцы ТКМ на основе ТС в условиях микрогравитации на борту РС МКС. Установлено, что при длительности полета на МКС до 7 дней жизнеспособность ТС в кюветах, заполненных термообратимым гидрогелем, составляет не менее 97%. Получено соотношение для оценки времени формирования ТКМ на основе ТС при различных концентрациях парамагнетика. Определены экспериментальные зависимости формирования ТКМ из ТС (хондросфер, тиросфер, миосфер) от концентрации парамагнетика в среде в присутствии биосовместимого термочувствительного неадгезивного гидрогеля. Определена минимально допустимая концентрация парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) 10 мМоль, которая обеспечивает значение магнитной силы, превышающей силу вязкостного трения среды.

10. На основе комплекса теоретических и экспериментальных исследований разработан новый научный подход по формированию в магнитных, акустических и магнитоакустических полях различных неорганических и органических композиционных материалов с заданной топологией, в том числе компонентов матрикса костной ткани, тканевых эквивалентов из клеточного материала.

### **Практическая значимость работы**

1) Разработана новая методика магнитного формирования ТКМ на основе ФК, заключающаяся в левитационном формировании и перекристаллизации гранул ФК с образованием единого ТКМ. Выявлено, что методика позволяет получить кристаллы ОКФ из  $\alpha$ -трикальцийфосфата ( $\alpha$ -ТКФ) в буферных растворах за 48 ч. 2) Разработана новая методика формирования ТКМ из органических материалов на основе ТС в магнитных полях. Способ включает левитационное формирование ТС в питательной среде под действием магнитных сил и дальнейшее образование единого левитирующего ТКМ в виде тканевого эквивалента за счет процессов клеточного слияния с сохранением жизнеспособности клеток. 3) Разработана новая методика определения антибактериальной восприимчивости ТКМ на основе ФК с использованием ТБК из грамположительных и грамотрицательных бактерий. Метод заключается в формировании в условиях левитации под действием магнитных сил комбинированных образцов ТБК с

гранулами ФК с дальнейшим тестированием образцов на резистентность антимикробным препаратом. 4) Разработан новый метод магнитоакустического формирования ТКМ на основе клеточного материала, заключающиеся в комбинированном воздействии магнитного поля для левитации и ультразвукового поля для задания геометрии ТКМ. 5) Разработана и создана магнитная система для формирования ТКМ на основе ФК и ТС на базе постоянных магнитов, сближенных вплотную одноименными полюсами. 6) Разработана и создана акустическая система для формирования ТКМ на основе ФК и ТС на базе плоских и цилиндрических излучателей. 7) Разработана и создана магнитоакустическая система для левитационного формирования тканеинженерных изделий из ТС на базе постоянных магнитов и магнита Биттера. 8) Разработан и создан магнитный биопринтер «Орган.Авт», который позволяет формировать образцы ТКМ в условиях микрогравитации на борту РС МКС посредством магнитного поля. Получено 5 патентов на изобретения в РФ и 5 патентов в США.

Полученные результаты внедрены в специализированных ведомствах и организациях. Так работы использована в совместной деятельности Госкорпорации «Роскосмос» и лаборатории биотехнологических исследований ЧУ «3Д Биопринтинг Солюшенс» (в рамках соглашения № 5 от 08.02.2019 г.). Полученные результаты использованы при формировании долгосрочной программы научно-прикладных исследований и экспериментов, планируемых на РС МКС и в ПАО «Ракетно-космическая корпорация «Энергия» имени С.П. Королёва» в рамках интеграции научной аппаратуры на борт РС МКС для проведения космического эксперимента (договор № 417-780/2017 от 03.10.2017 г.).

Ряд полученных результатов использованы в Госкорпорации «Роскосмос», а также в «РКК «Энергия» имени С.П. Королёва при разработке технического задания на космический эксперимент № 1301-30/2017, технического задания на научную аппаратуру № 10-17 и рабочей конструкторской документации (БНРС.943129.000). Полученные результаты использованы при проведении конструкторско-доводочных испытаний научной аппаратуры и в ФГБУНЦ РФ Институте медико-биологических проблем РАН при санитарно-гигиенической

экспертизе биологических материалов и химических веществ (заключение № 1336-121-07/19).

Созданное оборудование использовано при проведении космических экспериментов и получения композиционных материалов на борту РС МКС в период с 2018 по 2024 гг. в экспедициях МКС 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 66 и 70. Получен акт от ГК «Роскосмос» от 14.06.2022 г. (приложение А).

Также результаты использованы в АО "ГНЦ РФ ТРИНИТИ" при формировании и выполнении научно-исследовательской программы по теме «Разработка технологии объемной биофабрикации клеточных объектов/конструктов при помощи физических полей. Этап 2023-2025 гг.» (договор № 313/3038-Д\226/4888-Д) в рамках единого отраслевого тематического плана НИОКР ГК «Росатом». Получен акт от АО «ГНЦ РФ ТРИНИТИ» Госкорпорации «Росатом» от 27.05.2022 г. (приложение Б).

#### **Степень достоверности результатов**

Достоверность и обоснованность результатов достигнута за счет исследований, основанных на мировых достижениях в данной области, и использования современных взаимодополняющих методов диагностики и статистической обработки. При создании магнитных и акустических систем применялось математическое моделирование методом молекулярной динамики и методом конечных элементов.

#### **Апробация работы**

Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались на российских и международных конференциях: «Biofabrication» (Северная Каролина, США, 2016 г.); «International Baltic Conference on Magnetism» (Светлогорск, Россия, 2017 г.); «International Conference on Biofabrication» (Пекин, Китай, 2017 г.); the 4th International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine» (Москва, Россия, 2019 г.); 1ST Seminar & Meeting (SET) «Cells and extracellular templates, Nature's principles into engineering practice: Strong Artificial Intelligence and Robotics» (Милан, Италия, 2019 г.); «International Conference on Biofabrication» (Колумбус, Огайо, США, 2019 г.); «XXXII Сессия

Российского акустического общества, Акустический институт им. академика Н.Н. Андреева» (Москва, Россия, 2019 г.); International Congress on Ultrasonic (Брюгге, Бельгия, 2019 г.); «HFML-FELIX User Meeting» (Неймеген, Нидерланды, 2019 г.); «TERMIS-EU 2019» (Родос, Греция, 2019 г.); «15 International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society» (Ванкувер, Канада, 2019 г.); «3-я Всероссийская акустическая конференция» (Санкт-Петербург, Россия, 2020 г.); «TERMIS-EU 2020» (Манчестер, Великобритания, 2020 г.); «4-я международная конференция по практическому применению аддитивных технологий (АТ) в различных сферах производства «3D КонЦентрАТ» (Воронеж, Россия, 2021 г.); «Возможности применения аддитивных технологий в практической хирургии» (Сочи, Россия, 2022 г.); «Цифровой Росатом» (Нижний Новгород, Россия, 2022 г.); «5-я международная конференция по практическому применению аддитивных технологий (АТ) в различных сферах производства «3D КонЦентрАТ» (Воронеж, Россия, 2022 г.); III Международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука для практической медицины-2023» Аддитивные технологии, современные материалы и физические методы в медицине: инновации (Эльбрус, Россия, 2023 г.), «Форум будущих технологий» (г. Москва, Россия, 2024 г.).

**Личный вклад** автора в настоящую работу заключается в разработке плана исследований, проведении экспериментов, обработке, анализе, подготовке основных публикаций и обобщении полученных результатов в период с 2015 по 2024 гг.

### **Публикации**

По результатам проведенных исследований опубликовано более 80 работ, в том числе 31 статья в научных журналах, определенных ВАК, из них 8 статей, индексируемых базой данных RSCI (K1), 4 статьи в журналах с категорией K2 и K3 и 19 статей в изданиях, входящих в наукометрические базы Web of Science и Scopus (Q1 и Q2), а также глава в монографии и 10 патентов на изобретения.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы и приложения, изложена на 319 страницах и содержит 125 рисунка и 10 таблиц. Список литератур включает 257 источника.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному консультанту чл.-корр. РАН В.С. Комлеву, а также сотрудникам ЧУ Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс» и в особенности В.А. Миронову и Ю.Д. Хесуани за всестороннюю поддержку и помощь при выполнении исследований.

## **Глава 1 АДДИТИВНОЕ ПРОИЗВОДСТВО В БИОМЕДИЦИНЕ - ПРЕИМУЩЕСТВА И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ**

В главе представлен детальный аналитический обзор последних достижений в области формирования композиционных материалов для тканевой инженерии. Детально рассмотрены существующие проблемы и предложения по их возможному решению. Особое внимание уделено использованию физических полей в процессе формирования композиционных материалов.

### **1.1 Композиционные материалы для восстановления функций поврежденных тканей**

Для пластических целей традиционно используются различные виды биоматериалов в качестве трансплантатов. В 1983 году Галлетти и Боретос определили эти материалы как натуральные или искусственные вещества, а также их комбинации, которые могут замещать или дополнять любую ткань, орган или функцию организма без лекарственного воздействия [1]. Идеальные материалы для восстановления дефектов должны быть совместимы с биологическими тканями, не вызывать иммунного ответа, не иметь токсических или аллергических реакций, а также иметь механические свойства близкие к костной ткани. При использовании этих материалов необходимо учитывать изменения их свойств в процессе стерилизации и воздействия на организм. Они также должны быть доступными и удобными в применении [2].

Материалы для пластических целей можно разделить на биологического происхождения, такие как ауто- и аллотрансплантаты, и полученные искусственным путем, включая металлы, полимеры, керамику и их комбинации. Все они представляют собой композиционные материалы, состоящие из двух или более компонентов с различными физическими и химическими свойствами, что приводит к образованию нового материала с уникальными характеристиками, отличными от свойств отдельных компонентов (рисунок 1.1.1) [3].



Рисунок 1.1.1 – Композиционные материалы в организме человека

Каждый из типов материалов имеет свои преимущества и недостатки (рисунок 1.1.2). Биологический материал, в отличие от синтетических, обладает физико-химическими свойствами, наиболее близкими к здоровой кости. При замещении костных дефектов, признанным "золотым стандартом" является пересадка, полученная от самого пациента (аутотрансплантат), так как она обладает наиболее сходными физико-химическими и биологическими свойствами с костью, минимизирует риск передачи болезнетворных агентов и возникновения антигенных реакций. Однако, применение аутотрансплантата требует расширения хирургического вмешательства, что может вызвать дополнительную травму для пациента и увеличить риск общих хирургических осложнений (гематомы, инфекционные осложнения, повреждение кожных нервов, косметические дефекты). Более того, объем доступной кости ограничен и не всегда достаточен для устранения больших дефектов. При использовании пересадок от других людей (алло- или гомотрансплантация) существует риск возникновения иммунологического конфликта и реакции отторжения, а также проблема неконтролируемой резорбции этого материала. Следует отметить, что получение, хранение и транспортировка таких трансплантатов сопряжены с техническими и социально-правовыми сложностями. Положительным аспектом данного метода устранения костных дефектов является отсутствие необходимости расширения

операции, что снижает травматичность хирургической процедуры и позволяет заполнять крупные полости, что приводит к лучшему косметическому эффекту.



Рисунок 1.1.2 – Виды композиционных материалов для медицины

Применение современных материалов в травматологии представляет собой перспективное направление, обладающее рядом преимуществ. Эти материалы позволяют эффективно восстанавливать значительные дефекты костей и мягких тканей, минимизируя травматичность хирургических вмешательств. Более того, они не представляют опасности для организма, в отличие от аллотрансплантатов, и способствуют избежанию различных юридических и социальных проблем.

Медицина активно использует различные биоматериалы, включая металлы, керамику и полимеры. При выборе и применении этих искусственных материалов учитываются их остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства. Остеокондуктивные свойства способствуют адгезии и связыванию остеогенных клеток, что способствует образованию новых сосудов и стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки клеток. В свою очередь, остеоиндуктивные свойства позволяют индуцировать дифференцировку клеток окружающих тканей в остеообразующие. Идеальный синтетический материал должен обладать и остеоиндуктивностью, и остеокондуктивностью.

Металлы являются одними из первых искусственных материалов, применяемых в медицине. В настоящее время они широко используются для изделий, используемых при фиксации и сращении костей в ортопедии и

травматологии, а также для создания искусственных суставов. Однако, химическая нестабильность металлов, особенно в присутствии биологических жидкостей с высоким содержанием электролитов, может привести к их разрушению в результате коррозии. Кроме того, отмечаются негативные биологические реакции, связанные с ионами металлов, которые могут вызвать иммунный ответ организма [4]. Большинство исследований этих реакций проводится при длительном нахождении металлических изделий в организме человека. Поэтому основным направлением разработки металлических имплантатов является устранение этих негативных реакций, сохраняя при этом неизменными физико-химические свойства сплавов как в период предоперационной подготовки, так и в процессе функционирования в организме пациента.

Также в медицине широко применяются синтетические биокерамические материалы, включающие вещества на основе кремния, углерода, фосфата или сульфата кальция. Они находят применение в качестве наполнителей к костным трансплантатам или остеозамещающим препаратам. В зависимости от взаимодействия с биологической средой биокерамические импланты подразделяются на биоинертные, биологически активные и биодеградируемые группы.

Биоинертные материалы, такие как оксид алюминия или циркония, используются в эндопротезах. Они не изменяют свою форму, не взаимодействуют с окружающими тканями и не вызывают врастание ткани. При контакте с тканями вторая группа материалов постепенно изменяет свою форму, обрастая костью. Примером таких материалов являются гидроксиапатитовые (ГА) покрытия элементов эндопротезов. Третья группа материалов, включая трикальцийфосфат (ТКФ), полностью заменяется биологическими тканями при взаимодействии со средой организма.

Биологически активные и биодеградируемые материалы являются наиболее приемлемыми для замещения костных дефектов. В литературе часто встречается описание использования биокерамических материалов на основе ФК [1, 4, 6, 7]. ФК имеет высокую совместимость с живыми тканями, так как является основой

неорганического компонента твердых тканей организма. Важным параметром является ионное соотношение кальция и фосфора, определяющее кислотность и растворимость в воде. Чем ниже ионное соотношение, тем более кислым и растворимым является соединение [5]. В качестве химической структуры часто используются трикальций фосфат ( $\alpha$ -ТКФ), в сочетании с ГА или аморфным ФК [6]. Эти материалы выпускаются в виде порошков, гранул или блоков. Для повышения биоактивности стремятся увеличить удельную поверхность и пористость изделия. Оптимальный размер пор составляет около 100 мкм, при котором рассасывание имплантируемого вещества соответствует скорости образования новой костной ткани. Добавление аутологической костной крошки, обогащенной коллагеном, костным мозгом или костным морфогенетическим протеином, улучшает остеоиндуктивные свойства.

Также широко используются объемные заменители для ликвидации значительных дефектов костей в виде имплантатов заданной формы, изготовленных из пористых материалов на основе ГА. Механические характеристики таких материалов (матриков) могут варьироваться в широких пределах в зависимости от пористости, что позволяет подобрать упругие и жесткостные свойства имплантатов и обеспечить необходимую прочность всей биомеханической системы «кость-имплантат».

Для использования в практике неорганические и органические материалы необходимо сформировать в изделия с требуемой трехмерной геометрией. Для этого можно использовать подходы, основанные на трехмерной печати.

## **1.2 История развития трехмерной печати композиционных материалов**

Трехмерная печать, также известная как аддитивное производство (АП), послойное производство, быстрое прототипирование (БП) или создание твердотельных объектов произвольной формы, представляет собой метод прямого изготовления деталей посредством последовательного нанесения слоев,

основываясь на цифровых данных из файла, полученного при помощи системы автоматизированного проектирования (САПР). В рамках трехмерной (3D) печати, модели деталей, подлежащих изготовлению, сначала виртуально разделяются на серию двухмерных (2D) слоев. Затем оборудование для 3D-печати формирует изделия, нанося один слой за другим в соответствии с информацией о 2D-слоях, объединяя последовательные слои для создания итогового трехмерного объекта. САПР предоставляет возможность проектирования поверхностей и твердых тел в трехмерном пространстве. С появлением 3D-печати такие виртуальные структуры теперь могут быть преобразованы в физические 3D-объекты, которые могут служить прототипами или напрямую использоваться в качестве функциональных частей для различных приложений.

История современной 3D-печати уходит корнями в 1980-е годы, когда Чарльз Халл изобрел стереолитографию (SLA), первую технологию 3D-печати [7]. SLA - это процесс, в котором ультрафиолетовый (УФ) лазерный источник света фокусируется на поверхности ванны с жидким мономером, отверждаемым УФ-излучением, с изображениями, представляющими собой поперечные сечения слоев. Отсканированные мономеры подвергаются фотоиндуцированному сшиванию и затвердевают, формируя желаемые 2D-поперечные сечения, в то время как неотвердевшие мономеры остаются в ванне. Халл также был первым, кто предложил метод для взаимодействия файлов САПР, смоделированных на компьютере, с системой БП для создания деталей. Патент Халла был одобрен в 1986 году, и это стало первым патентом на 3D-принтер. Компания «3D Systems», основанная Халлом, сосредоточилась на коммерциализации систем SLA, которые стали первыми коммерческими 3D-принтерами.

В 2014 году, когда Национальное управление по авиации и исследованию космического пространства США отправило первое устройство для 3D-печати на МКС для непосредственного создания деталей в космосе в условиях микрогравитации, исследователи из Ок-Риджской национальной лаборатории построили полный кузов автомобиля с использованием технологии 3D-печати. Технологии гибкого производства, основанные на 3D-печати, продвигают

производство по инновационным проектам, которые трудно или невозможно реализовать с традиционными подходами к производству. Технологии 3D-печати также оказывают значительное влияние на биомедицинские исследования - от устройств до тканевой инженерии (ТИ), биопечати и доставки лекарств.

Несколько технологий 3D-печати были задуманы и разработаны примерно во время появления SLA. Декард изобрел селективное лазерное спекание (СЛС), будучи аспирантом в группе Бимана в Техасском университете в Остине [8]. СЛС использует порошковые материалы, нанесенные на рабочую пластину, где лазер выборочно спекает порошок в определенных областях на основе файла САD. Подобная концепция на основе порошкового слоя легла в основу другой технологии 3D-печати в Массачусетском технологическом институте группой Сакса. Струйная печать была объединена с порошковым слоем для связывания материала на каждом слое [9]. Скотт и Лиза Крамп разработали еще одну технологию 3D-печати, называемую моделированием методом наплавления (FDM). FDM включает нагревание термопластической нити до полужидкого состояния, которое затем экструдировано и наносится через сопло на подложку для создания деталей слой за слоем на основе информации из файла САD [10]. Это некоторые из примечательных технологий 3D-печати на ранних стадиях, которые в первую очередь были ориентированы на БП для проверки и визуализации дизайна.

За последние 20 лет появилось множество новых технологий, которые превратили идею БП в АП, где детали, изготовленные на 3D-принтере, можно напрямую использовать для различных приложений. Что касается металлических материалов, то технологии на основе лазера или электронного луча с порошковым слоем или без него действительно произвели революцию в промышленном применении этих принтеров. В части биомедицинских приложений используются различные технологии в зависимости от приложения (капельная, экструзионная, лазерная, магнитная и т.п.).

### 1.2.1 Преимущества трехмерной печати для биомедицинских приложений

Технология 3D-печати предлагает значительные преимущества для медицинских изделий за счет возможности изготавливать небольшие объемы или единственные в своем роде изделия по запросу, исходя из потребностей конкретного пациента. Например, хирургические имплантаты в настоящее время производятся путем изготовления деталей посредством операцийковки, литья или механической обработки с последующей специальной обработкой поверхности или обработкой для достижения желаемой поверхности, механических свойств и эстетических эффектов. Эти операции требуют дорогостоящего инструмента, поэтому индивидуальные для пациента или уникальные имплантаты дороги и используются редко. Другие проблемы, такие как сложность обработки титановых сплавов из-за высокой прочности, низкого модуля упругости и низкой теплопроводности по сравнению со сталью, делают более дорогостоящим изготовление имплантатов из этих материалов для конкретных пациентов. Наконец, технологии могут быть энергоемкими, приводить к образованию значительного количества отходов и не позволяют легко производить имплантаты с функциональной градиацией.

Хотя 3D-печать может потребовать окончательной обработки, подход, основанный на АП, обеспечивает значительную гибкость при изготовлении небольших объемов сложных имплантатов по индивидуальному заказу. АП предоставляет конструкторам геометрическую свободу без производственных ограничений, что приводит к новым легким изделиям и потенциально сокращает количество деталей для медицинских имплантатов. Специально для медицинских изделий АП позволяет изготавливать функциональные персонализированные имплантаты сложной формы с мультимодальной пористостью и производить изготовление по запросу.

Несмотря на некоторые заметные успехи, создание человеческих тканей с помощью 3D-печати по-прежнему представляет серьезные проблемы [11,12]. От

лечения врожденных дефектов до пластической хирургии - все области медицины стремятся к прорывам, которые позволят 3D-печати улучшить качество жизни или помочь пациентам прожить дольше.

Предполагается, что применение 3D-печати произведет революцию в области биомедицинских устройств и ТИ из-за присущей ей гибкости в производстве сложных изделий с использованием различных материалов. Однако, многие проблемы все еще остаются из-за отсутствия различных материалов для использования в любом принтере и невозможности изготовления многокомпонентных структур с использованием коммерческих принтеров.

### **1.2.2 Будущие тенденции трехмерной печати в медицинском направлении**

3D-печать мультиматериальных структур является одним из наиболее перспективных направлений в области биомедицины. Использование различных материалов в конкретных областях изделий позволяет достичь свойств, недостижимых при применении монолитных структур. Эти материалы могут быть соединены или сливаться друг с другом только в процессе формирования изделия, что предоставляет возможность модификации его состава.

Известно использование мультиматериальной 3D-печати в биомедицине для восстановления функции костных тканей с использованием имплантатов, изготовленных из сплавов Ti6Al4V или CoCrMo. Для улучшения интеграции костной ткани имплантаты иногда покрывают пористым металлом Ti или Ta или керамикой на основе ФК. Применение многоматериальной 3D-печати позволяет наносить указанные покрытия непосредственно в процессе изготовления детали на одной и той же машине. Таким образом, помимо гибкости в дизайне, мультиматериальная 3D-печать предоставляет возможность внедрения инноваций в передовые материалы и изделия.

В области биопечати возможность создания композиционных изделий из нескольких материалов, включая органические и неорганические, открывает

перспективы создания полностью функциональных основ для ТИ. Важными критериями при этом являются жизнеспособность клеток и срок хранения напечатанных изделий. Для успешного создания каркасов, пригодных для дальнейшего использования *in vitro*, *in vivo* или *in situ*, необходима тщательная оптимизация процесса, учитывающая значительные различия клеток и материалов.

Еще одной важной задачей является обеспечение васкуляризации - образования новой сети кровеносных сосудов (ангиогенез). Это требование обусловлено потребностью в васкуляризации любого тканеинженерного изделия размером более полмиллиметра, поскольку 200 мкм - это предел свободной диффузии кислорода в живых тканях. Отсутствие микроваскулярной перфузии, в сочетании с трудностями обеспечения иннервации, представляет собой серьезное препятствие для масштабирования многих многообещающих концепций биопроизводства композиционных изделий в виде живых тканей.

### **1.2.3 Биопечать на основе биочернил и ее ограничения**

Биопечать, основанная на использовании биочернил, представляет собой инновационное направление в области биомедицинских технологий. Одним из ключевых преимуществ данного метода является простота проектирования и реализации конфигурации изделий [13,14]. В частности, это делает его предпочтительным для создания больших, однородных по клеткам, богатых матрицей тканей, таких как кости или хрящи, благодаря масштабируемости метода [15].

Тем не менее, несмотря на появление новых биологических биочернил, например, на основе коллагена или фибрина [16,17], они пока еще не универсальны и иногда запатентованные и/или дорогие [18]. Поскольку эти гидрогели являются по существу мягкими материалами, для придания изделиям необходимых биомеханических свойств требуется этап упрочнения, обычно с использованием

химической или УФ-индуцированной полимеризации [19]. Это может привести к повреждению клеток, и тем самым значительно снижают эффективность процесса.

Возможными альтернативами являются различные методы «гибридной» биопечати, которые включают в себя использование второго, обычно фибриллярного биоматериала [20]. Тем не менее, потеря клеток может происходить в процессе биопечати по разным причинам, зависящим от метода. Например, во время образования капель к образцу передается значительная энергия, что приводит к вибрации и нагреву сильным электрическим полем [18]. В настоящее время разрабатываются более мягкие методы биопечати, такие как биопечать с помощью лазера [21]. Однако, жизнеспособность клеток может быть проблемой даже при использовании этого метода [22].

Важно отметить, что «инкапсуляция» клеток внутри поддерживающего геля может дополнительно нарушать межклеточную коммуникацию. Если клетки выживают после первоначальной изоляции, то в дальнейшем за счет медленной диффузии паракринных факторов через пористый материал и/или растворения закладочного матрикса может проследиваться сокращение межклеточных расстояний вследствие пролиферации и перемещения клеток.

Однако, в отличие от поверхности, которая может быть в высшей степени анатомически реалистичной, при изучении внутренней клеточной архитектуры большинства трехмерных изделий [23] пространственная организация довольно упрощена. Это связано с тем, что она соответствует легко доступным геометрическим образцам, а не структуре ткани, поскольку ткани включают в себя большое количество случайностей и/или большое структурное уточнение, такое как фрактальное пространственное распределение. В некоторых случаях после своего первоначального размещения клетки перемещаются в тканевом объекте после растворения биоматериала, что позволяет организовать более естественное расположение клеток.

Другой важной проблемой, с которой сталкивается стратегия биопечати на основе биоматериалов, является их биосовместимость. С одной стороны, энергоемкие процессы производства капель могут генерировать вторичные

молекулярные продукты из гелей, которые могут быть непосредственно цитотоксичными либо для клеток [24], либо для организма-реципиента после имплантации изделия. Кроме того, эти биоматериалы могут вызывать реакцию инородного тела на материал [13]. Вероятно, они будут менее серьезными в будущем, когда будет использоваться больше «биочувствительных элементов». Даже в этом случае и коллаген, и фибрин напоминают процессы заживления ран и противовоспалительные процессы, которые могут сигнализировать встроенным клеткам о тонких соответствующих ответах.

В биопринтинге могут быть использованы «биочувствительные элементы», полученные исключительно из природных материалов, таких как коллаген или фибрин, или даже органо-специфичных внеклеточных матриксов [25]. Последний вариант является наиболее многообещающим с точки зрения биосовместимости и способен смягчить другие недостатки «биочувствительных элементов», о которых говорилось выше.

Важной проблемой биопечати на основе биоматериалов является их биосовместимость. Энергоемкие процессы производства капель могут генерировать вторичные молекулярные продукты из гелей, которые могут быть цитотоксичными для клеток [24] или вызывать реакцию инородного тела на имплант или гидрогель [13]. Возможно, использование большего количества «биочувствительных элементов» позволит смягчить эти проблемы.

Использование «биочувствительных элементов», приготовленных из природных материалов [25], представляет собой перспективное направление в области биопечати, способное смягчить некоторые из вышеупомянутых недостатков.

#### **1.2.4 Биоматериально-независимая (без поддержек) биопечать**

В проблематике использования биоматериалов в биопечати заметно, что многие трудности могли бы быть устранены при использовании исключительно

клеток [26], особенно полученных от пациентов (например, взрослые мезенхимальные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) [27]). В свою очередь, это может привести к созданию полностью аутологичных тканей [28].

За последние годы было разработано несколько методов, каждый со своими преимуществами и недостатками. Однако, общим ограничением этого подхода является то, что, несмотря на возможность индивидуального манипулирования клетками, они не способны легко формировать стабильные образцы. Для обеспечения клеточного слияния необходимо поддерживать их в контакте до тех пор, пока межклеточная адгезия не станет достаточной, и получать в результате продукт, секретлируемый клетками в виде внеклеточного матрикса. Этот процесс может занять значительное время и зависит от типа ткани. В связи с этим, клетки сначала предварительно собираются в конгломераты (чаще всего в ТС), которые способны гораздо быстрее формировать крупномасштабные изделия [26]. Тем не менее, биомеханические свойства подобных изделий остаются менее предсказуемыми, чем при использовании заранее определенного материала. В случае недостаточности или непригодности этого подхода для различных приложений могут быть созданы «гибридные» сфероиды.

Методы, основанные на ТС, обладают большей щадящей способностью и, следовательно, вызывают значительно меньше повреждений клеток во время процедур или вовсе их не вызывают. Другой привлекательной особенностью биопечати без поддержек является ее эффективность, поскольку скорость может быть сопоставимой или даже выше, чем у других форм биопечати за счет использования в качестве «строительных блоков» больших ТС (в десятках тысяч клеток [29]).

Несмотря на то, что методы сборки клеток без поддержек не имеют общих проблем струйной печати и микроэкструзии, таких как засорение сопла, они все же имеют свои собственные технические ограничения. К ним относится время предпечатной подготовки, которое обычно больше, тогда как время созревания после печати вероятно сопоставимо между двумя подходами. Кроме того, в таких

структурах межклеточные перекрестные помехи происходят естественным образом, в то время как дополнительное добавление гидрогелей между клетками и внутри ТС все еще остается возможным и, вероятно, полезным [30,31]. Таким образом, поскольку масштабируемость более ограничена, методы без поддержек являются предпочтительнее для тканей, где важна непосредственная (или постоянная) межклеточная коммуникация.

Определяющим свойством этого подхода к биотехнологии является то, что структура ткани не строго следует заранее заданному дизайну, а возникает из фундаментальных принципов развития, более похожих на эмбриологическую или органоидную биологию [32]. «Векселем» этой формы биопечати является ТС, и, как следствие, относительное разрешение находится в диапазоне сотен микрон. На практике расположение клеток может быть известно с гораздо большей точностью, поскольку они достигают предсказуемых местоположений внутри ТС [33]. В качестве альтернативы более высокая точность расположения клеток может не потребоваться или даже может быть вредной, если она препятствует разворачиванию механизма самоорганизации во время фазы постпечатного созревания.

Другим аспектом, в основном связанным с биофизическими факторами, воздействующими в процессе биофабрикации без использования поддержек, является спектр возможных применений, а также необходимость обучения, компетентности и особого подхода со стороны пользователей и операторов данной технологии. Несмотря на это, биотехнология без поддержек, как отрасль биоинженерии, остается количественной дисциплиной, способной извлекать выгоду из применения расширенной аналитики, оптимизации на молекулярном уровне, компьютерного моделирования и разработки новых типов принтеров [34–36].

Все вышеописанные методы применяются в области тканевой инженерии - междисциплинарного научно-технического направления, основной целью которого является создание живых тканей и органов для медицинских целей. С момента публикации работы Роберта Лангера и Джозефа Ваканти «Тканевая

инженерия» в мультидисциплинарном научном журнале «Science» в 1993 году прошло более 30 лет [37]. Концептуальной основой технологии ТИ является триада, включающая три основных компонента: 1) клетки, 2) матрикс и 3) сигнал (физические и химические факторы, воздействующие на создаваемое тканеинженерное изделие в биореакторе).

Матрикс отличается от протезов и имплантов, которые после имплантации постоянно находятся в организме пациента и не подвергаются биодegradации со временем - это временная и биодegradируемая основа. Долгое время считалось, что без использования матриксов невозможно создать тканеинженерное изделие, особенно состоящее из твердых тканей, таких как кость. Однако, эта доминирующая в области ТИ догма недавно была поставлена под сомнение. Согласно новой парадигме ткани и органы можно создавать более эффективно без использования временных поддерживающих и удаляемых поддержек [38].

Однако, детальный анализ предложенных без поддержек технологий показывает, что в качестве временной поддержки используются либо удаляемые металлические иглы, либо удаляемая, но не биодegradируемая агароза, а иногда биодegradируемый гидрогель. Таким образом, практически в любом случае, описанном в научной литературе, безскаффолдной («scaffold-free») ТИ используется та или иная временная поддерживающая и удаляемая структура - поддержка.

### **1.2.5 Магнитное левитационное формирование как формативный способ производства**

В промышленности существуют три основных метода производства: субтрактивный, аддитивный и формативный (рисунок 1.1.3). Субтрактивный метод предполагает удаление избыточного материала из заготовки для получения конечного продукта. Примерами субтрактивного производства могут служить создание каменных памятников путем отсечения лишних частей зубилом или

обработка металлической заготовки на токарном станке. Аддитивное производство включает в себя поэтапное нанесение материала с использованием специализированного оборудования, такого как роботизированный 3D-принтер. Этот процесс осуществляется по заранее разработанной цифровой модели будущего объекта. Формативное производство предполагает создание физического молда или формы для получения желаемого изделия.

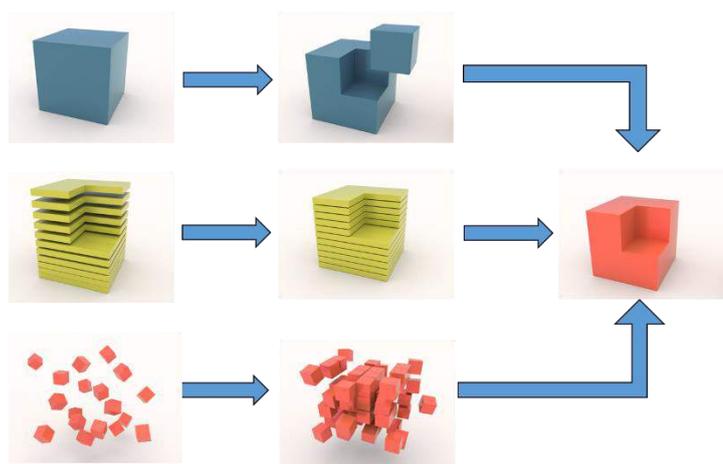


Рисунок 1.1.3 – Схематическое изображение субтрактивного, аддитивного и формативного способа производства изделий [39]

Метод магнитного и акустического левитационного формирования относится к формативным методам производства, где форму изделия определяют физические поля. Используемые в этом подходе физические поля, выполняющие функцию временной поддержки аналогично традиционным поддержкам и скаффолдам, предложено называть «скаффилдами» (scaffields), от слов «scaffold –скаффолд» и «field –поле» [40].

Магнитное левитационное формирование композиционных материалов является прямым следствием эффекта диамагнетизма, который был открыт Майклом Фарадеем в 1846 году. Диамагнитные материалы (вода, живые объекты, пластик и т.д.) обладают свойством иметь магнитную проницаемость меньше единицы, что приводит к их перемещению в направлении уменьшения интенсивности магнитного поля, то есть они выталкиваются из поля. Это свойство позволяет создавать условия для левитации диамагнитных объектов в постоянном

магнитном поле, компенсируя гравитационные силы. Интересно, что на возможность левитации диамагнитных тел в магнитном поле указал Уильям Томсон (Лорд Кельвин) [41]. Однако, высказал сомнение в реализуемости этого подхода, т.к. существовали большие трудности создания достаточно сильных магнитных полей. Последние технические достижения, связанные с изготовлением электромагнитов, создающих сильные магнитные поля, позволили Андрею Гейму ныне Лауреату Нобелевской Премии, провести известные эксперименты по левитации лягушки в университете Неймегена имени святого Радбода Утрехтского в Нидерландах (рисунок 1.1.4) [42], где через более чем 20 лет были поставлены новые эксперименты уже с левитационным магнитным формированием и биофабрикацией функциональных биологических образцов.



Рисунок 1.1.4 – Эксперименты на магните Биттера. а) Нобелевский лауреат Андрей Гейм; б) лаборатория высоких магнитных полей в г. Неймеген, Нидерланды; в) левитирующая лягушка в сильном магнитном поле; г) эксперименты по левитационному формированию, проводимые на магните Биттера (указан стрелкой) [39]

Важно отметить, что развитие этого направления в значительной степени базируется на наработках, полученных в ходе космических экспериментов на РС МКС «Кулоновский кристалл». В этих экспериментах проводилось формирование структур из дисперсных макрочастиц неорганического материала в условиях микрогравитации с использованием «магнитной ловушки» [43].

### 1.3 Трехмерная печать костных трансплантатов из неорганического материала

Костная ткань представляет собой минерально-органический композит, основным компонент которого - ФК [44]. Белки (преимущественно коллаген типа I) и вода также играют значимую роль в составе костной ткани. В данном контексте ФК представлен в виде нестехиометрического и частично кристаллизованного апатита.

Исходя из этого, использование 3D-скаффолда на основе ФК для конструирования костной ткани представляется перспективным направлением. Применение ФК в качестве материала для костного трансплантата обладает рядом преимуществ, включая биodeградацию, биосовместимость и остеокондуктивные свойства. Синтетические ФК-материалы, активно используемые в клинической практике, обычно основаны на трикальцийфосфатной керамике [45–47]. Однако, скорость биodeградации ТКФ часто ниже, чем скорость остеогенеза, что приводит к скоплению ФК в области дефекта кости [48].

В свете этого, предложен биомиметический подход, предполагающий использование ОКФ в качестве предшественника ГА в естественной костной ткани [5,49]. Однако, процесс производства ОКФ является сложным и занимает около двух недель [50].

За последнее десятилетие были разработаны и внедрены в практику методы быстрого прототипирования 3D костных трансплантатов на основе керамики [51–54]. Этот процесс включает в себя несколько этапов: создание компьютерной модели объекта, 3D разрезание модели и послойное изготовление объекта с требуемыми параметрами с использованием различных подходов к 3D-печати, таких как лазерная стереолитография [55], экструзионная печать [50], струйная печать [56,57]. Самыми полезными приемами для керамики 3D-печати являются: первый - это смешивание порошков или агломератов ФК с полимерами с последующим их химическим отверждением и, наконец, высокотемпературной

обработкой [53]; второй - печать жертвенной обратной матрицы, ее проникновение в керамическую суспензию и выжигание негатива [52]. Однако, несмотря на значительные достижения в данной области, аддитивный подход имеет ряд ограничений, включая временные затраты, ограниченное разрешение, (определяемое инструментом) необходимость использования вспомогательного материала, усадку керамики и высокую температуру обработки.

Следовательно, развитие существующих подходов может способствовать значительному улучшению качества медицинских изделий и, как следствие, повышению уровня оказания медицинской помощи. В настоящее время разработка технологии для надежной подготовки фазы ОКФ является важной задачей для изготовления композиционных материалов, предназначенных для ТИ костной ткани.

## **1.4 Трехмерная печать композиционных материалов мягких тканей**

### **1.4.1 Тканевые сфероиды – органические «строительные блоки» для формирования**

ТС представляют собой плотно упакованные агрегаты живых клеток [58] (рисунок 1.1.5). Вначале они использовались для разработки моделей заболеваний человека *in vitro* и кандидатов на тест-лидерство на доклинических стадиях разработки лекарств [59–62]. Относительно недавно была предложена концепция использования ТС в качестве строительных блоков для биопечати функциональных тканей и органоидов человека [26,63,64].

Исследования в области ТС фокусировались на трех ключевых направлениях:

- 1) разработка роботизированных, масштабируемых, стандартизированных методов биофабрикации ТС [65];
- 2) систематическое фенотипирование ТС [66];

3) разработка методов формирования ТС в трехмерные ткани и структуры органоидов [67–69].

Применение ТС в качестве строительных блоков имеет ряд преимуществ. Прежде всего, ТС обладают максимально возможной теоретической плотностью клеток, сопоставимой с плотностью натуральной ткани [59]. Вторым преимуществом является компактная округлая форма ТС с размером, который не превышает максимального, при котором диффузия питательных элементов будет недостаточна для поддержания жизнеспособности клеток в центральной части ТС. Третьим преимуществом является сложная внутренняя структура и многоклеточный состав ТС, обусловленный наличием внеклеточного матрикса.

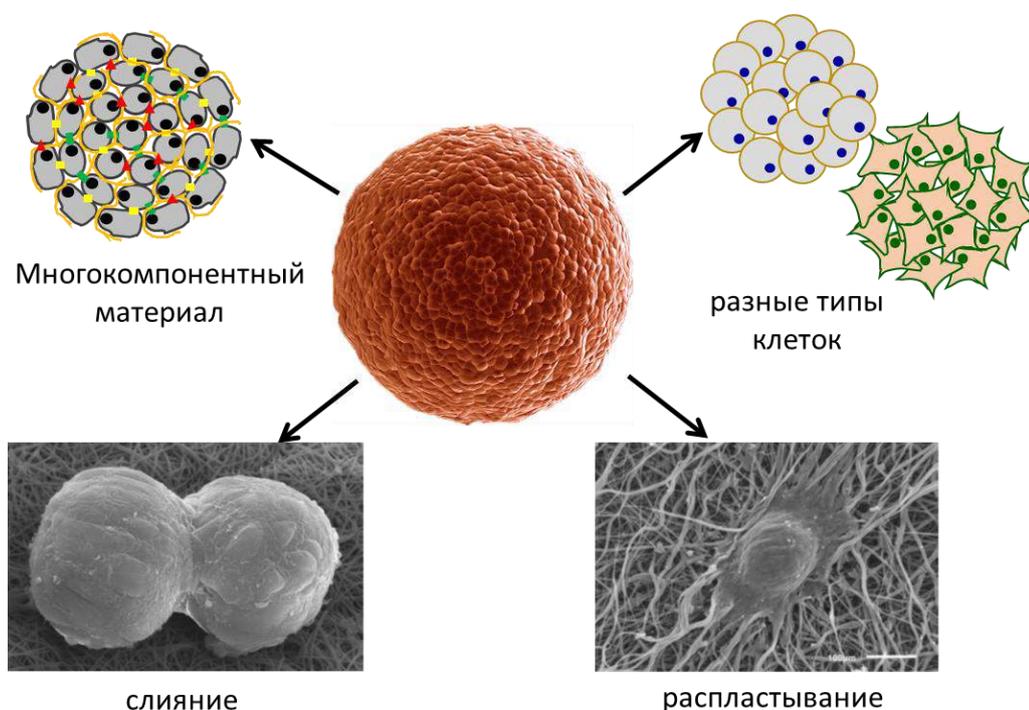


Рисунок 1.1.5 – Особенности ТС

Кроме того, ТС могут быть предварительно васкуляризованы [70]. Слияние тканей - это распространенное явление во время эмбрионального развития [71] и фундаментальный принцип быстро развивающихся технологий биопечати и биотехнологии, основанных на использовании ТС в качестве строительных блоков. Тесно расположенные и непосредственно соприкасающиеся ТС начинают сливаться, формируя сложные трехмерные тканеинженерные изделия [26].

## 1.4.2 Трехмерная биопечать с использованием роботических систем

Технология трехмерной биопечати обладает возможностью создания сложных многослойных тканеинженерных изделий, обеспечивая при этом контроль над архитектурой изделия посредством автоматизированного процесса осаждения.

В контексте биофабрикации тканей и органов с использованием ТС были разработаны различные подходы. В одном из них клеточные агрегаты были помещены в 3D-матрицы с использованием роботизированного подхода, где матрицы были напечатаны из разнообразных биоразлагаемых биоматериалов [72–74]. Другой подход предполагал распределение ТС по матрицам, созданным методом электроспиннинга [75–77]. Кроме того, были применены магнитные силы для формирования двухмерного рисунка тканей, биоизготовленных из клеток, меченных магнитными наночастицами [78–82].

Все эти методы имеют свои преимущества и ограничения. Например, роботизированная 3D-биопечать позволяет изготавливать сложные трехмерные ткани и органы [13,83,84]. Большинство современных подходов включают использование биоматериалов или наноматериалов в качестве поддерживающего материала для клеток и/или ТС.

Существует устройство для 3D-биопечати [85], которое позволяет производить биопечать ТС с использованием форсунки в виде шприцевого устройства. Однако, применение данного подхода может привести к слиянию ТС друг с другом в шприце и слиянию ТС в трубке (игле), что может вызвать блокировку иглы и затруднение прохождения последующих ТС. Это, в свою очередь, может приводить к повреждению и разрушению ТС при выдавливании.

Известно устройство [86], в котором применяется метод биопечати одиночными ТС, заключающийся во взятии ТС по одному из 96-ти луночной плашки с неадгезивным дном, переносе и нанизывании их на стержни. Однако, этот подход ограничивает область применения технологии, так как только

определенные типы клеток способны сформировать ТС достаточного размера. Кроме того, возможно разрушение ТС при нанизывании на стержни, а использование жесткого скаффолда может негативно влиять на слияния определенного типа ТС ввиду «ужимаемости» (деформации) образцов в процессе слияния при культивировании. Скорость биопечати в этом способе ограничена скоростью перемещения форсунки для забора ТС из плашки и нанизывания их на стержни.

В работах группы под руководством Тима Б.Ф. Вудфилда [87] представлено устройство, содержащее систему подачи ТС на базе печатающей головки, которая включает канал, в который загружают ТС, канал с установленным выдавливающим плунжером, канал с установленным блокирующим плунжером и выходной канал одиночного ТС. Однако, в работе не представлен механизм непосредственного перемещения одиночного ТС на печатаемую поверхность (субстрат), а диаметр ТС в данной работе составлял около 1300 мкм. Печать одного ТС идет по трехэтапной схеме, в результате скорость печати зависит от скорости выполнения этих трех этапов. Сначала блокирующий плунжер перекрывает и блокирует канал, в который перемещается ТС из канала загрузки в результате кратковременного всплеска давления. При отведении блокирующего плунжера приводится в движение выдавливающий плунжер и ТС попадает в выходной канал. Для управления плунжерами используются соленоиды, управляемые контроллерами в соответствии с заданным алгоритмом. Во время печати существует вероятность, что на приемной поверхности образуется излишек питательной среды. Это может препятствовать точному встраиванию одиночных ТС на приемную поверхность или на один, или несколько слоев ТС.

Наиболее стабильная система для печати ТС представлена в работе [85]. Данное техническое решение позволяет повысить качество биопечати путем обеспечения процесса биопечати ТС без их повреждения и без выхода питательной среды из устройства на субстрат, что позволяет повысить точность позиционирования ТС на печатаемой поверхности и улучшить качество производства трехмерных тканеинженерных изделий. Использование данного

устройства позволяет также повысить производительность печати жизнеспособных ТС.

Ускорение процесса печати достигается за счет автоматизации процесса и использования кинематической схемы устройства с меньшим количеством подвижных элементов (плунжеров), что, в свою очередь, приводит к уменьшению количества этапов по сравнению с наиболее близким аналогом, где скорость печати ограничена скоростью выполнения трех этапов.

Качество биопечати обеспечивается за счет функции удаления питательной среды из смеси «питательная среда – ТС», которая подается устройством подачи во входной канал. Эта функция реализуется благодаря конструкции системы каналов в печатающей головке, а именно наличием двух систем микроканалов (у верхнего и нижнего каналов сепарации), соединенных с одной стороны с выходным каналом печатающей головки в первой и второй областях выходного канала, а с другой - с соответствующим каналом сепарации. Размер каждого микроканала не позволяет пройти ТС в каналы сепарации. Питательная среда откачивается в емкость для сбора отработанной питательной среды. Это предотвращает образование капель питательной среды из выходного канала печатающей головки и обеспечивает точное позиционирование каждого ТС на печатаемой поверхности. Для обеспечения выхода только одного ТС на субстрат используется попеременная работа плунжера и печатающего инструмента. Расположение ТС во входном канале по одному позволяет доставить их до субстрата без повреждений, что также повышает качество биопечати.

Однако, фиксированный диаметр каналов не позволяет производить печать из ТС с различными диаметрами без замены печатающей головки. Кроме того, скорость биопечати недостаточна для создания объемных жизнеспособных тканеинженерных изделий. Для обеспечения печати необходимо использовать поддерживающий механизм в виде поддержек, что в совокупности не позволяет обеспечить воссоздание требуемых сложноустроенных объектов из жизнеспособных ТС.

### 1.4.3 Формирование мягких тканей с использованием магнитных полей

Биоразлагаемый поддерживающий материал является ключевым элементом концепции технологии ТИ, которая позволяет осуществлять биофабрикацию трехмерных тканеинженерных изделий из композиционных материалов и развивать промышленную ТИ [88].

Стоит отметить, что ранее в мире предпринимались немногочисленные попытки использования магнитных наночастиц из оксида железа для формирования единичных ТС и их последующего расположения в желаемую геометрическую форму с помощью постоянных магнитов, расположенных у дна культуральных пластиковых планшетов. Недостатком данного подхода является тот факт, что для эффективной манипуляции магнитными ТС требуется довольно высокая концентрация магнитных наночастиц в каждой клетке, которая нарушает их метаболизм. Кроме того, в случае подсаживания сформированных таким способом тканевых образцов в организм наночастички из окиси железа со временем будут накапливаться в печени и селезенке человека и приводить к развитию заболеваний по типу гемосидероза.

В последнее десятилетие был предложен новый альтернативный подход, не предполагающий использование поддерживающих материалов [89]. Несмотря на заявления разработчиков этого нового подхода о его реализации без использования поддержек, на практике все же применяются различные варианты «временной и съемной опоры», такие как съемные металлические иглы [29] или удаляемый гидрогель из агарозы [90]. Следовательно, можно заключить, что в данных методах все же используются традиционные опоры в виде поддерживающего физического материала.

Существующие методы биофабрикации предлагают различные решения для сборки клеток в процессе создания моделей тканей, однако все они связаны с воздействием силы гравитации на печатаемые объекты. До настоящего времени не

было продемонстрировано ни одного метода, который позволил бы изготавливать тканевые образцы в отсутствии гравитации.

В этом контексте использование физических полей, таких как магнитные, акустические и электрические поля, в качестве временной и съемной опоры, представляется одним из наиболее перспективных подходов без использования поддерживающих материалов. Биофабрикация, основанная на использовании физических полей вместо физических поддерживающих материалов, является инновационным подходом в области ТИ. Например, магнитное поле выполняет функции временной физической поддержки для материалов, которые подвергаются сборке и последующему слиянию. После относительно быстрого процесса формирования, который занимает несколько минут, клеточный материал продолжает удерживаться в левитирующем состоянии магнитным полем до момента полного слияния компонентов и образования цельной неразрывной структуры. Использование магнитной и акустической левитационной технологии позволяет осуществлять формирование изделия без применения поддерживающих материалов, при этом разрешающая способность такого метода фабрикации зависит в основном от размера частиц исходных объектов.

Применение магнитных сил в ТИ началось с серии пионерских исследований Хонда и Ито [91]. Они предложили этот подход как магнитно-силовую инженерию тканей. Первоначально магниты и связанные с ними магнитные поля использовались для быстрого высева клеток, меченых магнитными наночастицами. Например, этот подход использовался для быстрого посева меченых эндотелиальных клеток на сосудистые матриксы [92] и для улучшения отделения и переноса клеточных слоев в технологии клеточных листов, первоначально разработанной группой Тэруо Окано [93]. Следующий шаг включал применение магнитных сил для 2D формирования ТС, меченых магнитными наночастицами [78–82]. Недавно было сообщено, что суперпарамагнитные наночастицы оксида железа в умеренных концентрациях не токсичны и могут даже подвергаться биологическому разложению и метаболизироваться в физиологические белки, такие как ферритины [94].

В исследованиях [95,96] был продемонстрирован процесс левитации объектов небиологического характера крупного масштаба. Применение подхода магнитной левитации позволило осуществлять процесс левитации, сортировки и создания живых материалов [97]. В рамках данных исследований авторы утвердили использование магнитной левитации для формирования объектов диамагнитного типа масштаба от миллиметра до сантиметра в парамагнитной жидкой среде. Каждый из объектов был запрограммирован по форме и распределению плотности, расположенных в градиенте магнитного поля, создаваемого магнитами NdFeB. Благодаря отсутствию прямых контактов между компонентами, их равновесная конфигурация зависела от противовеса действующим магнитным и гравитационным силам. Данный метод позволяет позиционировать компоненты в трехмерном пространстве.

Сначала в ТИ без использования поддерживающих материалов привлекали внимание в основном магнитные поля. Значительный интерес вызвал «феномен» магнитной левитации живой лягушки в сильном магнитном поле, описанный Андреем Геймом [98], а также авторитетная работа группы Джорджа Уайтсайда [99]. Это способствовало созданию прочной основы для систематического изучения магнитной левитации различных объектов. Последующие прорывные исследования, демонстрирующие магнитное левитационное биоформирование живых объектов, стали важным этапом в продвижении использования магнитных полей в биофабрикации и ТИ. В новаторских работах из лаборатории Уткана Демирчи была представлена миниатюризация технологии магнитной левитации до уровня микрофлюидики [100]. Дурмус с соавторами впервые продемонстрировали магнитную левитацию отдельных клеток и изменение их профиля при гибели клетки [101].

Однако, для реализации магнитного левитационного биоформирования необходимо применение относительно токсичной парамагнитной среды, содержащей хелаты гадолиния. Возможный токсический эффект соединений гадолиния может подрвать предполагаемую ценность биофабрикации тканевых изделий с использованием магнитного левитационного биоформирования для *in*

*in vitro* трехмерных моделей тканей и фундаментальных / прикладных исследований. Это представляет собой проблему в продвижении магнитного левитационного биоформирования.

Таким образом, разработка трехмерных композиционных материалов (органических, неорганических) в виде тканеинженерных изделий на основе управляемой магнитной седиментации или левитационного формирования образца в неоднородном магнитном поле из хаотично распределенных в рабочем объеме жидкой среды органических и неорганических материалов представляет собой альтернативу существующим подходам. Теоретически можно выделить три возможных способа снижения нежелательного токсического действия парамагнитной среды:

1) разработка нетоксичного хелата гадолиния или альтернативной парамагнитной среды, при этом необходимо бороться с повышенным осмотическим давлением;

2) выполнение левитационного биоформирования в сильном магнитном поле;

3) выполнение магнитного левитационного биоформирования в условиях микрогравитации.

Все эти три способа являются предметом систематических исследований.

Для формирования тканевых изделий значительных размеров при нетоксичной концентрации парамагнетика можно использовать магнитные системы с магнитным полем до 30 Тл (магниты Биттера или сверхпроводящие магниты), обеспечивающие требуемый градиент магнитного поля на протяжении всего рабочего объема, либо использовать условия микрогравитации, например, на борту РС МКС. Далее будет рассмотрено биоформирование ТКМ в сильных магнитных полях и в условиях микрогравитации на борту РС МКС.

#### 1.4.4 Формирование мягких тканей с применением сильных магнитных полей

С начала 1990-х годов несколько авторов продемонстрировали возможность левитации в воздухе воды и других диамагнитных веществ [102,103]. Икезо и др. удалось поднять в атмосферу парамагнитный водяной шар, содержащий  $\text{CuSO}_4$  (они назвали это явление «магнито-архимедовой левитацией»), хотя до этого утверждалось, что левитирование парамагнитных веществ технологически невозможно [103]. С тех пор принципы магнитной левитации успешно и широко используются в различных областях техники и промышленности [104]. В 1997 году Андре Гейм, как было описано ранее, выполнил диамагнитную левитацию живого организма (лягушки) в воздухе [42]. В клеточной биологии, поскольку клетки или ТС являются диамагнитными, было предложено достичь их левитации с помощью парамагнитной относительно них окружающей среды. Наиболее часто используемые парамагнитные агенты представляют собой хелаты гадолиния. Этот подход подразумевает создание трехмерной «магнитной ловушки» для диамагнитных объектов в водном растворе парамагнитных ионов. Винкелман и соавторы продемонстрировали захват полистирольных сфер и различных типов живых клеток: клеточных линий фибробластов мыши NIH-3T3, дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*) с использованием постоянных магнитов в растворе соединений парамагнитного гадолиния 40 мМоль [105]. После исследований группы Джорджа Уайтсайда [99] и серии публикаций группы Уткана Демирчи (оба являются выпускниками Гарвардского университета) [101,106–108] несколько исследовательских групп по всему миру также продемонстрировали, что магнитное левитационное биоформирование с использованием парамагнитной среды технологически возможна [40,109]. Следует отметить, что этот подход позволяет избежать использования «меток» любого типа, а именно магнитных наночастиц, которые являются цитотоксичными и доказано, что они накапливаются в организме

человека после имплантации тканеинженерных изделий, содержащих наночастицы [97,110,111].

Хелаты гадолиния широко используются в качестве контрастных веществ, которые одобрены агентством министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA) для применения в клинических изображениях, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) [112]. Нежелательная токсичность гадолиния представляет собой главную проблему в дальнейшем развитии этого направления. Очевидна дилемма - высокая концентрация гадолиния обеспечивает магнитную левитацию, но является относительно токсичной, тогда как низкая, нетоксичная концентрация гадолиния не позволяет обеспечить магнитную левитацию с постоянными магнитами. В такой ситуации некоторые исследователи использовали низкую концентрацию гадолиния, чтобы показать отсутствие токсичности, а затем более высокую концентрацию гадолиния, чтобы обеспечить магнитную левитацию [113].

#### **1.4.5 Использование условий микрогравитации на борту Российского сегмента Международной космической станции для формирования композиционных материалов медицинского назначения**

Долговременное пребывание в условиях невесомости, а также космическая радиация негативно влияют на организм человека особенно при космических полетах за пределами защитной магнитосферы Земли. Методы ТИ уже на протяжении нескольких десятилетий используются для изучения влияния невесомости и космической радиации на человеческие ткани. При этом биофабрикацию относительно просто организованных человеческих тканей (например, суставного хряща) вполне возможно осуществлять в космосе в специальных биореакторах.

Одним из первых экспериментов, посвященных ТИ в космосе, была работа американских ученых из Массачусетского Института Технологии, выполненная

под руководством профессора Роберта Лангера на российской космической станции МИР [114]. В данной работе тканеинженерный хрящ был изначально получен из трехмерного биodeградируемого полимерного скаффолда и бычьих клеток хряща в ротационном биореакторе «Syntheson», после чего он созрел 3 месяца на Земле и затем был отправлен на 4 месяца в космос в том же биореакторе. Было показано, что как в космосе, так и на Земле сохранялась трехмерная тканеспецифическая архитектура хряща, содержащая экстраклеточный матрикс, представленный типичными протеогликанами и коллагеном второго типа. При этом по сравнению с контрольным хрящом, находящемся на Земле, хрящ, выращенный в условиях невесомости на космической станции, был круглее, меньше по размерам и механически слабее. В данной работе, по сути, изучалось переживание в условиях невесомости тканевой структуры хряща, предварительно созданной на Земле, и не изучались эффекты космической радиации.

В настоящее время одним из мировых лидеров в проведении тканеинженерных экспериментов в космосе является научный коллектив под руководством немецкой ученой Даниелы Гримм, работающей в Дании [115]. Ее группа систематически проводит космические эксперименты в рамках коротких космических миссий, запускаемых Европейским Космическим Агентством, на МКС и на космических аппаратах Китайской Народной Республики. В частности, используя монослой опухолевых клеток щитовидной железы, группа Д. Гримм обнаружила уникальный морфогенетический феномен, заключающийся в способности раковых клетки щитовидной железы образовывать ТС в условиях невесомости [116].

Полученные экспериментальные данные, доказывающие возможность образования таких изделий в условиях микрогравитации, могут быть объяснены тем, что невесомость создает более благоприятные условия не только для формирования, но и слияния ТС между собою, отчасти опосредованное повышенной адгезией контактирующих клеток. Таким образом, можно предположить, что созревание напечатанных трехмерных композиционных материалов в виде органических изделий, состоящих из пространственно

организованных и при этом плотно контактирующих друг с другом ТС, в условиях микрогравитации в космосе будет происходить намного быстрее и эффективнее.

В отличие от используемой в условиях земной гравитации аддитивной или послойной биопечати в космосе необходимо обеспечить направленную подачу и желаемое пространственное распределение ТС. Одним из возможных подходов является использование магнитного поля (или другого воздействия) на клеточный материал. Ранее несколькими группами исследователей была продемонстрирована возможность получения ТС из меченых ферромагнитными наночастицами клеток с последующим паттернированием их в необходимую геометрическую форму с помощью постоянных магнитов, расположенных в непосредственной близости от дна чашек Петри. Такой подход был положен в основу разработки принципов использования нанотехнологий для биофабрикации и биопечати сложных тканей и органов [117]. В апреле 2017 г. американская компания «BioServe Space Technologies» совместно с NASA запустила 6-месячный космический эксперимент на МКС по изучению возможностей культивирования клеточных трехмерных агрегатов в условиях невесомости. В данном эксперименте была использована технология, разработанная Техасской компанией «Nano3D Biosciences» (США), позволяющая получать ТС из клеточной линии аденокарциномы легкого человека при помощи ферромагнитных наночастиц и постоянных магнитов.

Несмотря на определенные преимущества, для эффективной манипуляции ТС потребуется использовать довольно высокие концентрации магнитных наночастиц, способные вызывать цитотоксический эффект [97]. Кроме того, в случае имплантации сформированных подобным образом тканевых изделий в организм, наночастицы из окиси железа со временем будут накапливаться в печени и селезенке человека и приводить к развитию патологических состояний по типу гемосидероза [118].

Надо отметить, что рассматриваемая технология магнитного формирования является по своей сути платформенной, поскольку позволяет осуществлять направленное формирование как живых материалов из ТС, состоящих из различных типов клеток (соединительнотканых, эпителиальных, эндотелиальных,

мышечных и др.), так и получать кристаллические формы химических соединений (неорганические компоненты матрикса костной ткани, лекарственные препараты, ферменты и гормоны), помещенных в неоднородное магнитное поле с высоким градиентом напряженности. Дополнительным направлением исследований может являться формирование посредством магнитных полей ТБК, которые можно использовать для антибактериальной восприимчивости с формируемыми композиционными материалами [119].

#### **1.4.6 Формирование композиционных материалов с использованием акустических полей**

Одна из самых простых и часто встречающихся форм в тканях и органах — это кольцо или трубка, так именно такую форму имеют кровеносные сосуды и капилляры. Проблема васкуляризации остро стоит перед биоинженерией, так как для поддержания жизнеспособности ткани необходимо не только сформировать материал из клеток, но и обеспечить ее питание, а питательные вещества проникают сквозь клеточную среду не глубже чем на 150-200 мкм — это и определяет максимальный радиус жизнеспособных ТС.

Несмотря на недавние серьезные достижения в области ТИ, создание многослойных сложных трубчатых изделий все еще остается проблемой [120]. Многие системы органов человеческого организма состоят из трубчатых тканей, особенно сердечно-сосудистая, дыхательная, мочева и желудочно-кишечная системы органов. Исторически развитие тканеинженерных кровеносных сосудов (ТИКС) преобладает над другими типами трубчатых тканей. В 1986 году Вайнберг и Белл впервые сделали ТИКС, применив коллаген с гладкомышечными клетками (SMC) и фибробластами в трубчатой форме с последующим культивированием [121]. Другой подход - формирование клеточных листов - был предложен в 1998 году Хеурекс, который обернул клеточные листы, культивированные из SMC и фибробластов, вокруг оправки для получения многослойного ТИКС [122]. Этот

подход был дополнительно изменен и применен несколькими группами [123–125]. В дополнение к ТИКС была применена технология клеточного листа для создания трубчатого трансплантата мочеполовой системы [126,127], уретры [128] и трансплантата толстой кишки человека [125]. Помимо технологий гидрогелевого литья и клеточного листа была применена стратегия, основанная на использовании загруженного в клетку скаффолдного материала [129]. В инженерии сосудистых тканей этот подход был исследован для широкого спектра материалов, включая синтетические полимеры [129,130], природные полимеры [131], децеллюляризованный свиной [132] или человеческие органы [133]. Использование клеточного матрикса с трубчатой формой для реконструкции уретры упоминалось в некоторых доклинических [134–136] и клинических исследованиях [137].

Чжан и соавторы использовали технологию трехмерной биопечати для создания уретры, насыщенной клетками, с использованием синтетического биоразлагаемого полимера, клеток уротелия и SMC [138]. Пи и соавторы применял микрофлюидную биопечать для получения многослойных трубчатых уротелиальных и сосудистых тканевых изделий [139]. Между тем, как ранее уже было сказано, Итох продемонстрировал оригинальный метод роботизированного сборки трубчатых органов, в частности сосудистой ткани, с использованием металлических игл в форме круга в качестве временного скаффолда для ТС, полученных из фибробластов или SMC. В этой технологии (называемой «метод Кензана») узорчатые ТС были затем помещены в биореактор для поддержки процесса синтеза и, наконец, для удаления игл из зрелой жесткой трубчатой структуры [29,140]. В другом подходе, предложенном Норотте, различные типы сосудистых клеток были объединены в отдельные единицы: либо многоклеточные ТС, либо цилиндры контролируемого диаметра, которые затем были напечатаны послойно одновременно с агарозными стержнями, использованными здесь в качестве шаблона для формования. Уникальным аспектом этого метода была возможность построения иерархических деревьев сосудов, состоящих из труб с различными диаметрами и формами [90].

В качестве альтернативы подходу на основе поддерживающих материалов были разработаны новые технологии без поддержек, основанные на использовании физических полей в качестве временной опоры для быстрого изготовления тканевых изделий со сложной геометрией. Несколько исследовательских групп успешно применили акустические волны в качестве инструмента для формирования паттерна клеток и ТС в плотно упакованных функциональных ТКМ, таких как сердечные тканевые изделия [141], кольцевые тканевые изделия, образованные слитыми фибробластами и ТС из эндотелиальных клеток [142] и мягкие клетки-роботы в форме кольца из нейронов и астроцитов [143]. Методы акустической левитации для формирования трехмерных объектов также известны из публикаций [144–146].

Известно, что акустическое (ультразвуковое) поле может использоваться для левитации, в том числе и ТС. Из-за сильной зависимости акустического поля от формы и размеров ультразвукового источника, его рабочей частоты и граничных условий можно создавать сложные трехмерные акустические ловушки. Когда ТС помещаются в объем, подвергаемый воздействию ультразвукового поля, возникает так называемая «сила акустического излучения», которая является результатом передачи импульса от акустической волны поглощающим или рассеивающим объектам. Амплитуда и направление силы излучения зависит от конкретной структуры поля. Например, если используется акустическое поле в виде стоячей волны, а длина волны больше диаметра ТС, то результирующая сила излучения перемещает ТС в узлы акустического давления.

При этом ультразвуковое поле больше подходит для образования небольших акустических ловушек и не позволяет удерживать большое количество ТС в условиях гравитации, что накладывает ограничение на формирование сложных трехмерных объектов. Для манипулирования большими размерами изделий только акустическим полем необходимо будет большая мощность излучения, что приведет к разрушению данного материала или использование дополнительных воздействий.

## 1.5 Заключение по Главе 1

На основе проведенного анализа можно сделать вывод, что за последние время аддитивные технологии стали все чаще применяться в биомедицинских и технологических направлениях, в том числе исследованиях по созданию экспериментальных и функциональных ТКМ из неорганических и органических материалов. При этом практически все современные аддитивные технологии, такие как 3D-печать, основаны на послойном нанесении материалов, что подразумевает использование различных инструментов печати (диспенсеров). Для стабильной поддержки биоматериалов в заданных точках формируемых образцов необходимы временные опорные поддержки, состоящие из гидрогелей, полимеров, порошка, металлических стержней и др. Практически в каждом опубликованном в литературе случае ТИ используется та или иная временная поддерживающая и удаляемая структура – скаффолд. Ключевой проблемой являются материалы. Различают материалы биологического происхождения, к которым относят аутологичные и аллогенные, и полученные искусственным путем. Идеальные ТКМ должны быть биологически совместимы, не вызывать выраженного иммунного ответа, приводящего к отторжению материала, не вызывать токсических, аллергических и клеточных реакций, механические свойства должны быть близкими к свойствам ткани. Каждый из видов органического и неорганического материала имеет свои преимущества и недостатки. Применение неорганических материалов перспективно в случае замещения твердых тканей в ортопедии и травматологии. В ТИ мягких тканей многообещающим подходом является использование клеточного материала.

Несмотря на определенные технологические успехи современных междисциплинарных подходов в области АТ, большинство методов обладают рядом недостатков, таких как: длительность процесса печати, критичная для некоторых видов объектов, например, биологических; необходимость в использовании поддерживающего временного материала; ограниченная

разрешающая способность; способность развитого мультимасштабного структурирования изделий при решении комплексных задач восстановления функции тканей.

Разработка способов формирования функциональных ТКМ с отсутствием, приведенных выше недостатков на основе органических и неорганических материалов, является актуальной задачей. В частности, способы магнитного и акустического левитационного биоформирования относятся к группе методов «формативного» производства, где факторами, задающими заданную форму изделий, являются физические поля, которые могут обеспечить пространственное позиционирование материала согласно цифровому заданию.

## Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вторая глава посвящена описанию используемых материалов их анализу и методам исследования.

### 2.1 Материалы и реагенты

Модифицированная среда «Dulbессо Eagle» (DMEM, кат. № 12491-015), бычья сыворотка (FBS, кат. № 16000-044), антибиотик-антимикотик (кат. № 15240-062), трипсин/ЭДТА (кат. № 25200-114), фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS, кат. № 18912-014) были получены из «Gibco» (США). Версен (кат. № R080) и L-глутамин (кат. № F032) были получены из компании «Paneco» (Российская Федерация). Глутаровый альдегид (кат. № G5882) был получен из «Sigma-Aldrich» (США). «CellTiter-Glo 3D kit» (кат. № G9682) был приобретен у компании «Promega» (США). «Omniscan» (гадодиамид) был приобретен у «GE Healthcare» (Ирландия). Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM, кат. №: 12491-015), фетальная бычья сыворотка (FBS, кат. №: 16000-044), антибиотик-антимикотик (кат. №: 15240-062), трипсин/ EDTA (кат. №: 25200-114) были получены от «Gibco» (США). EDTA (кат. №: R080), L-глутамин (кат. №: F032) был получен от «Paneco» (Россия). Высокоочищенный нитрат кальция (кат. №: 13477-34-4), карбонаты аммония (кат. №: 506-87-6), диаммонийфосфат (кат. №: 7722-76-1), ацетат натрия (кат. №: 127-09-3), глутаральдегид (кат. №: G5882) и натриевая соль резазурина (кат. №: R7017-5G) были получены от «Sigma-Aldrich» (США).

### 2.2 Синтез и свойства фосфатов кальция

Порошок  $\alpha$ -ТКФ синтезировали в водной среде путем медленного добавления раствора фосфата диаммония  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$  в раствор нитрата кальция  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ , содержащий раствор аммиака  $(\text{NH}_4\text{OH})$ , при постоянном перемешивании. Значение pH смеси составляло около 7 с молярным соотношением

Ca/P 1,5/1. После полного добавления реагентов суспензию фильтровали, сушили при 80 °С и спекали при 900 °С в течение 2 ч.

Для получения частиц  $\alpha$ -ТКФ был использован метод, основанный на сфероидизации капель жидкости под действием сил поверхностного натяжения с использованием смешанной суспензии  $\alpha$ -ТКФ, связующего вещества (желатина) и масла (рисунок 2.2.1). Этот способ позволяет получать пористые гранулы сферической формы с открытыми порами, получаемые при выгорании связующего. Сферические частицы, полученные под действием сил поверхностного натяжения, фильтровали на воронке Бюхнера, промывали от масла, высушивали и затем нагревали до 1300 °С. Частицы  $\alpha$ -ТКФ со средним размером 250–500 мкм были использованы для сборки скаффолдов (рисунок 2.2.1 б). Состав частиц  $\alpha$ -ТКФ был подтвержден с помощью рентгенофазового анализа (рисунок 2.2.1 в, г).

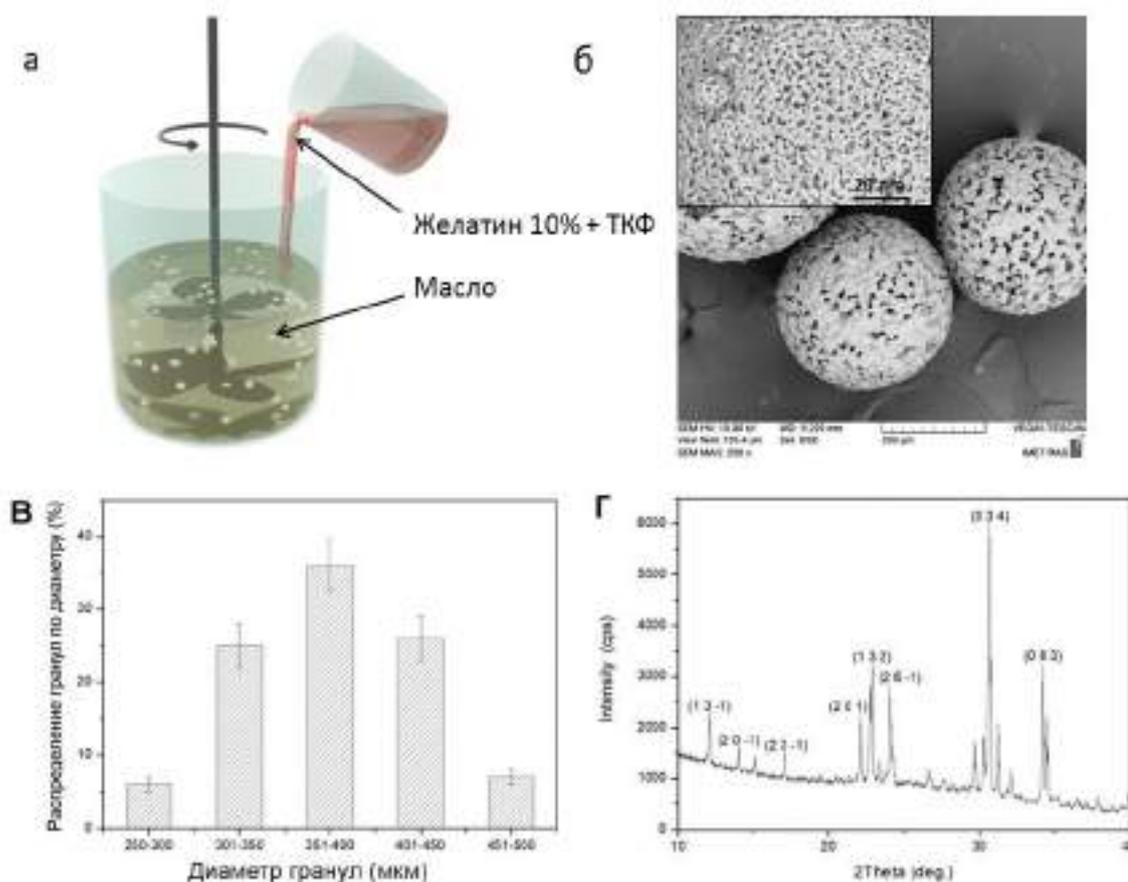


Рисунок 2.2.1 — Изготовление частиц  $\alpha$ -ТКФ: а) схематическое изображение процесса изготовления  $\alpha$ -ТКФ частиц; б) СЭМ-изображение частиц  $\alpha$ -ТКФ (бар 200 мкм и 20 мкм); (в) Распределение диаметра частиц  $\alpha$ -ТКФ; г) рентгенофазовый анализ частиц  $\alpha$ -ТКФ [147]

### Подготовка растворов для перекристаллизации

Два раствора были подготовлены для достижения магнитно-левитационной сборки и перекристаллизации частиц  $\alpha$ -ТКФ. Один буферный раствор (называемый буфер №1) готовили растворением  $1,5 \pm 0,1$  Моль ацетата натрия и  $1,0 \pm 0,01$  Моль фосфорной кислоты в воде ( $\text{pH } 5,2 \pm 0,2$ ). Второй буферный раствор (буфер №2) готовили растворением  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (95,2 г) в 700 мл дистиллированной воды (что составляет 1,66 Моль/л) с  $\text{pH } 8,2 \pm 0,2$ . И буфер №1, и буфер №2 содержали 3 Моль  $\text{Gd}^{3+}$ . Чтобы получить концентрацию 3 Моль, 3 мл Гадовиста (1 Моль, «Bayer Pharma AG», Германия) лиофилизировали с использованием «Heto PowerDry» LL3000 («Thermo Fisher Scientific», США) и растворяли в 1 мл буфера №1 или буфера №2.

### Характеристика материала

Фазовый состав анализировали с помощью обычной методики дифракции рентгеновских лучей (XRD) [«Shimadzu» XRD-6000 (Япония), Ni-фильтрованная мишень  $\text{CuK}\alpha 1$ ,  $\lambda = 1,54183 \text{ \AA}$ ]. Образцы сканировали при  $2\theta = 3^\circ - 60^\circ$  с шагом  $0,02^\circ$  в течение предварительно установленного времени 5 с.

Аппаратура сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) («Tescan Vega II», Чешская Республика), работающая в режиме вторичного и обратного рассеяния электронов, использовалась для исследования материалов.

ТКМ на основе ФК со ствольными клетками из молочных зубов (SHED) фиксировали 2,5% v/v Глутаральдегидом / PBS (физиологический раствор с фосфатным буфером), обезвоживали в серии спиртов этанола и затем сушили в сушилке с критической точкой (НКФ-2, «Hitachi Koki Co. Ltd.», Япония) и проводили для наблюдения с помощью микроскопа JSM -6510 LV («JEOL», Япония).

Все образцы были покрыты напылением с использованием ионного устройства для нанесения покрытий («IB-3», «EIKO», Япония) слоем золота толщиной 25 нм перед визуализацией для придания электропроводности поверхностям.

## 2.3 Клеточные культуры

В исследованиях с ФК использовались первичные адгезивные культуры - мезенхимальные стволовые клетки (MSC) из пульпы молочных зубов (рисунок 2.3.1). Молочные зубы человека были собраны у 3 здоровых детей (от 5 до 8 лет). Образцы хранили в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), содержащем антибиотик / антимикотик («Gibco», США), до доставки в лабораторию в течение 24 ч. Ткань пульпы механически извлекали, обрабатывали в 0,1% растворе коллагеназы типа I в HBSS («Gibco», США) в течение 60 мин при 37 °С. Клетки SHED центрифугировали и суспендировали в среде (DMEM / F12 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 100 единиц/мл пенициллина / стрептомицина). Клетки размножали в колбах объемом 75 см<sup>3</sup> при стандартных условиях (37 °С, увлажненный воздух, содержащий 5% CO<sub>2</sub>). Для пассирования клетки отделяли путем инкубации с 0,25% v/v раствором трипсина-ЭДТА («Paneco», Россия) в течение 5 мин при 37°С, суспендировали в ростовой среде и пересевали в соотношении 1:3.

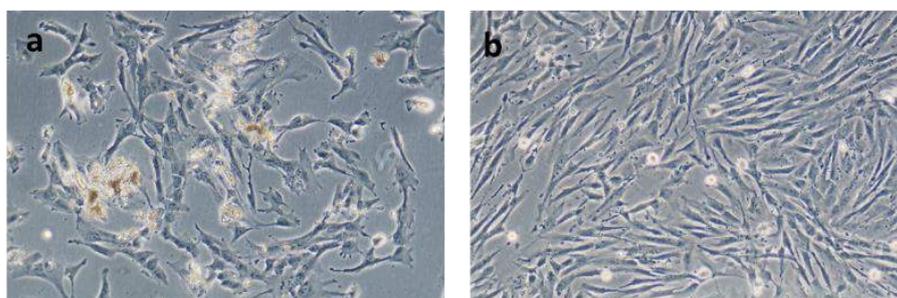


Рисунок 2.3.1 — Фазоконтрастная микроскопия первичной SHED культуры: а) до первого пассажа; б) в пассаже [147]

Первичную культуру SHED анализировали методом иммунофенотипирования с использованием проточной цитометрии на наличие и отсутствие определенных маркеров, как рекомендовано Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [148]. Было обнаружено, что клетки являются сильно положительными (более 95%) для CD29, CD44, CD49b, CD73 и CD90 и отрицательными (менее 2% положительно) для CD34, CD45 и HLA-DR.

Клеточные культуры также были проверены на мультипотентную способность дифференцироваться в остеогенные, адипогенные и хондрогенные линии, поскольку способность дифференцироваться в три различных линии является еще одним обязательным критерием ISCT для MSC (рисунок 2.3.2).

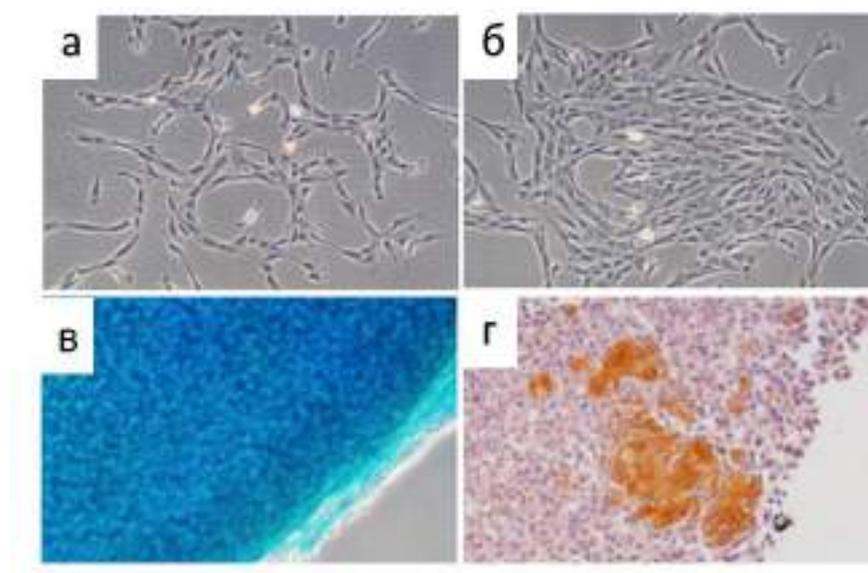


Рисунок 2.3.2 — SHED многолинейная дифференцировка: а) остеогенная дифференциация была обнаружена окрашиванием ализарином красным для визуализации отложений кальция; б) остеогенная дифференциация была продемонстрирована окрашиванием анализом щелочной фосфатазы; в) хондрогенная дифференциация была подтверждена окрашиванием Alcian Blue для визуализации продукции матрицы, богатой гликозаминогликаном; г) адипогенная дифференциация была обнаружена окрашиванием масляным красным для визуализации внутриклеточных липидных вакуолей [147]

Результаты анализа показали, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки были преобладающими клетками в культурах SHED.

В исследованиях в магнитном и акустическом полях использовалась первичная культура суставных хондроцитов овец, которая была предоставлена доктором медицинских наук Н. П. Омеляненко (Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, Москва, Россия). Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, дополненной антибиотиком/антимикотиком и 2 мм L-глутамином. Клетки инкубировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и регулярно разделяли при наращивании 85-95%. Перенос клеток и приготовление одноклеточных

суспензий проводили с помощью мягкой ферментативной диссоциации 0,25% раствором трипсина / 0,53 мм ЭДТА.

В исследованиях в сильном магнитном поле использовалась клеточная линия хондросаркомы человека SW1353, которая была приобретена из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (кат. № НТВ-94) и культивирована в модифицированной среде Eagle фирмы «Dulbессо» (DMEM) / F12 («Gibco», США) с 10% FBS (фетальная бычья сыворотка; «Gibco», США) во увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С и регулярно рассеивались при 85-95% заполнении. Перенос клеток и приготовление одноклеточных суспензий проводили с помощью мягкой ферментативной диссоциации 0,25% раствором трипсина / 0,53 мм ЭДТА («Gibco», США).

В исследованиях в магнитоакустическом поле использовались гладкомышечные клетки (SMC) мочевого пузыря человека (далее называемые hbSMC), которые были приобретены у «ScienCell» (кат. № 4310) и культивированы в бессывороточной среде для SMC с добавками для роста (SMCM, кат. № 1101, «ScienCell», США). Клетки инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и регулярно разделяли при заполнении 85-95%. Приготовление суспензии отдельных клеток проводили с использованием мягкой ферментативной диссоциации с 0,25% раствором трипсина / 0,53 мМоль ЭДТА (кат. № P043p, «Paneco», Россия).

Для создания ТС из тиреоцитов крысы использовались клетки линии щитовидной железы крысы FRTL-5. Тиреоциты крысы культивировали при стандартных условиях (37°С, 5% CO<sub>2</sub>) в культуральных флаконах со сменой питательной среды каждые три-четыре дня. При достижении 85-95% конфлюэнтности клетки аккуратно снимали с культуральных флаконов с использованием мягкой ферментативной диссоциации раствором Версена и 0,25% раствором трипсина / ЭДТА. Готовили клеточную суспензию необходимой концентрации.

Все клетки были свободны от микоплазменного загрязнения, что подтверждено с использованием протокола окрашивания DAPI (кат. № D1306, «Invitrogen», США).

## 2.4 Подготовка тканевых сфероидов

В исследованиях в магнитном и акустических полях поле использовались ТС, сформированные с использованием микропланшетов «Corning spheroid» («Corning», кат. №: 4520) в соответствии с протоколом производителя. Клетки в монослое с 95% заполнения промывали раствором ЭДТА, собирали с субстрата 0,25% трипсином / 0,53 мМоль ЭДТА и затем ресуспендировали в среде для культивирования клеток. Концентрация клеток составляла  $2,7 \times 10^5$  на миллилитр. 100 мкл клеточной суспензии вносили в лунки микропланшетов «Corning». Инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч.

В исследованиях в сильном магнитном поле использовались ТС полученные с использованием «MicroTMKCues 3D» (Z764019-6EA, 81 круглая лунка 800 мкм × 800 мкм, «Sigma Aldrich», США) следующим образом: клетки SW-1353 отделяли от пластика и суспендировали в полной ростовой среде в концентрации  $3,4 \times 10^6$  клеток на миллилитр. После этого 190 мкл суспензии помещали в каждую 81-луночную неадгезивную агарозную форму, а формы помещали в 12-луночные культуральные пластины («Nunc», США) и покрывали полной питательной средой на 1 ч. Полученные ТС содержали  $8 \times 10^3$  клеток.

В исследованиях в магнитоакустическом поле использовались ТС, полученные с использованием микромолдов для чашек Петри «MicroTMKCues 3D» (Z764019-6EA, 81 лунка 800 мкм × 800 мкм, «Sigma Aldrich», США) в соответствии с протоколом. Клетки hbSMC собирали из матрасов для культивирования и затем суспендировали в среде для культивирования клеток при концентрации  $6,8 \times 10^6$  клеток на миллилитр. После этого 190 мкл суспензии помещали в каждую 81-луночную неадгезивную агарозную форму и формы помещали в 12-луночные

культуральные планшеты («Nunc», США) и через 1 ч покрывали полной питательной средой. Полученные ТС содержали  $1,6 \times 10^4$  клеток.

## **2.5 Определение диаметра и округлости тканевых сфероидов**

Размеры ТС определяли на 3-ий день с использованием изображения, полученного на инвертированном микроскопе «Nikon Eclipse Ti-S», Япония. Диаметры и округлость ТС измеряли с помощью программного обеспечения Image J 1.48 v («NIH Bethesda MD», США). Все исходные изображения в оттенках серого были преобразованы в упрощенные пороговые изображения, в следствии чего края ТС были автоматически обнаружены. Границы обнаруженных краев ТС первоначально измерялись в пикселях и преобразовывались в микрометры путем сравнения с эталонной длиной. Округлость измерялась с помощью дескриптора формы изображения J 1.48 v и вычислялась как  $4 \cdot \text{площадь} / (\pi \cdot \text{большая ось})$  [36].

## **2.6 Оценка жизнеспособности тканевых сфероидов при различных условиях**

Жизнеспособность ТС при различных концентрациях парамагнетика оценивали с помощью набора «CellTiter-Glo 3D» (кат. № G9682, «Promega», США), основанного на биолюминесцентном обнаружении денозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в жизнеспособных клетках в соответствии с протоколом производителя. 3-х дневные ТС с начальным числом клеток 8000 клеток помещали в концентрации 0, 50 и 250 мМоль  $Gd^{3+}$  в течение 24 ч - для экспериментов в магнитном поле и 4-х дневные ТС помещали в 0, 0,8, 50 и 100 мМоль гадобутрола на 24 ч - для экспериментов в высокоинтенсивном магнитном поле. Затем добавляли «CellTiter-Glo 3D kit» и регистрировали люминесценцию после 30-минутной инкубации с помощью мультилабельного считывателя пластин VICTOR X3 («Perkin Elmer», США).

Влияние 0,8 мМоль гадобутола и магнитного поля интенсивностью 19 Тл на жизнеспособность клеток внутри ТС анализировали с помощью набора двойного окрашивания живых/мертвых клеток («Sigma-Aldrich», США) и флуоресцентной микроскопии. После воздействия 0,8 мМоль гадобутола при 19 Тл ТС инкубировали в растворе, содержащем кальцеин АМ и йодид пропидия (ПИ), при 37 °С в течение 1 ч. После промывки PBS ТС были анализированы методом флуоресцентной микроскопии («Nikon Eclipse Ti-E», Япония).

В исследованиях в магнитоакустическом поле 1-дневные ТС (16000 клеток / ТС) подвергались воздействию 0, 20, 50 и 250 мМоль гадобутола в течение 24 ч. Затем был добавлен набор «CellTiter-Glo 3D», и люминесценция регистрировалась после 60-минутной инкубации с использованием «VICTOR X3 Multilabel Plate Reader» («Perkin Elmer», США).

## **2.7 Анализ слияния тканевых сфероидов**

Анализ слияния ТС проводили с использованием микропланшетов «Corning spheroid microplates» («Corning», кат. № 4520). Изображения ТС получали с помощью микроскопа «Nikon Eclipse Ti-E». Контактные межсферные углы измерялись с помощью программного обеспечения «ImageJ 1.48 v» («NIH Bethesda MD», USA) и строились в зависимости от времени с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism» («GraphPad Software»). Измерения для каждого параметра были представлены в виде среднего значения  $\pm$  S. E. M.

В исследованиях в магнитном поле исследовались пары 3-дневных ТС с начальным числом клеток 8000 клеток помещали в контакт в концентрациях солей  $Gd^{3+}$  0, 50 и 250 мМоль и инкубировали в течение 7 дней. Изображения сфероидных дублетов были получены в точках 0 ч, 4 ч, 6 ч, 1 сут., 2 сут., 3 сут., 4 сут. и 7 сут.

В исследованиях в сильном магнитном поле пары ТС помещали в контакт с концентрациями гадобутола 0, 0,8 и 100 мМоль и инкубировали в течение 5 дней и далее получали изображения в моменты времени 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 и 24 ч.

В исследованиях в магнитоакустическом поле пары однодневных ТС (16000 клеток / ТС) помещали вместе в лунки и инкубировали с 0, 20 и 50 мМоль гадобутролом (Gd-DO3A-бутрол, «Gadovist», «Bayer Pharma AG», Германия) на 24 ч. Изображения были получены в точках 0, 2, 4, 6 и 24 ч.

## **2.8 Морфология тканевых сфероидов**

ТС фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом/PBS, а затем обрабатывали 1%-ным тетраоксидом осмия / PBS. Образцы обезвоживали путем вымачивания в серии растворов возрастающих концентраций этанола, окрашивали 1%-ным уранилацетатом / 70%-ным этанолом и погружали в смесь аралдит-эпон. Полутонкие срезы готовили на ультратоме LKB-III (Швеция), окрашивали 1%-ным толуидиновым синим и затем исследовали с помощью светового микроскопа («Leica DM 2500», Германия), оснащенного цифровой камерой («Leica DFC 290», Германия).

## **2.9 Гистология трехмерных композиционных материалов в виде мягких тканей**

Образцы, собранные из хондросфер в магнитном поле, фиксировали в 10%-ном буферном формалине (рН 7,4) в течение 24 ч, а затем погружали в парафин с температурой плавления + 54 °С («Биовитрум», Россия). Серийные срезы толщиной 5 мкм изготавливали с помощью микротомы «Microm HMS 740» («ThermoFisher Scientific», США), рутинно окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия) и затем покрывали средой Bio-Mount («Bio Optica Milano S.P.A.», Италия) перед гистологическим исследованием.

Образцы, полученные в сильном магнитном поле и магнитоакустическом поле, фиксировали в 4% растворе параформальдегида, забуференного PBS (PFA, кат. № P6148, «Sigma-Aldrich»), затем помещали в расплавленный 2% агарозный

гель (кат. № Am-0710-0.1, «Геликон», Россия) и, наконец, помещали в парафин («Merck», Германия). Для депарафинизации использовали ксилол и батарею нисходящих спиртов. Серийные срезы толщиной 4 мкм, полученные с помощью «Microtome Microm HM355S» («Thermo Fisher Scientific», США), помещали на стекло, покрытое поли-L-лизинном, и окрашивали гематоксилин-эозином («Sigma-Aldrich», Германия).

Образцы, полученные в условиях микрогравитации, фиксированные формалином, помещали в изготовленные на заказ агарозные формы для стереомикроскопии (Nikon SMZ18, Япония) и затем помещали в парафин («Биовитрум», Россия). Серийные срезы толщиной 4 мкм нарезали с помощью «Microtome HMS 740» («Thermo Fisher Scientific», США) и размещали на стекле, покрытом поли-L-лизинном. Депарафинизацию проводили в ксилоле и в нисходящей батарее спиртов, извлечение антигена проводили с использованием протеиназы К («Sigma-Aldrich», США) в течение 20 мин. Дальнейшие процедуры выполнялись автоматически в системе Autostainer 360 («Thermo Fisher Scientific», США). Протокол включал инкубацию в растворе, блокирующем пероксидазу (10 мин), в растворе, блокирующем белок (10 мин), 30 мин - с первичными антителами, 10 мин - с вторичными антителами и 5-минутную обработку 3,3'-диаминобензидином (DAB). Промывку осуществляли в Трис-буфере (pH 6,0) с Твином 20. Первичные поликлональные кроличьи антитела к крысиному и человеческому маркерам Ki-67 и каспаза-3 антитела (оба компании «Abbotec», США) использовали в разведениях 1: 100. Ядра окрашивали гематоксилином Майера. Наконец, срезы обезвоживали и помещали в Bio-Mount («Bio Optica Milano S.P.A.», Италия). Некоторые срезы обычно окрашивали гематоксилин-эозином («Биовитрум», Россия) и затем исследовали с помощью световой микроскопии («Nikon Eclipse Ti-E», Япония).

## **2.10 Тест жизнеспособности клеточного материала в трехмерных композиционных материалах**

Жизнеспособность клеток трубчатого ТКМ, изготовленного из ТС hbSMC, в исследованиях в магнитоакустическом поле, контролировали с использованием набора для окрашивания живых / мертвых клеток (кат. № 04511, «Sigma-Aldrich», США) в соответствии с протоколом производителя после 8 ч инкубации в сильном магнитном поле. Трубчатый образец инкубировали с раствором, содержащим ацетоксиметил флуорексона (кальцеина) (Calcein AM) и йодид пропидия (PI), при 37 °С в течение 30 мин. После промывания фосфатно-солевым буфером Дульбекко (PBS, кат. № 18912-014, «Gibco», США) трубчатый образец визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии («Nikon Eclipse Ti-S», Япония).

## **2.11 Оценка на биосовместимость трехмерных композиционных материалов из фосфатов кальция**

Субстанция для анализа цитотоксичности ТКМ ФК представляла собой культуральную среду, в которую был помещен скаффолд при 37 °С в течение 4 дней. Клетки SHED высевали в 96-луночный культуральный планшет в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/лунка. Каждая лунка содержала 100 мкл клеточной суспензии, планшет инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> для получения культуры перед монослоем. Затем 200 мкл культуральной среды, предварительно инкубированной с трехмерным скаффолдом, вставляли в экспериментальные лунки и 200 мкл свежей культуральной среды вставляли в контрольные лунки. Планшет инкубировали в течение дополнительных 72 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, после чего аспирировали 200 мкл супернатанта и в каждую лунку планшета добавляли 10 мкл 0,02% раствора резазурина в культуральной среде. Планшет возвращали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 6 ч, а затем регистрировали флуоресценцию при длине волны

возбуждения 555 нм с эмиссией, регистрируемой при 580 нм, с использованием многолучевого планшет-ридера VICTOR X3 («Perkin Elmer», США). Лунки содержали среду для культивирования клеток без каких-либо клеток и использовали для оценки фонового сигнала.

Биосовместимость ТКМ была исследована в отношении ТС SHED с помощью флуоресцентной микроскопии («NIKON SMZ18», США) и SEM (JSM-6510 LV, «JEOL», Япония). Однодневные ТС из клеток SHED инкубировали в тесном контакте с 3D-скаффолдом из ФК в течение 7 дней. Жизнеспособность клеток контролировали с использованием набора для окрашивания живых / мертвых клеток («Sigma-Aldrich», США) в соответствии с протоколом производителя. Этот анализ использовали для визуального определения того, остаются ли жизнеспособными клетки в ТС после культивирования с использованием ТКМ из ФК. После 7-дневного культивирования ТКМ с однодневными ТС из клеток SHED инкубировали с раствором, содержащим кальцеин АМ и йодид пропидия (PI), при 37 °С в течение 30 мин. После промывания PBS ТС визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии («NIKON SMZ18», США).

## **2.12 Анализ сокращения трубчатого образца трехмерного композиционного материала**

Чтобы оценить способность hbSMCs в полученных ТКМ сжиматься в ответ на добавление физиологического вазоконстриктора, они были инкубированы их с 50 нМоль эндотелина-1. Трубчатый ТКМ обрабатывали 50 нМоль эндотелином-1 (кат. № E7764, «Sigma-Aldrich», США). Сокращение образца регистрировали в точках 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120 и 180 мин с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-S. Площадь внутреннего отверстия трубчатого образца измеряли с использованием программного обеспечения Image J 1.48v («NIH, Bethesda, MD», США) и наносили на график как функцию времени с использованием программного обеспечения GraphPad Prism («GraphPad Software, Inc., La Jolla,

СА»). Агент вызывал зависящее от времени уменьшение площади внутреннего отверстия, указывая, что сократительный ответ произошел. Уменьшение площади просвета является показательным параметром для модели *in vitro* полого органа с мышечной стенкой.

### **2.13 Сканирующая электронная микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия образцов**

ТС и ТКМ из хондросфер помещали на поверхность электроспиннинговой полиуретанового матрикса и оставляли прикрепляться в течение 6 ч. Трубчатый ТКМ и ТС фиксировали в натрий-фосфатном буфере (PBS), содержащем 2,5 об./об.% глутаральдегида (кат. № G5882, «Sigma-Aldrich», США), подвергали дегидратации, высушиванию методом перехода критической точки на установке НКФ-2 («Hitachi Koki Ltd», Япония). Образцы переносили на металлическую заглушку с адгезивной поверхностью, покрывали золотом с помощью установки ионного напыления IB-3 («Eiko», Япония) и затем наблюдали с помощью микроскопа JSM -6510 LV («Jeol», Япония).

В исследованиях структуры и состава бактериальных конгломератов, выращенных в космосе, фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом и 3 раза промывали раствором PBS в течение 10 мин. Структуру агрегатов анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) и СЭМ. Клеточные нуклеоиды визуализировали с помощью SYBR Green I. Компоненты матрицы биопленки визуализировали с помощью FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain. Для получения изображений использовался конфокальный микроскоп Zeiss LSM 510Meta («Carl Zeiss», Германия) и объектив Plan-Apochromat 63 / 1,4 Oil DIC. Изображения были обработаны с использованием Zeiss LSM510 Meta Software Release 3.2. Для СЭМ агрегатные образцы готовили в соответствии со стандартной процедурой, используемой для биопленок, и покрывали распылением платиной толщиной 20 нм. Электронный микроскоп

Camscan S2 («Cambridge Instruments», Великобритания) в режиме SEI с оптическим разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ использовался для получения изображений. Изображения были получены с использованием программного обеспечения MicroCapture («SMA», Российская Федерация).

## **2.14 Просвечивающая электронная микроскопия образцов**

Для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ) образцы фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом в 0,1 Моль какодилатном буфере. Их держали в фиксаторе в течение 24 ч. Образцы промывали 0,1 Моль какодилатным буфером и фиксировали 1%-ным тетроксидом осмия в том же буфере, содержащем 1,5%-ный феррицианид калия, в течение 1 ч в темноте при 4 °С. Затем образцы обезвоживали в этаноле, инфильтрировали смолой Эпон в течение 2 суток, погружали в ту же смолу и полимеризовали при температуре 60 °С в течение 48 ч. Ультратонкие срезы получали с помощью ультрамикротомы Leica Ultracut UCT и монтировали на медные сетки с покрытием Formvar. Срезы окрашивали 2%-ным уранилацетатом в воде и цитратом свинца. Затем срезы наблюдали в электронном микроскопе Теснаі Т12, оснащённом ПЗС-камерой Eagle 4kx4k («Thermo Fisher Scientific», Нидерланды).

## **2.15 Электроспиннинг полиуретанового матрикса**

Полиуретан был предоставлен доктором Сюэцзюнем Вэнем (EG-85A, «Lubrizol», США). Электроспиннинг микроволокнистого полиуретанового матрикса проводился с помощью коммерческого лабораторного прибора Electrospinning Lab («Yflow», Испания) под напряжением 17 кВ. Расстояние между иглой, распыляющей раствор, и коллектором составляло 20 см, а скорость распыления раствора полимера – 1,3 мл/ч. Полиуретан растворяли до 17% концентрации в растворителях, содержащих 40% N,N-диметилформаида и 60%

тетрагидрофурана. После изготовления полиуретановые матриксы промывали в дистиллированной воде в течение 24 ч. Образцы полиуретанового матрикса округлой формы с диаметром 10 мм помещали в ячейки 24-луночного культурального планшета.

## **2.16 Определение плотности модельных объектов**

Плотность полистирольных шариков («Polyscience, Inc.», США, кат. № 64235) была определена путем приравнивания силы тяжести к силе плавучести. Помещали полистирольные шарики диаметром 170 мкм в контейнер с деионизированной водой, а затем в контейнер добавляли порошок декстрозы с последующим тщательным перемешиванием. Постепенное регулирование концентрации декстрозы в растворе обеспечивало плавание шариков в объеме воды, не погружаясь и не всплывая на поверхность. Таким образом, была получена плотность полистирольных шариков, соответствующая – 1,0405 г/см<sup>3</sup>.

## **2.17 Анализ термочувствительного неадгезивного гидрогеля**

### **2.17.1 Оценка влияния геля на жизнеспособность тканевых сфероидов**

Чтобы обеспечить безопасную доставку жизнеспособных ТС с Земли в космос, был использован коммерчески доступный термообратимый неадгезивный биосовместимый гидрогель Mebio1 («Cosmo Bio», Япония). Поскольку во время доставки на МКС ТС необходимо включать в гель Mebio1 на несколько дней, было оценено потенциальное токсическое действие геля Mebio1 на ТС. Было разработано устройство, обеспечивающее безопасную доставку жизнеспособных ТС с Земли в космос, которое предотвращает нежелательное преждевременное слияние и распластывание (расхождение, растекание) ТС при транспортировке в космос. Выращенные в течение 2-х дней ТС помещали в Mebio1 гель при комнатной

температуре на 72 ч. Контрольные ТС инкубировали в полной культуральной среде при 37 °С во влажной среде, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность ТС оценивали с использованием набора CellTiter-Glo 3D в соответствии с протоколом производителя. При использовании набора CellTiter-Glo 3D люминесценция регистрировалась через 60 мин инкубации с использованием многоканального планшет-ридера VICTOR X3 («Perkin Elmer», США).

Качественную оценку жизнеспособности клеток в ТС проводили с использованием набора для окрашивания живых / мертвых клеток Live/Dead Cell Double Staining Kit («Sigma-Aldrich», США) в соответствии с протоколом производителя. ТС инкубировали в растворе, содержащем краситель кальцеин АМ и пропидиум йодид (PI), при 37 °С в течение 1 ч. После промывания PBS ТС визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии («Nikon Eclipse Ti-E», Япония).

### **2.17.2 Реологическое тестирование**

Реологические измерения проводились в режиме колебательного сдвига с использованием ротационного реометра Anton-Paar MCR 501. Образцы чистого раствора Mebiol и рабочего раствора помещали между конусом (КФ50-1 / TG-SN15826; d = 0,05 мм) и пластиной диаметром 50 мм с зазором 0,5 мм. После охлаждения до + 4 °С края покрывали минеральным маслом для предотвращения обезвоживания. Температурная зависимость модуля накопления (G'), модуля потерь (G'') и комплексной вязкости ( $\eta^*$ ) измерялись с помощью температурной развертки (колебания) путем увеличения температуры от + 4 до + 37 °С при скорости нагрева + 5 °С/мин. Частота и деформация сдвига поддерживались постоянными на уровне 10 рад/с и 1% соответственно. В каждой группе были измерены по двадцать образцов.

## **2.18 Механические испытания тканевых сфероидов**

Механические свойства ТС измеряли методом сжатия между двумя параллельными пластинами в испытательной системе Microsquisher («CellScale», Канада) с использованием программного обеспечения SquisherJoy. Для тестирования ТС формировали с помощью микропланшетов Corning spheroid. ТС культивировали 3 дня, а затем помещали в питательные среды с различной концентрацией парамагнетика в течение 24 ч до начала испытаний на механические характеристики. Для механических испытаний ТС помещали в заполненную PBS ванну при температуре 37 ° C и сжимали до 50% деформации в течение 20 с. В зависимости от жесткости и чувствительности, необходимых для измерения ТС из различных типов клеток, использовались микропучки диаметром 152,4 мкм (рекомендуемая максимальная сила 57 мН) и 304,8 мкм (рекомендуемая максимальная сила 917 мН). Данные о силе смещения, полученные в результате испытания на сжатие, были преобразованы в кривые напряжения-деформации, а нижняя часть кривой (деформация 0-20%) была использована для получения линейной линии регрессии и оценки условного модуля упругости. В каждой группе были измерены двадцать образцов ТС.

## **2.19 Окрашивание альциановым синим**

Фиксированные ТС промывали PBS и окрашивали в течение ночи 1% раствором альцианового синего. Результаты исследовали с использованием инвертированного светового микроскопа AxioVert 2 («Zeiss»), оснащенного DSLR-камерой Nikon D610 («Nikon»).

## 2.20 Иммуногистохимическое окрашивание на коллаген II типа

Визуализацию коллагена типа II в ТС осуществляли с использованием набора системы обнаружения концентрированной пероксидазы Novocastra™ (код продукта RE7130-K, «Leica Microsystems») в соответствии с протоколом производителя. Срезы ТС подвергали извлечению антигена путем инкубации в теплом растворе (37 °C) трипсина в течение 30 мин. После промывки секций в деионизированной воде эндогенную пероксидазу нейтрализовали с помощью блока пероксидазы Novocastra™ (код продукта RE7101, «Leica Microsystems»). Неспецифическое связывание первичных и вторичных антител снижалось с помощью белкового блока Novocastra™ (код продукта RE7102, «Leica Microsystems»). Затем срезы инкубировали в течение 1 ч с оптимально разбавленным первичным антителом к коллагену типа II (код продукта NCL-COLL-Pr, Novocastra™, «Leica Microsystems») с последующей 30-минутной инкубацией с биотинилированным вторичным антителом (концентрированным биотинилированным вторичным антителом Novocastra™ (код продукта RE7108, «Leica Microsystems») и 30-минутную инкубацию с конъюгатом стрептавидин-HRP Novocastra™ (код продукта RE7109, «Leica Microsystems»), конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (HRP), который связывается с биотином в молекуле антитела. Пероксидазная активность исследовалась с DAB (хромогенный субстрат HRP 3,3'- диаминобензидин), который был свежеприготовлен с использованием Novocastra™ DAB Chromogen (код продукта RE7105, «Leica Microsystems») и Novocastra™ субстратный буфер (код продукта RE7106, «Leica Microsystems»). После каждой инкубации (с блоком пероксидазы Novocastra™, блоком белка Novocastra™, первичным антителом, вторичным антителом и концентрированным стрептавидином-HRP Novocastra™ срезы промывали в 0,5 Моль Трис-буфере, pH 7,6 («Sigma», США) в течение 5 мин. Наконец, срезы промывали в дистиллированной воде, окрашивали гематоксилином Novocastra™ (код продукта RE7107, «Leica Microsystems»), пропускали через серию

возрастающих концентраций этанола (70%, 80%, 90%, 96%, 100%), инкубировали в ксилоле и погружали в «Канадский бальзам» (Canada balsam).

### **2.21 Визуализация бактериальных конгломератов**

Бактерии, выращенные в «магнитной ловушке», фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом и промывали PBS 3 раза в течение 10 мин. Структуру агрегатов анализировали с помощью КЛСМ и СЭМ. Клеточные нуклеоиды визуализировались с помощью красителя SYBR Green I. Компоненты матрицы биопленки визуализировались с помощью красителя FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain. Для получения изображений использовались конфокальный микроскоп Zeiss LSM 510Meta («Carl Zeiss», Германия) и объектив Plan-Apochromat 63/1,4 Oil DIC. Изображения обработаны с использованием программного обеспечения Zeiss LSM 510Meta версии 3.2. Для СЭМ образцы агрегатов готовили в соответствии со стандартной процедурой, используемой для биопленок [149], и покрывали распылением платиной толщиной 20 нм. Для получения изображений использовался сканирующий электронный микроскоп Camscan S2 («Cambridge Instruments», Великобритания) в режиме SEI с оптическим разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ. Изображения получены с использованием программного обеспечения MicroCapture («SMA», Российская Федерация).

### **2.22 Оценка жизнеспособности бактерий в условиях магнитной левитации**

Жизнеспособность бактерий в конгломератах определяли путем окрашивания клеток с помощью набора молекулярных зондов для оценки жизнеспособности бактерий Live / Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes). Бактерии культивировали в течение трех дней в соответствующей парамагнитной питательной среде в условиях магнитного поля. После трех дней культивирования

*in vitro* агрегаты трижды промывали PBS и разрушали встряхиванием в течение 30 с для получения суспензии клеток. Суспензии клеток инкубировали в течение 15 мин в PBS, содержащем флуоресцентный краситель SYTO™ 9 (2,5 мкМоль) и йодид пропиди (4 мкМоль). Окрашенные клетки наблюдали с использованием микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом CFI Plan Apo VC 20 × 0,75. Для количественной оценки живых и мертвых бактерий была использована нейронная сеть U-Net сверточной архитектуры, учитывающая функцию потерь с мерой симметричности Дайса [150]. Сеть была обучена на 100 микроскопических изображениях с микроорганизмами, которые были обработаны человеком. Предсказание сети представляло собой матрицу с вероятностью расположения микроорганизма для каждого пикселя исходного изображения. Затем области с вероятностью, превышающей 0,98, были подсчитаны по алгоритму «Сузуки-Абэ» (Suzuki-Abe) [151].

### **2.23 Анализ подвижности бактерий**

Анализ подвижности проводили следующим образом. Для посева в пробирки (шприцы) объемом 50 мл, наполненные бульоном LB, были использованы культуры *E. coli*, культивированные на стандартных чашках Петри в LB на протяжении 12 ч. Посев проводился с помощью бактериальных игл. Подвижность рассчитывали, как средний диаметр пятна, измеренный на разных глубинах через 16 ч после посева. Средние значения, взятые из каждого из трех экспериментов, использовались для расчета среднего значения и стандартного отклонения.

### **2.24 Анализ данных**

Статистические данные анализировались с помощью программного обеспечения GraphPad Prism («GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA») и представлялись в виде среднего значения ± S. E. M. Дисперсионный анализ

(ANOVA) использовался для выявления достоверных различий между средними значениями трех групп с  $P < 0,0001$ .

## **2.25 Заключение по Главе 2**

Во второй главе были продемонстрированы способы и методы, используемые в работе по формированию ТС, их характеристика и оценка ТКМ. В следующей главе будут приведены разработанные и созданные лабораторные экспериментальные стенды и представлены способы формирования ТКМ.

### **Глава 3 РАЗРАБОТКА СТЕНДОВ ДЛЯ МАГНИТНОГО, АКУСТИЧЕСКОГО И МАГНИТОАКУСТИЧЕСКОГО ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ**

В данной главе приведены системы магнитного, акустического и магнитоакустического формирования, разработанные с использованием инструментов моделирования полей и возникающих в них процессов. Показано влияние размерных и конструктивных факторов на интенсивность полей и воздействий.

#### **3.1 Экспериментальные стенды для генерации магнитных полей**

Для создания условия формирования ТКМ в левитационных условиях необходимо создать так называемые «магнитные ловушки», а именно области пространства, где силы магнитного поля достаточны для удерживания и сборки материала из хаотично распределенных объектов сборки. Компоновка и размерные факторы магнитной системы могут значительно влиять на конфигурацию магнитного поля при формировании «магнитной ловушки». Одним из ключевых факторов является расположение и ориентация магнитных элементов в системе. Конфигурация магнитного поля в «магнитной ловушке» может быть оптимизирована и настроена с помощью компьютерного моделирования и экспериментальных исследований. Это позволяет определить оптимальные параметры компоновки и размеров магнитной системы для достижения требуемой конфигурации магнитного поля.

В качестве основных вариантов магнитных систем рассмотрены случаи с использованием цилиндрических, концентрических и кольцевых постоянных магнитов (рисунок 3.1.1), а также электромагнит Биттера.

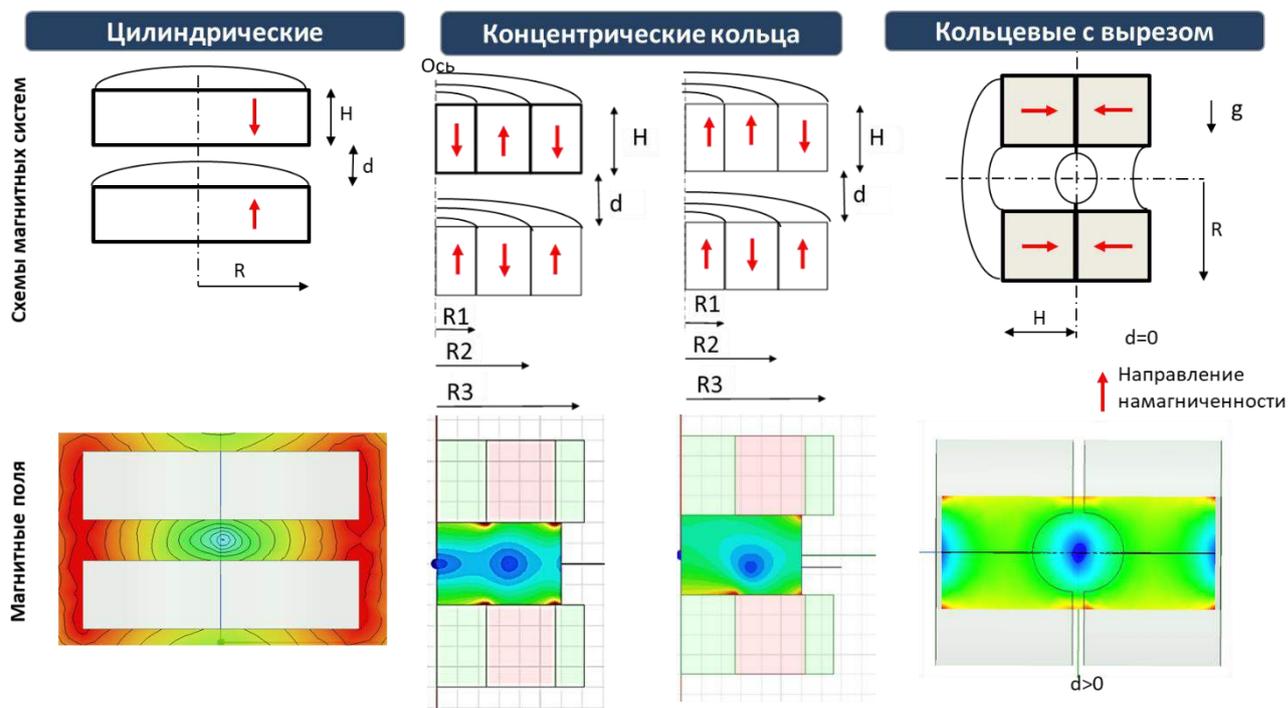


Рисунок 3.1.1 - Основные варианты магнитных систем из постоянных магнитов

Для отработки способов направленного формирования в магнитных системах в качестве модельных объектов выбраны полистироловые шарики, которые по своим физическим свойствам наиболее близки к ТС (по диаметру, плотности, диамагнитной восприимчивости, упругости и др.). Такой подход позволяет более точно исследовать процессы направленного формирования и определить условия для формирования изделий.

Принцип действия экспериментальных стендов предполагает создание локальной зоны микрогравитации, в которой компенсируются воздействия всех сил, действующих на объекты. Магнитная сила появляется только в том случае, если магнитное поле неоднородно. Это вызывает движение объектов от областей, где сильное магнитное поле. Магнитная сила применима для частиц с нейтральными зарядами, которые имеют относительную проницаемость, отличную от фоновой жидкости. Тогда эффективная магнитная сила  $F$ , действующая на объект в неоднородном магнитном поле, будет описываться следующим соотношением:

$$F_m = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \nabla(H^2), \quad (3.1.1)$$

где  $H$  - магнитное поле,  $\mu_f$  - относительная проницаемость жидкости,  $\mu_p$  - относительная проницаемость частицы (частиц),  $\mu_0$  - магнитная постоянная, а  $K$  определяется как:

$$K = \frac{\mu_p - \mu_f}{\mu_p + 2\mu_f}$$

Относительная проницаемость жидкости и частиц очень близка к 1, поэтому магнитная сила, действующая на частицы, приблизительно линейна с разницей между ними. Поскольку  $\mu > 1$  для парамагнетиков и  $\mu < 1$  для диамагнетиков, разница ( $\mu_p - \mu_f$ ) определяет направление действия магнитной силы. В результате объекты будут выталкиваться в область с меньшей напряженностью поля («магнитная ловушка») под действием магнитной силы. В условиях гравитации Земли уравнивание объектов происходит на определенном расстоянии от локального минимума магнитного поля.

Основным фактором, влияющим на магнитную силу, является градиент магнитного поля. Чем он больше, тем меньше необходимо добавлять парамагнитных веществ в жидкую среду для создания разницы магнитных восприимчивостей среды и объектов.

Условия левитационной сборки ТКМ приведены на рисунке 3.1.2, где  $F_m$  - магнитная сила,  $F_{st}$  - сила вязкостного трения (Стокса),  $F_a$  - сила Архимеда,  $F_g$  - сила гравитации.



Условия левитационной сборки:

1  $F_m = F_g - F_A$

2  $F_m > F_{st}$

3 «магнитная ловушка»

Рисунок 3.1.2- Условия магнитного формирования

Ниже приведен анализ влияния компоновки и размерных факторов магнитных систем на топологию магнитного поля.

### 3.1.1 На базе цилиндрических магнитов

Разработан и создан вариант с использованием магнитной системы, состоящей из двух цилиндрических неодимовых магнитов, расположенных одноименными полюсами друг к другу (рисунок 3.1.3). Картина магнитного поля приведена на рисунке 3.1.3 б,в,д, которая имеет «магнитную яму» на оси системы.

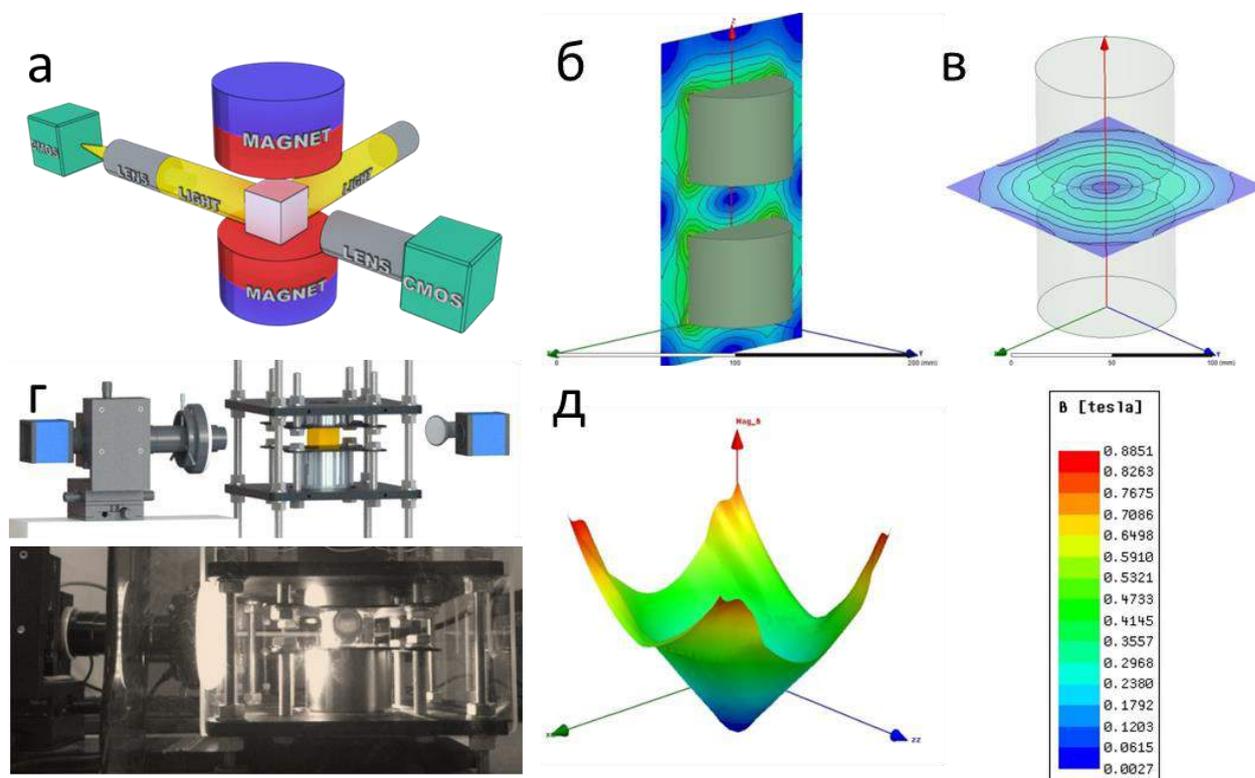


Рисунок 3.1.3 – Магнитная система из цилиндрических магнитов: а) принципиальная схема магнитной системы; б) магнитное поле в вертикальном сечении, образованное между двумя постоянными цилиндрическими магнитами; в) магнитное поле в вертикальном сечении; г) 3D модель и фото магнитной системы; д) трехмерный график значения магнитной индукции в рабочей зоне (вертикальное сечение)

Для анализа влияния габаритно-компоновочных факторов магнитной системы на конфигурацию магнитного поля проведено моделирование методом конечных элементов. Моделирование трехмерного неоднородного статического магнитного

поля в парамагнитной среде из системы постоянных магнитов проводилось с использованием программного обеспечения «ANSYS Electromagnetics Suite» для «Maxwell3D». Характеристики магнитного поля, использованные при моделировании, следующие: относительная проницаемость парамагнитной среды 1,00004135; и марка материала магнита NdFeB N 42 ( $B_r = 1,28$  Тл,  $H_{cb} = 12$  кЭ).

Проведено исследование зависимости индукции магнитного поля (рисунок 3.1.3) от параметров системы - зазор между магнитами, высота магнитов, радиус магнита согласно схеме, представленной на рисунке 3.1.1. Показано, что основным фактором, влияющим на увеличение градиента магнитного поля, является высота цилиндрического магнита до значений 30 мм с постепенным выходом на плато.

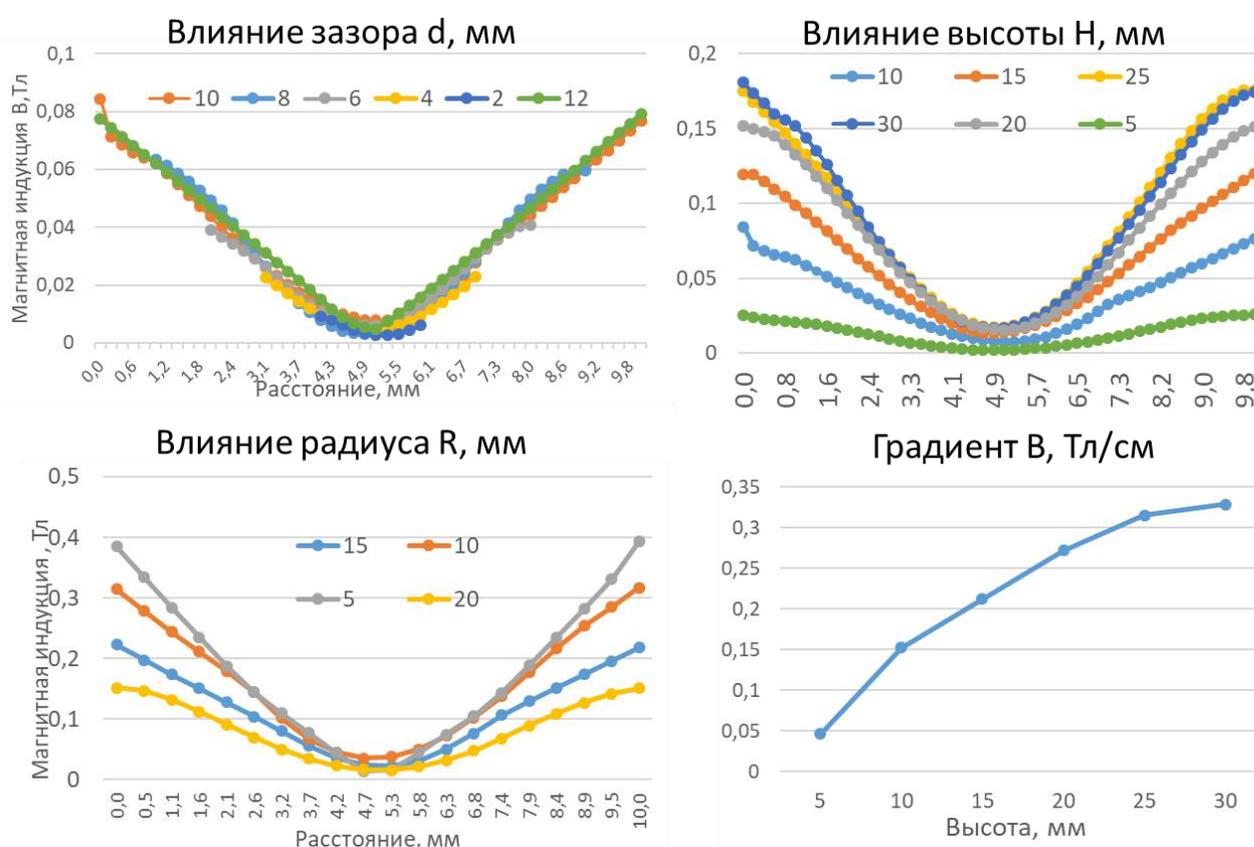


Рисунок 3.1.3- Магнитная индукция на вертикальной оси магнитной системы

С целью определения параметров формирования образцов использовался метод молекулярно-динамического (МД) моделирования. МД проводилось как описано в работах [43,152,153]. Использовано предположение, что все частицы в расчетах МД являются сферическими, имеющими одинаковый размер и массу. Для

моделирования динамики частиц диамагнитного полистирола в «магнитной ловушке» численно решена система уравнений Ньютона для всех частиц ( $1 < k < N$ )

$$m_p \frac{d^2 \mathbf{r}_k}{dt^2} = \sum_l F(|\mathbf{r}_{kl}|) \frac{\mathbf{r}_{kl}}{|\mathbf{r}_{kl}|} + \mathbf{F}_{kB} + \mathbf{f}_k + \mathbf{f}_g + \mathbf{f}_b, \quad (3.1.2)$$

где  $r_k$ - положение центра частицы  $k$ ,  $r_{kl} = r_k - r_l$  межчастичное расстояние. Первый член в правой части уравнения (3) - взаимодействие Леннарда-Джонса с другими частицами; второй член - взаимодействие с магнитным полем ловушки  $|\mathbf{F}_{kB}| = (\chi_p - \chi_s) B \nabla B$ , где  $\chi_p, \chi_s$ - магнитная восприимчивость частицы и раствора соответственно. Третий член - это сила вязкого трения о сплошную жидкость, которая определяется формулой Стокса,  $f_k = -3\pi \cdot d \cdot \eta \cdot u_k$  - вязкость суспензии гадобутрола,  $d$  - диаметр частицы и  $u_k = dr_k/dt$ - скорость частицы относительно неподвижной жидкости, четвертый и пятый члены- сила тяжести  $f_g$  и сила плавучести  $f_b$ , действующие на частицу. Численное моделирование проводилось для  $N = 100$ .

Результаты моделирования формирования образца и экспериментальные данные приведены на рисунке 3.1.4. Схожесть расчетов с экспериментальными данными приведена на графике (рисунок 3.1.4 б)

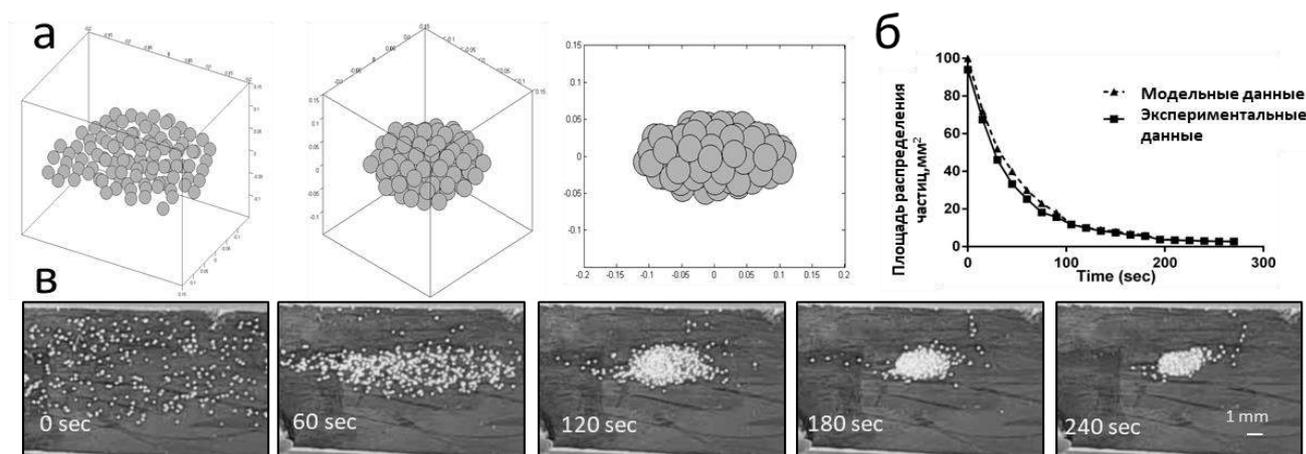


Рисунок 3.1.4 – Моделирование и экспериментальные данные формирования образцов из полистироловых шариков в жидкой парамагнитной среде с парамагнетиком (концентрация 250мМоль): а) процесс формирования при компьютерном моделировании. Количество частиц  $N=100$ ; б) кинетика формирования образцов смоделированных и экспериментальных данных; в) этапы левитационного формирования образцов из полистироловых шариков в эксперименте

Экспериментальные и расчетные данные показывают, что левитационное формирование образцов из объектов диаметром приблизительно 300 мкм при использовании подобного рода систем возможна только при использовании значительных концентраций парамагнетика в среде (250 мМоль). Снижение концентрации происходит при уменьшении зазора и достигает 100 мМоль при зазоре 1 мм, что является недостаточным для обеспечения рабочего пространства области формирования. Данные также подтверждаются существующими публикациями других авторов [154].

Левитационное формирование ТС в данной установке возможна, но концентрация парамагнетика оказывает неприемлемое токсическое действие на клетки. Процесс левитационного формирования ТС показан на рисунке 3.1.5.

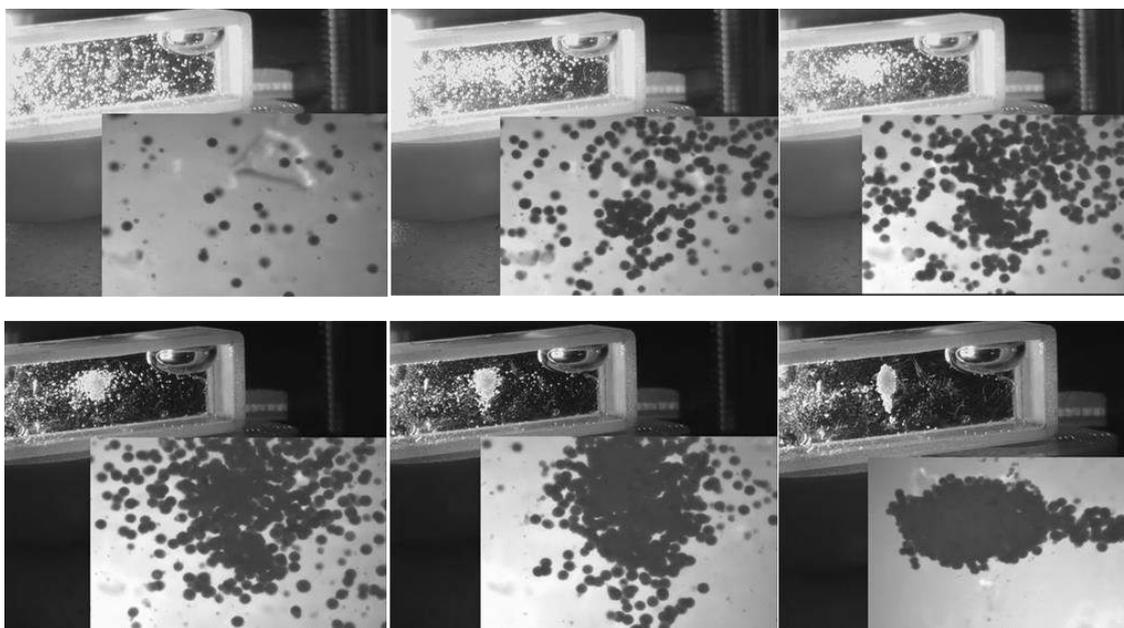


Рисунок 3.1.5 – Процесс левитационного формирования ТКМ из ТС в магнитной системе на базе цилиндрических магнитов. Изображение сфотографировано общим планом с кюветой и с увеличением

В процессе формирования наблюдались инерционные эффекты, связанные с торможением и инерцией движения ТС в «магнитной ловушке».

В следующих разделах будут приведены результаты вариантов, позволяющие решить задачу левитационного формирования ТКМ при сниженной концентрации парамагнетика в среде.

### 3.1.2 На базе concentрических кольцевых магнитов

«Магнитные ловушки» могут иметь тороидальную форму для формирования кольцевых образцов. Далее приведено исследование влияния компоновки и размерных факторов магнитной системы на конфигурацию магнитного поля при формировании тороидальной «магнитной ямы».

#### Первый случай с симметричной магнитной системой

Установлено, что тороидальная «яма» устойчиво возникает в системе из двух сборок, из трех concentрических колец каждая, намагниченных аксиально с попеременной полярностью. Схема подобной системы приведена на рисунке 3.1.6.

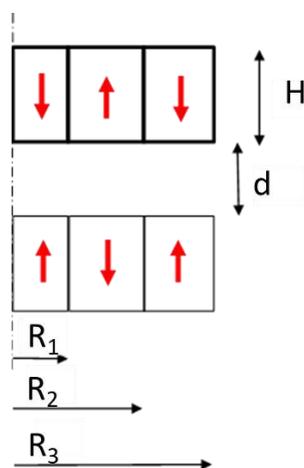


Рисунок 3.1.6 – Сечение магнитной системы, состоящей из трех concentрических колец (красная стрелочка указывает направление намагниченности)

Геометрия системы характеризуется тремя радиусами -  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$ , высотой магнитов  $H$  и зазором  $d$ . В расчетах использовались магнитные свойства NdFeB марки N42 ( $B_r = 1,28$  Тл,  $H_{cb} = 12$  кЭ). Ниже рассмотрено влияние зазора  $d$  магнитной системы на градиенты магнитного поля.

#### Случай с зазором $d = 4$ мм

Варьировалась высота магнитов  $H$ . При этом, для сохранения среднего диаметра тороидальной «ямы» равным 7 мм приходилось слегка варьировать диаметры колец. Из различных вариантов изменений  $R_1$  и  $R_2$  предпочтение отдавалось конфигурациям с более симметричными бортами «ямы» на графике

зависимости поля от радиуса. Пример распределения поля в модели показан на рисунке 3.1.7а.

Рассчитаны значения магнитного индукции для случаев с различной толщиной магнитов (оси координат проходят через точку нулевого поля):

- 1)  $H = 2$  мм,  $R_1 = 2,6$  мм,  $R_2 = 5,1$  мм,  $R_3 = 7,1$  мм;
- 2)  $H = 4$  мм,  $R_1 = 2,6$  мм,  $R_2 = 5,1$  мм,  $R_3 = 7,1$  мм
- 3)  $H = 6$  мм,  $R_1 = 2,5$  мм,  $R_2 = 5,4$  мм,  $R_3 = 7,1$  мм
- 4)  $H = 8$  мм,  $R_1 = 2,4$  мм,  $R_2 = 5,7$  мм,  $R_3 = 7,1$  мм.

Вычислены значения градиентов в центральной области в зависимости от толщины магнитов  $H$ , полученные зависимости показаны на следующем рисунке 3.1.7б.

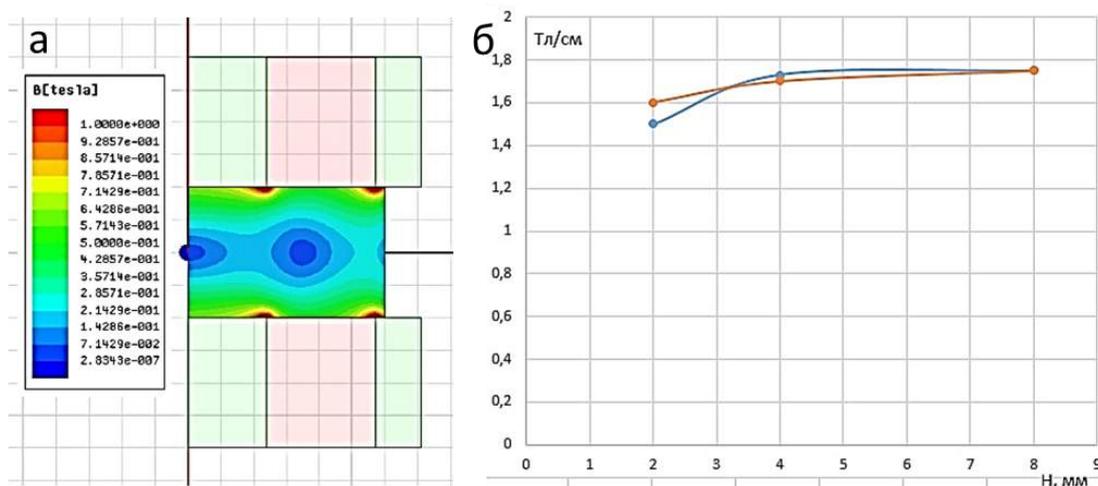


Рисунок 3.1.7 – Магнитное поле: а) картина магнитного поля; б) зависимость градиента в центральной области от толщины магнитов при зазоре 4 мм (по взаимно перпендикулярным осям)

Как видно, значения градиентов по взаимно-перпендикулярным направлениям близки между собой, при этом зависимость от толщины магнитов крайне слаба. Значения градиента вдоль аксиальной координаты вблизи магнитов достигают 4-5 Тл/см.

#### Случай с зазором $d = 6$ мм.

Также варьировалась высота магнитов  $H$ . При этом, для сохранения среднего диаметра тороидальной «ямы» равным 7 мм, варьировались  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$ .

Пример распределения поля в модели приведен на рисунке 2.1.8а.

Рассмотрены случаи:

1)  $H = 2$  мм,  $R_1 = 2,6$  мм,  $R_2 = 5,1$  мм,  $R_3 = 6,6$  мм.

2)  $H = 4$  мм,  $R_1 = 2,7$  мм,  $R_2 = 5,3$  мм,  $R_3 = 7,1$  мм.

3)  $H = 8$  мм,  $R_1 = 2,6$  мм,  $R_2 = 5,1$  мм,  $R_3 = 6,6$  мм.

Итоговый график зависимости величины градиентов в центральной области от высоты магнитов приведен на рисунке 3.1.8 б

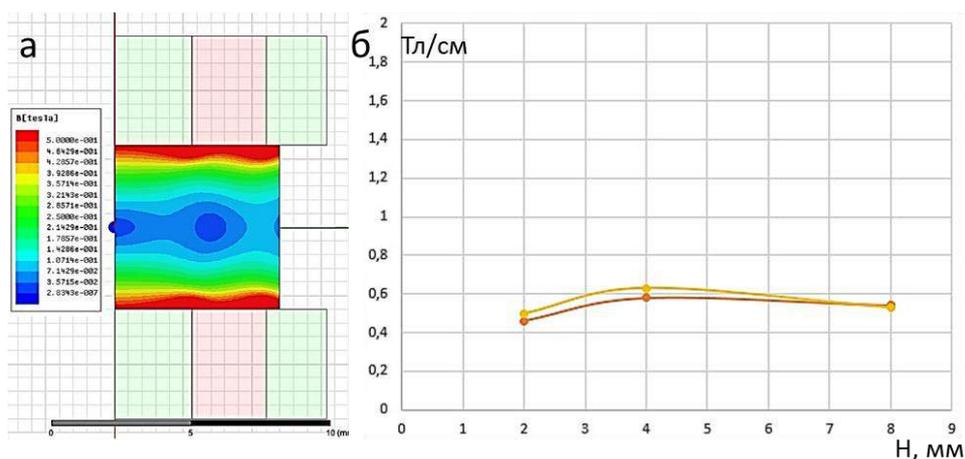


Рисунок 3.1.8 – Магнитное поле: а) картина магнитного поля; б) зависимость градиента в центральной части от толщины магнитов при зазоре 6 мм (по взаимно перпендикулярным осям)

### Случай с зазором $d = 10$ мм.

Аналогичным образом получена картина распределения поля (рисунок 3.1.9 а) и график градиента магнитного поля (рисунок 3.1.9 б) в зависимости от толщины магнитов.

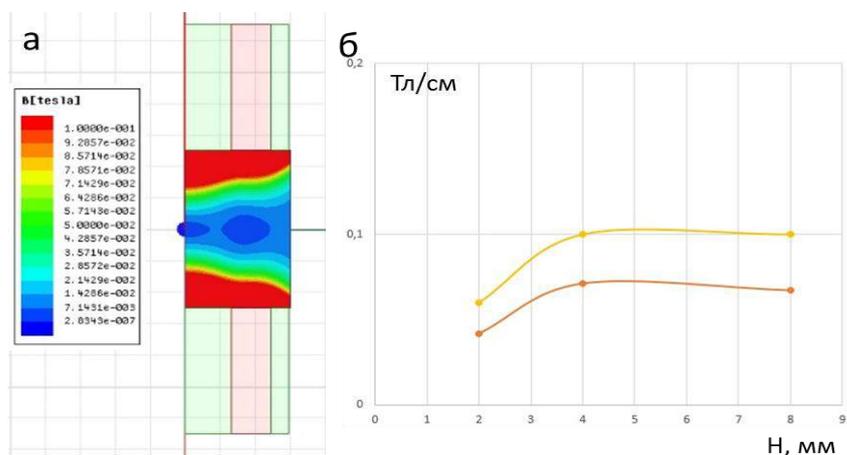


Рисунок 3.1.9 – Магнитное поле: а) картина магнитного поля; б) зависимость градиента в центральной части от толщины магнитов при зазоре 10 мм (по взаимно перпендикулярным осям)

Зазор  $d = 13$  мм.

В данном случае расчет производился только для толщины магнитов 4 мм; градиент в центральной области составил приблизительно 0,015 Тл/см.

Из анализа полученных результатов можно сделать вывод, что дальнейшее увеличение зазора приведет к еще большему уменьшению градиента магнитного поля, что не позволит обеспечивать требуемую магнитную силу, необходимую для формирования образцов.

На рисунке 3.1.10 представлен итоговый график зависимостей градиентов поля от зазора  $d$ , полученных в расчетах (толщина магнитов для всех точек составляет 4 мм). Ввиду крайне резкой зависимости градиентов от зазора использована логарифмическая шкала.

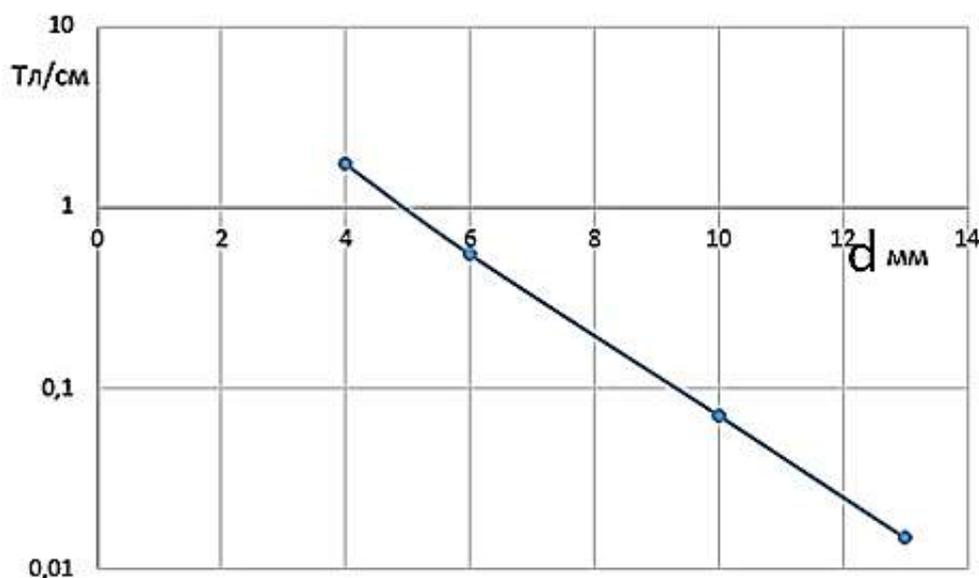


Рисунок 3.1.10 – Зависимость градиента в центральной части от зазора  $d$  между магнитными формированиями

### Второй случай с несимметричной магнитной системой

Принципиальным недостатком рассмотренных выше симметричных магнитных систем является наличие, помимо тороидальной «ямы», также «ямы» в центре рабочей области. Устранить минимум поля в центре рабочей области можно, применив магнитную систему, показанную на рисунке 3.1.11. Как видно из представленных далее иллюстраций и графиков, тороидальная «яма» смещается в этом случае от среднего сечения к одному из краев, и также нарушается ее

симметричность по аксиальной координате, но центральный минимум может быть полностью устранен.

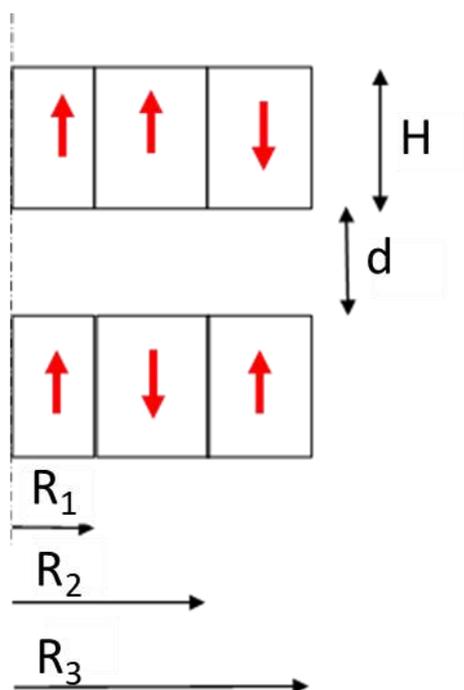
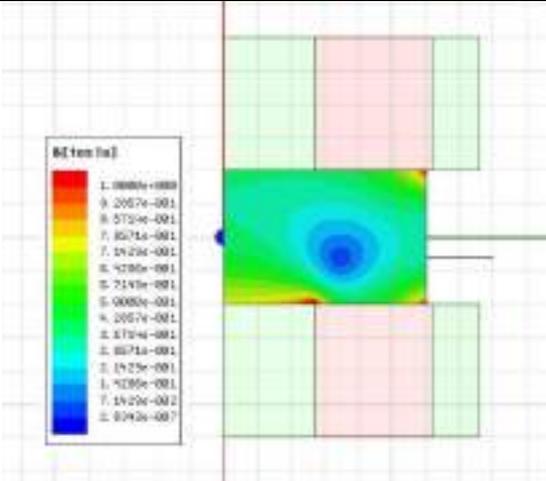
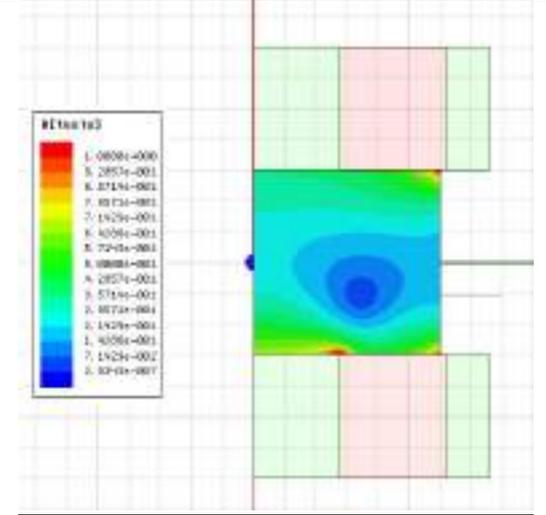
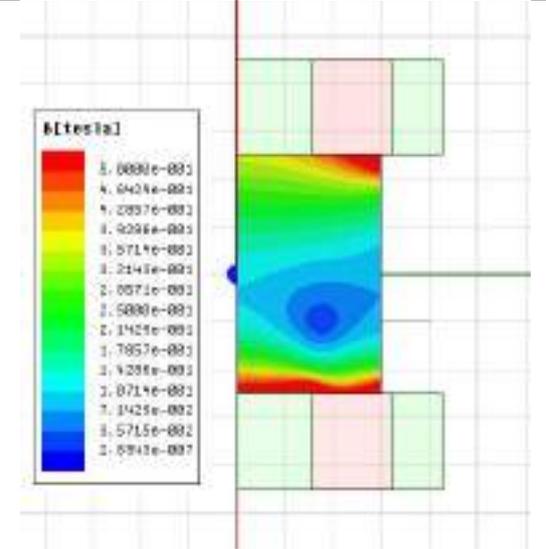
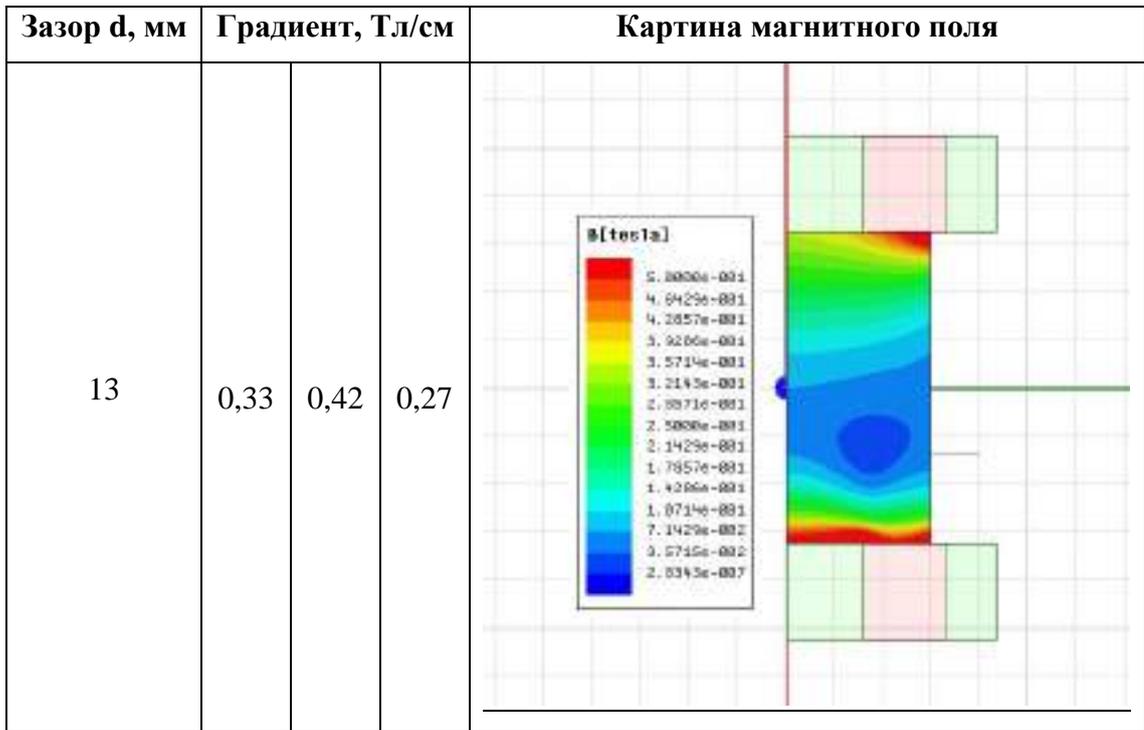


Рисунок 3.1.11. Сечение магнитной системы, состоящей из трех концентрических колец (красная стрелочка указывает направление намагниченности)

В таблице приведены эскизы расчетных моделей полей и расчетные графики модуля поля для ряда межполюсных зазоров. Ввиду слабой зависимости поля от толщины магнитов, что было показано в предыдущем разделе, толщина магнитов была во всех случаях равна 4 мм. Для каждого из зазоров путем серии расчетов подобраны соотношения радиусов магнитных колец, обеспечивающие правильный диаметр кольцевой «ямы». Для всех приведенных графиков средний диаметр тора близок к 7 мм. Так же были вычислены значения градиентов, данные приведены в таблице 3.1.1

Таблица 3.1.1 – Магнитные поля с тороидальной «магнитной ямой»

| Зазор d, мм | Градиент, Тл/см |      |      | Картина магнитного поля  |
|-------------|-----------------|------|------|--|
|             |                 |      |      |  |
| 4           | 2,40            | 2,46 | 2,10 |    |
| 6           | 1,40            | 1,58 | 1,16 |   |
| 10          | 0,60            | 0,67 | 0,44 |  |



По данным от картин магнитных полей получены значения градиента магнитного поля в зависимости от величины межполюсного зазора (рисунок 3.1.12). По вертикальной оси, как и ранее, использован логарифмический масштаб. Три линии на графике соответствуют, в порядке возрастания величины градиентов поля, аксиальному градиенту в направлении к ближайшему полюсу, радиальному градиенту и аксиальному градиенту в направлении к среднему сечению системы.

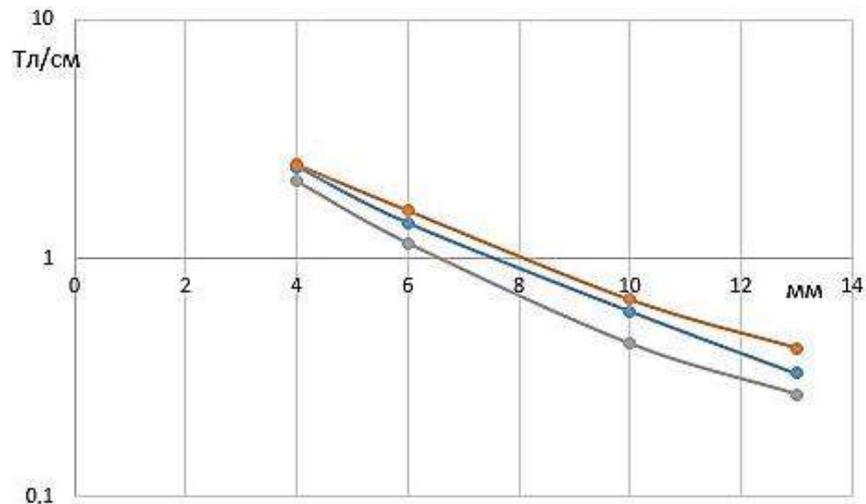


Рисунок 3.1.12 – Зависимость градиента в центральной части от зазора  $d$  между магнитными формированиями (цветами показаны градиенты по возрастанию градиента в аксиальном в сторону к ближнему полюсу, радиальном и аксиальном в сторону к среднему сечению системы)

Таким образом, для рассмотренной несимметричной системы при межполюсном зазоре  $d = 6$  мм ( $H = 4$  мм,  $R_1 = 2,8$  мм,  $R_2 = 6,2$  мм,  $R_3 = 7,6$  мм) менее реализуются параметры, необходимые для работы в поле тяжести, а при зазоре  $d = 13$  мм ( $H = 4$  мм,  $R_1 = 3,2$  мм,  $R_2 = 6,7$  мм,  $R_3 = 8,7$  мм) обеспечиваются градиенты, подходящие для работы в условиях невесомости.

Наличие тороидальной «ямы» в рассмотренной конфигурации магнитной системы достаточно устойчиво к вариациям геометрических размеров элементов системы. Однако, для соблюдения диаметра тора и обеспечения максимально возможных градиентов рекомендуется изготовление магнитов с повышенной геометрической точностью (не менее 0,05 мм).

Полученные данные говорят о принципиальной возможности образования условий формирования в магнитном поле образцов с тороидальной геометрией, однако диаметр подобных изделий составляет более 4 мм.

### **3.1.3 На базе сближенных вплотную кольцевых магнитов**

Разработана магнитная система (рисунок 3.1.13а) состоящая из системы 2-х кольцевых магнитов NdFeB (N52) со специальным вырезом. Внешний диаметр магнитов составляет 85 мм; внутренний диаметр - 18 мм; толщина (высота) - 24 мм. Магниты сближены одноименными полюсами друг к другу. Неоднородное магнитное поле создается в осевом отверстии магнитной установки (рабочей зоны).

Распределение значений магнитной индукции в вертикальном и горизонтальном сечении рабочей зоны показано на диаграмме 3D-модели (рисунок 3.1.13 б, в). Зависимость расстояния от левитирующего узла до центра магнитного поля от соотношения между магнитофоретической и гравитационной силой, действующей на частицы (регулируется концентрацией парамагнитной соли в среде), показана на рисунке 3.1.13 г. В центре конструкции перпендикулярно оси магнитных колец было сделано цилиндрическое отверстие для наблюдения за процессом фабрикации с помощью 2-х цифровых камер CMOS, источников света

и системы линз. Магнитная установка включает в себя также ферромагнитный экран, экранирующий магнитное поле во внешней среде.

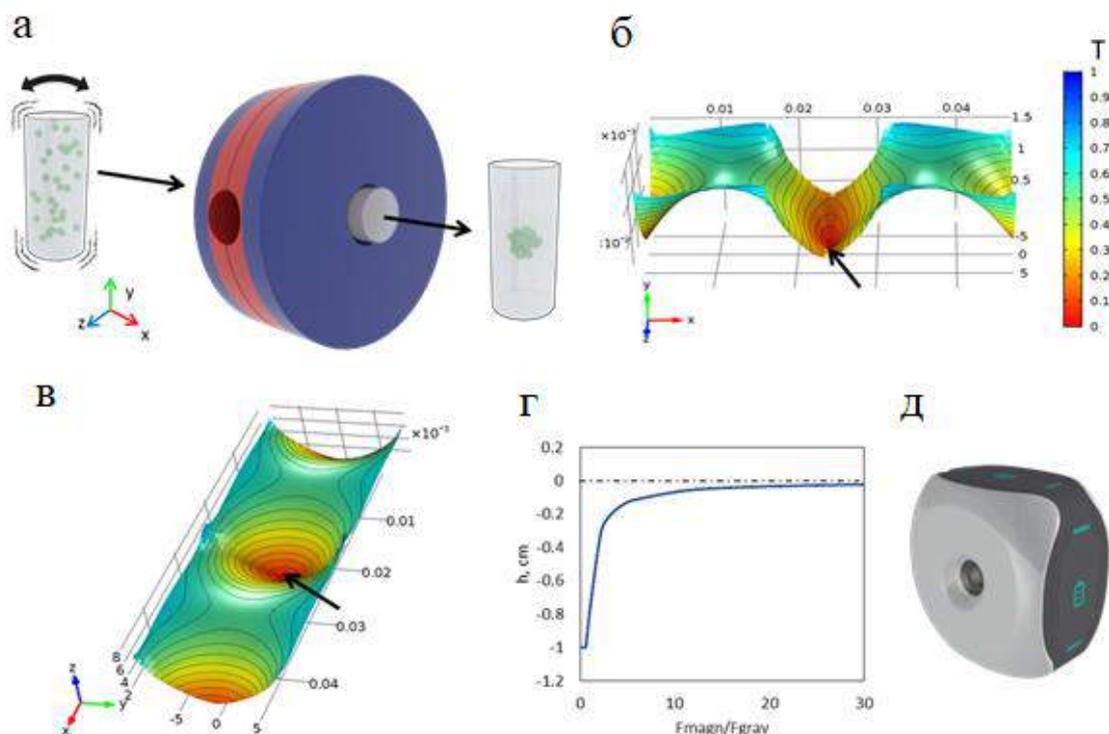


Рисунок 3.3.13 — Магнитная установка: а) схематическое изображение установки и изготовления скаффолда; б) горизонтальное сечение магнитного поля (стрелки показывают «магнитную яму»); в) вертикальное сечение магнитного поля; г) зависимость расстояния от левитирующего узла до центра магнитного поля от соотношения между магнитофоретической и гравитационной силой, действующей на частицы; (д) модель магнитного принтера [147]

Проведено исследование зависимости индукции магнитного поля (рисунок 3.1.14) от параметров системы - зазор между магнитами, высота магнитов, радиус магнита согласно схеме, представленной на рисунке 3.1.1. Показано, что основным фактором, влияющим на увеличение градиента магнитного поля, является зазор между кольцевыми магнитами. В случае отсутствия зазора между магнитами средний градиент магнитного поля достигает до 5,5 Тл/см.

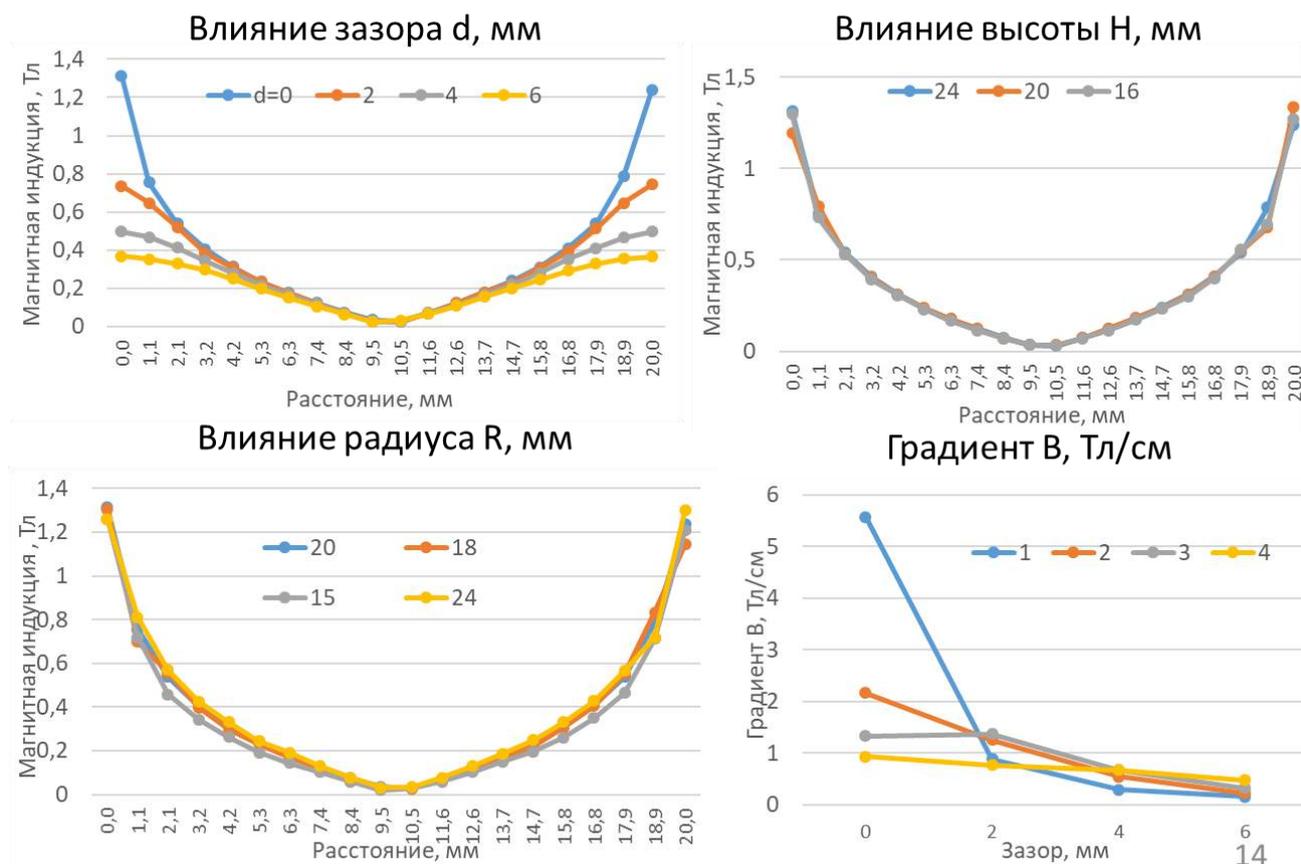


Рисунок 3.1.14 - Магнитная индукция на вертикальной оси магнитной системы

Для случая с неорганическим материалом внешний вид магнитной установки показан на рисунке 3.1.13 д.

Проведено моделирование трехмерного неоднородного статического магнитного поля с использованием многофизической вычислительной программы «COMSOL» методом конечных элементов. Характеристики, использованные при моделировании магнитного поля, были следующими: относительная проницаемость парамагнитной среды составляла  $\mu_f = 1,00027$ , материал класса NdFeB магнит N38 ( $V_G = 1,21$  Тл). Магнитное поле было рассчитано, а затем помещено уравнение траектории частиц поля. Переходный расчет траекторий частиц проводился с использованием «COMSOL», «Модуль отслеживания частиц». В ходе этого расчета учитывались следующие силы: магнитофоретическая сила, основанная на разнице между магнитной проницаемостью среды и частицы, сила сопротивления, влияющая на время формирования, сила упругости

взаимодействия частица-частица и сила тяжести. Из-за низких скоростей частиц закон сопротивления Стокса использовался для описания вязкого сопротивления. Физические характеристики частиц были такими же, как у частиц ФК: диаметр составлял 0,5 мм, плотность принималась равной  $2000 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ , форма частиц предполагалась сферической, а общее количество моделируемых частиц составляло 400. Несмотря на то, что плотность твердого ФК составляет  $2800 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ , частицы содержали пузырьки воздуха, которые уменьшали эффективную плотность. Особенности парамагнитной жидкости были найдены экспериментально и оказались следующими: плотность составляла  $1550 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ , динамическая вязкость составляла  $0,01 \text{ Па}\cdot\text{с}$ . Рассчитанные скорости частиц хорошо соответствовали экспериментальным данным.

С помощью компьютерного моделирования определены необходимая концентрация парамагнитного агента в буферном растворе и требуемая конфигурация магнитного поля, необходимая для обеспечения левитационного формирования. Моделирование также позволяет оценить форму образца, время формирования и высоту левитации (рисунок 3.1.15).

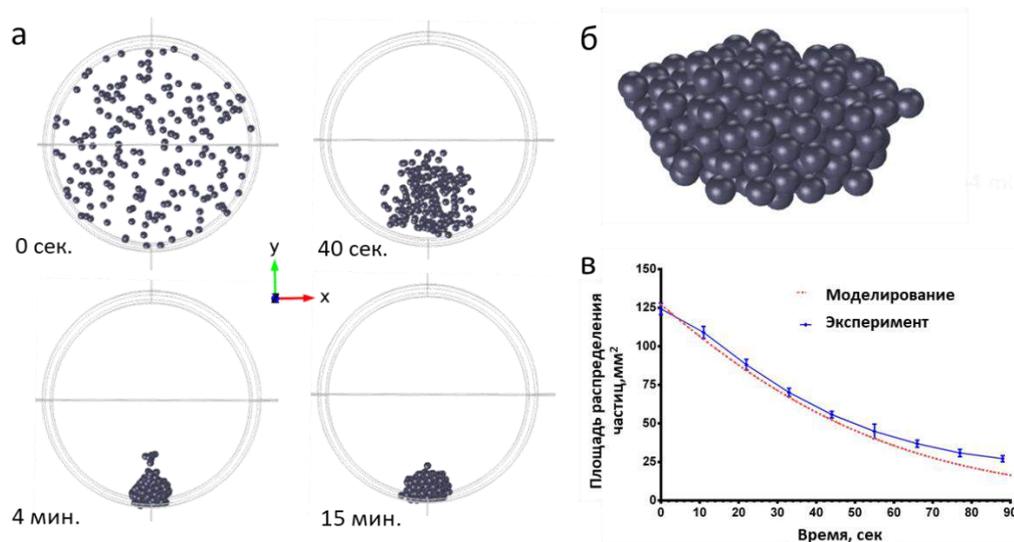


Рисунок 3.1.15 — Левитационное формирование ТКМ на основе ФК в парамагнитной среде с использованием магнитного поля (концентрация соли гадолиния составляет 3Моль): а) моделирование формирования объектов  $\alpha$ -ТКФ и формы ТКМ; в) кривые площади времени формирования при моделировании и в эксперименте, выделены красным и синим соответственно [147]

Высота формирования образца зависит от концентрации парамагнитной соли в среде, и, если она достаточно высока, генерируемая магнитофоретическая сила может преодолеть гравитацию и вызвать левитацию объектов. Из-за нелинейного изменения градиента магнитного поля в вертикальном направлении взаимодействие между магнитными и гравитационными силами, действующими на объекты, также зависит от высоты формирования. «Магнитная ловушка» наблюдается в центре области внутри магнитов, но из-за силы тяжести образец может быть размещен в области более высокого магнитного поля. Таким образом, величина магнитофоретической силы должна превышать силу тяжести, чтобы удерживать образец в центральной «магнитной ловушке». Увеличение этого соотношения приведет к увеличению высоты формирования скаффолда. Следует отметить, что точное компьютерное моделирование требует учета характеристик жидкости и частиц. Хотя плотность может быть определена довольно легко, магнитная проницаемость ФК не была известна. Вязкость среды в данных условиях оценивалась экспериментально: движение гранулы фиксировалось для определения ее скорости, а вязкость рассчитывалась по закону Стокса. В настоящем исследовании скорость была очень низкой, и поэтому число Рейнольдса было меньше 1. В этом случае удельное сопротивление жидкости было достаточно точно описано законом Стокса. Используя все другие известные параметры ФК и среды, магнитную проницаемость частиц можно рассчитать из сравнения времени формирования в пилотном эксперименте и компьютерного моделирования. Она равна  $\mu_r = 0,99999$ , что очень близко к значениям магнитной проницаемости кости.

Для формирования органических материалов разработана оригинальная лабораторная установка с конструкцией, показанной на рисунке 3.3.14 а,г. Установка состоит из 2-х CMOS -цифровых камер (DMK41AU02, «The Imaging Source Europe GmbH», Германия), источников света, линзовой системы (Optem ZOOM 70XL, «Qioptiq», Германия), которые монтируются на 3-х осевой системе позиционирования, собранной из 3-х линейных ступеней (TSX-1D, «Newport Corporation», США), магнитной системы из 2-х кольцевых магнитов NdFeB с вырезами для обеспечения визуализации и видеозахвата. Наружный диаметр

магнитов- 85 мм, внутренний- 20 мм, толщина (высота) - 24 мм. Магниты собраны таким образом, что они ориентированы друг на друга одинаковыми полюсами. Эта экспериментальная установка была помещена в инкубатор для обеспечения соответствующего температурного режима (37 °С) для обеспечения условий слияния клеточного материала.

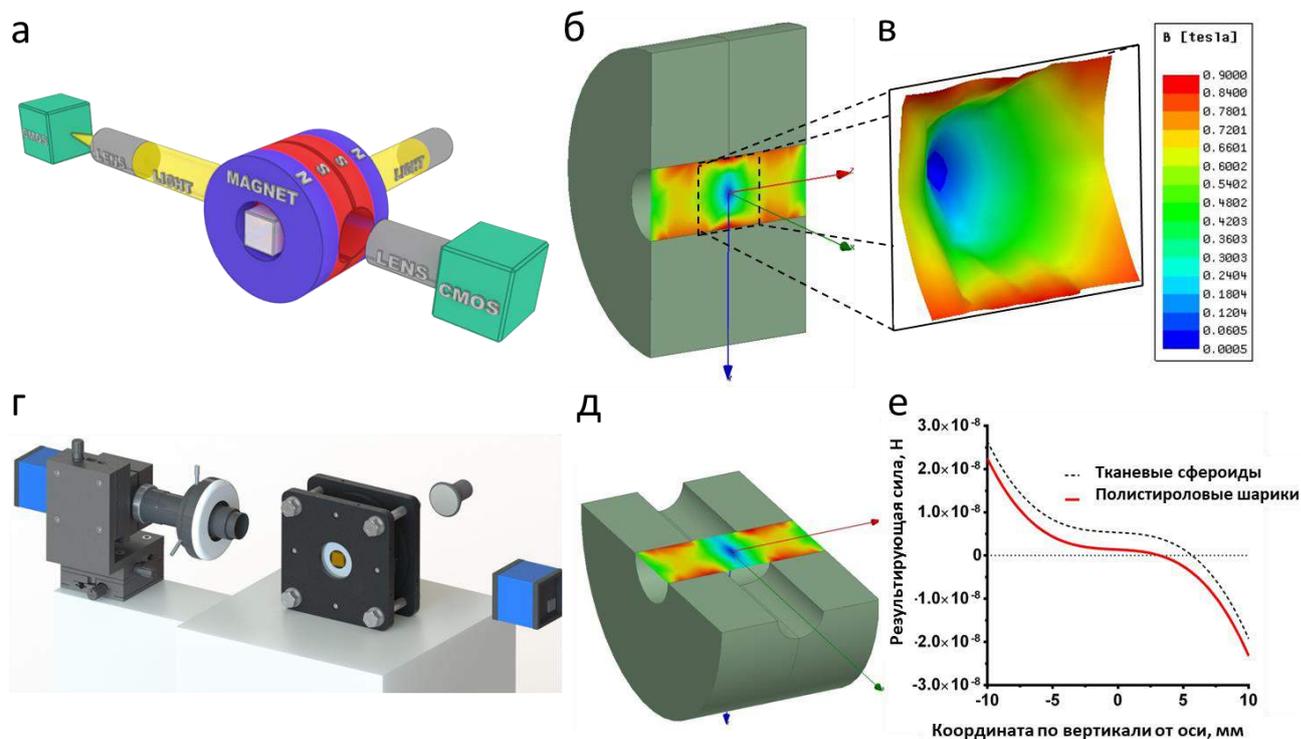


Рисунок 3.1.16 — Экспериментальная магнитная установка: а) принципиальная схема магнитной установки б) вертикальное поперечное сечение магнитного поля; в) вертикальное распределение вектора магнитной индукции в рабочей зоне; г) 3D - модель магнитной экспериментальной установки; д) горизонтальное поперечное сечение магнитного поля в рабочей зоне; е) график равнодействующей силы, действующей на вертикальную ось на объекты [40]

В осевом отверстии магнитной установки (рабочей зоне) создается неоднородное магнитное поле. Распределение значений магнитной индукции в вертикальном сечении рабочей зоны показано на графиках (рисунок 3.1.16 б,в,д и 3.1.17). Прозрачная стеклянная кювета размером 12 x 12 x 50 мм помещалась в отверстие магнитной системы. Кюветы были заполнены парамагнитной жидкостью, содержащей диамагнитные объекты. Парамагнитная жидкость состояла из среды DMEM с растворенными в ней  $Gd^{3+}$  в концентрациях: 0, 50

и 250 мМоль. Процесс левитационной сборки объектов фиксировался двумя видеокамерами с 1-кратным и 3-кратным оптическим увеличением.

В условиях гравитации Земли равновесие объектов происходит на некотором расстоянии от локального минимума магнитного поля. Стабильные условия левитации уравнивались на высоте, соответствующей градиенту магнитного поля 2,2 Тл/см.

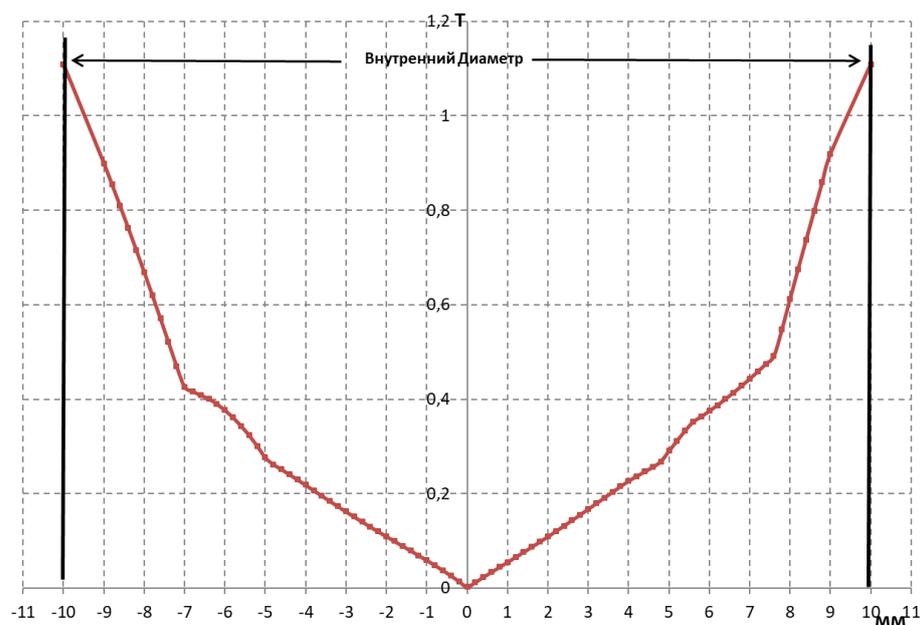


Рисунок 3.1.17 – Распределение магнитной индукции на вертикальной оси рабочей зоны магнитной системы

В результате расчетов были получены кривые (рисунок 3.1.16 е), на которых показана связь между проекцией на вертикальную ось результирующей силы, действующей на объекты (ТС и полистирольные шарики) в ходе эксперимента, и вертикальной координатой системы. Согласно исследованиям, высота, при которой равнодействующая сила равно нулю, имеет следующие координаты по вертикальной оси: 3,2 мм для полистирольных шариков и 5,6 мм для ТС. Можно сделать вывод, что результаты моделирования хорошо согласуются с экспериментальными данными.

Для оценки времени, формы и высоты формирования ТКМ в магнитном поле был использован метод МД моделирования. МД моделирование динамики частиц в «магнитной ловушке» проводилось для полистирольных шариков и ТС с

плотностями  $\rho=1,0405 \text{ г/см}^3$  и  $\rho=1,05 \text{ г/см}^3$  соответственно. Плотность среды принималась равной  $\rho=1,015 \text{ г/см}^3$ . На первом этапе частицы распределялись случайным образом в вычислительной области с начальной нулевой скоростью. Вычислительная область соответствует внутреннему объему экспериментальной ячейки -  $12 \times 12 \times 47 \text{ мм}$  (рисунок 3.1.18).

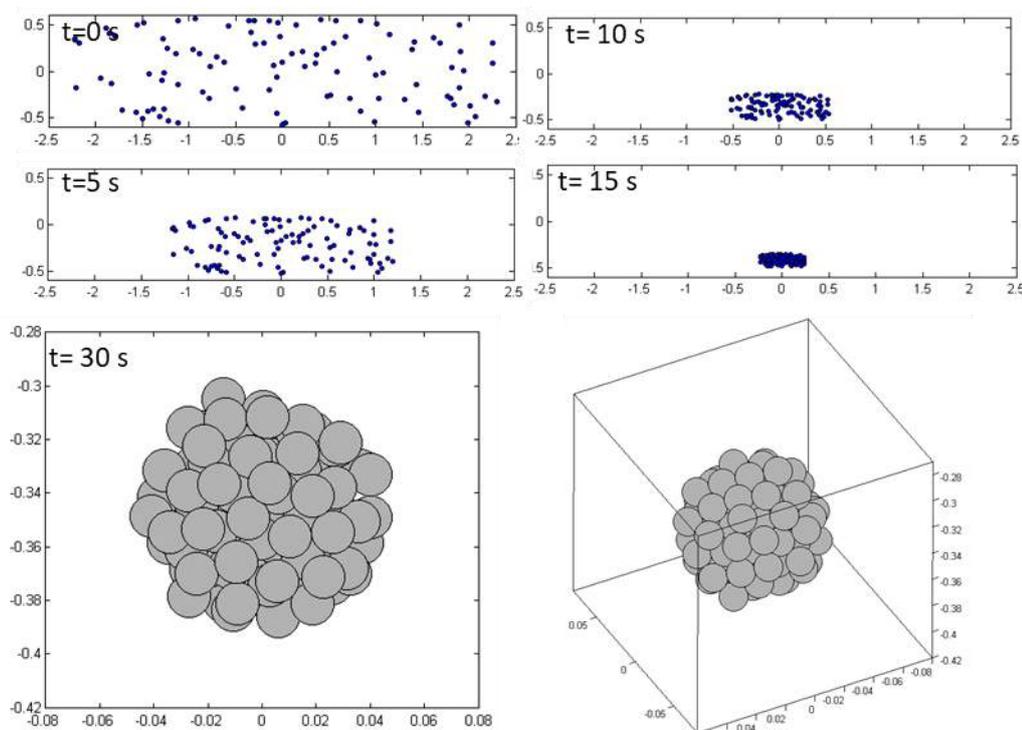


Рисунок 3.1.18 — МД-моделирование динамики хондросфер в «магнитной ловушке». Пошаговое формирование образца из полистирольных шариков

В МД моделировании для формирования кластера из полистирола частиц с диаметром  $d = 170 \text{ мкм}$  и ТС диаметром  $d = 350 \text{ мкм}$ , использовались  $\chi = -0.65 \cdot 10^{-6} \text{ см}^3/\text{г}$  и  $-0.72 \cdot 10^{-6} \text{ см}^3/\text{г}$ , соответственно. При достаточно большом  $N$  форма скопления становилась почти независимой от  $N$ , а соотношение толщины и диаметра скопления было близко к теоретическому значению соотношения между полуосями. Экспериментальные значения соотношения для полистирола и ТС были практически равны и соответствовали теоретическим значениям.

Конфигурации кластеров полистирольных шариков, полученные экспериментально, показаны на рисунке 3.1.19. Центр массы для структуры частиц полистирола, образованной имитацией МД, расположен на расстоянии  $3,5 \text{ мм}$  вниз от центра «магнитной ловушки».

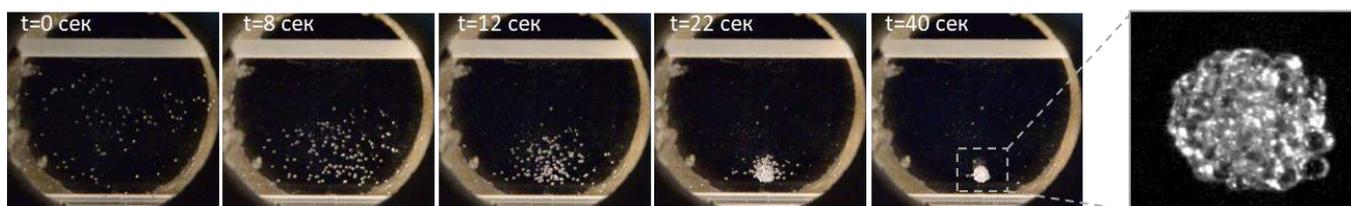


Рисунок 3.1.19 – Формирование образцов из полистироловых шариков в магнитном поле при концентрации парамагнетика 50 мМоль [40]

В следующем разделе будут рассмотрены пути уменьшения концентрации парамагнетика в жидкой среде.

### 3.1.4 На базе магнита Биттера

С целью уменьшения токсического эффекта парамагнетика на клеточный материал разработан вариант с использованием сильных магнитных полей.

Для создания сильного магнитного поля использовался 50-миллиметровый магнит Биттера мощностью 31 Тл (рисунок 3.1.20 а,б). Для обеспечения температурного режима 37 °С в рабочей зоне в магнит был помещен водяной термостат. Для размещения кюветы с материалом внутри рабочей зоны магнита использовался специально разработанный держатель (рисунок 3.1.20 в), который фиксировал кювету на определенной высоте и использовал систему зеркал и линз для наблюдения за процессом левитации и формирования объектов. Светодиоды были прикреплены к держателю для освещения рабочей зоны. В качестве кюветы использовалась стеклянная колба с пластиковой завинчивающейся крышкой. В кювету загружали объекты с питательной средой, содержащей различные концентрации парамагнетика (гадобутрола). Для видеорегистрации процесса формирования использовалась видеокамера.

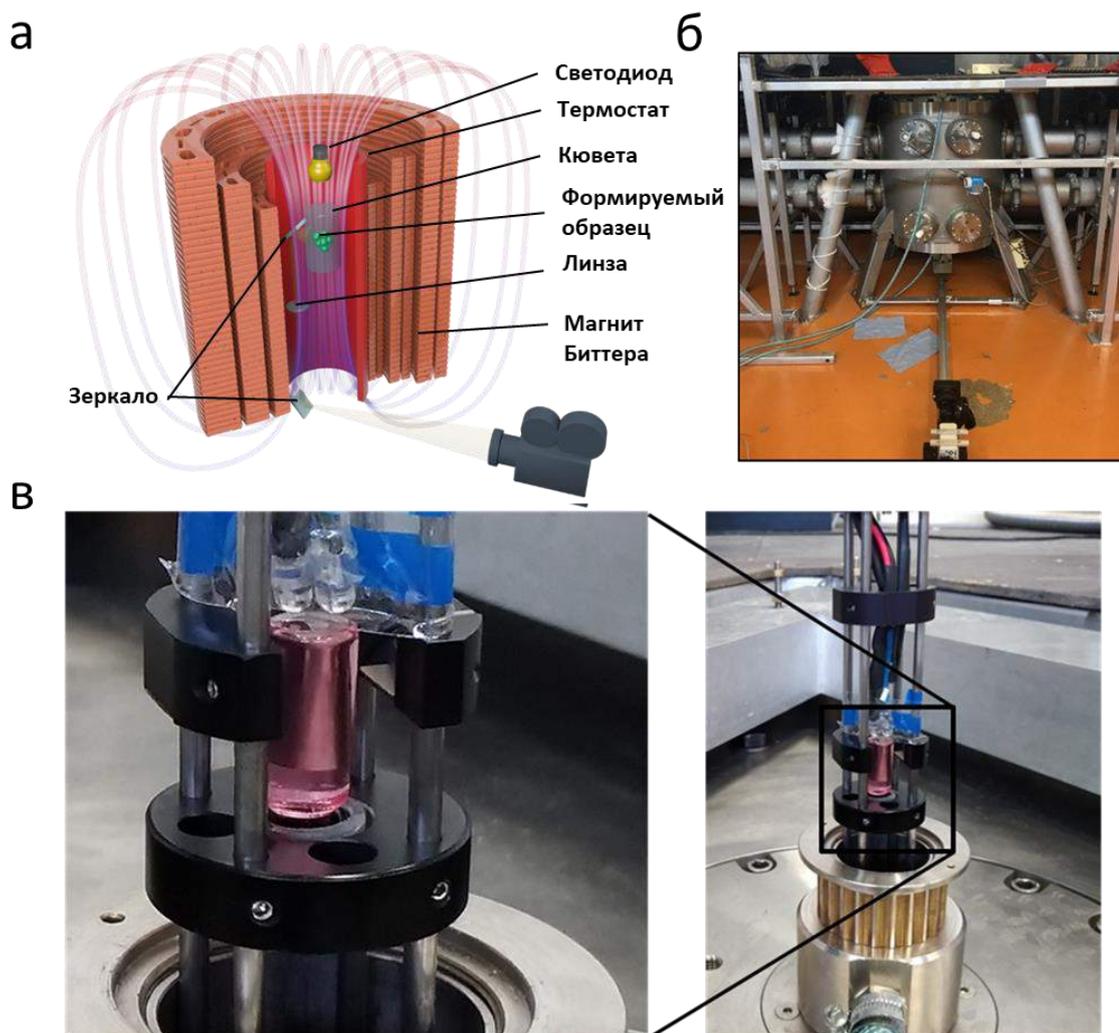


Рисунок 3.1.20 — Магнитная установка: а) схема магнитной установки магнита Биттера диаметром 50 мм, 31 Тл; б) фотография магнита Биттера; в) кювета с ТС в среде с гадобутролом, помещенная в специально разработанную установку [155]

Для моделирования левитационного формирования было рассчитано магнитное поле, создаваемое магнитом Биттера (рисунок 3.1.20 а). Оптимальное положение вдоль вертикальной оси магнита Биттера вычислялось по профилю поля в соответствии с методикой, описанной Берри и Геймом [42]. Стабильная зона была определена как  $88 \pm 6$  мм выше центра поля (рисунок 3.1.21).

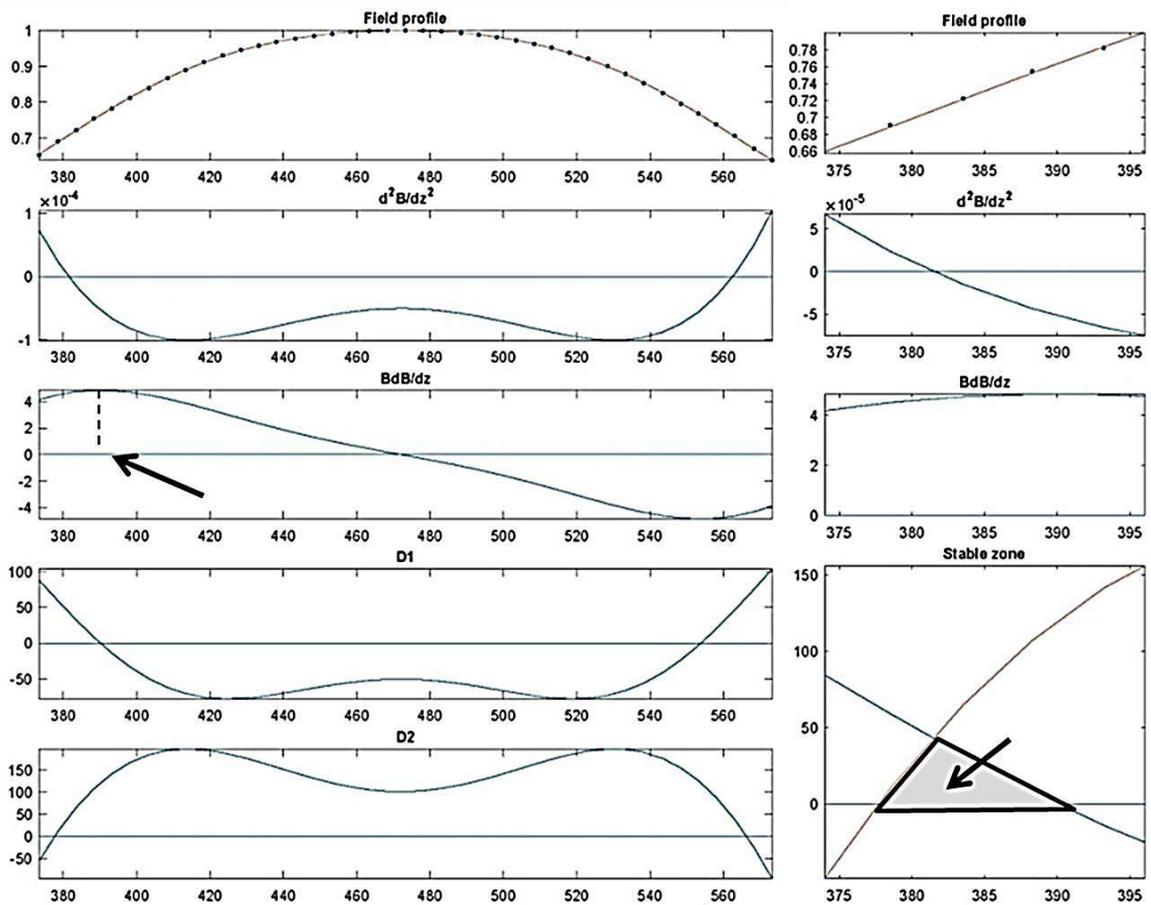


Рисунок 3.1.21— Характеристики магнитного поля в магните Биттера. Расчет зоны устойчивой левитации. (стрелки показывают зону вертикальной и горизонтальной устойчивости) [155]

МД моделирование проводилось с использованием алгоритма, описанного в предыдущем разделе. Вычислительная область соответствует внутреннему объему экспериментальной цилиндрической ячейки -  $R_7 \times 25$  мм.

МД моделирование показало, что объекты начинают агрегироваться через 4 мин, достигая стабильной конфигурации через 10 мин. Экспериментальные и смоделированные формы собранных образцов имеют хорошее сходство и выглядят в форме эллипсоида (рисунок 3.1.22 б,в). Шаги процесса формирования образцов показаны на рисунке 3.1.23.

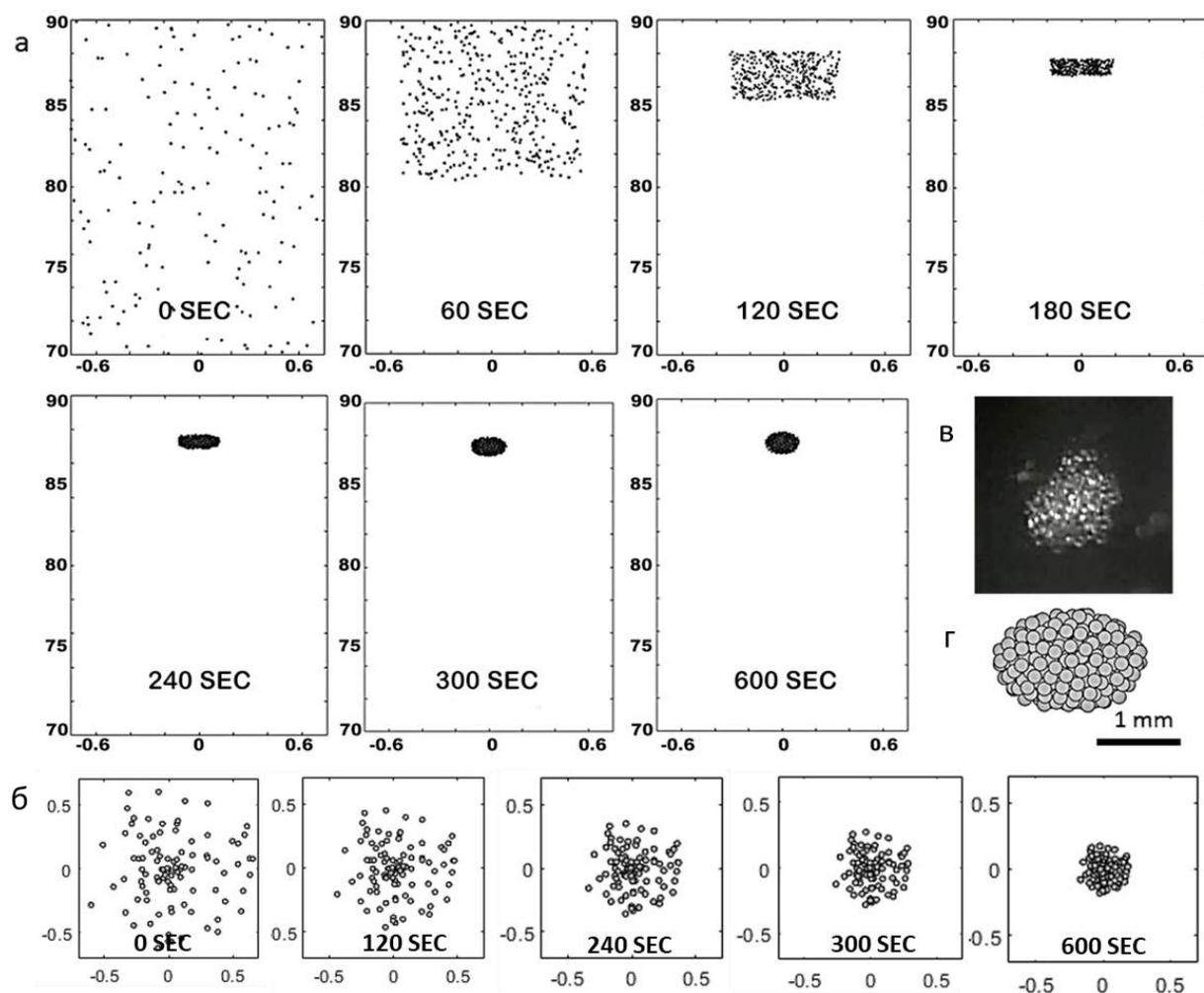


Рисунок 3.1.22 — МД моделирование формирования образцов в «магнитной ловушке» из полистирольных шариков. Количество шариков - 400, диаметр 175 мкм: а,б) этапы сборки при МД моделировании (вид сбоку и сверху); в) внешний вид образцов после экспериментального формирования; г) внешний вид образцов после модельного формирования. (Единицы измерения вдоль оси – см, вектор  $g$  ориентирован вертикально вниз) [155]

Процесс левитационного формирования образцов за счет магнитного поля происходил при напряженности магнитного поля 22 Тл в присутствии 0,5 мМоль гадобутрола. Формирование происходило в течении 10 мин (рисунок 3.1.23). Результаты магнитно-левитационного формирования образцов подтвердили прогностические математические модели и расчеты.

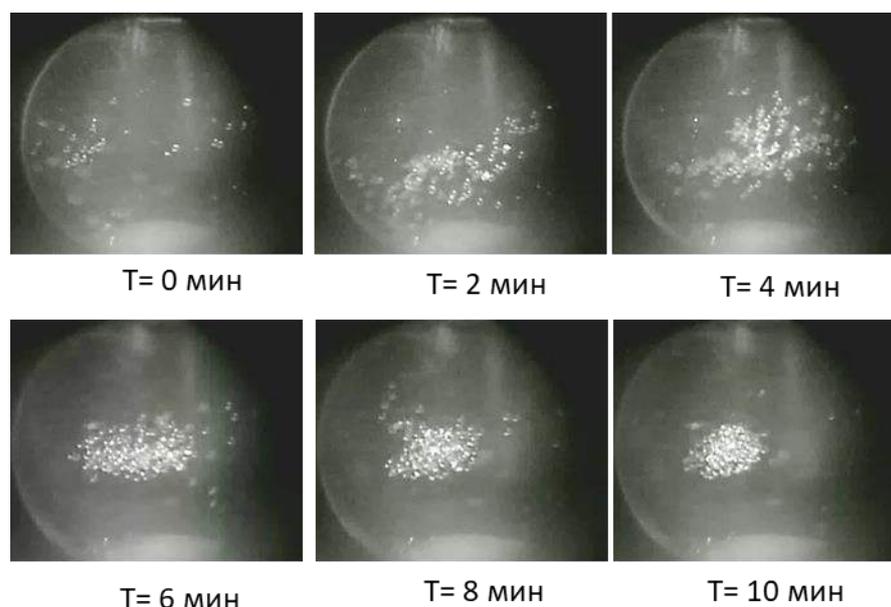


Рисунок 3.1.23 — Формирование образцов из полистироловых шариков под действием сильного магнитного поля (22 Тл) [155]

Далее будет рассмотрен вопрос использования акустических волн, как инструмента, в формировании ТКМ.

## 3.2 Экспериментальные стенды по генерации акустических полей

### 3.2.1 Акустическая радиационная сила

Разработка методов формирования ТКМ с использованием других физических полей (кроме магнитных) позволяет создать дополнительный инструмент, с помощью которого можно формировать структуры нового качества.

В данном разделе проведена разработка методики по формированию ТС в форме трубчатого образца только в акустическом поле без использования магнитов. Такой метод является более безопасным для клеток, так как полностью исключено токсическое воздействие парамагнитных солей, ТС со всех сторон окружены питательным раствором, а амплитуда акустического поля выбирается минимальной, чтобы не вызвать кавитацию или перегрев среды.

Для того чтобы придать случайно распределенным ТС форму трубки постоянного сечения, использовался цилиндрический пьезоэлектрический

преобразователь. Он представляет собой пьезокерамический цилиндр из пьезокерамики ЦТБС-3 с толщиной стенки 2,5 мм, внешним диаметром 33 мм и высотой 20 мм. К внешней и внутренней поверхностям пьезоцилиндра прикладывалось переменное электрическое напряжение с амплитудой порядка 10 В с генератора сигналов «Agilent» 33250А, и вследствие пьезоэффекта стенки цилиндра колебались в радиальном направлении на заданной частоте, создавая тем самым ультразвуковую волну. Во внутренней области такого пьезопреобразователя на резонансных частотах формировалось стоячее ультразвуковое поле. Структура поля звукового давления была с высокой точностью радиально симметричной: узлы и пучности формировали чередующиеся друг за другом цилиндрические области (рисунок 3.5.1 а). В вертикальном направлении структура поля не являлась полностью однородной: на границе пьезоэлектрика с жидкостью неизбежно возникают поверхностные волны Лэмба [156], являющиеся причиной вариации амплитуды излучаемого поля акустического давления.

Распределение давления внутри колеблющегося с частотой  $f$  цилиндра радиуса  $a$  описывается следующим образом [157]:

$$P(R) = \frac{P_0}{J_0(ka)} J_0(kR), \quad (3.2.1)$$

где  $R$  – радиальная координата,  $k = 2\pi f/c$ ,  $c$  – скорость звука в воде,  $J_0(ka)$  – функция Бесселя 0-го порядка. Из выражения видно, во-первых, что максимальная амплитуда акустического давления соответствует оси цилиндра, то есть координате  $R = 0$ , а во-вторых, равенство  $J_0(ka) = 0$  является условием резонанса и позволяет рассчитать те резонансные частоты, на которых амплитуда звукового давления будет наиболее высока. Также стоит отметить, что радиальное распределение амплитуды давления соответствуют функции Бесселя. Таким образом, легко рассчитать радиусы зон, формирующих узлы и пучности. Например, радиус первого от центра узла определяется соотношением:

$$R_1 \approx \frac{2,41}{k}. \quad (3.2.2)$$

Таким образом, варьируя частоту, подаваемую с генератора на преобразователь, можно изменять радиус узловой области поля.

Если в области распространения ультразвуковой волны находятся объекты с импедансом, отличающимся от импеданса иммерсионной среды, то будет возникать эффект рассеяния волны, а на сам объект начнет действовать акустическая радиационная сила. Если в первом приближении принять рассеиватель за упругую сферу малого волнового размера, то теория для расчета радиационной силы  $F_r$  существенно упрощается, и можно использовать приближение Горькова [158,159]:

$$\mathbf{F}_r = -\nabla U, \quad (3.2.3)$$

$$U = \frac{\pi r^3}{3} \left\{ f_1 \frac{|P|^2}{\rho c^2} - \frac{3}{2} f_2 \rho |\mathbf{v}|^2 \right\}, \quad (3.2.4)$$

где  $r$  – радиус рассеивателя, а множители  $f_1$  и  $f_2$  зависят от упругих свойств рассеивателя – плотности  $\rho_{sc}$ , скоростей продольной и поперечной волн  $c_l$ ,  $c_t$ :

$$f_1 = 1 - \frac{\rho c^2}{\rho_{sc} c_l^2} \frac{1}{1 - \frac{4c_t^2}{3c_l^2}}, \quad (3.2.5)$$

$$f_2 = 2 \frac{\rho_{sc} - \rho}{2\rho_{sc} + \rho}. \quad (3.2.6)$$

Из формул (3.2.3) – (3.2.6) видно, что в случае стоячего ультразвукового поля при условии, что акустический импеданс малого рассеивателя больше импеданса иммерсионной среды, радиационная сила действуют в направлении от пучности к узлу акустического давления (рисунок 3.2.1).

Как видно из таблицы 3.2.1, как для ТС, так и для их имитаторов – полистироловых шариков выполняется условие формирования в узловых областях стоячего поля.

Таблица 3.2.1 – Параметры материала частиц. Величины  $f_1$  и  $f_2$  рассчитаны для случая нахождения частиц в воде ( $\rho=1000 \text{ кг/м}^3$ ,  $c=1500 \text{ м/с}$ )

| Тип частиц            | $\rho_{sc}$ , кг/м <sup>3</sup> | $c_l$ , м/с | $c_t$ , м/с | $f_1$ | $f_2$ | $f_1 + \frac{3}{2}f_2$ |
|-----------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------|-------|------------------------|
| Полистироловые шарики | 1040                            | 2350        | 1120        | 0,438 | 0,026 | 0,477                  |
| ТС                    | 1050                            | 1600        | 3           | 0,163 | 0,032 | 0,211                  |

Условия акустического формирования представлены на рисунке 3.2.1, где  $F_{rad}$  – радиационная сила,  $F_{st}$  – сила вязкостного трения (Стокса),  $F_a$  – сила Архимеда,  $F_g$  – сила гравитации. Расчет акустической радиационной силы включает в себя расчет рассеяния и является нетривиальной задачей, поэтому для практических расчетов удобно пользоваться приближением Горькова. Это приближение применимо, когда выполняются следующие условия: размеры частицы малы по сравнению с длиной волны акустического поля, амплитуда колебаний частицы мала по сравнению с ее размерами, частица имеет сферическую форму, частица и окружающая среда являются однородными и изотропными, а также не имеют значительного затухания акустической волны.

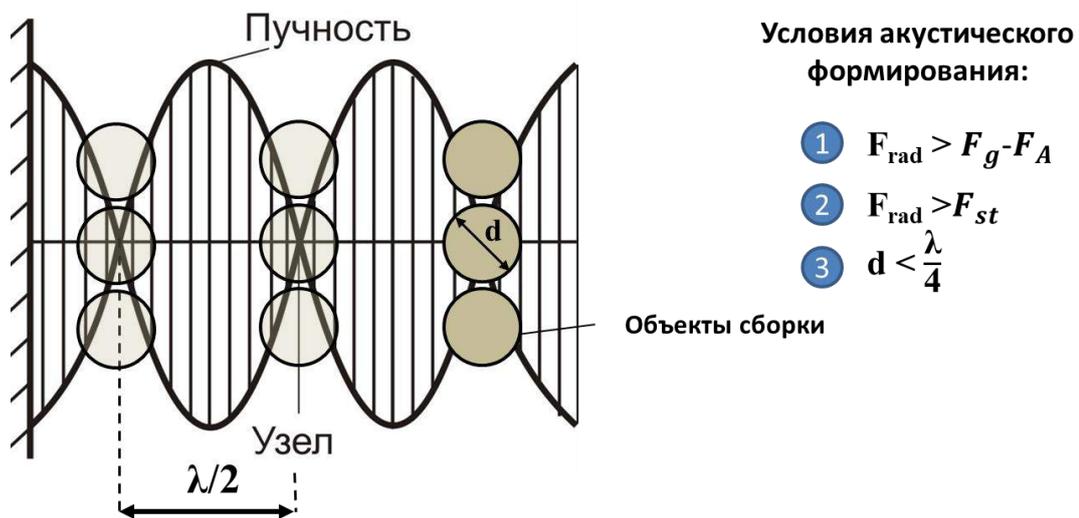


Рисунок 3.2.1 – Условия акустического формирования

Таким образом, если поместить набор малых сферических частиц в стоячее ультразвуковое поле внутри колеблющегося пьезоэлектрического

цилиндрического преобразователя, можно ожидать, что радиационная сила вызовет перемещение частиц в узлы акустического давления и сформирует из них цилиндрическую структуру. Толщина стенки такой структуры будет определяться соотношением между длиной волны и радиусом частиц, а радиус получаемой трубочки будет задаваться излучаемой частотой.

Отличие модельного представления от реального излучателя заключается в том, что не на всех частотах излучение происходит одинаково эффективно. Как правило, для создания поля, похожего на цилиндрическое, на практике используют пьезоэлектрический полый цилиндр с радиальным направлением поляризации (рисунок 3.2.2).



Рисунок 3.2.2 – Излучающий элемент – пьезоэлектрический полый цилиндр с радиальной поляризацией. Справа – демонстрация его радиальных колебаний

Наиболее эффективно электроакустическое преобразование происходит на частоте толщинного резонанса. Толщинный резонанс пьезоэлектрической пластины является явлением, при котором пластина из пьезоэлектрического материала, такого как кварц, титанат бария, PZT (свинец-цирконат-титанат) и другие, вибрирует в направлении перпендикулярном ее поверхностям при определенных частотах. Эти частоты резонанса зависят от физических свойств материала, таких как его плотность и модуль Юнга, а также от толщины самой пластины.

Когда на пьезоэлектрическую пластину подается переменное электрическое поле, оно вызывает механические колебания пластины благодаря прямому

пьезоэлектрическому эффекту. Если частота электрического поля совпадает с одной из собственных частот механических колебаний пластины, происходит резонанс, и амплитуда колебаний сильно увеличивается.

В случае толщинного резонанса, основная мода колебаний такова, что волна колебаний распространяется перпендикулярно к плоскости пластины, и расстояние между узлами колебаний (местами, где колебания минимальны) равно половине длины волны. Существует ряд гармоник этой основной частоты, где колебания происходят на частотах, в два, три и т. д. раза больше основной. Эти более высокие моды называются обертонами.

Формула для основной частоты толщинного резонанса выглядит следующим образом:

$$f_d = \frac{V}{2d} \quad (3.2.7)$$

где  $f_d$  – частота толщинного резонанса,  $V$  – скорость распространения упругой волны в материале,  $d$  – толщина пьезоэлектрической пластины.

Это явление широко используется в различных областях техники и технологий, например, в изготовлении резонаторов для часов, фильтров для радиочастот, датчиков давления, ультразвуковых преобразователей и многого другого, где важны высокая точность и стабильность частоты. Применительно к пьезоэлектрическим цилиндрам, если радиус цилиндра много больше его толщины, то его участок можно рассматривать как пластину с плоскопараллельными стенками, поэтому частота толщинного резонанса будет в целом соответствовать приведенной формуле. На практике наиболее эффективное акустическое излучение будет происходить на основной частоте толщинного резонанса, а не на обертонах.

Ключевыми параметрами для определения частоты толщинного резонанса является толщина стенки цилиндра и скорость звука в пьезопластине в радиальном направлении, которая определяется упругими свойствами и пьезомодулями материала. В случае различных пьезоматериалов для одинаковой толщины излучающего элемента частота толщинного резонанса будет немного отличаться,

однако для практического применения это не так существенно: несмотря на то, что пьезоэлектрические элементы имеют весьма высокую добротность, существует довольно широкий частотный диапазон в несколько десятков – сотен кГц, в котором излучение будет довольно эффективным.

### **3.2.2 Особенности разработки системы для случая с цилиндрическим пьезокерамическим излучателем**

Разработана акустическая система на базе цилиндрического пьезопреобразователя, где акустическая радиационная сила воздействует на объекты только в горизонтальном направлении, тогда как в вертикальном направлении объекты оседают в питательном растворе под действием силы гравитации. Необходимы такие условия, при которых объекты после добавления в рабочую область успели сформироваться в форме вертикально стоящей трубки до того момента как осядут на дно кюветы. Вместе с этим необходим контакт сформированного образца с некоторой подложкой в нижней части зоны действия радиационной силы, причем такая подложка не должна препятствовать прохождению питательных веществ к объектам. Более того, для построения одиночного трубчатого образца необходимо ограничить область пространства, в которой могут находиться объекты, чтобы они попадали только в первый узел стоячей волны и не распределялись по следующим узловым областям. Для этих целей была предварительно подготовлена кювета специальной формы из агарозы.

Агарозная кювета была выполнена в виде цилиндра с конусообразным отверстием, радиус которого не превышал радиуса второй узловой зоны, а внешние размеры позволяли осуществить ее размещение внутри пьезоэлектрического преобразователя (рисунок 3.2.3 а, серая область). Высота агарозной кюветы соответствовала высоте пьезоцилиндра, а дно конусообразного отверстия находилось на расстоянии 7 мм от нижнего края преобразователя. Использование агарозной кюветы вместо стандартной пластиковой или стеклянной кюветы было

обусловлено несколькими причинами. Во-первых, наличие твердых стенок у пластиковой кюветы вызывает дополнительное отражение и поглощение ультразвуковой волны, а в случае неидеального совпадения оси кюветы с осью цилиндрического пьезопреобразователя нарушаются условия резонанса, и радиационная сила уменьшается. В то же время, агарозные кюветы очень близки по физическим свойствам к воде и не вызывают сильных отражений и поглощения ультразвуковой волны. Высокая акустическая прозрачность агарозы избавляет от необходимости строго центрировать форму с преобразователем, а оптическая прозрачность позволяет наблюдать за ходом эксперимента с помощью видеокамеры. Во-вторых, пластиковое дно кюветы адгезивно для клеточного материала, тогда как к агарозе они не прилипают. Пористая структура агарозы позволяет объектам получать питательные вещества.

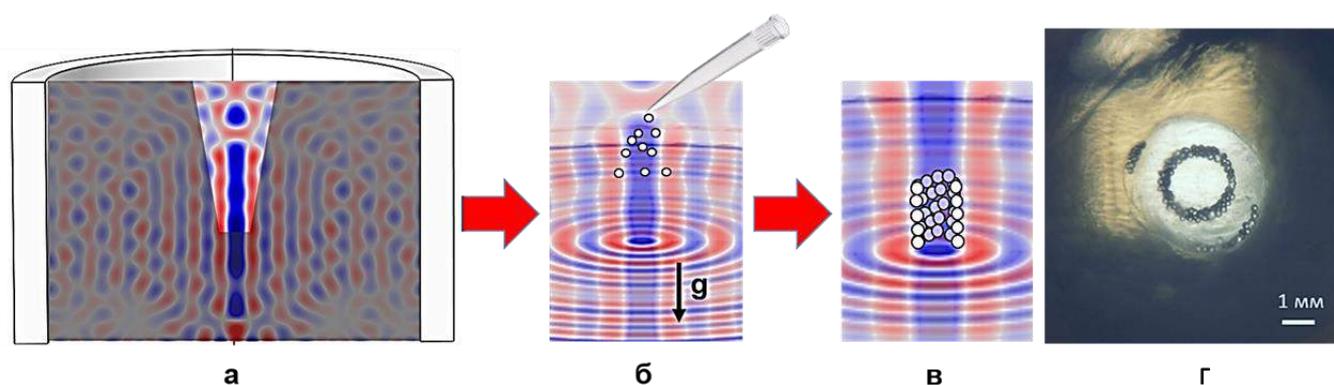


Рисунок 3.2.3 – Схема эксперимента по формированию трубчатого образца из объектов в акустическом поле: а) стоячее поле, созданное кольцевым пьезопреобразователем, и положение формы из агарозы (темная область) внутри цилиндра; б) впрыскивание объектов в область ультразвукового поля; в) формирование тубулярного образца в результате оседания объектов в поле действия силы тяжести и акустической радиационной силы; г) образец из полистироловых шариков [160]

Пьезопреобразователь с агарозной кюветой внутри помещался в стеклянную емкость, которая также была заполнена питательным раствором. Затем установка устанавливалась в термостат, поддерживающий температуру 37 °С и необходимую для клеток концентрацию CO<sub>2</sub> в воздухе. Наличие дополнительного объема питательного раствора в емкости с преобразователем гарантировало более

стабильный температурный режим внутри преобразователя во время излучения ультразвука и защищало ТС от перегрева.

Ниже представлена таблица 3.2.2 рассчитанных параметров излучающего элемента (частоты излучения  $f$ , толщины стенки пьезоцилиндра  $d$  и его внутреннего радиуса  $R_0$ ), необходимых для создания трубчатых образцов заданного радиуса  $r_1$ . Скорость звука в воде задана равной 1524 м/с, продольная скорость звука в пьезоэлектрике 3810 м/с, соответствующая материалу PZT-8.

Таблица 3.2.2 – Параметры излучающего цилиндра для создания ТКМ заданного радиуса

| Параметры  |           |          | $R_0$ , мм |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------|-----------|----------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $r_1$ , мм | $f$ , кГц | $d$ , мм | 1          | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
| 0,50       | 1116      | 1,7      | 0,8        | 1,5  | 2,2  | 2,9  | 3,6  | 4,3  | 4,9  | 5,6  | 6,3  | 7,0  |
| 0,75       | 744       | 2,6      | 1,2        | 2,3  | 3,3  | 4,3  | 5,4  | 6,4  | 7,4  | 8,4  | 9,5  | 10,5 |
| 1,00       | 558       | 3,4      | 1,7        | 3,1  | 4,4  | 5,8  | 7,2  | 8,5  | 9,9  | 11,3 | 12,6 | 14,0 |
| 1,50       | 372       | 5,1      | 2,5        | 4,6  | 6,6  | 8,7  | 10,7 | 12,8 | 14,8 | 16,9 | 18,9 | 21,0 |
| 2,00       | 279       | 6,8      | 3,3        | 6,1  | 8,8  | 11,6 | 14,3 | 17,1 | 19,8 | 22,5 | 25,3 | 28,0 |
| 2,50       | 223       | 8,5      | 4,2        | 7,6  | 11,1 | 14,5 | 17,9 | 21,3 | 24,7 | 28,2 | 31,6 | 35,0 |
| 3,00       | 186       | 10,2     | 5,0        | 9,2  | 13,3 | 17,4 | 21,5 | 25,6 | 29,7 | 33,8 | 37,9 | 42,0 |
| 3,50       | 159       | 11,9     | 5,8        | 10,7 | 15,5 | 20,3 | 25,1 | 29,9 | 34,6 | 39,4 | 44,2 | 49,0 |
| 4,00       | 140       | 13,7     | 6,7        | 12,2 | 17,7 | 23,2 | 28,6 | 34,1 | 39,6 | 45,0 | 50,5 | 56,0 |
| 4,50       | 124       | 15,4     | 7,5        | 13,7 | 19,9 | 26,1 | 32,2 | 38,4 | 44,5 | 50,7 | 56,8 | 63,0 |
| 5,00       | 112       | 17,1     | 8,3        | 15,3 | 22,1 | 29,0 | 35,8 | 42,6 | 49,5 | 56,3 | 63,1 | 70,0 |

### 3.2.3 Численный анализ оптимальных параметров излучающего пьезоэлектрического элемента

При планировании экспериментов по формированию трубчатых ТКМ недостаточно лишь модельных представлений об излучающей системе, так как такие представления не учитывают большого количества факторов, таких как различные граничные условия, неточность сведений об излучающем элементе, поверхностные волны на излучателе и так далее. Поэтому особое внимание должно быть уделено численному моделированию акустического поля, создаваемого

пьезоэлектрическими элементами, а также проверке соответствия модельных представлений более точным численным результатам расчетов. Прежде чем изучать поле сложной составной излучающей системы, необходимо определить, какие факторы, кроме уже изученных аналитически, влияют на поле цилиндрического преобразователя и какие параметры необходимо учитывать в ходе эксперимента.

Численное моделирование акустического поля проводилось в программном комплексе «Comsol Multiphysics» с использованием модулей «Pressure Acoustics» для расчета линейного акустического поля и модулей «Electrostatics» и «Solid Mechanics» с межмодульными интерфейсами «Acoustic-Structure Interaction» и «Piezoelectric Effect» для расчета пьезоэлектрического эффекта и оценки колебательной поверхности, которую создает пьезоэлектрический элемент под действием разности потенциалов. Рассматривались случаи гармонического излучения в широком диапазоне частот (от сотен кГц до 1 МГц). Геометрия задачи была выбрана актуально симметричной, исходя из того факта, что угловая зависимость поля и значимых параметров установки пренебрежимо мала, а двумерная задача для численного анализа требует существенно меньше времени. Расчетная область была окружена поглощающим слоем PML для минимизации переотражений от краев геометрии, однако также использовались другие граничные условия для проверки их влияния на структуру поля внутри излучающего элемента. Размер шага численной сетки подстраивался под расчетную частоту, исходя из требования обеспечить 10 точек на длину волны. На рисунке 3.2.4 показана простейшая модель расчета поля одного излучающего элемента.

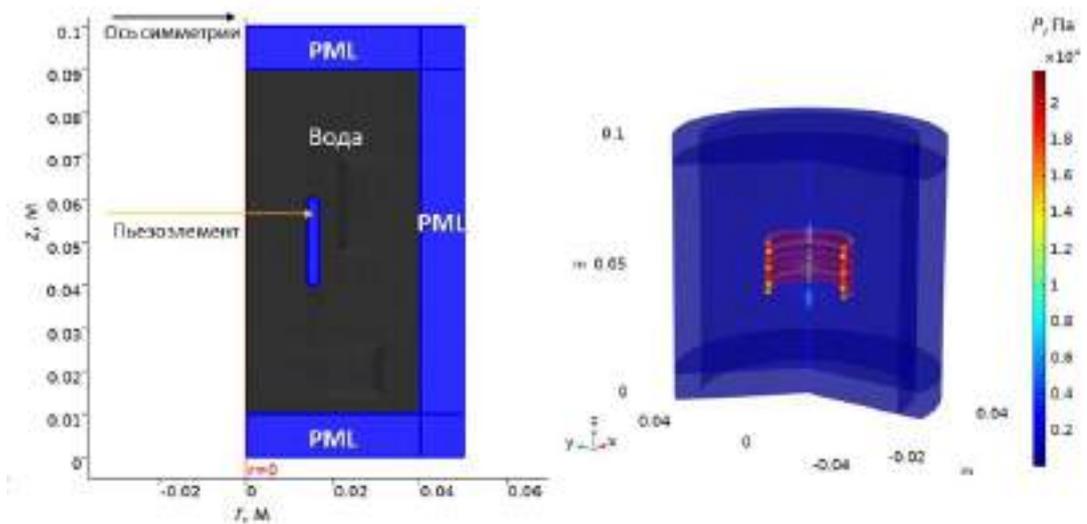


Рисунок 3.2.4 – Расчетная схема и пример расчетного поля для одноэлементного излучающего устройства

Кроме расчета акустического поля производится расчет поля механических напряжений и деформаций в пьезоэлектрике, а также расчет электростатического поля. Также в рамках пост-обработки производился расчет компоненты радиальной и продольной акустической радиационной силы  $F_r$  и  $F_z$ .

### 3.2.4 Определение резонансной частоты цилиндрического преобразователя

Как уже было упомянуто выше, резонансная частота плоской пьезоэлектрической пластины зависит от ее толщины и скорости продольной волны. Однако, на практике бывает сложно рассчитать скорость звука в пьезоэлектрике: разнообразие материалов и производителей, а также различие в технологиях производства приводят к тому, что даже для одной и той же марки пьезокерамики, такой как PZT-8, у разных производителей будут отличающиеся пьезоэлектрические модули, механические упругие константы и потери, влияющие на скорость звука в заданном направлении. Поэтому стоит задача определения влияния разных типов пьезокерамики в излучающих элементах одинаковой геометрии на акустическое поле и резонансы системы.

Одним из способов определения резонанса системы является измерение электрического импеданса излучающего элемента, помещенного в среду излучения, в зависимости от частоты. Электрический импеданс — это комплексное сопротивление, которое электрическая цепь оказывает переменному току. Импеданс объединяет в себе как реактивное сопротивление (индуктивность и емкость), так и активное сопротивление (омическое сопротивление). В случае пьезоэлектрического элемента импеданс будет зависеть от частоты приложенного электрического сигнала и будет варьироваться от минимального значения на резонансной частоте до максимального на антирезонансной.

Частота резонанса и антирезонанса – это термины, описывающие особые точки в поведении колебательной системы, такой как пьезоэлектрический элемент.

Частота резонанса – это частота, на которой система при колебаниях достигает максимальной амплитуды. В контексте электрических схем пьезоэлектрический элемент ведет себя как резонансный контур, состоящий из индуктивности (L), емкости (C) и сопротивления (R). На резонансной частоте реактивные компоненты индуктивности и емкости уравниваются друг друга так, что общий импеданс системы минимален и в основном определяется активным сопротивлением (R). В этом состоянии система может легко пропускать через себя электрический ток, если рассматривать ее в контексте электрической цепи.

Антирезонанс – это частота, на которой система демонстрирует минимальную амплитуду колебаний. Это происходит, когда реактивное сопротивление индуктивности и емкости становится максимально и взаимно компенсируется, но в такой манере, что общий импеданс системы наибольший. На этой частоте система крайне плохо пропускает ток и имеет высокий импеданс.

Для определения соответствия акустического резонанса системы ее электрическому импедансу был проведен численный расчет поля пьезоэлектрического цилиндра внутреннего радиуса 14 мм, толщины стенки 2,5 мм и длины 20 мм материала PZT-8, помещенного в воду со скоростью 1500 м/с. На графике зависимости импеданса от частоты (рисунок 3.2.5) видим, что на частоте резонанса график импеданса показывает резкий провал (минимум), а на частоте

антирезонанса – пик (максимум). Это связано с тем, что на резонансной частоте реактивные составляющие компенсируют друг друга, а на антирезонансной частоте они суммируются, увеличивая общий импеданс.

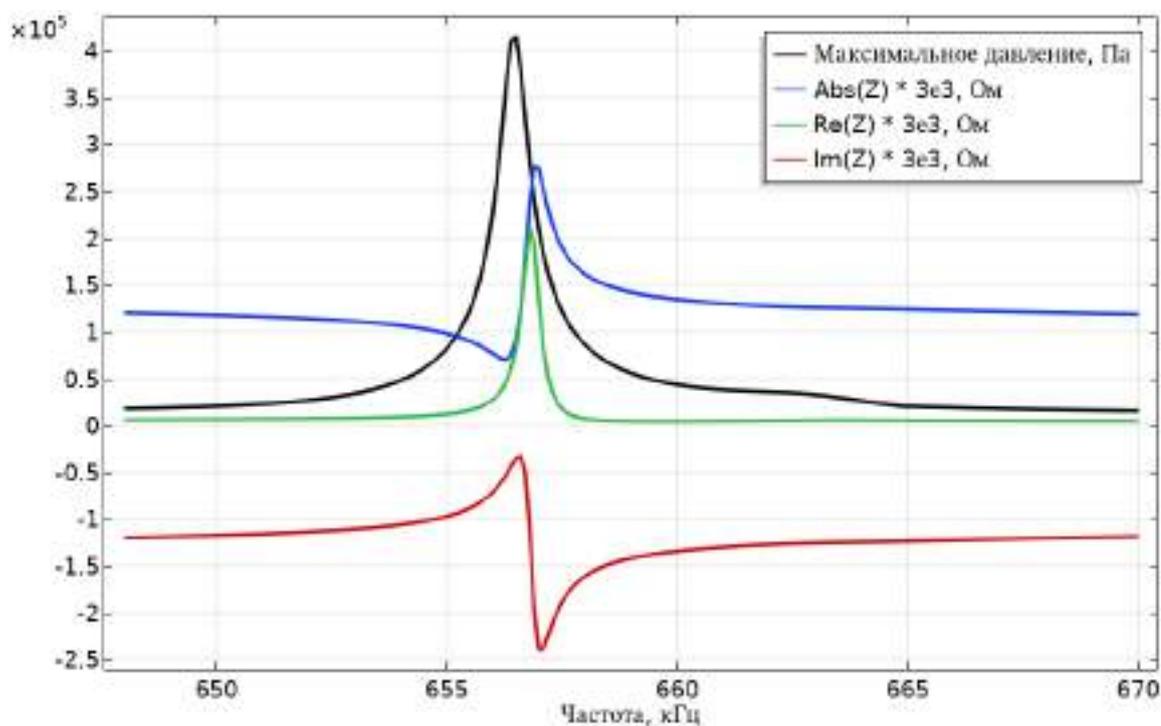


Рисунок 3.2.5 – Зависимость электрического импеданса и максимума акустического давления от частоты. Пик давления соответствует локальному минимуму модуля импеданса

Таким образом, для нахождения резонансной частоты пьезокерамического излучателя необходимо измерить его электрический импеданс. Минимум модуля импеданса или максимум мнимой части импеданса соответствуют наиболее эффективному режиму излучения акустической волны.

Как видно из условия стоячей волны  $f_m = \frac{c \cdot j_{1,m}}{2\pi R_0}$ , резонансных частот может быть много, и это должно влиять на импеданс излучающего элемента. На рисунке 3.2.6 показан диапазон частот от 580 до 720 кГц, включающий в себя три резонансных пика, и для каждого пика выполняется соответствие максимума акустического давления и локального минимума модуля импеданса.

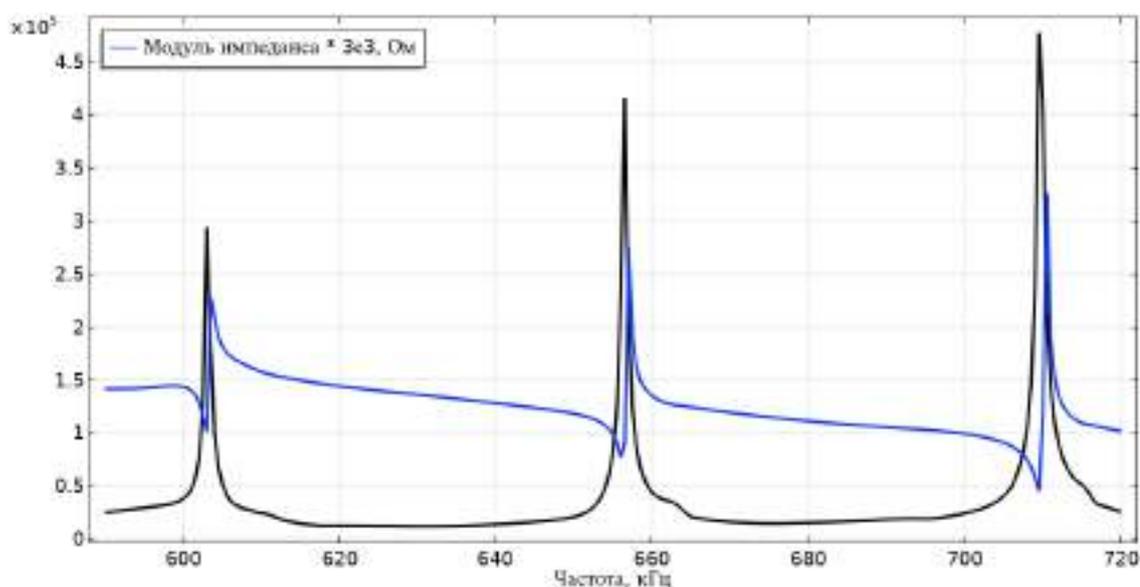


Рисунок 3.2.6 – Соответствие пиков давления и локальных минимумов модуля импеданса в диапазоне частот

Таким образом, для любого пьезоэлектрического цилиндра возможно определение его резонансных частот без знания параметров его материала, а только по измерению его электрического импеданса.

### 3.2.5 Зависимость резонансной частоты от параметров пьезокерамики

Как уже было сказано ранее, иногда свойства пьезокерамики определить затруднительно, причем они оказывают существенное влияние на излучаемое поле. При подборе оптимальной толщины элемента для наиболее эффективного излучения ориентир был на то, что рабочая частота должна быть близка к толщинному резонансу пьезоцилиндра. Действительно, если рассмотреть пьезоэлектрический элемент из пьезокерамики вида PZT-8, то согласно табличным данным, продольная скорость в направлении поляризации составляет около 3810 м/с. Тогда для модельного цилиндра внутреннего радиуса 14 мм, толщины стенки 2,5 мм и длины 20 мм материала PZT-8, помещенного в воду со скоростью 1500 м/с, частота толщинного резонанса составит 762 кГц. Это означает, что в диапазоне нескольких десятков-сотен кГц от этой частоты излучение будет наиболее

эффективным, требуется меньшее усиление электрического сигнала для удержания ТС в форме трубки, и происходит меньший нагрев окружающей преобразователь среды за счет более высокого КПД. Однако, при изменении параметров керамики изменится и электрический импеданс излучателя, и частота его толщинного резонанса. Возникает вопрос: можно ли пользоваться приведенными в таблице 3.2.2 оценками для другого типа пьезокерамики?

Были сделаны расчеты акустических полей и импеданса для трех разных наиболее распространенных типов пьезокерамики: PZT-8, PZT-4 и PZT-2 – это стандартные типы свинцово-цирконатно-титанатных керамик, которые отличаются своими диэлектрическими, пьезоэлектрическими и механическими свойствами.

PZT-2 – этот тип пьезокерамики обычно характеризуется высокими диэлектрическими и пьезоэлектрическими константами. Он обладает хорошими чувствительностью и временной стабильностью. PZT-2 часто используется в датчиках и преобразователях для применений, где необходима высокая чувствительность.

PZT-4 – этот тип керамики более подходит для применений с высокими уровнями драйва или большими механическими нагрузками. Он обладает более низкими диэлектрическими и пьезоэлектрическими константами по сравнению с PZT-2, но имеет более высокую механическую прочность и устойчивость к электрическому пробое, что делает его более прочным в жестких условиях эксплуатации.

PZT-8 – этот материал является еще более прочным и устойчивым к высоким давлениям и электрическим нагрузкам. У него самая низкая диэлектрическая проницаемость из этой группы, что делает его подходящим для применений, где требуются высокая мощность и долговременная стабильность. Этот тип керамики близок к материалу российского производства ЦТБС-3, что делает его привлекательным для численных расчетов.

На рисунке 3.2.7 изображена частотная зависимость модуля электрического импеданса для трех типов пьезокерамических цилиндров одинаковой геометрии.

На рисунке видно, что величина импеданса отличается, но характерные особенности остаются схожими. Близко совпадают и резонансные частоты – небольшие отклонения видны на самых высоких частотах выше 700 кГц, когда структура колебаний становится более сложной. Это позволяет сделать вывод о том, что размер фабрикуемой тканевой трубки, в первую очередь, определяется частотой волны и геометрией излучателя, а не его материалом.

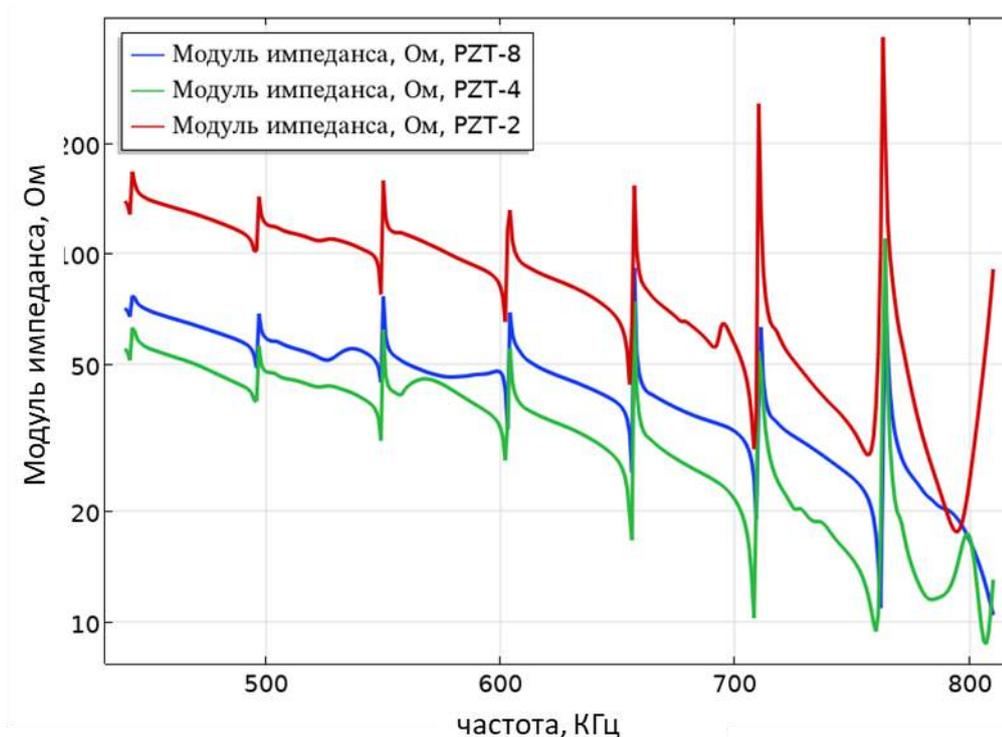


Рисунок 3.2.7 – Зависимость модуля импеданса пьезоэлектрического цилиндра от частоты для разных типов пьезокерамики

На рисунке 3.2.8 показана зависимость максимального акустического давления (давления на оси цилиндра) в зависимости от частоты. На данном графике также видно совпадение резонансных частот, которое немного нарушается при увеличении частоты. Однако, можно наблюдать, что амплитуда пиков у трех разных пьезокерамик различная, причем частота, на которой возможно достичь максимальной эффективности излучения, разная: для PZT-4 и PZT-2 это 656 кГц, тогда как для PZT-8 это 762 кГц. Это объясняется тем, что у всех керамик разные характеристики, и, как следствие, продольные скорости и частоты толщинного резонанса. Характеристики PZT-4 и PZT-2 более близки друг к другу, чем PZT-8, а

скорость продольной волны немного ниже, поэтому для этих двух керамик формирование будет эффективнее происходить на более низкой частоте.

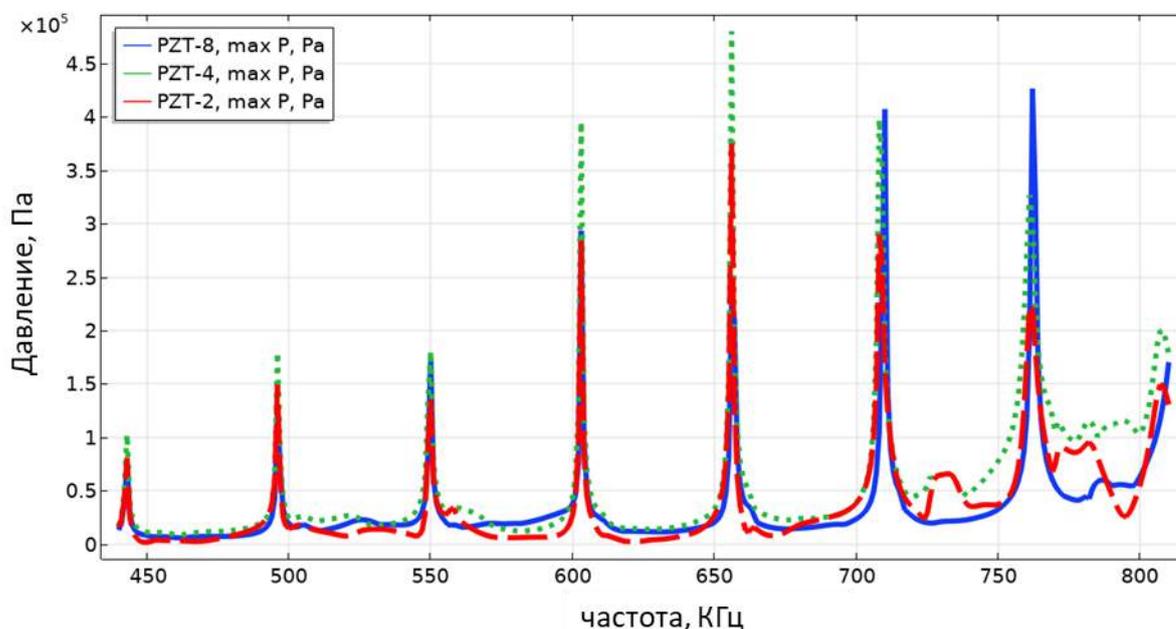


Рисунок 3.2.8 – Зависимость максимума давления от частоты для разных типов пьезокерамики

Если же рассмотреть радиальную структуру поля на одной и той же частоте, то можно увидеть, что она совпадает и отличается лишь амплитудой колебаний (рисунок 3.2.9, рисунок 3.2.10).

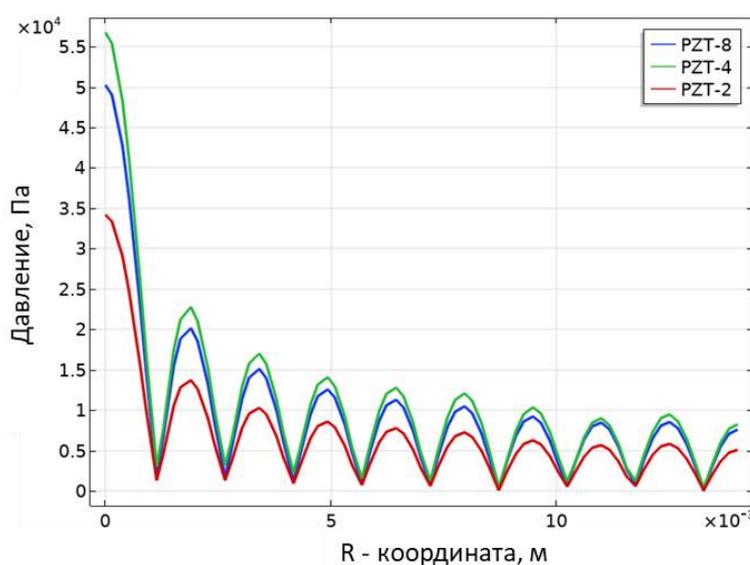


Рисунок 3.2.9 – Зависимость амплитуды давления от радиальной координаты внутри цилиндра на частоте 497 кГц для трех типов пьезокерамики

Это еще раз подчеркивает важность выбора правильного типа пьезоматериала и соответствия излучаемой частоты тому диапазону частот вблизи толщинного резонанса, где электроакустическое преобразование происходит с максимально возможным КПД.

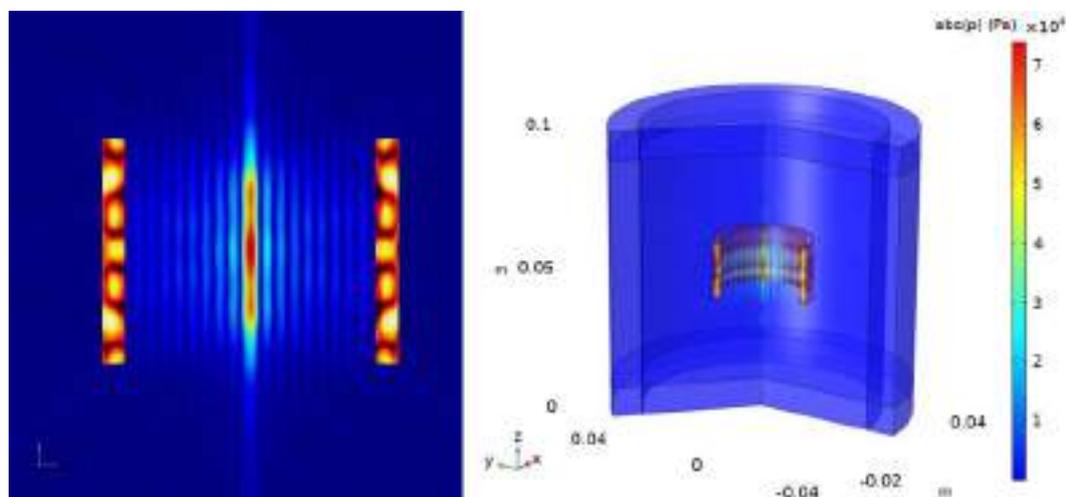


Рисунок 3.2.10 – Поле акустического давления на частоте 497 кГц

Если же посмотреть на структуру поля на одной из резонансных частот, то можно увидеть, что она регулярная и с ярко выраженным пиком на оси симметрии цилиндра. Именно в такой конфигурации поля можно осуществлять формирование ТКМ.

### 3.2.6 Структура поля в зависимости от граничных условий

Важным вопросом является соответствие моделируемой задачи реальным условиям. Предыдущие результаты были рассчитаны для случая поглощающих граничных условий, когда ультразвук, излучаемый элементами вовне цилиндра, рассеивается и поглощается. В реальном эксперименте, как правило, создать такие условия затруднительно, так как нужно иметь доступ к зоне внутри цилиндра, а также не всегда есть возможность окружить всю емкость поглотителями. Поэтому

были рассмотрены и сравнены 4 случая граничных условий, чтобы понять, каким образом следует разработать акустическую установку для ее эффективной работы:

1) первый случай граничных условий – поглощающие со всех сторон (рисунок 3.2.11 а). Это соответствует тому, что зона вокруг излучающего цилиндра довольно большая и окружена специальными акустическими поглотителями;

2) другой вариант граничных условий – контакт с воздухом на верхней границе расчетной области, представляющий собой мягкие граничные условия, и поглощение со всех других сторон (рисунок 3.2.11 б);

3) следующий вариант – поглощающие условия только на нижней границе расчетной зоны, а сверху и сбоку мягкие граничные условия, соответствующие контакту с воздухом (рисунок 3.2.11 в);

4) последний вариант – нет поглощающих слоев, сверху и сбоку – мягкие граничные условия (контакт с воздухом), снизу – твердые граничные условия (например, контакт со стеклянным или металлическим дном емкости, в которой проводится формирование) (рисунок 3.2.11 г).

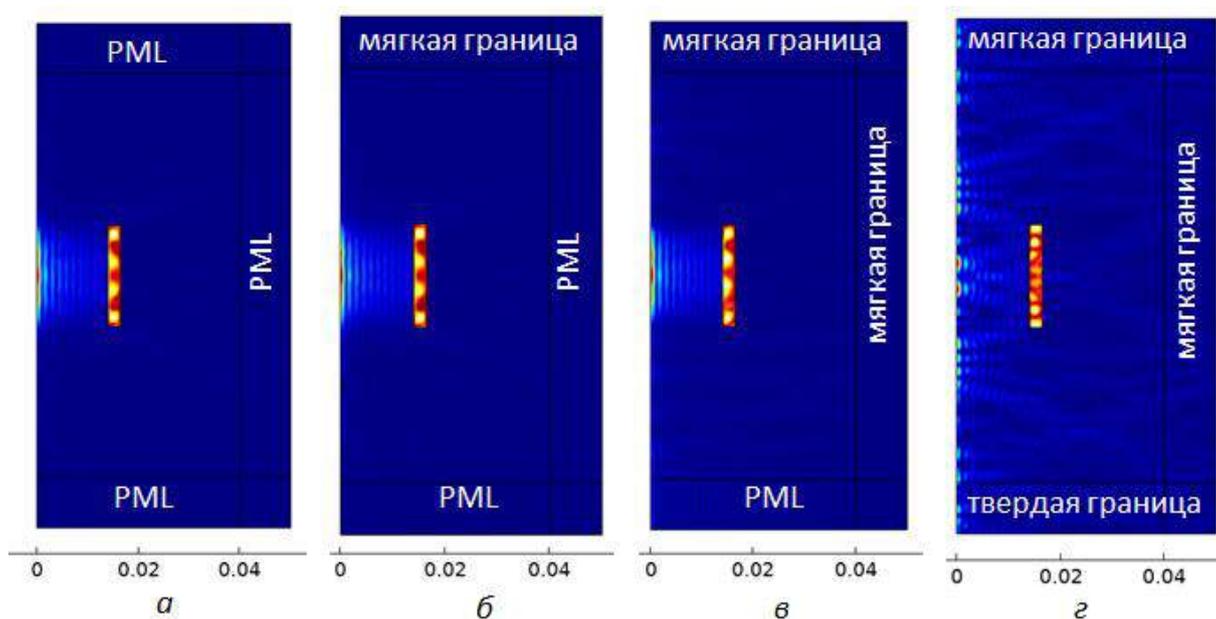


Рисунок 3.2.11 – Влияние граничных условий на структуру акустического поля

Как показали результаты расчета на рисунке 3.2.11, в реальности допустимы любые граничные условия кроме случая, когда и на верхней, и на нижней границе образуются сильные отражения. В таком случае нарушается вертикальная

однородная структура поля внутри излучающего элемента, вследствие чего эффективность акустического формирования существенно понижается. Стоячая структура поля между внешней стенкой излучающего цилиндра и окружающим его контейнером слабо влияет на поле внутри, поэтому основным условием успешного формирования ТКМ является наличие поглотителя сверху или снизу для предотвращения появления сильных переотражений.

### **3.2.7 Зависимость диапазона частот эффективного излучения от толщины излучающего элемента**

Как уже было сказано выше, толщинный резонанс определяется толщиной стенки пьезоэлектрического цилиндра и скоростью продольной волны в пьезокерамике. При изменении толщины стенки излучающего элемента можно сместить диапазон частот, при которых будет происходить наиболее эффективное электроакустическое преобразование. Общая тенденция такова: чем толще стенка пьезоэлектрического цилиндра, тем ниже частота толщинного резонанса, тем более низкие резонансные частоты будут наиболее эффективными для формирования и тем большего радиуса тканевую трубку возможно собрать. На рисунке 3.2.12 и рисунке 3.2.13 рассмотрены цилиндры с одинаковым внутренним радиусом 14 мм из материала PZT-4, но с разной толщиной и рассчитаны соответствующие им электрический импеданс и максимальное акустическое давление в зависимости от частоты. Как видно из рисунка 3.2.12, область вблизи толщинного резонанса характеризуется увеличением модуля импеданса, и именно в этой области наблюдаются пики максимального давления.

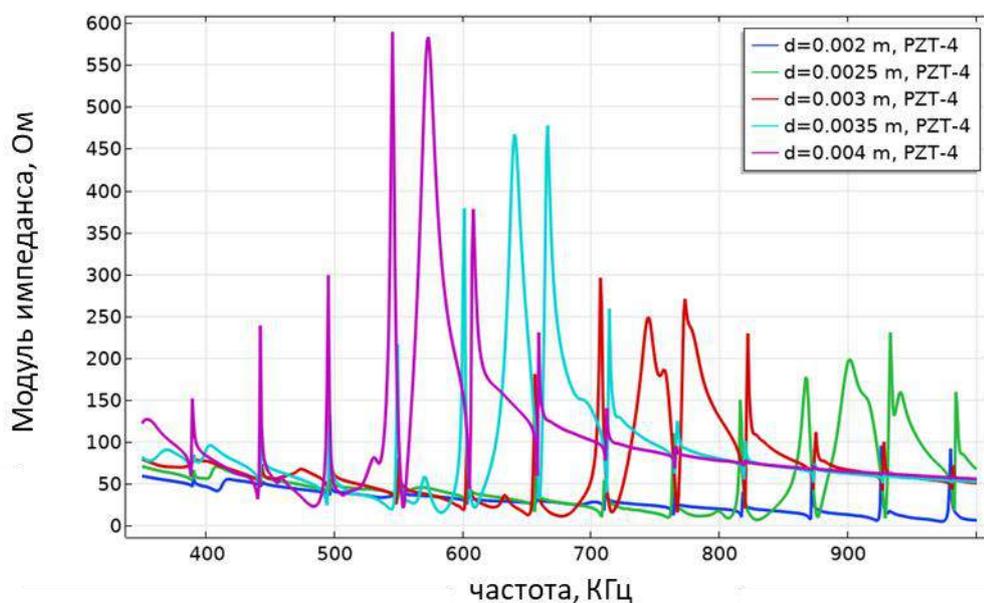


Рисунок 3.2.12 – Зависимость модуля импеданса от частоты для излучающих пьезоцилиндров разной толщины

Таблица 3.2.3 обобщает результаты расчетов, показывая эффективный диапазон излучения в зависимости от толщины цилиндра. Еще одним неочевидным следствием является то, что при увеличении элемента при приложении одинаковой разности потенциалов пиковое давление уменьшается. Другими словами, для формирования более крупной трубки потребуется более высокая электрическая мощность, подаваемая на излучатели.

Таблица 3.2.3 – Диапазон частот эффективного излучения от толщины стенки излучателя

| $d$ , мм | Диапазон частот, кГц |
|----------|----------------------|
| 2,0      | 900-1000             |
| 2,5      | 800-900              |
| 3,0      | 700-900              |
| 3,5      | 550-750              |
| 4,0      | 500-600              |

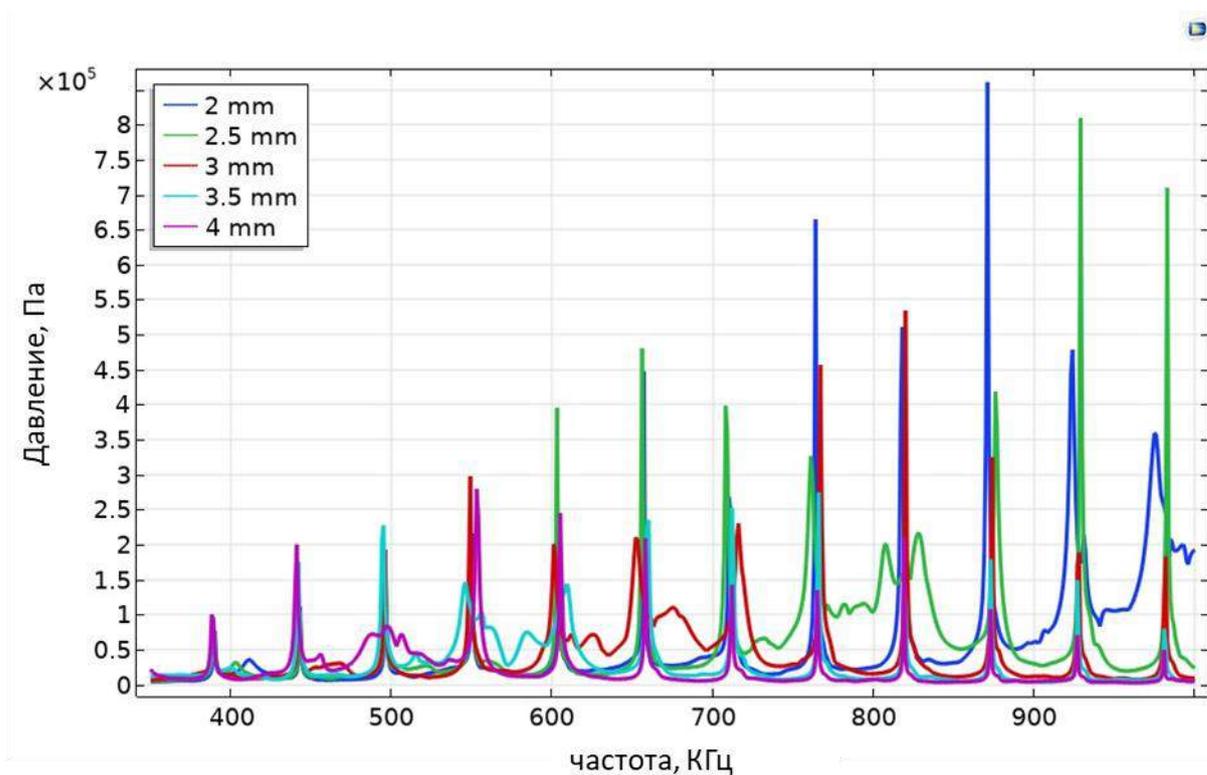


Рисунок 3.2.13 – Зависимость максимума акустического давления от частоты для излучающих пьезоцилиндров разной толщины

### 3.2.8 Структура поля акустической радиационной силы

Исходя из теоретических соображений, акустическая радиационная сила, действующая на малые сферические объекты в стоячем цилиндрическом поле, должна перемещать их в направлении узлов поля. Так как в реальности акустическое поле не является идеально цилиндрическим, были сделаны численные расчеты, чтобы показать, что это предположение верно. Расчеты были сделаны для параметров объектов, указанных в таблице 3.2.1. На рисунке 3.2.14 показано радиальное распределение амплитуды акустического давления (синяя линия) и радиальной компоненты акустической радиационной силы (черная линия).

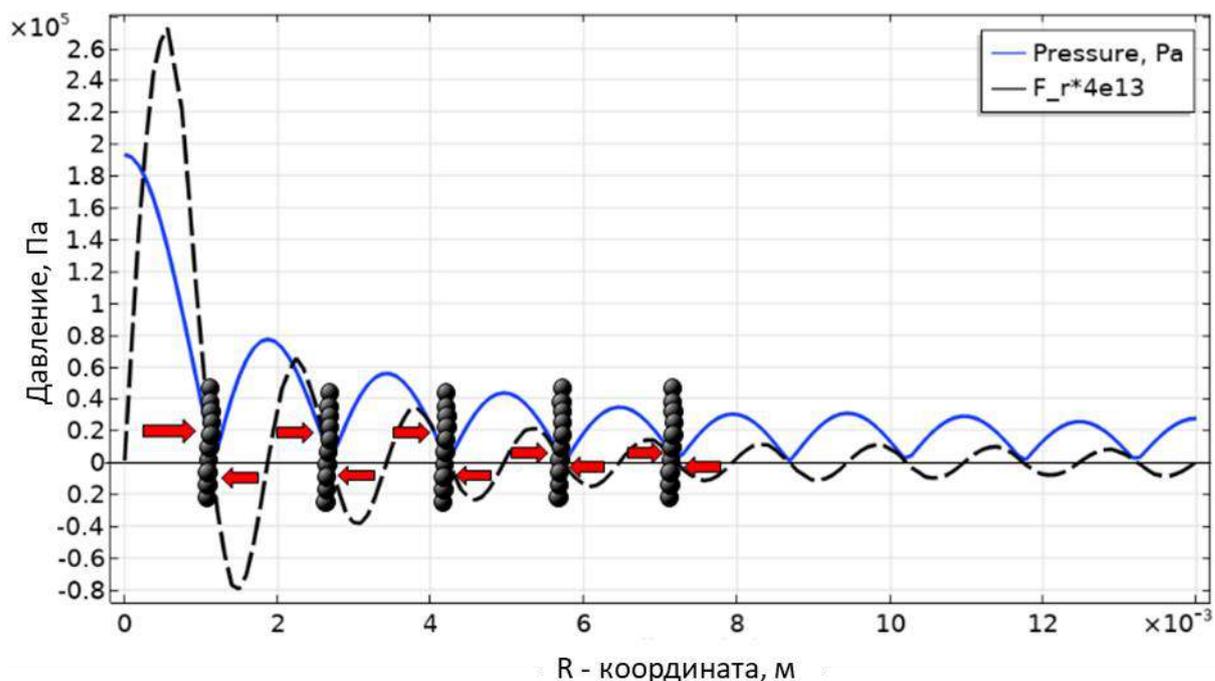


Рисунок 3.2.14 – Радиальное распределение амплитуды давления и радиальной компоненты акустической радиационной силы внутри колеблющегося пьезоцилиндра. Стрелками показано направление акустической радиационной силы, соответствующее узлам поля давления

Как видно из графика, акустическая радиационная сила в радиальном направлении  $F_r$  меняет знак: чередуются зоны положительного и отрицательного воздействия, образуя зоны устойчивого равновесия, соответствующие узловым областям поля акустического давления. Также из графика видно, что наибольшая амплитуда акустической радиационной силы достигается в районе первого узла. Таким образом, формирование частиц в первой узловой зоне является наиболее эффективной, хотя при достаточном усилении энергии, подводимой к излучателю, возможна и в узлах более высоких порядков.

Важным вопросом является структура акустической радиационной силы в вертикальном направлении. На рисунке 3.2.15 показаны распределения радиальной и вертикальной компоненты акустической радиационной силы внутри излучающего на частоте 497 кГц элемента. Как видно из изображений, радиальная компонента  $F_r$  в вертикальном направлении довольно однородна и соответствует по амплитуде распределению амплитуды давления. Также видно, что  $F_z$  в вертикальном направлении неоднородна и образует свои зоны устойчивого

равновесия, которые могут мешать равномерному формированию ТКМ. Это происходит из-за того, что на поверхности пьезоэлектрика возникают волны Лэмба – упругие волны в пластинах – которые нарушают равномерное распределение колебательной скорости на излучающей поверхности. Однако, амплитуда волн Лэмба гораздо меньше амплитуды нормальных колебаний, потому и максимальная амплитуда  $F_z$  на порядок меньше максимальной амплитуды  $F_r$ . Это означает, что при выборе оптимальной разности потенциалов, подводимой к излучателю, акустическая радиационная сила в вертикальном направлении будет достаточно слаба по сравнению с силой тяжести, чтобы не оказывать существенного воздействия на структуру формируемого ТКМ.

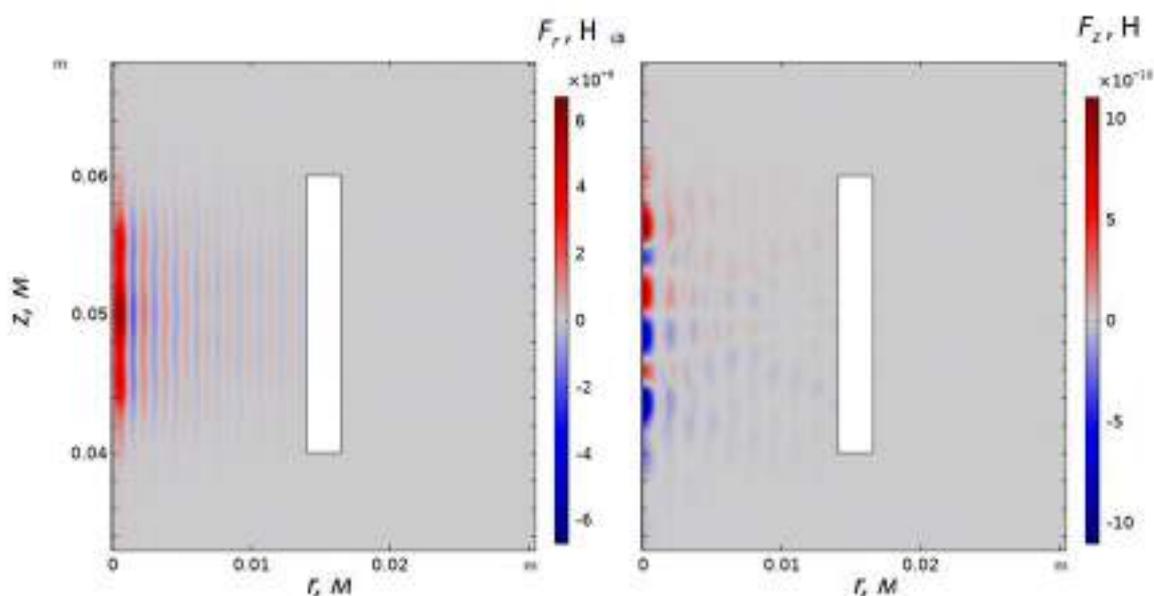


Рисунок 3.2.15 – Распределение компонент акустической радиационной силы  $F_r$  и  $F_z$ , действующих на ТС на частоте 497 кГц при разности потенциалов на обкладках преобразователя 20 В

Еще одним важным вопросом является зависимость величины акустической радиационной силы от напряжения на обкладках излучателя. Акустическая радиационная сила, как нелинейный феномен, линейно зависит от интенсивности звуковой волны, которая, в свою очередь, квадратично зависит от акустического давления. Как правило, зависимость акустического давления от напряжения на обкладках излучателя также линейно, то есть ожидается квадратичная зависимость

акустической радиационной силы (ее компонент) от приложенной разности потенциалов.

На рисунке 3.2.16 а показана зависимость  $F_r$  и  $F_z$  от напряжения, приложенного к пьезокерамическому цилиндру, в пределах от 1 до 20 В. Предположение о квадратичной зависимости полностью выполняется. Также интересно сравнение  $F_z$  с весом частиц, чтобы оценить возможную степень влияния акустической радиационной силы на однородность формируемой структуры в вертикальном направлении.

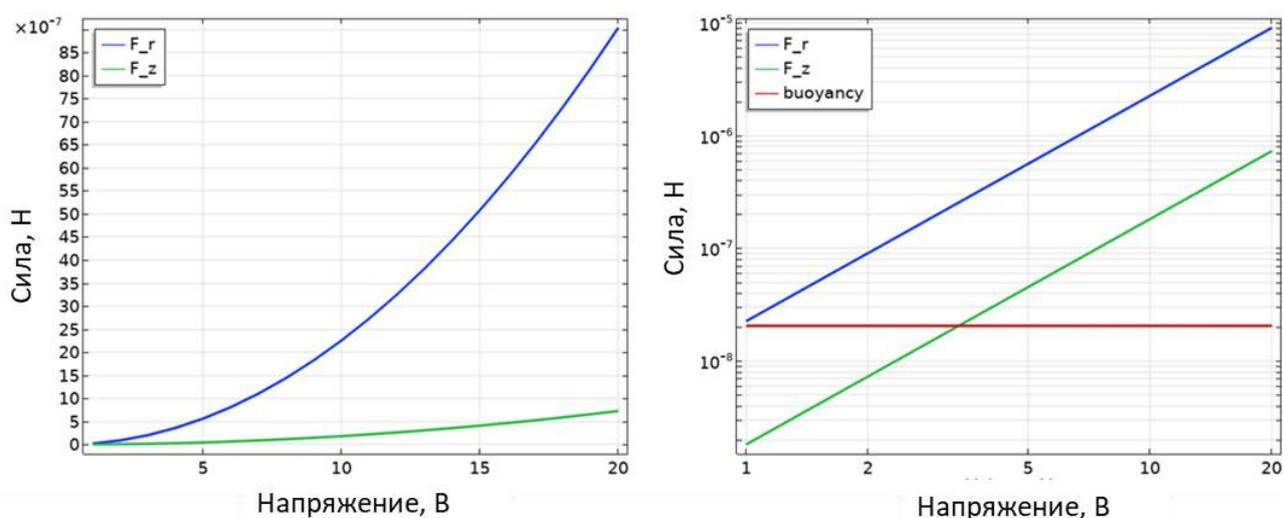


Рисунок 3.2.16 – Зависимость компонента акустической радиационной силы от напряжения, приложенного к пьезокерамическому цилиндру; а) зависимость компонента акустической радиационной силы от напряжения на обкладках пьезоэлектрического преобразователя; б) сравнение амплитуд компонент акустической радиационной силы с весом ТС, логарифмическая шкала

Как видно из рисунка 3.2.16 б, при напряжении выше 3 В на единичном излучающем элементе максимальная амплитуда акустической радиационной силы в вертикальном направлении больше веса частицы, помещенной в жидкость. Однако усредненная  $F_z$  по всей области воздействия равна нулю, и частицы плотно взаимодействуют друг с другом, поэтому в реальности нарушение структуры трубчатого образца из объектов может происходить лишь при гораздо больших напряжениях.

## **3.2.9 Особенности разработки системы для случая с плоским пьезокерамическим излучателем**

### **3.2.9.1 Экспериментальная установка**

Эксперименты по левитации частиц проводились и ранее, причем размеры таких частиц различались. ТС также были предметом акустического левитационного эксперимента. Однако, их помещали в резонатор и воздействовали потоком токсиканта, чтобы проверить их жизнеспособность в ускоренном режиме. Расстояние между преобразователем и отражателем составляло полторы длины волны, поэтому был только один узловой слой, где собирались ТС.

Данный раздел направлен на создание установки, способной удерживать объекты в левитационном состоянии в питательной среде в специальной колбе, и тем самым формировать из них устойчивые плоские образцы.

Разработана система на базе плоского пьезоэлектрического преобразователя, состоящим из пьезокерамического диска и стеклянного отражателя. Конструкция отражателя включала стеклянную пластину с воздушной емкостью сзади, которая обеспечивала мягкие граничные условия для падающей ультразвуковой волны. Кроме того, отражатель можно было разместить на вращающейся оснастке, что было необходимо для достижения необходимого угла между преобразователем и отражателем.

Первый тип экспериментальной установки показан на рисунке 3.2.17. Она состояла из жесткой рамы, на которой держались вращающийся преобразователь и отражатель. В качестве другого отражателя использовалось плексигласовое дно установки. Этот тип установки поддерживает два типа режимов стоячих волн. Первый режим (рисунок 3.2.17 а) возникает при наклоне преобразователя и отражателя ко дну под углом  $45^\circ$ : излучаемая волна отражается от нижнего отражателя, падает на наклонный отражатель и затем возвращается обратно. Область интерференции падающих и отраженных волн имеет сложную структуру, но это поле стоячее и может удерживать мелкие частицы. Вторым режим

(рисунок 3.2.17 б) включает параллельный преобразователь и отражатель, стоящие в вертикальном направлении. Область стоячей волны изображена зелеными линиями на рисунке 2.2.17 а,б, а синие стрелки показывают направление падения и отскока волн.

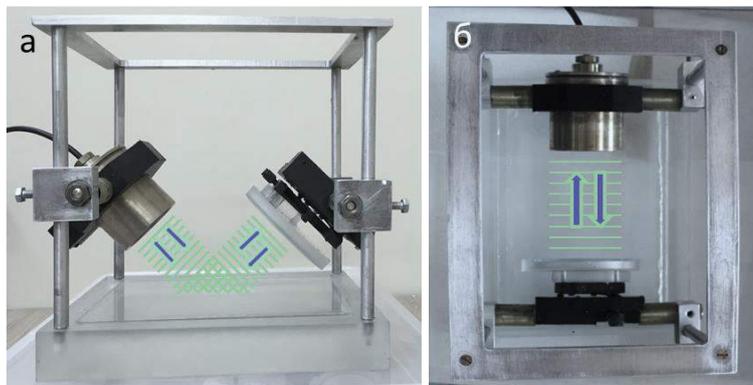


Рисунок 3.2.17 Экспериментальная установка 1-ого типа: а) преобразователь и отражатель ко дну под углом 45°; б) преобразователь и отражатель параллельны друг другу

Вся конструкция помещалась в прозрачную емкость с дегазированной водой комнатной температуры. Емкость с объектами в жидкости устанавливалась между преобразователем и отражателем строго параллельно плоскости волны. Отражатель был прямоугольным, чтобы уменьшить эффекты рассеяния поверхностных акустических волн.

Другой тип экспериментальной установки показан на рисунке 3.2.18.

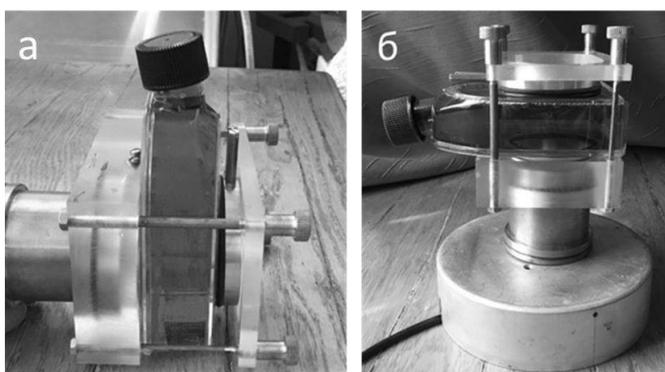


Рисунок 3.2.18 – Экспериментальная установка 2-го типа: а) акустическая волна распространяется вертикально; б) акустическая волна распространяется горизонтально

В этом случае ультразвуковая волна распространяется только внутри контейнера с частицами и двух заполненных водой небольших емкостей,

используемых в качестве отражателя и переходника между преобразователем и контейнером. Преимуществами таких установок являются их небольшие размеры и произвольная ориентация в пространстве. Тем не менее такая конструкция не способна регулировать сильный параллелизм между источником и отражателем, и появление экранирующих пузырьков возможно в слоях жидкости вне контейнера.

### **3.2.9.2 Исследование процесса формирования образцов в стоячем акустическом поле**

В качестве источника использовался плоский пьезоэлектрический преобразователь. Его резонансная частота и производимая длина волны составляли 1,09 МГц и 1,38 мм соответственно. Первым шагом к созданию стоячей волны между преобразователем и отражателем было установление достаточного параллелизма между ними. Для этого излучался импульсный сигнал 20-60 периодов синуса на резонансной частоте преобразователя. Длина сигнала выбиралась соответственно расстоянию между преобразователем и отражателем. После испускания акустической волны она отражалась от отражателя и достигала преобразователя, а затем сигнал измерялся преобразователем в режиме приема. Чем меньше угол между плоскостями преобразователя и отражателя, тем больше амплитуда отраженного сигнала. Для большей точности предпочтительно изучать амплитуды отраженных волн, так как эффект непараллельности влияет на них сильнее.

В однородных средах максимум излучаемой мощности преобразователя соответствует резонансной частоте 1,09 МГц. Однако, включение культурной колбы и отражателя в систему изменяет распределение электрической энергии по частоте. Поскольку расстояние между преобразователем и отражателем (приблизительно 10 см) было значительно больше длины волны, и помещенная в стоячую волну культуральная колба с ТС содержала жидкость с несколько отличающимися от окружающей воды параметрами и жесткими пластиковыми

стенками, необходимо было регулировать генерируемую частоту, чтобы достичь резонанса системы и одновременно достичь максимума выходной мощности. Для этого была измерена частотная зависимость КПД электрической нагрузки преобразователя  $W / W_0$  (отношение электрической мощности  $W$  к мощности  $W_0$  при идеальной нагрузке 50 Ом). Результат показан на рисунке 3.2.19. Как видно из графиков, вблизи резонансной частоты преобразователя наблюдаются три или четыре пика и соответствующие им частоты подходят для создания стоячей волны.

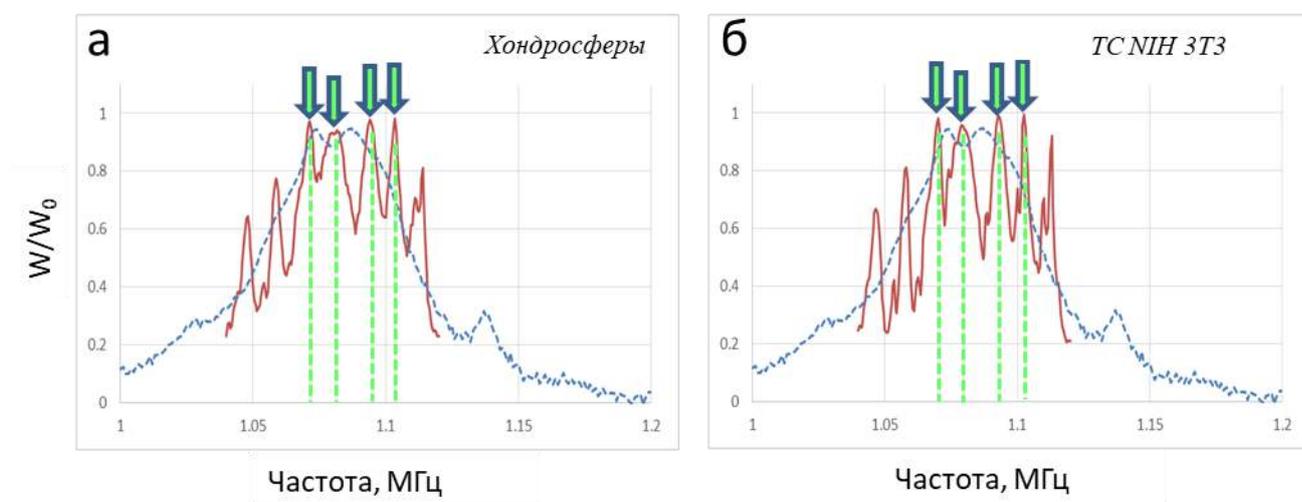


Рисунок 3.2.19 – Электрическая нагрузка по частоте, синяя линия соответствует однородной среде, красная линия показывает измерения для вставленной колбы с хондросферами (а) и ТС НИИ 3ТЗ (б)

Полученная схема экспериментальной установки показана на рисунке 3.2.20 а,б. Полученное ультразвуковое стоячее поле не является плоским и особенно вблизи оси имеет сложную структуру, что обусловлено генерацией волн Лэмба внутри пьезокерамической пластины и дифракционной расходимостью пучка.

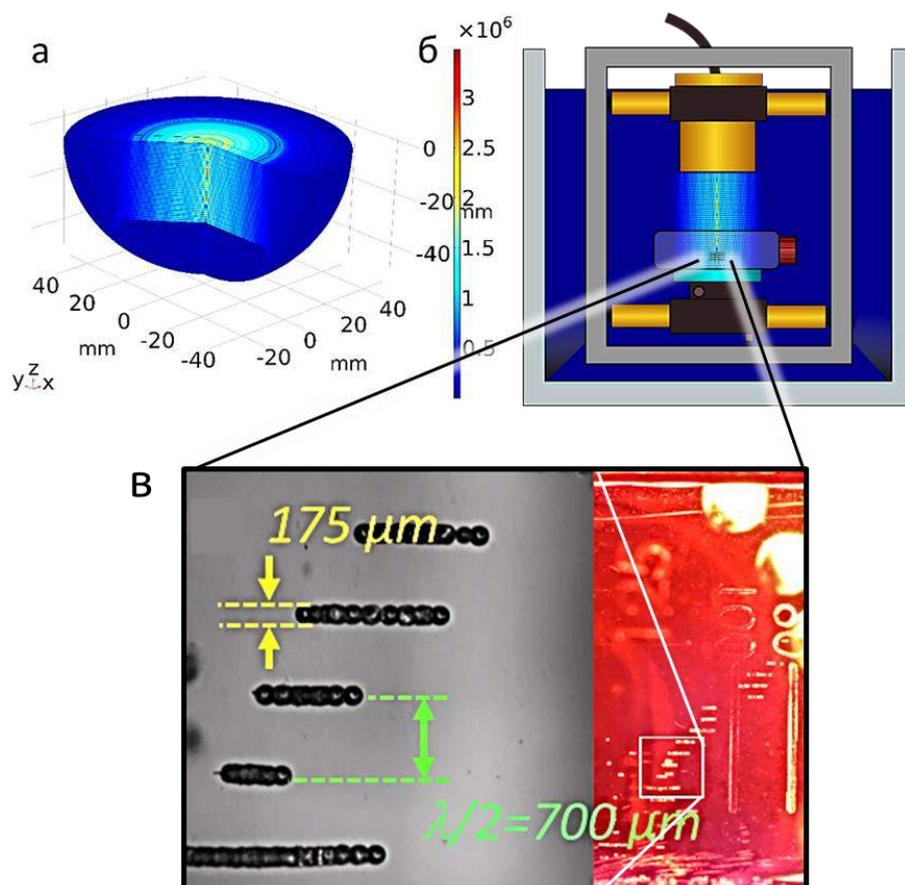


Рисунок 3.2.20 –Акустическое формирование: а) модель стоячего ультразвукового поля; б) схема установки

Наблюдение за эффектом левитации осуществлялось двумя камерами: монохромной промышленной камерой DMK 41AU02 и видеокамерой «Panasonic» HC-W850. Первая обеспечивала высокое разрешение изображения, вторая позволяла снимать длинные и красочные фильмы. Полученные результаты левитации слоев объектов приведены на рисунке 3.2.20 в.

В следующем разделе будут рассмотрены аспекты подхода объединения магнитного и акустического воздействия одновременно.

### 3.3 Экспериментальные стенды по генерации магнитоакустических полей

#### 3.3.1 Описание метода

Одним из основных потенциальных преимуществ магнитоакустического формирования является возможность создания трехмерных экспериментальных

образцов со сложной геометрией, такие как тор, трубка и более сложные топологии, включая сеть ветвящихся каналов.

Технологический процесс включает в себя создание неоднородного магнитоакустического поля («биполя») и формирование из хаотически распределенных в жидкости объектов экспериментальных образцов.

Неоднородное магнитное поле может генерироваться с помощью нескольких постоянных магнитов определенной формы, расположенных относительно друг друга определенным образом. Для этой цели можно использовать неодимовые магниты [154]. Более сильные градиенты и интенсивности магнитного поля и, следовательно, большие рабочие области, могут быть достигнуты с использованием магнитов Биттера или сверхпроводящих магнитов. Магнитное поле удобно для удержания большого объема ТС, но имеет ограниченные возможности по образованию тонкой структуры.

Акустическое поле создается ультразвуковыми излучателями, расположенными вне «магнитной ловушки». Акустическое излучение попадает в «магнитную ловушку» с разных направлений, которые могут, например, совпадать с осями X, Y и Z. Благодаря созданию продольных стоячих акустических волн в трех измерениях и возможности управления амплитудами и фазами сигналов, подаваемых на источники излучения, можно получить сложно распределенные зоны с требуемыми уровнями акустического давления, например в виде разветвленных каналов как на рисунке 3.3.1.



Рисунок 3.3.1 – Изображение зон (областей), в которых акустическое поле, создаваемое набором акустических излучателей, сильнее магнитного поля при гибридном магнито-акустическом формировании ТКМ

Объекты, находящиеся в жидкой среде, устремляются в область «магнитоакустической ловушки» в результате совместного действия гравитационных, магнитных и акустических сил. Комбинация магнитного и акустического полей открывает новые возможности и позволяет формировать сложные трехмерные структуры.

Для генерации магнитоакустического поля источники акустического излучения могут быть размещены в зазоре между полюсами магнитов или в отверстии электромагнита. Схема устройства для генерации магнитоакустического поля и условия формирования приведены на рисунке 3.3.2.

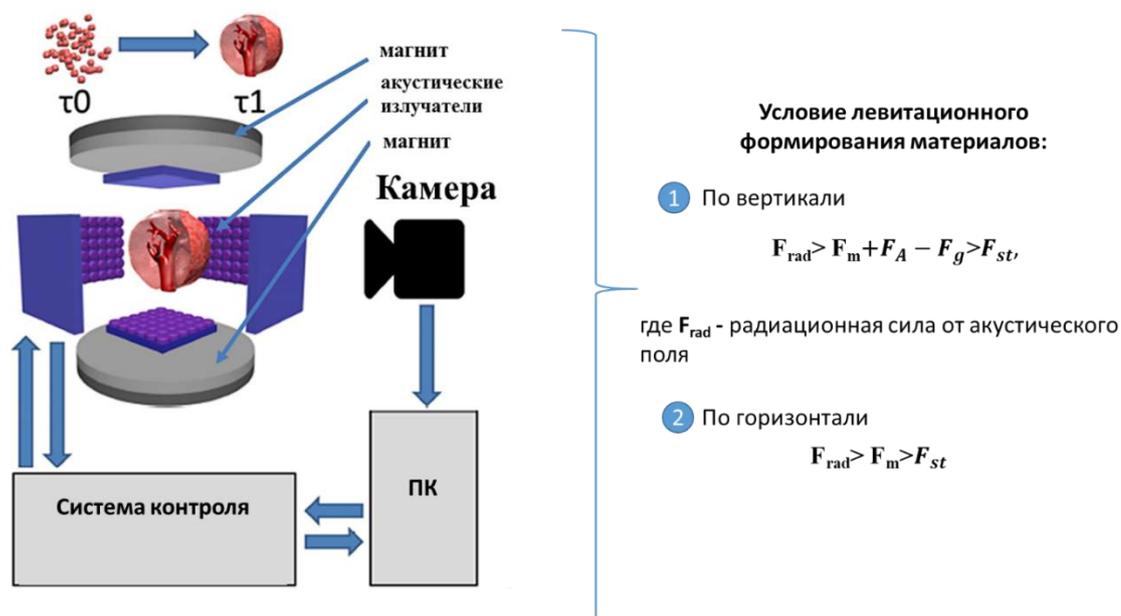


Рисунок 3.3.2 – Схематическое изображение формирования ТКМ под воздействием комбинации магнитного и акустического полей. Условия левитационного формирования материалов

Способ магнитоакустического формирования можно условно разделить на две стадии:

- процесс формирования объектов в определенную, заранее выбранную, форму, которая определяется параметрами магнитного поля и структурой акустического поля. При отключении полей сразу после формирования форма образца развалится.

- процесс образования единого изделия (слияние, перекристаллизация и др.) - удерживание объектов в заданной форме для обеспечения процесса объединения. Стадия наступает сразу после окончания процесса формирования. Поддерживающая стадия длится 3-40 ч и более, при этом интенсивность ультразвуковой волны должна быть достаточно малой, чтобы не повредить клеточный материал.

### 3.3.2 Действие силы акустического излучения на малые рассеиватели в цилиндрическом волновом поле

Для произвольных граничных условий поле акустического давления  $P(r, \varphi)$  внутри круга радиуса  $a$  на заданной частоте определяется как решение задачи Гельмгольца:

$$\begin{cases} \Delta P(r, \varphi) + k^2 P(r, \varphi) = 0, & 0 \leq \varphi < 2\pi, \quad 0 < r < a, \\ P(a, \varphi) = h(\varphi), & 0 \leq \varphi \leq 2\pi, \end{cases} \quad (3.7.1)$$

где  $r, \varphi$  - радиальная и угловая координаты соответственно,  $h(\varphi)$  - граничное условие,  $k = \frac{2\pi f}{c}$  - волновое число, которое зависит от частоты волны  $f$  и скорости звука  $c$ .

Решением проблемы Гельмгольца является следующая сумма:

$$u(r, \varphi) = \sum_{n=0}^{\infty} [A_n \cos(n\varphi) + B_n \sin(n\varphi)] J_n(kr), \quad (3.7.2)$$

где коэффициенты  $A_n$  и  $B_n$  определяются граничным условием:

$$A_n = \frac{1}{2\pi J_n(ka)} \int_0^{2\pi} h(\varphi) \cos(n\varphi) d\varphi, \quad n = 0, 1 \dots \quad (3.7.3)$$

$$B_n = \frac{1}{2\pi J_n(ka)} \int_0^{2\pi} h(\varphi) \sin(n\varphi) d\varphi, \quad n = 1, 2 \dots \quad (3.7.4)$$

$J_n$  - функция Бесселя  $n$ -го порядка. В простейшем случае колебания пьезоэлектрического цилиндра радиально-симметричны, так как  $h(\varphi) = P_0 = const$ . В этом случае все коэффициенты  $A_n$  и  $B_n$  для  $n \geq 1$  обратятся в ноль, а единственный ненулевой коэффициент  $A_0$  будет равен:

$$A_0 = P_0 / J_0(ka), \quad (3.7.5)$$

Распределение давления в круге будет описано следующим образом:

$$P(r, \varphi) = \frac{P_0}{J_0(ka)} J_0(kr) \quad (3.7.6)$$

Итак, видно, что максимальная амплитуда акустического давления соответствует центру круга, в то время как амплитуда неограниченно увеличивается, когда

$$J_0(ka) = 0 \quad (3.7.7)$$

Это уравнение фактически является условием резонанса и позволяет вычислять резонансные частоты с наибольшей амплитудой звукового давления. Также стоит отметить, что функционально радиальное распределение давления соответствует функции Бесселя нулевого порядка. Таким образом, легко вычислить радиусы зон, образующих узлы и пучности. Например, радиус первого узла от центра определяется соотношением:

$$r \approx \frac{2,41}{k} \quad (3.7.8)$$

Радиус области узлового поля можно регулировать, изменяя частоту ультразвукового поля на генераторе.

Если в области распространения ультразвуковой волны есть объекты с импедансом, отличным от импеданса среды, возникнет эффект рассеяния волны, и на сам объект будет действовать сила акустического излучения. Радиационная сила  $\mathbf{F}_r$ , действующая на диффузор произвольной формы, может быть выражена как [161]:

$$\mathbf{F}_r = \oint_{\sigma} \frac{d\mathbf{F}_r}{d\sigma} d\sigma, \quad (3.7.9)$$

$$\frac{d\mathbf{F}_r}{d\sigma} = \left\langle \left( \frac{\rho v^2}{2} - \frac{P^2}{2\rho c^2} \right) \mathbf{n} - \rho \mathbf{v}(\mathbf{v} \cdot \mathbf{n}) \right\rangle, \quad (3.7.10)$$

где  $\sigma$  - каждая замкнутая поверхность вокруг диффузора,  $\rho$  и  $c$  - плотность и скорость звука в среде,  $\mathbf{v}$  и  $P$  - колебательная скорость и давление ультразвуковой волны,  $\mathbf{n}$  - вектор нормали вне поверхности  $\sigma$ , треугольные скобки обозначают усреднение по периоду волны. Приведенное выше уравнение получено из теории линейного рассеяния и может быть вычислено численно.

Если принять диффузор за упругую сферу с малым волновым размером, формула сильно упростится. В этом случае радиационная сила может быть рассчитана через потенциал Горькова [161,162]:

$$\mathbf{F}_r = -\nabla U, \quad (3.7.11)$$

$$U = \frac{\pi r_{sc}^3}{3} \left\{ f_1 \frac{|P|^2}{\rho c^2} - \frac{3}{2} f_2 \rho |\mathbf{v}|^2 \right\}, \quad (3.7.12)$$

где  $r_{sc}$  - радиус рассеивателя, а множители  $f_1$  и  $f_2$  зависят от упругих свойств рассеивателя:  $\rho_{sc}$ , продольная и поперечная скорости звука  $c_l, c_t$ :

$$f_1 = 1 - \frac{\rho c^2}{\rho_{sc} c_l^2} \frac{1}{1 - \frac{4c_t^2}{3c_l^2}}, \quad (3.7.13)$$

$$f_2 = 2 \frac{\rho_{sc} - \rho}{2\rho_{sc} + \rho}. \quad (3.7.14)$$

В случае постоянного ультразвукового поля, когда акустический импеданс малого рассеивателя выше, чем у среды, радиационная сила действует в направлении к ближайшему узлу. Таким образом, если поместить набор малых сферических объектов в стоячее поле внутри колеблющегося пьезоэлектрического цилиндрического преобразователя и скомпенсировать действующую на них силу тяжести магнитной силой, можно ожидать, что радиационная сила поместит частицы в узлы ультразвукового поля и сформирует из них цилиндрические образцы. Толщина стенки такого образца будет определяться соотношением между длиной волны и радиусом объектов, а радиус получаемых ТКМ будет задаваться излучаемой частотой.

### 3.3.3 Магнитоакустический стенд на основе постоянных магнитов

В качестве основного инструмента формирования образцов используется действующая на объекты комбинация неоднородного магнитного и стоячего акустического полей, которые создают в некоторой области «магнитоакустическую ловушку».

Схема и 3D модель конструкции установки приведена на рисунке 3.3.3. Для создания кольцевых образцов экспериментальная установка состояла из двух кольцеобразных магнитов, соединенных друг с другом противоположными полюсами. В центре установки реализована цилиндрическая полость для размещения пьезоэлектрического преобразователя.

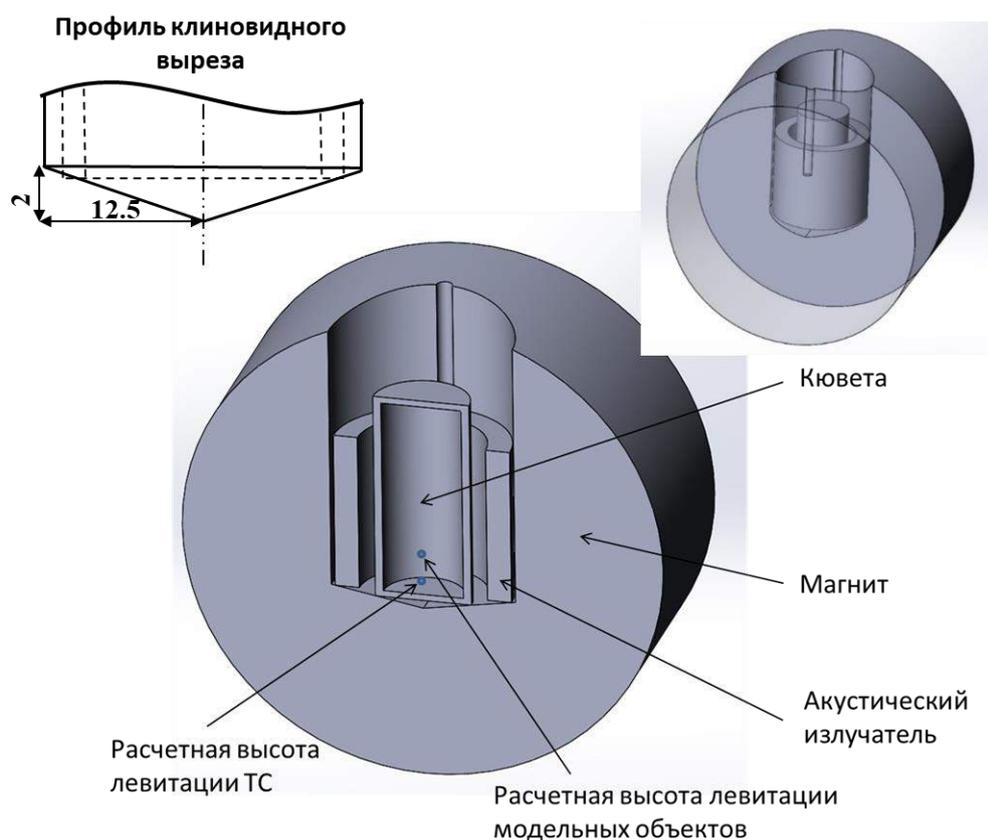


Рисунок 3.3.3 – 3D модель магнитоакустической установки на постоянных магнитах - показан вертикальный разрез установки

Для того, чтобы придать образцам из объектов кольцевую геометрию использовался пьезоэлектрический преобразователь в форме цилиндра. В выемку между магнитами помещался цилиндрический ультразвуковой преобразователь, а внутри пьезокерамического цилиндра располагалась рабочая зона (кювета с объектами).

В качестве источника акустического поля использовался акустический преобразователь в форме пьезоэлектрического цилиндра с внутренним радиусом  $R_{\text{внутр}} = 16$  мм, внешним радиусом  $R_{\text{внеш}} = 22$  мм и высотой  $H = 20$  мм (рисунок 3.3.4).

Материал преобразователя пьезокерамика ЦТС-4. Толщина стенки 2 мм соответствовала частоте резонанса 770 кГц. Для того, чтобы создать стоячую волну внутри преобразователя, следовало выбрать такую частоту излучения, которая соответствовала бы геометрическому резонансу стоячей цилиндрической волны, то есть определялась бы условием:

$$J_0(kR_{\text{внутр}}) = 0,$$

где  $k = 2\pi f/c$  — волновое число,  $J_0$  — функция Бесселя нулевого порядка. В то же время частота излучения должна быть близка к частоте резонанса для эффективного электроакустического преобразования.

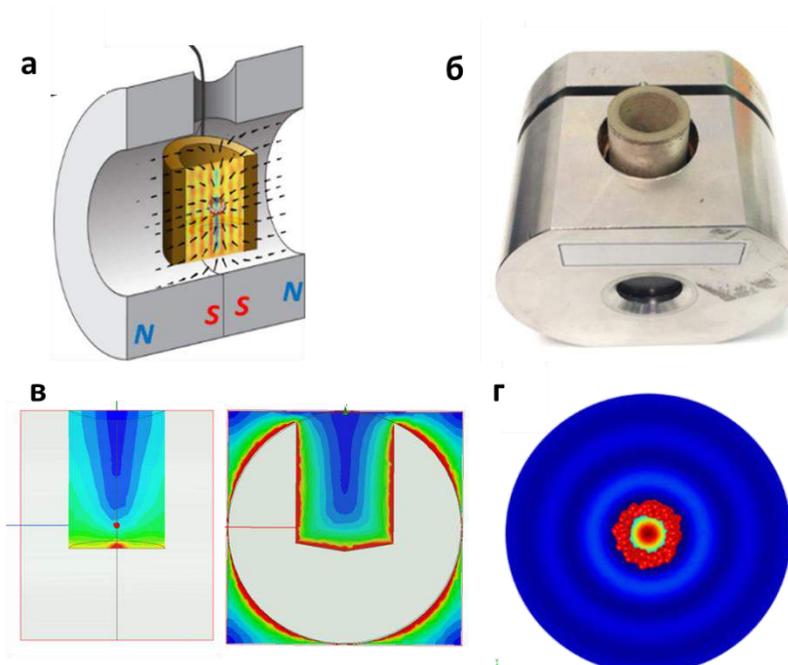


Рисунок 3.3.4 – Магнитоакустический стенд на базе постоянных магнитов:

- а) схематическое изображение конструкции установки (силовые линии показывают направление магнитофоретических сил, область внутри пьезоэлектрического преобразователя показывает распределение амплитуды акустического давления); б) изображение магнитоакустической установки с цилиндрическим ультразвуковым преобразователем; в) картина магнитного поля; г) результаты численного моделирования формирования ТС в магнитоакустическом поле (цвет фона показывает амплитуду потенциала Горькова) [163]

Магнитная часть экспериментальной установки создает локальный минимум потенциала магнитного поля. Из-за неоднородности магнитного поля и того факта, что относительная проницаемость ТС отличается от проницаемости фоновой

жидкости, возникает магнитофоретическая сила. Это вызывает движение частиц к областям с низким потенциалом магнитного поля.

В полости внутри преобразователя создавалось стоячее акустическое поле, близкое к цилиндрическому, следовательно, узлы поля тоже имели форму цилиндра. Объекты, попадающие в узлы такого поля, формировали образец кольцевой формы. Толщину стенки образца определял размер объектов и амплитуда акустического поля, а длину — количество объектов. Радиус кольцевого образца зависел от длины волны, излучаемой акустическим преобразователем. Частота ультразвуковой волны выбрана при следующих двух условиях: частота должна быть близка к резонансу как для толщины преобразователя, так и для стоячей цилиндрической волны внутри цилиндра пьезокерамического акустического преобразователя. В условиях эксперимента, чтобы получить кольцевой образец диаметром 1,5 мм, использовалась ультразвуковая волна с частотой 780 кГц.

### **3.3.4 Магнитоакустический стенд на основе магнита Биттера**

Как было показано выше, использование постоянных магнитов вносит сильные ограничения в возможности процесса формирования протяженных ТКМ. Рассмотрим магнитоакустическую установку на базе магнита Биттера для возможности снижения концентрации парамагнетика и увеличения размеров ТКМ.

#### **3.3.4.1 Топология магнитного и акустического полей и моделирование процесса формирования образцов**

Проект экспериментальной установки основан на результатах численного моделирования. Такие оценки были необходимы для определения распределения акустического давления и для моделирования действия акустического излучения и магнитофоретических сил. Оценка оптимальных параметров эксперимента

проводилась методом конечных элементов с использованием программного обеспечения «Comsol Multiphysics» и «Matlab».

Пьезоэлектрический цилиндрический преобразователь с радиальной поляризацией создавал акустическое поле с внутренним и внешним радиусами соответственно 8 мм и 10 мм, в длину - 20 мм. Распределение акустического давления, создаваемого цилиндрическим пьезокерамическим преобразователем в интересующей области, и его воздействие на частицы показано на рисунке 3.3.5 а.

Для прогнозирования траекторий движения частиц в магнитоакустическом поле и формирования трубчатых образцов моделировалось движение нестационарных объектов под действием всех действующих сил (под действием силы акустического излучения, магнитофоретической силы, силы сопротивления Стокса, силы упругости взаимодействия частиц и частиц и силы тяжести).

На основе полученного распределения результирующего поля акустического давления рассчитан потенциал Горькова, на основе которого определена радиационная сила (рисунок 3.3.5 б), действующая на сферические объекты, помещенные в акустическое поле [19]. Свойства объектов соответствовали физическим характеристикам клеточного материала (скорость ультразвука составляла 1600 м/с, как для мышечной ткани, плотность составляла 1050 кг/м<sup>3</sup>, а диаметр составлял 0,2 мм).

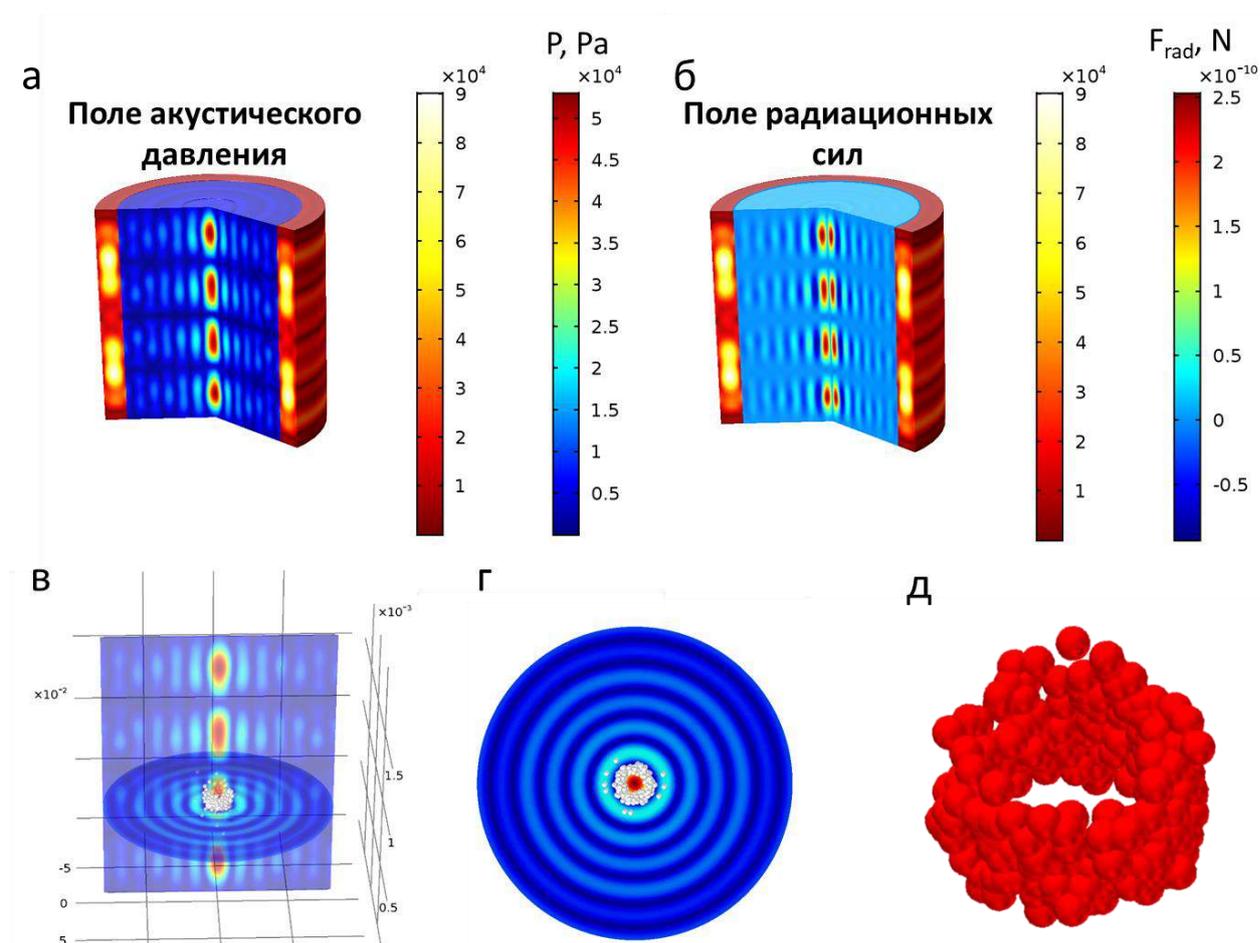


Рисунок 3.3.5 – Результаты численного моделирования акустического поля и процесса формирования образца в магнитоакустическом поле: а) распределение амплитуды акустического давления внутри преобразователя; б) распределение силы излучения; в) иллюстрация накопления объектов в узлах акустического поля давления; г) коаксиальная структура узлов стоячей волны внутри цилиндрического преобразователя; д) результирующий трубчатый образец, полученный в магнитоакустическом поле в результате моделирования движения объектов [83]

Распределение магнитного поля по оси магнита Биттера представлено на рисунке 3.3.6. Магнитное поле изменялось вдоль вертикальной оси и оставалось однородным в горизонтальной плоскости. Для расчета магнитофоретической силы использовались параметры: относительная магнитная проницаемость ТС и среды составляла  $\mu_{\text{sph}} = 0,999992$  и  $\mu_f = 0,9999994$  соответственно, напряженность магнитного поля составляла 9,5 Тл. Физические характеристики моделируемых объектов выбирались в соответствии с экспериментальными измерениями [66].

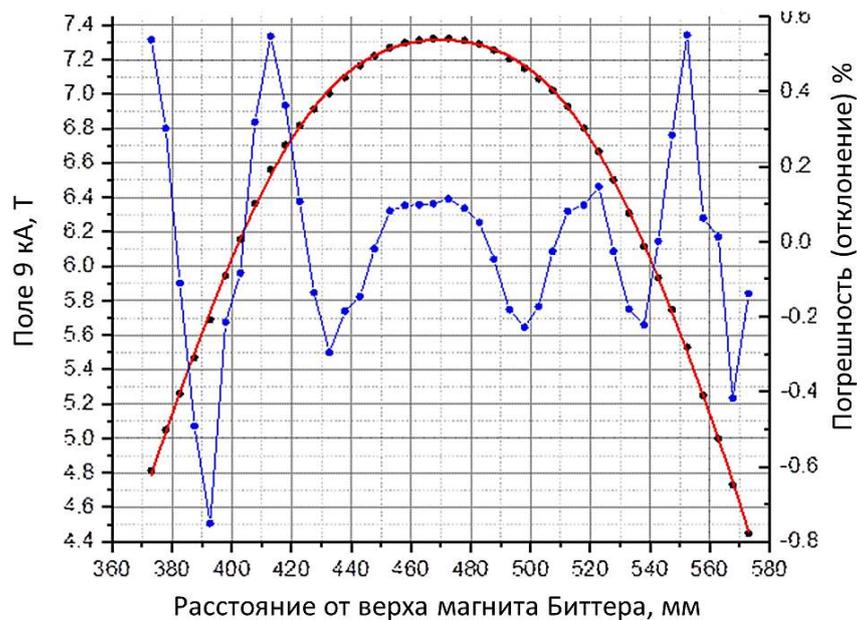


Рисунок 3.3.6 – Распределение магнитного поля по вертикальной оси магнита [164]

Для расчета силы акустического излучения использовался потенциал Горькова- потенциал акустической радиационной силы. Такой подход является довольно хорошим приближением для случая, когда длина волны намного больше, чем размер рассеивателя [165]. Минимум потенциала соответствует области, в которую направлены силы радиационного давления и куда будут устремляться ТС. Так как структура поля внутри преобразователя концентрическая, как и поле радиационной силы, то при сильном акустическом поле возможно образование не одного трубчатого образца, а нескольких коаксиальных. Однако, магнитная сила имеет еще и горизонтальную составляющую, «притягивающую» объекты к оси магнитной установки. Поэтому амплитуда излучаемой ультразвуковой волны выбиралась опытным путем, учитывая два условия: амплитуда должна быть больше магнитной силы в центре рабочей зоны, чтобы сформировать кольцо, то есть оттолкнуть объекты от центра, но меньше в области второго минимума потенциала радиационной силы, чтобы все объекты из рабочего объема участвовали в формировании единого кольца.

### 3.3.4.2 Исследование процесса формирования образцов в магнитоакустическом поле на базе магнита Биттера

Для обеспечения магнитной левитации применялся магнит Биттера с отверстием 50 мм и напряженностью поля 31 Тл [42]. Методика контроля процесса формирования с использованием системы зеркал и цифровой камеры показана на рисунке 3.3.7.

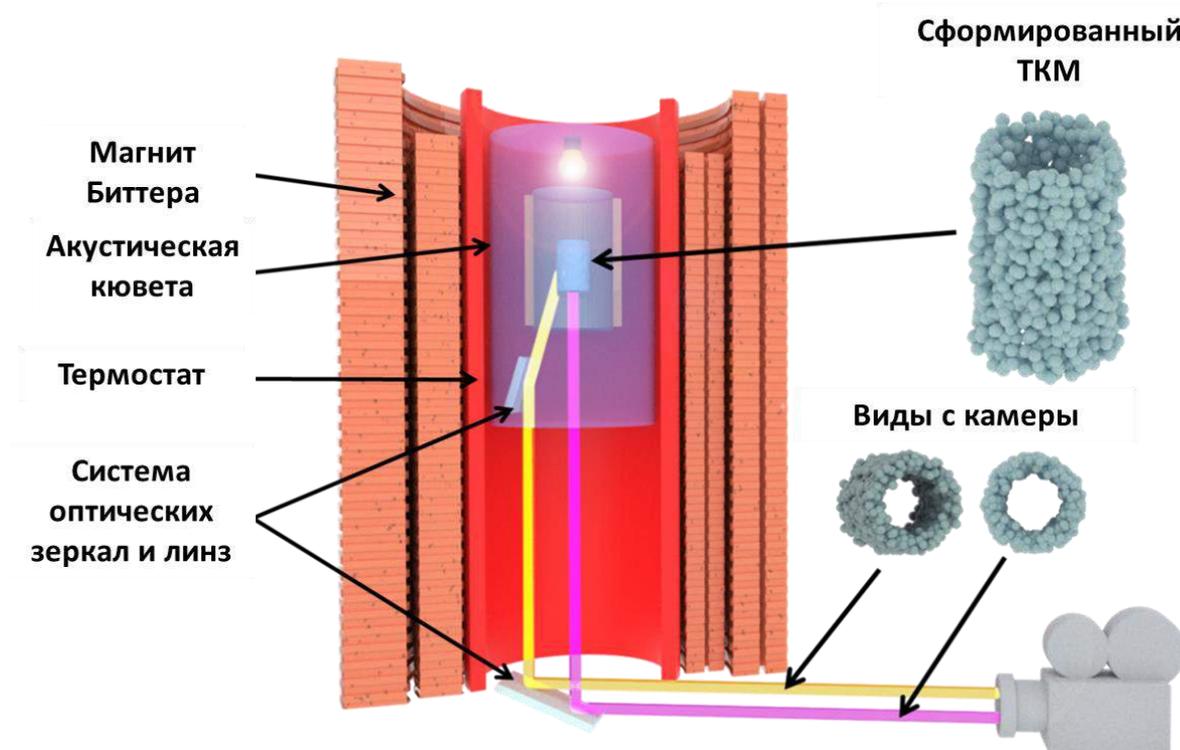


Рисунок 3.3.7 — Оптическая схема, используемая для регистрации формирования ТКМ в магнитоакустической установке [83]

Для процесса формирования использовалась кювета, содержащая пьезокерамические цилиндрические и кольцевые ультразвуковые преобразователи, светодиоды, оптическое зеркало для мониторинга, а также агарозный контейнер для ТС (рисунок 3.3.8 а,б).

Акустический блок вставлен непосредственно в отверстие термостата диаметром 40 мм. Термостат выполнен в виде герметичной прозрачной цилиндрической кюветы из поликарбоната с пластиковой крышкой из материала ZEDEX. Материалы, из которых выполнены кювета и крышка, выбирались из

материалов с низкой пористостью, поскольку появление пузырьков в области ультразвукового излучения нежелательно.

Платформа с вертикально расположенным цилиндрическим пьезоэлектрическим преобразователем прикреплена к крышке на пластиковых стержнях. Провода, соединенные с преобразователем, проходящие через центр кюветы, плотно прикреплены к крышке и выходили для последующего подключения к генератору сигналов и осциллографу. Кроме того, к крышке со стороны, обращенной внутрь кюветы, прикреплены светодиоды, которые подключены к источнику постоянного тока.

Чтобы наблюдать движение частиц во время эксперимента, использовали оптическую схему, состоящую из зеркала, расположенного под углом  $45^\circ$  к вертикальной оси, совпадающей с вертикальной осью магнита Биттера, фокусирующей линзы и видеокамеры с апертурой, учитывающей фокус. Поскольку нижняя часть кюветы прозрачная, эта схема позволяла наблюдать за формированием образца в вертикальном направлении (рисунок 3.3.7). Зеркало располагалось непосредственно под магнитом Биттера, а видеокамера и фокусирующая линза расположены таким образом, чтобы обеспечить удобное наблюдение за процессом формирования образца.

Оптическая система, установленная внутри кюветы, непосредственно под пьезоэлектрическим преобразователем, использовалась для оценки длины сформированного ТКМ. Небольшое зеркало прикреплено к пластиковому кольцу, плотно установленному внутри цилиндрической кюветы под небольшим углом к вертикали таким образом, чтобы приемная видеокамера захватила изображение через зеркало со смещенным углом в  $45^\circ$ .

Система также включает дополнительные горизонтально ориентированные зеркала, которые отражают свет, падающий сверху на объекты, для лучшей контрастности получаемого изображения. Таким образом, в ходе эксперимента получен вид снизу и вид сбоку формируемого образца.

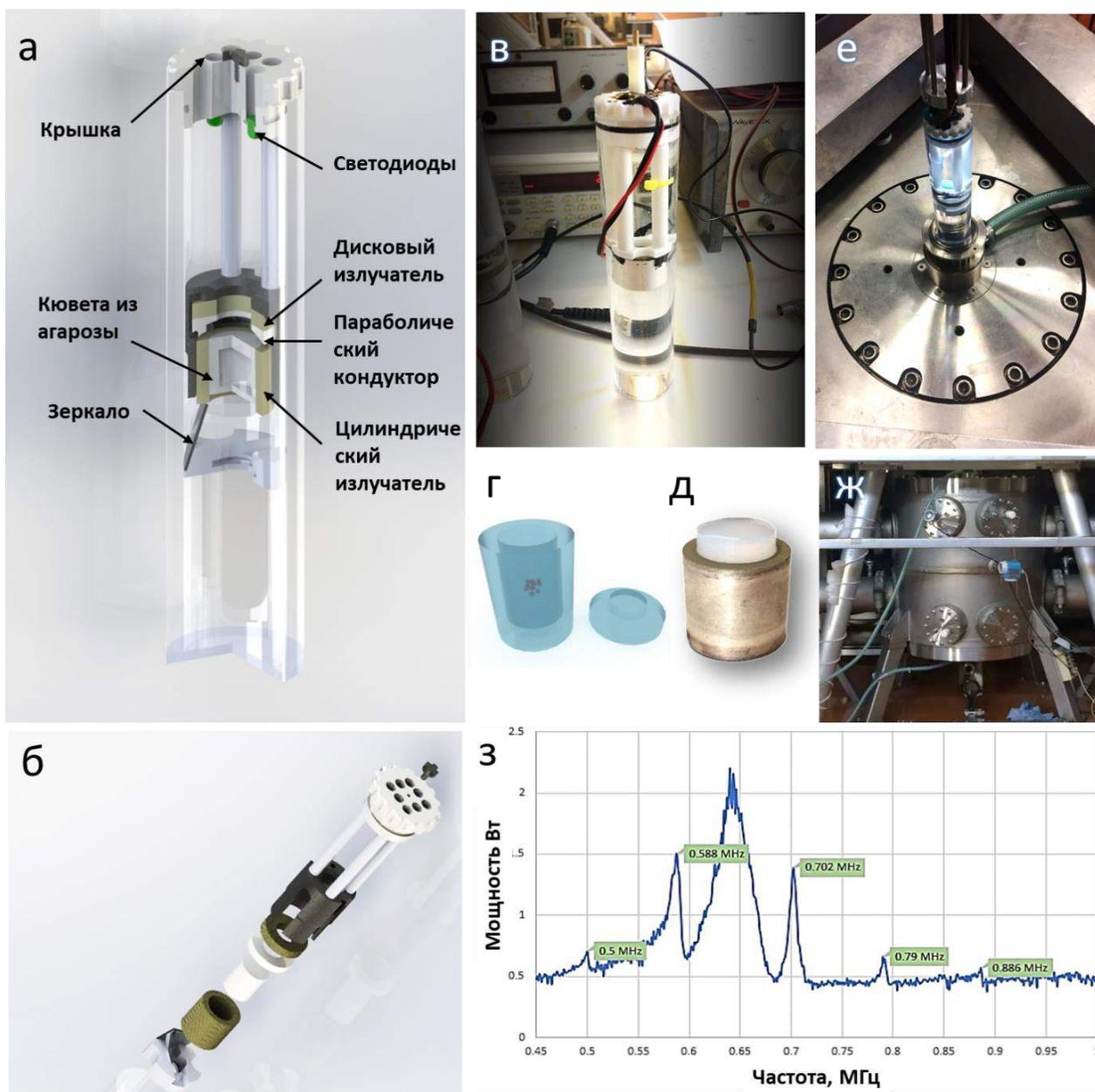


Рисунок 3.3.8 — Конструкция кюветы с акустическими преобразователями: а) схема кюветы; б) модель кюветы с элементами, разнесенными в пространстве; в) кювета с жидкостью; г) трехмерная модель агарозной кюветы с объектами внутри; д) агарозная кювета внутри цилиндрического преобразователя; е) установка кюветы в магнит Биттера; ж) магнит Биттера, использованный в экспериментах (вид сбоку); з) частотная зависимость электрической мощности преобразователя при идеальной нагрузке 50 Ом. Пики профиля соответствуют резонансным частотам системы [83]

Пьезокерамический цилиндрический акустический преобразователь (внутренний диаметр 8 мм, толщина стенки 2 мм) генерировал стоячие ультразвуковые волны на частотах, обеспечивающих формирование объектов в трубчатые образцы. Кольцевой преобразователь в сочетании с фокусирующей

параболической пластиной, помещенной над цилиндрическим акустическим преобразователем и сфокусированной внутри полого пространства цилиндрического акустического преобразователя, использовался для обеспечения перемешивания объектов перед началом процесса формирования объектов (рисунок 3.3.9).

Включение и выключение каждого преобразователя происходит последовательно: сначала для обеспечения перемешивания объектов - включается кольцевой преобразователь, затем выключается, и включается цилиндрический преобразователь для формирования трубчатого образца.

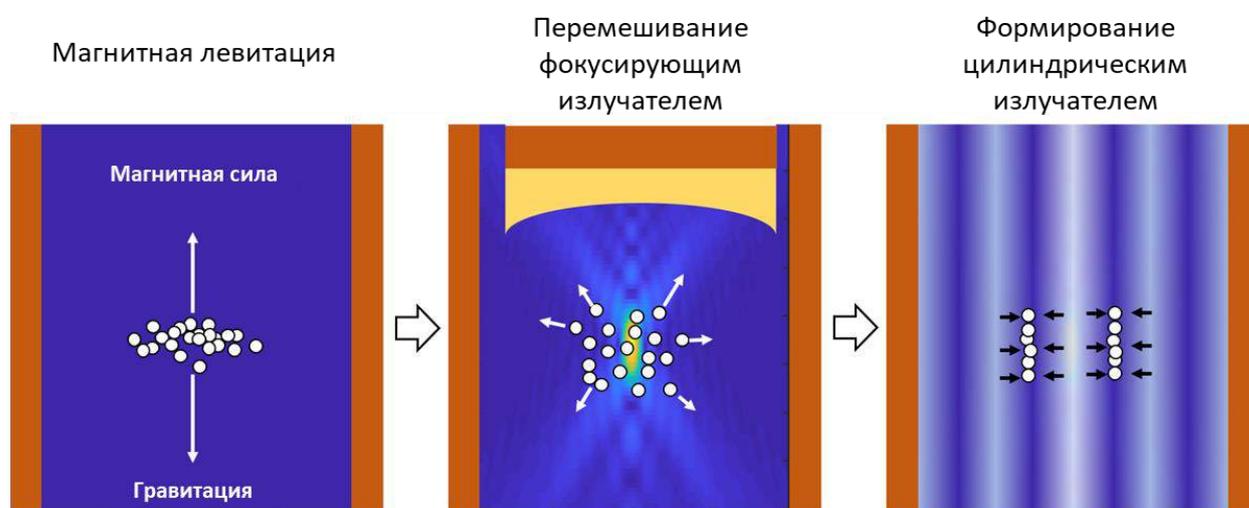


Рисунок 3.3.9 — Этапы формирования образца с помощью магнитной левитации, акустического поля от кольцевого пьезоэлектрического преобразователя и стоячего акустического поля от цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя [83]

Агарозная кювета с объектами и средой, содержащей 20 мМоль гадобутрола (рисунок 3.3.8 г), помещена внутрь цилиндрического преобразователя, как показано на рисунке 3.3.8 д. Использование контейнера из агарозы, а не традиционного пластика или стекла, было предпочтительным, поскольку плотность агарозы и скорость звука в ней очень близки к аналогичным параметрам воды. Это помогло избежать лишнего отражения и искажения волн. Собранный кювета была помещена внутрь магнита Биттера (рисунок 3.3.8 е,ж) с напряженностью магнитного поля 9,5 Тл. Формирование кольцеобразных и трубчатых структур разных диаметров достигнуто за счет применения

акустических волн с несколькими резонансными частотами в диапазоне от 0,5 до 1 МГц. Номинальная амплитуда акустической волны на выходе генератора составляла до 10 В (рисунок 3.3.9).

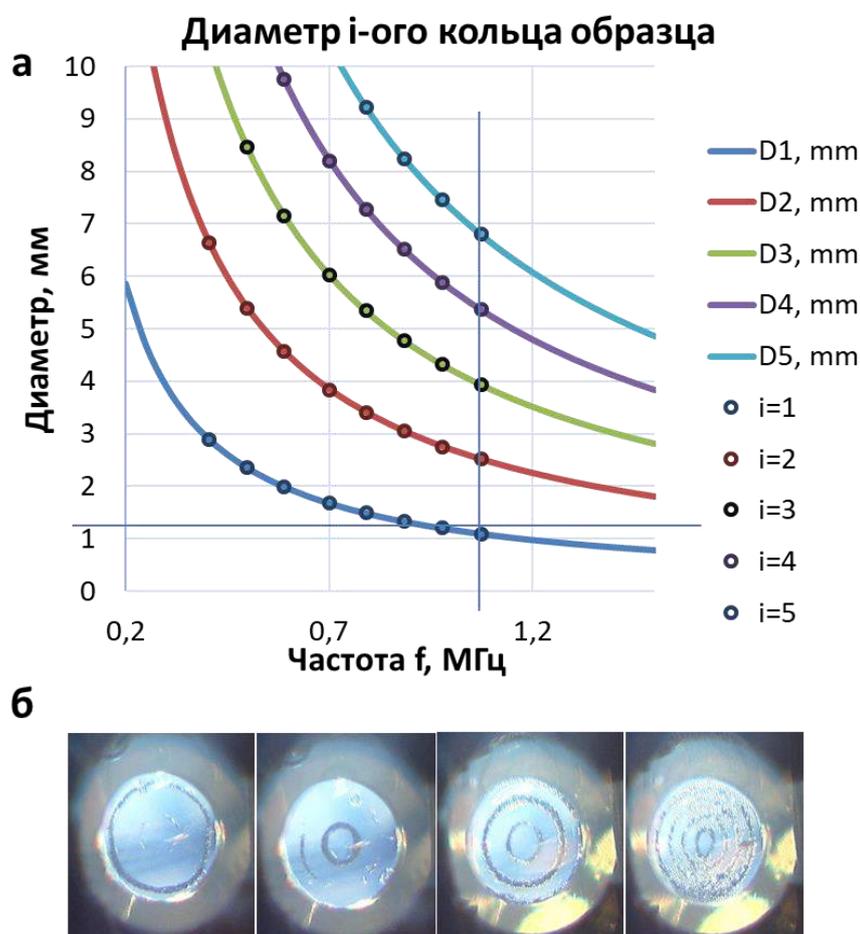


Рисунок 3.3.9 — Формирование образцов с различными диаметрами в зависимости от частоты акустического поля: а) расчетные значения диаметра от частоты акустического поля; б) фотографии формирования соосных кольцевых образцов из объектов в условиях левитации

Чтобы создать наиболее эффективную стоячую волну с помощью цилиндрического преобразователя, необходимо создать резонанс системы и одновременно достичь максимальной выходной мощности. Расположение преобразователя внутри кюветы, а также добавление культуральной колбы и отражателя в систему может изменить функцию электрической мощности частотного и сдвигового резонансов. Частотная зависимость электрической мощности преобразователя измерялась для настройки параметров максимальной мощности. Установлено, что максимум излучаемой энергии преобразователя соответствует частоте 0,64 МГц, а также существуют вторичные резонансы

(рисунок 3.3.8 з). Данный набор частот сообщался с различными конфигурациями постоянного ультразвукового поля и позволял создавать трубчатые ТКМ с различными диаметрами.

Установлена прямая зависимость диаметра формируемого изделия от используемой резонансной частоты (рисунок 3.3.10). Теоретические расчеты согласуются с экспериментальными данными.

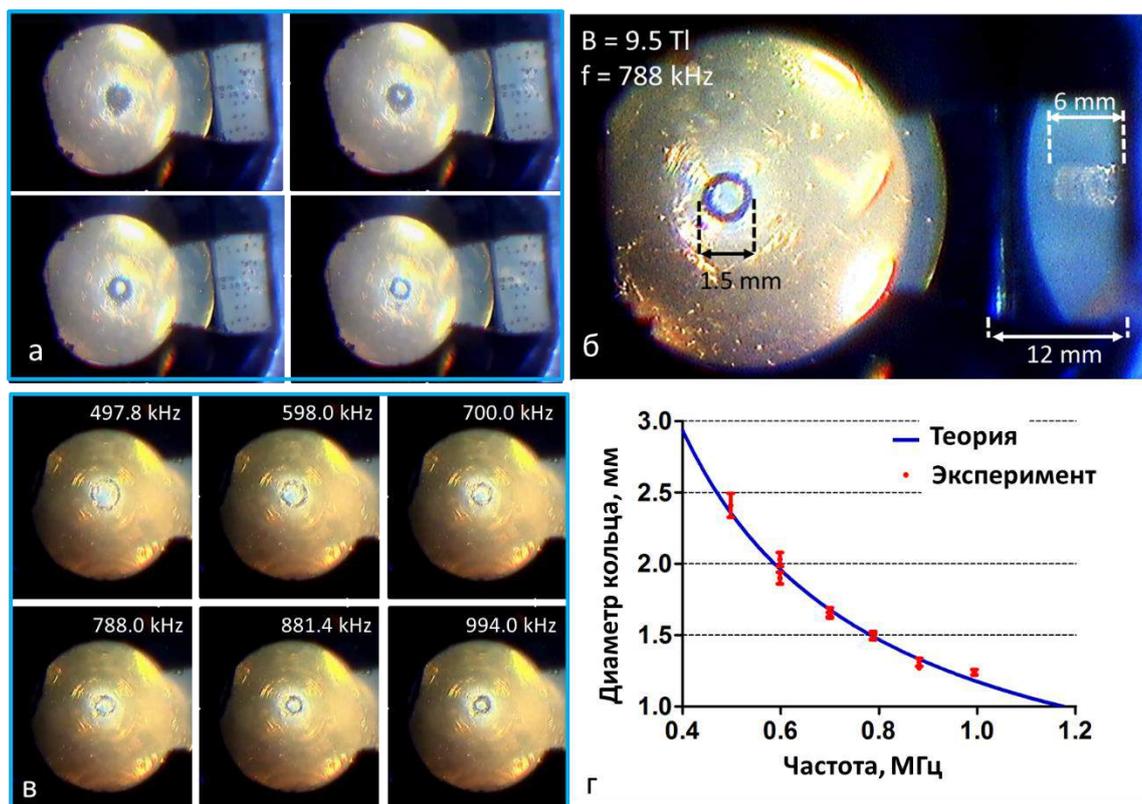


Рисунок 3.3.10 – Формирование образцов из полистироловых шариков при различных параметрах акустического поля: а) процесс формирования кольца в левитационном состоянии с использованием акустического и магнитного полей; б) левитирующий трубчатый ТКМ; в) изменение диаметра образца ТКМ зависит от частоты; г) сходимость экспериментального и рассчитанных диаметров [83]

Как и ожидалось, объекты, сформированные в узлах стоячих акустических волн, левитировали под действием магнитофоретической силы и образовывали сплошную трубку с радиусом, равным радиусу первого узла постоянного поля. Результаты численного моделирования (рисунок 3.3.5 в,г,д) воспроизведены в эксперименте. Форма сформированного образца согласуется с результатами моделирования.

В ходе эксперимента объекты были сосредоточены внутри пьезоэлектрического цилиндрического преобразователя, что обуславливало необходимость достижения высокой степени однородности поля в вертикальном направлении. Тем не менее, структура реального поля не была абсолютно однородной: на границе преобразователь-жидкость неизбежно появляются поверхностные акустические волны. Даже незначительные дефекты на поверхности преобразователя могут вызвать изменение амплитуды акустического давления [18].

### **3.4 Заключение по Главе 3**

Таким образом, разработаны и созданы стенды по генерации магнитных и акустических полей, а также представлены способы формирования ТКМ под действием магнитного, акустического полей и их комбинации, позволяющие производить формирование ТКМ при незначительной концентрации парамагнетика в окружающей жидкости за счет увеличения градиентов и силы магнитного поля. Рассмотрены акустические параметры (фазочастотные характеристики), необходимые для обеспечения возникновения требуемой радиационной силы и управляемого формирования образцов.

В следующей главе будет рассмотрено использование разработанных технических решений для формирования неорганических и органических ТКМ.

## Глава 4    ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ТРЕХМЕРНЫХ КОПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В НЕОДНОРОДНОМ МАГНИТНОМ, АКУСТИЧЕСКОМ ПОЛЯХ И ИХ КОМБИНАЦИИ

В четвертой главе представлены результаты формирования функциональных ТКМ для ТИ (рисунок 4.0.1) в неоднородном магнитном, акустическом полях и их комбинации.



Рисунок 4.0.1. – Формирование ТКМ

Общая маршрутизация процесса формирования и исследования ТКМ приведена на рисунке 4.0.2.

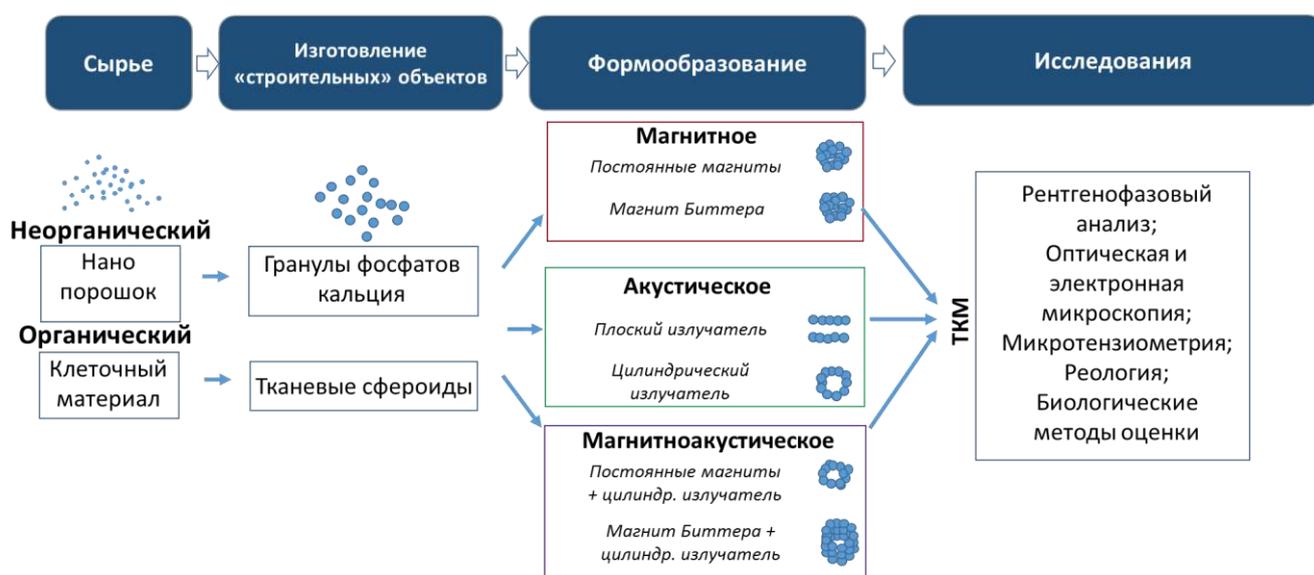


Рисунок 4.0.2 - Маршрутизация процесса формирования и исследования ТКМ

## **4.1 Формирование трехмерных композиционных материалов твердых тканей на основе фосфатов кальция**

### **4.1.1 В магнитном поле на базе постоянных кольцевых магнитов**

В данном исследовании впервые представлено магнитно-левитационное формирование объектов ФК с использованием специальных буферных растворов с последующей перекристаллизацией в условиях левитации. Основной целью настоящего исследования было доказать возможность формирования объектов  $\alpha$ -ТКФ с последующим образованием ОКФ, рассматриваемый как наиболее благоприятный тип ФК для ремоделирования кости с образованием ТКМ в виде 3D-скаффолда для инженерии костной ткани [166,167].

Для изготовления ТКМ прозрачный шприц емкостью 2 мл («SMF», Германия) заполняли буфером №1, содержащим частицы  $\alpha$ -ТКФ (отношение массы частиц к массе жидкости составляло 1:400). После энергичного встряхивания объекты распределялись по всему объему жидкости в шприце. Далее шприц был помещен в отверстие системы магнитов, частицы  $\alpha$ -ТКФ начали формироваться в «магнитной ловушке» под действием магнитных сил (рисунок 4.1.1). После того, как частицы  $\alpha$ -ТКФ сформированы в образец, происходил процесс перекристаллизации, который можно разделить на два этапа. На первом этапе  $\alpha$ -ТКФ оставались левитирующими в буфере №1 в течение 24 ч. На втором этапе шприц был извлечен из принтера, буфер №1 в шприце был заменен буфером №2, после чего шприц был снова помещен в магнитную установку. После этого экспериментальный образец подвергся дальнейшей перекристаллизации в условиях левитации в течение дополнительных 24 ч.

Хотя компьютерное моделирование, приведенное выше, предсказало сферическую форму конечного образца, в исследованиях после формирования было выявлено удлинение вертикальной формы образца (4.1.1). Это может быть

объяснено различием плотности объектов. Также можно отметить, что после 24 ч левитации в буфере №1 объекты начали оседать на образец.

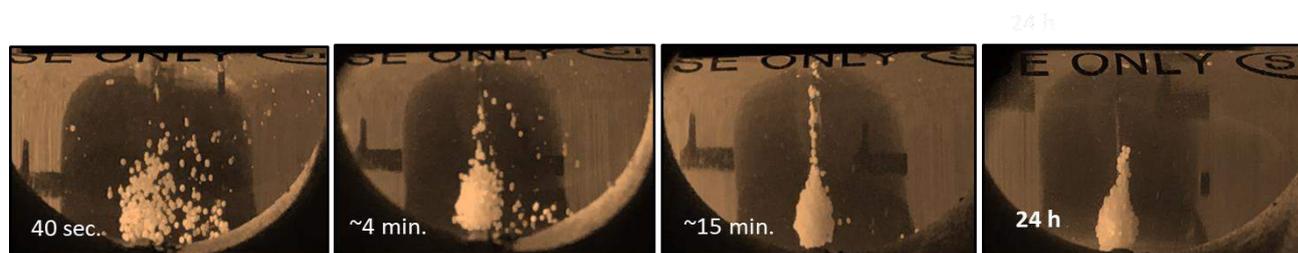
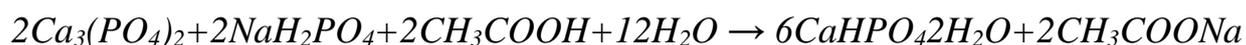


Рисунок 4.1.1 — Левитационное формирование ТКМ на основе ФК из частиц  $\alpha$ -ТКФ в парамагнитной среде с использованием магнитного поля (концентрация гадолиния составляет 3 Моль) [147]

Компьютерное моделирование формирования ТКМ проводилось для небольшого числа частиц. Несмотря на разницу в конечном размере образца между данными эксперимента и компьютерного моделирования, промежуточная зависимость времени для площади агрегации в обоих случаях была одинаковой.

В течение 24 ч начальная структура  $\alpha$ -ТКФ трансформируется в ДКФД (рисунок 4.1.2).  $\alpha$ -ТКФ на поверхности ТКМ растворяется из-за взаимодействия поверхности с продуктами диссоциации ацетата натрия, сопровождающегося выделением  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (преобладает в растворе) и  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  в растворе. Когда концентрация этих ионов достигает критического значения, происходит кристаллизация. Уровень насыщения усиливается за счет приложения неоднородного магнитного поля, поскольку концентрация анионов и катионов росла быстрее благодаря эффекту магнитного осаждения. Повышенная концентрация ионов в растворе приводит к образованию кристаллов ДКФД на поверхности  $\alpha$ -ТКФ с последующим их ростом. Образование ДКФД происходит по следующей схеме:



Далее происходит взаимодействие кристаллов ДКФД с продуктами диссоциации уксусной кислоты и гидроксида натрия, которые способствуют увеличению концентрации катионов  $\text{Ca}^{2+}$  и анионов  $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$  и  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  в интерфазе. Магнитная седиментация способствует увеличению концентрации

ионов в интерфазе, что приводит к осаждению ОКФ и образованию кристаллов ОКФ на поверхности ДКФД. Схему образования ОКФ можно представить следующим образом:

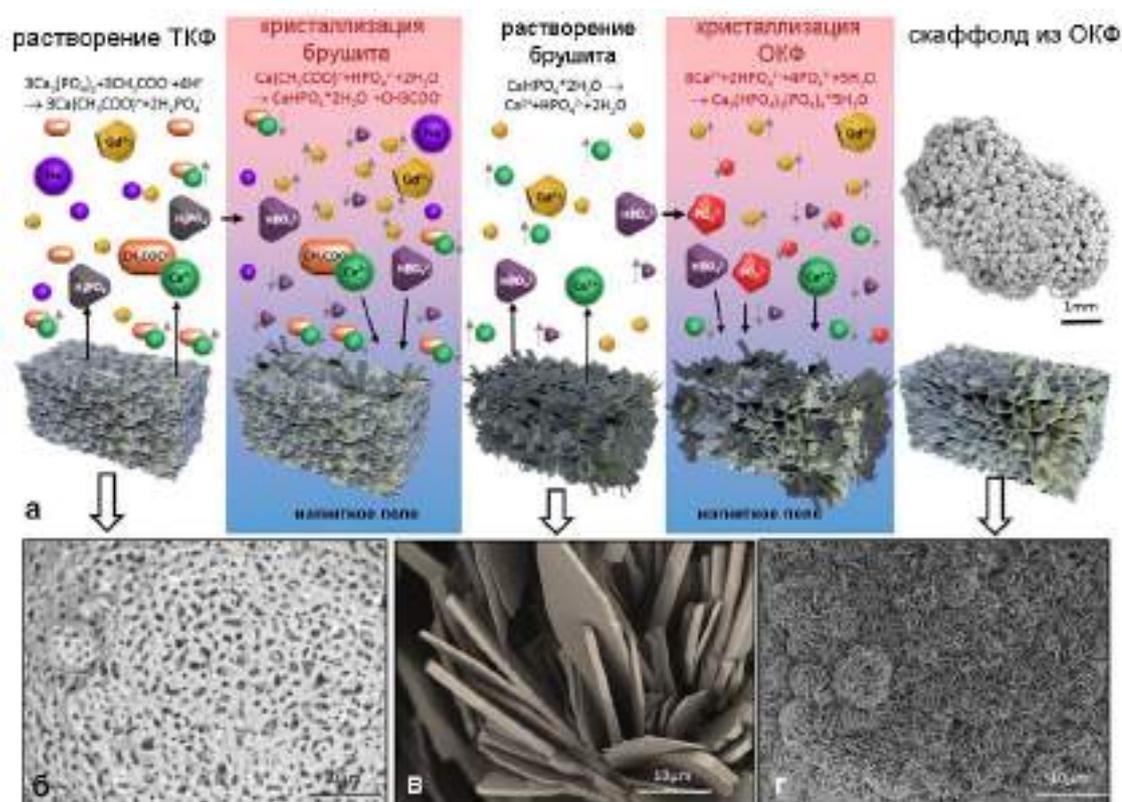
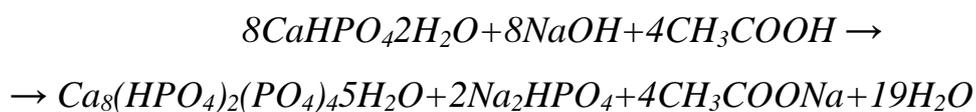


Рисунок 4.1.2 — Получение ТКМ из ФК в парамагнитной среде с использованием магнитного поля (концентрация гадолиния составляет 3 Моль): а) схематическое изображение стадий перекристаллизации; б) СЭМ поверхности исходных объектов  $\alpha$ -ТКФ; в) СЭМ фазы ДКФД (промежуточный продукт); г) СЭМ поверхности полученного ТКМ (фаза ОКФ) (шкала 10 мкм) [147]

В итоге вся структура была полностью преобразована в ОКФ (рисунок 4.1.2 г). Энергия Гиббса рассчитывалась на основе стандартной активности ионов, представленных в растворах.  $\Delta G$  образования ДКФД составляет 7 кДж/моль, а  $\Delta G$  образования ОКФ составляет 663 кДж/моль. Это подтвердило возможность этих реакций. На рисунке 4.1.3 приведен фазовый анализ ТКМ после каждой фазы перекристаллизации.

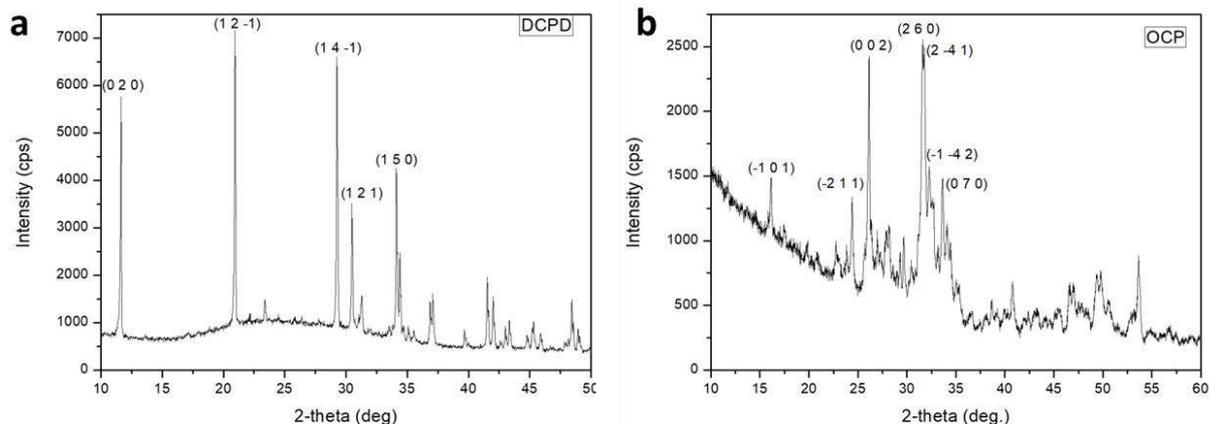


Рисунок 4.1.3 — Фазовый анализ ТКМ: а) РФА ТКМ изготовленного магнитной левитацией (20 ч в буфере №1) после фазы 1; б) рентгенофазовый анализ ТКМ, изготовленного магнитной левитацией, после фазы 1 (20 ч в буфере №1) и фазы 2 (20 ч в буфере №2) [147]

Для контроля был осуществлен процесс получения ТКМ в условиях, аналогичных буферным, но без использования магнитного поля. СЭМ полученного образца показана на рисунке 4.1.4. На поверхности контрольного образца не наблюдалось образования кристаллов ОКФ. Действительно, левитационное состояние в магнитном поле способствует формированию ОКФ за довольно короткое время, в течение 40-48 ч.

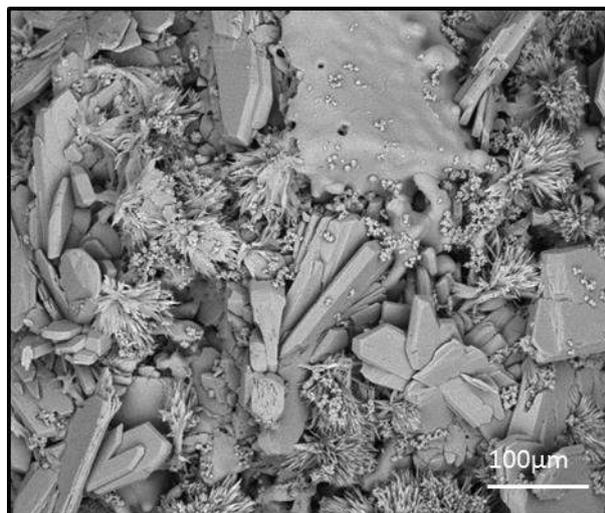


Рисунок 4.1.4 — СЭМ образца изготовленного без воздействия магнитного поля в аналогичных буферах [147]

Далее проведены исследования по цитотоксичности, адгезии и пролиферации клеток, полученных ТКМ.

На рисунке 4.1.5 а показано, что клетки SHED в культуральной среде, предварительно инкубированной с трехмерным скаффолдом, сохраняли 97% жизнеспособности после 72 ч инкубации в присутствии экстрактов.

Схематическое изображение миграции клеток SHED из ТС (рисунок 4.1.5 г) и их прикрепления к поверхности ТКМ (рисунок 4.1.5 д) показано на рисунке 4.1.5 г.

Поверхностные свойства ТКМ в отношении клеточной адгезии были оценены с помощью оптической, флуоресцентной микроскопии и СЭМ. Были использованы однодневные ТС из клеток SHED (рисунок 4.1.5 д), которые затем инкубировали в тесном контакте с ТКМ в течение 7 дней.

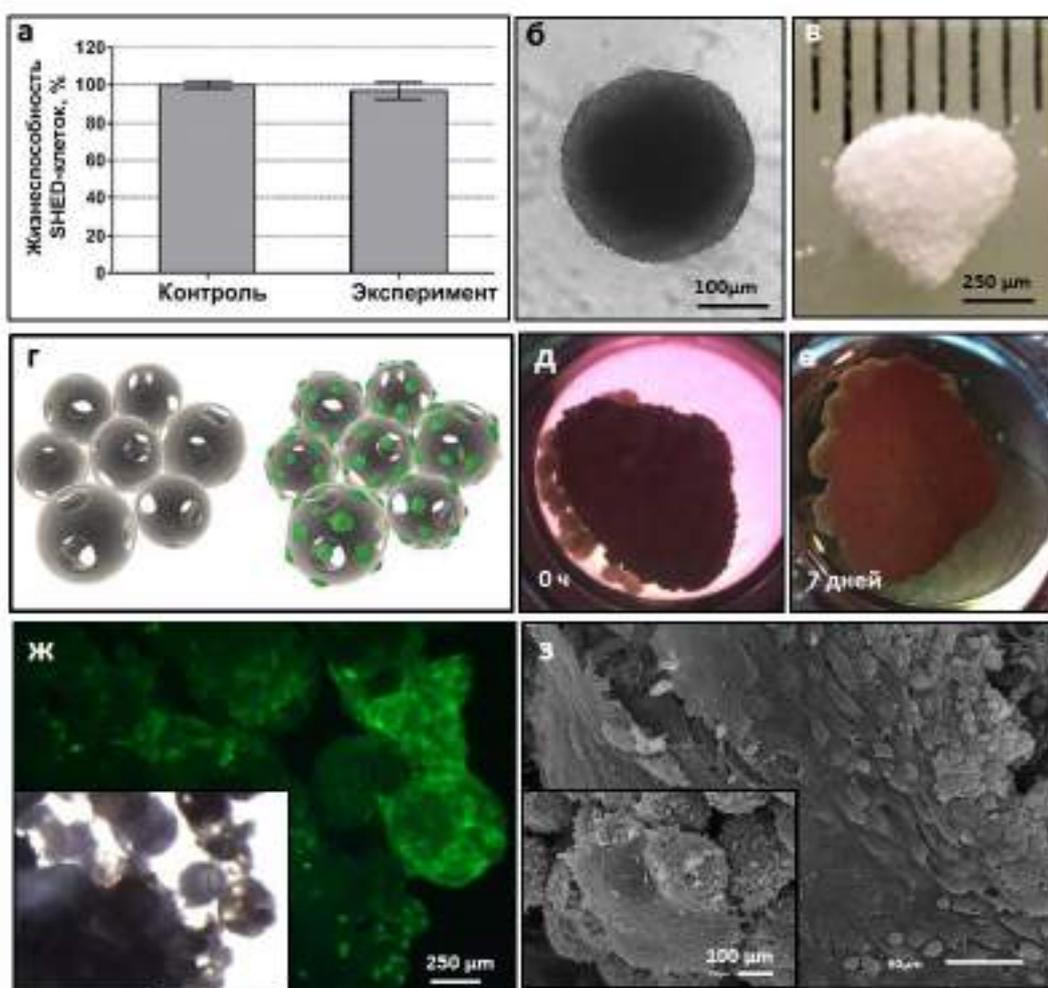


Рисунок 4.1.5 — Биосовместимость ТКМ: а) жизнеспособность клеток при 4-х дневной инкубации с ТКМ (анализ Alamar Blue, 72 ч); б) SHED ТС из 27000 клеток (шкала 100 мкм); в) ТКМ после формирования (шкала 2000 мкм); г) схематическое изображение прикрепления и миграции клеток SHED (зеленого цвета) на поверхность ТКМ; д,е) ТКМ, инкубированный со ТС SHED (0 ч - 7 дней); ж) изображения флуоресцентной и световой микроскопии ТКМ, инкубированного с ТС SHED (зеленого цвета) в течение 7 дней; з) СЭМ ТКМ с ТС SHED на поверхности после 7-дневной инкубации (шкала 50, 100 мкм) [147]

Можно наблюдать, что ТС прикрепляются к ТКМ и равномерно распределяются по его поверхности после 7 дней культивирования (рисунок 4.1.5 ж,з). Это указывает на нетоксичность и высокую биосовместимость ТКМ на основе ОКФ, полученные способом согласно настоящему методу.

Прочность на сжатие является одним из ключевых параметров для костной ткани. ТКМ имели несколько низкую прочность на сжатие. Это примерно 0,5 МПа. Однако, это значение является достаточным для инженерии костной ткани в качестве замещающего материала.

Производство ОКФ по-прежнему представляет собой множество проблем, которые, в частности, связаны с длительностью синтеза. Так, некоторые авторы сообщали о двухнедельном и более длительных сроках [50]. Представленный подход позволяет создавать ТКМ на основе фаз ОКФ в течение 40 ч. Более того данные РЭМ и РФА показывают, что гадолиний не остается ни в структуре, ни на поверхности ФК. Результаты показывают, что магнитное поле сильно способствует процессу роста и перекристаллизации кристаллов. Полученные данные коррелируются с другими исследованиями, посвященными изучению влияния неоднородного магнитного поля на качество белковых кристаллов [168]. Авторы цитируемых работ показали, что магнитное поле увеличивает скорость роста и улучшает чистоту получаемых кристаллов, что можно объяснить магнитной ориентацией и магнитным подавлением конвекции плавучести. Однако, механизмы, лежащие в основе процесса рекристаллизации ФК в магнитном поле, до сих пор остаются предметом дискуссий.

Помимо скорости перекристаллизации, еще одним важным свойством материала является его пористость. Формирование ТКМ подразумевает наиболее плотную упаковку сферических объектов. Пространство между гранулами называется взаимопроникающими порами, и существует линейная корреляция между взаимопроникающей пористостью при самой плотной гексагональной плотной упаковке сферических объектов и их диаметрами. По представленным данным диаметр проникающей поры составляет примерно 0,225 диаметра объектов. В настоящее время активно исследуется применение пористой керамики

с взаимопроникающими порами в качестве материала для заполнения костных дефектов [169]. Взаимопроникающие поры, как ожидается, будут иметь диаметр 10-135 мкм, чтобы обеспечить поступление крови и питательных веществ к контактной поверхности, а также способствовать прорастанию и закреплению новообразованной костной ткани [170,171]. Наличие пор меньшего диаметра также важно, поскольку они способствуют увеличению адсорбции белка и адгезии остеогенных клеток.

Таким образом, применение пористых частиц дополнительно обеспечивает osteoconductive свойства, и наиболее предпочтительной представляется керамика с бимодальным распределением пор по размерам. В приведенном исследовании изготовленные ТКМ имели достаточный уровень пористости, который мог бы обеспечить миграцию посеянных стволовых клеток внутри пористых каналов. В качестве альтернативы клетки или ТС могут быть помещены в гранулярное пространство между объектами.

Выбор типа и источника клеток является важным аспектом инженерии костной ткани. В настоящее время различные линии остеобластных клеток и MSC из различных источников, включая костный мозг, жировую ткань и пульпу зуба, являются наиболее распространенными клетками, используемыми для исследований на скаффолдах. MSC - это клетки, которые естественным образом участвуют в физиологических процессах регенерации. Следует отметить, что MSC способны к дальнейшей дифференцировке в сторону остеогенной линии, что делает их в комплексе с ТКМ на основе ОКФ перспективными кандидатами для использования в тканеинженерных подходах к регенерации кости. В настоящем исследовании использовались первичные адгезивные культуры MSC из пульпы молочных зубов. Эти клетки естественным образом участвуют в физиологических процессах регенерации и могут подвергаться остеогенной дифференцировке *in vitro*. Это делает их перспективными кандидатами для использования в тканеинженерных подходах к регенерации костной ткани.

Таким образом, с помощью предлагаемого подхода может быть реализовано изготовление тканеинженерного ТКМ на основе ОКФ и MSC, предназначенного

для регенерации костного дефекта и замещения костной ткани. Для подтверждения этого утверждения необходимо провести дополнительные исследования их механических и биологических свойств (в том числе тесты на животных *in vivo*). Еще одним фундаментальным вопросом, возникшим в результате данного исследования, является моделирование процесса рекристаллизации ФК в условиях левитации в неоднородном магнитном поле, что также должно быть уточнено в дальнейших экспериментах.

Однако, следует отметить, что для изготовления крупногабаритных ТКМ или костных тканей необходимо использовать мощные магнитные поля, например, генерируемые магнитами Биттера. В таких установках в сочетании с акустической системой и системой визуализации внутренней структуры можно не только изготавливать большие объемы, но и под воздействием радиационной силы, генерируемой акустическим полем, изготавливать ТКМ со сложной внутренней структурой (характерной для диафиза или апифиза кости) (рисунок 4.1.6).



Рисунок 4.1.6 – Схематическое изображение изготовления трехмерного каркаса с использованием магнитоакустического поля, включая сборку и перекристаллизацию скаффолда [147]

Для обеспечения изготовления сложных ТКМ, например, системы гаверсовых каналов для последующей васкуляризации, необходимо контролировать внутреннюю структуру и при необходимости вносить изменения в структуру акустического поля путем изменения частоты и амплитуды, например, с помощью компьютерной томографии реального времени.

#### 4.1.2 В акустическом поле от плоского излучателя

Для оценки возможности воздействия акустического поля на гранулы ФК использована акустическая установка, продемонстрированная на рисунке 4.4.2. Установка состояла из акустического плоского пьезокерамического излучателя, отражателя и емкости с гранулами. Рабочая зона погружена в воду для обеспечения стабильных характеристик звуковой волны.



Рисунок 4.4.2 – Акустическая установка: а) схема экспериментальной установки; б) фотография экспериментальной установки

Для постановки эксперимента емкость встряхивалась для взвешивания объектов. Под действием акустического поля гранулы фиксировались в узлах акустического поля (рисунок 4.4.3). На рисунке 4.4.3 также показана левитация гранул в более вязком растворе сахарозы.



Рисунок 4.4.3 – Левитационное формирование структур из гранул ФК в акустическом поле

Следует отметить, что за счет вязкости раствора гранулы после встряхивания медленнее опускались на дно до помещения в акустическое поле, что давало

возможность более детального изучения влияния воздействия на гранулы акустического поля по всей высоте емкости. Расстояние между левитирующими слоями из объектов составляло половину длины волны.

Далее будут приведены результаты исследований с использованием органического материала.

## **4.2 Формирование трехмерных композиционных материалов мягких тканей из клеточного материала**

### **4.2.1 В магнитном поле на базе постоянных магнитов из хрящевого клеточного материала**

Горизонты магнитного левитационного формирования были продемонстрированы в нескольких публикациях [99,154,172]. В ранних исследованиях авторы использовали преимущественно небиологические микрообъекты, такие как пластиковые шарики, клетки на шариках и клетки внутри гидрогелевых блоков. В данном разделе продемонстрировано быстрое производство ТКМ микротканей миллиметрового масштаба из хондросфер с помощью магнитно-левитационного формирования.

Земная гравитация - одно из самых серьезных препятствий для формирования биологических мягких тканей в условиях левитации. Одним из способов его преодоления является использование сильных градиентов магнитных полей с добавлением в рабочий раствор парамагнитных веществ. Однако, токсичность концентрации парамагнетика, позволяющей левитировать объекты, включает в себя возможное ограничение подхода. В представленном исследовании использована разработанная система из постоянных магнитов, причем разработка осуществлялась непосредственно с моделированием магнитных полей и МД-моделированием, что позволило достичь необходимые характеристики системы, позволяющие выполнять левитационное формирование ТС с нетоксичной

концентрацией парамагнетика в питательной среде. Предварительно были рассчитаны скорость и геометрическая форма формируемых ТКМ.

В исследовании использовались ТС (хондросферы), изготовленные из суставных хондроцитов. Ранее было показано, что близко расположенные хондросферы, как меченые магнитными наночастицами, так и без них, могут сливаться в крупногабаритные хрящевые ТКМ с использованием подхода без скаффолдов [82,173]. Более того, лечение дефектов хряща хондросферами, способными прикрепляться и распространяться по поврежденной поверхности хряща, уже было продемонстрировано в нескольких независимых доклинических и клинических исследованиях [174–176]. Однако, несмотря на множество положительных примеров медицинского применения магнитных, особенно на основе оксида железа, наночастиц, их возможная цитотоксичность *in vivo* все еще остается проблемой [141,177]. Представленные данные показывают, что магнитная левитация обеспечивает простой и быстрый способ для формирования ТКМ без поддерживающего материала и меток.

Хондросферы стандартного размера, формы и способные к слиянию были получены из первичных хондроцитов овец с использованием неадгезивных поверхностей. Магнитное левитационное формирование проводили с помощью устройства, оснащенного постоянными магнитами специальной формы в присутствии гадолиния ( $Gd^{3+}$ ) в питательных средах.

Для формирования ТКМ были использованы ТС 3-х дневного возраста. ТС имели четко очерченные края и сферическую форму на 3-е сутки культивирования (рисунок 4.2.1).

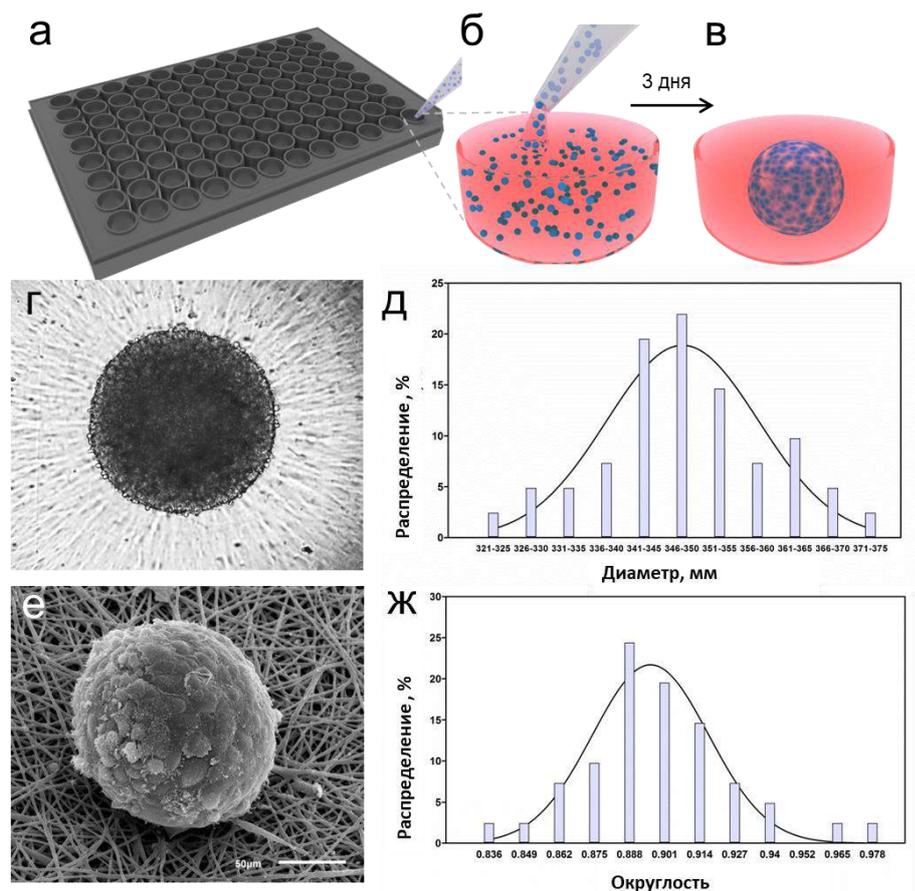


Рисунок 4.2.1 — Получение объектов формирования - ТС: а,б,в) схема ТС с использованием сверхнизкоадгезионных планшетов; г) фазово-контрастное изображение формирования хондросферы из первичных хондроцитов овец; д) распределение диаметра хондросфер, n=192; е) СЭМ хондросферы на поверхности электроспиннингового матрикса. Шкала бар – 100 мкм; ж) распределение округлости хондросфер, n=192 [40]

Для изучения морфологии и поверхностных характеристик ТС был произведен анализ их методом СЭМ (рисунок 4.2.1 е). Слои плотно упакованных клеток образовывали поверхность ТС. Стандартные размеры и форма ТС являются существенной предпосылкой для их использования в биопечати в качестве «строительных блоков». Диаметры ТС (рисунок 4.2.1 д) и округлость (рисунок 4.2.1 ж) измеряли через 3 дня культивирования. Средний диаметр ТС составил  $346 \pm 16,58$  мкм. Средняя округлость ТС составила  $0,907 \pm 0,047$ . Стандартные отклонения были  $<10\%$  от среднего значения как для диаметра, так и для округлости. Эти результаты показали, что ТС имеют одинаковый размер и форму и могут быть использованы для формирования ТКМ в виде мягких тканей.

Для оценки возможных токсических эффектов и определения оптимальной нетоксичной концентрации  $Gd^{3+}$  проводили гистологический анализ на полутонких срезах ТС 3-х дневного возраста (рисунок 4.2.2 а). В условиях без  $Gd^{3+}$  хондросферы демонстрировали высокую плотность клеток и интенсивное окрашивание цитоплазмы. В растворе  $Gd^{3+}$  с концентрацией 50 мМоль плотность клеток не изменялась, но окрашивание цитоплазмы было несколько снижено. При токсической концентрации 250 мМоль  $Gd^{3+}$  плотность клеток резко снижалась, что приводило к проявлениям клеточной гибели и апоптоза в виде пикнотических ядер и накоплению внеклеточного мусора.

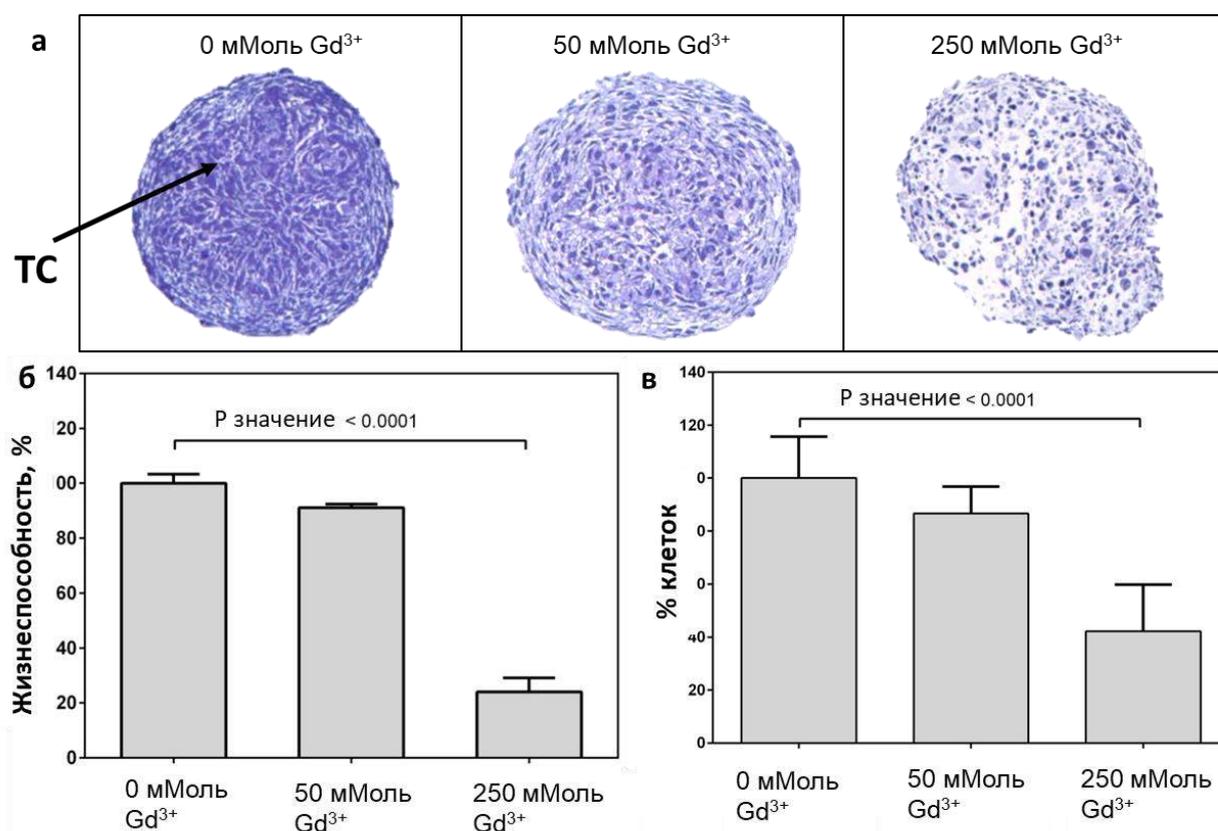


Рисунок 4.2.2 — Оценка токсического действия  $Gd^{3+}$ : а) внутренняя структура хондросфер при различных концентрациях  $Gd^{3+}$ . Окрашивание толуидиновым синим выявило выраженное токсическое действие на морфологию хондросфер при 250 мМоль  $Gd^{3+}$ ; б) жизнеспособность хондросфер существенно снижалась при 250 мМоль  $Gd^{3+}$  в клеточной культуральной среде; в) процент клеток с измененной морфологией в поперечных сечениях хондросфер при различных концентрациях  $Gd^{3+}$  [40]

Жизнеспособность клеток внутри ТС анализировали путем измерения люминесцентного сигнала, генерируемого люциферин-люциферазной связью в

зависимости от концентрации цитоплазматического АТФ. На рисунке 4.2.2 б показано, что ТС в 50 мМоль растворе  $Gd^{3+}$  оставались жизнеспособными после 24 ч инкубации, в то время как концентрация 250 мМоль  $Gd^{3+}$  проявляла значительный токсический эффект. Высокостатистически значимая разница ( $p < 0,0001$ ) в плотности клеток соответствовала 85% в 50 мМоль растворе  $Gd^{3+}$  по сравнению со 100% в 0 мМоль растворе  $Gd^{3+}$ , в то время как плотность клеток при концентрации 250 мМоль  $Gd^{3+}$  составляла 40% (рисунок 4.2.2 в). Таким образом, подсчет клеток показал, что увеличение концентрации  $Gd^{3+}$  приводит к снижению плотности клеток.

Влияние гадолиния  $Gd^{3+}$  на механические свойства ТС оценивали методом сжатия между двумя параллельными пластинами. Как показано на рисунке 4.2.3, механические свойства ТС сильно зависели от концентрации гадолиния  $Gd^{3+}$ . Значения условного модуля упругости ТС в растворах 0 и 50 мМоль  $Gd^{3+}$  составили  $2,91 \pm 0,15$  кПа и  $2,95 \pm 0,1$  кПа соответственно. Увеличение концентрации  $Gd^{3+}$  до 250 мМоль привело к снижению значения условного модуля упругости до  $0,14 \pm 0,05$  кПа. Это наблюдение можно объяснить низкой жизнеспособностью ТС в 250 мМоль растворе  $Gd^{3+}$ .

На рисунке 4.2.3 а показана диаграмма напряженно-деформированного состояния, полученная из кривой сила - перемещение. Резкий подъем кривой в области высоких значений деформации связан с увеличением поперечного сечения ТС. На рисунке 4.2.3 в показаны стадии процесса сжатия хондросферы между двумя параллельными пластинами. При сжатии до 20% от первоначального диаметра увеличение поперечного сечения не происходит. Кривая напряжение-деформация изменяется практически линейно перед этой деформацией. В этом диапазоне были рассчитаны условные модули упругости. Согласно результатам нетоксичная концентрация  $Gd^{3+}$  в ростовой среде практически не влияет на условный модуль упругости ТС, что, по-видимому, означает отсутствие существенных изменений во внутренней структуре ТС (рисунок 4.2.3 б). Наконец, при токсической концентрации 250 мМоль  $Gd^{3+}$  условный модуль упругости резко снижается приблизительно на 93%, что свидетельствует о том, что при данной

концентрации солей гадолиния внутри клеток происходят необратимые изменения, что явно сказывается на механических свойствах ТС.

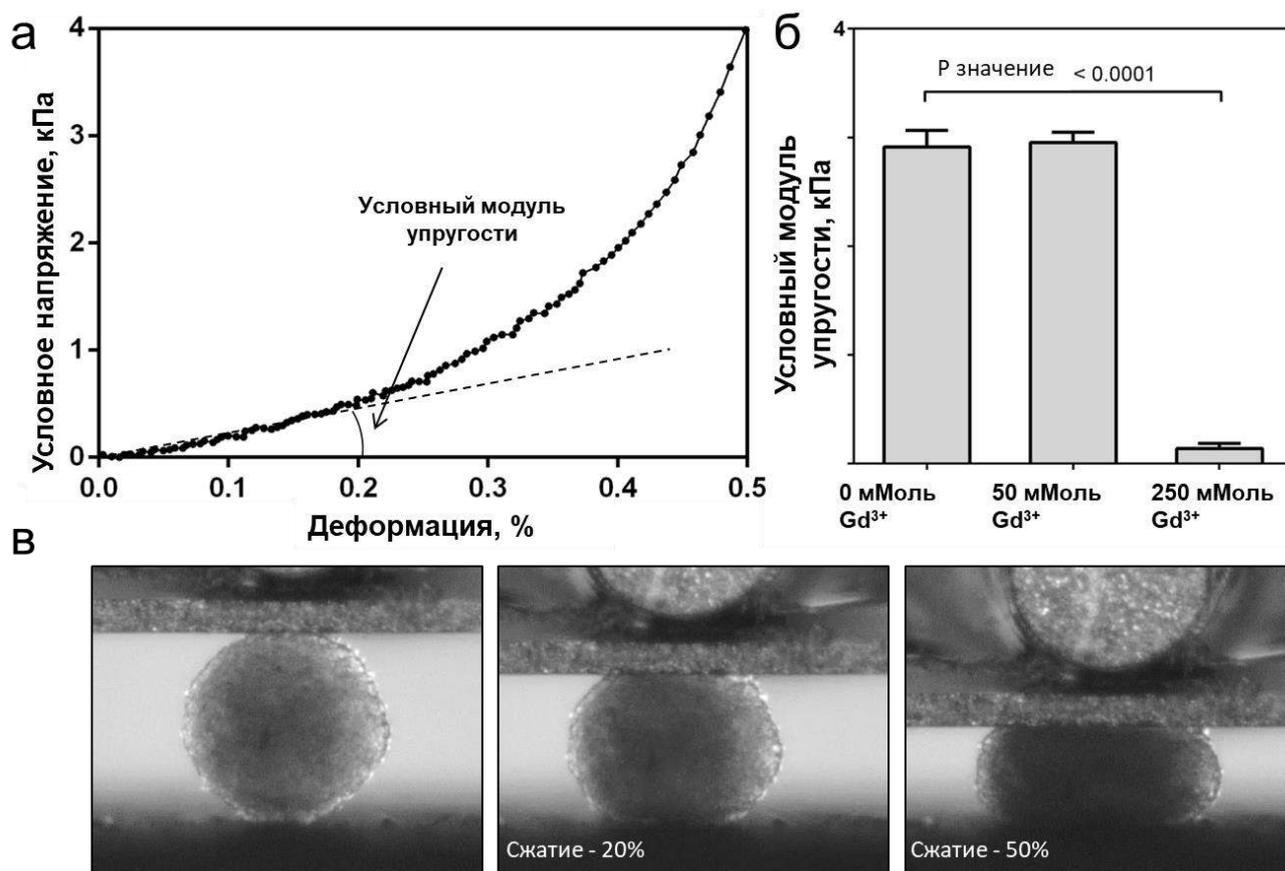


Рисунок 4.2.3 — Механические свойства ТС: а) диаграмма напряженно-деформированного состояния хондросферы при сжатии; б) модули упругости для хондросфер при различных концентрациях  $Gd^{3+}$  в растворе;  $n=12$ ; в) стадии сжатия при испытании механических свойств хондросфер [40]

Для исследования слияния ТС при различных концентрациях  $Gd^{3+}$  пары ТС помещали в контакт друг с другом в одну лунку микропланшета с низкой адгезией и оставляли сливаться в течение 7 дней. Кинетику слияния ТС контролировали и анализировали ежедневно в ярком поле под инвертированным микроскопом. Длина контакта, межсферный угол и длина дублета измерялись по методике [173] (рисунок 4.2.4 а). Как показано на рисунке 4.2.4 б, для сфероидных пар в растворах 0 и 50 мМоль  $Gd^{3+}$  контактные длины и межсферные углы увеличивались в зависимости от времени, а длины дублетов постепенно сокращались с первого дня культивирования. Сфероидный дублет в растворе 0 мМоль  $Gd^{3+}$  укорачивается быстрее, чем сфероидный дублет в растворе 50 мМоль  $Gd^{3+}$ . На седьмой день

инкубации межсферный угол увеличился до  $179^\circ$ , что свидетельствует о полном слиянии ТС. Пара ТС в 250 мМоль растворе  $Gd^{3+}$  продолжала сливаться в течение первых 24 ч, а затем дальнейшей прогрессирующей агрегации не наблюдалось. Это наблюдение подтвердило также высокую цитотоксичность 250 мМоль концентрации  $Gd^{3+}$ .

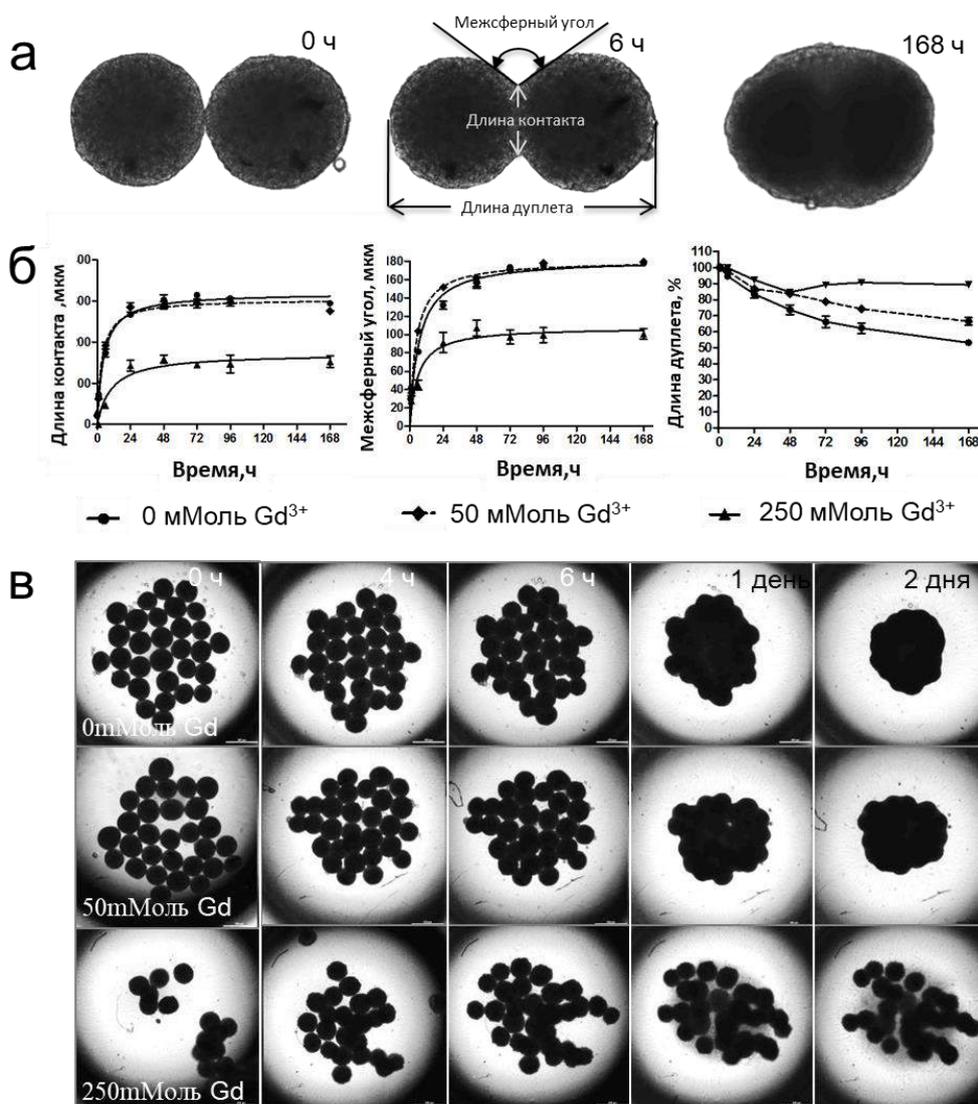


Рисунок 4.2.4 — Слияние ТС как функция времени: а) фазово-контрастные изображения после 0 ч, 6 ч и 24 ч слияния двух хондросфер. Показаны морфологические параметры, измеренные для характеристики стадии слияния; б) влияние  $Gd^{3+}$  на кинетику изменения длины контакта, межсферного угла и длины дуплета; в) влияние  $Gd^{3+}$  на слияние 30 тканевых хондросфер, помещенных в сверхнизкий адгезивный микропланшет. Фазово-контрастные изображения. Шкала бар – 500 мкм [40]

Чтобы проверить возможность формирования ТКМ при различных концентрациях  $Gd^{3+}$ , были помещены 30 хондросфер в одну и ту же лунку

неадгезивного планшета и выжидали слияния в течение 48 ч (рисунок 4.2.4 в). При концентрациях 0 и 50 мМоль  $Gd^{3+}$  образование компактных объединений наблюдалось через 2 дня инкубации, в то время как в 250 мМоль растворе  $Gd^{3+}$  никаких объединений не образовывалось.

На рисунке 4.2.5 а приведены этапы формирования ТКМ из ТС в магнитном поле. Время формирования ТС было короче на  $20\% \pm 1,5\%$  по сравнению с периодом формирования полистирольных шариков из-за разницы в магнитной восприимчивости диамагнитных материалов. Вместе с этим высота левитации сформированных образцов была ниже на  $1,2 \text{ мм} \pm 0,2 \text{ мм}$ , поскольку плотность ТС выше плотности полистирольных шариков, и, как следствие, выше сила тяжести. Это означает, что компенсация силы тяжести будет происходить в области, где магнитная сила выше, то есть ближе к поверхности магнита ввиду того, что градиент магнитного поля больше вблизи поверхности магнита. Кинетика формирования ТКМ коррелировалась с математическими прогнозами (рисунок 4.2.5 б).

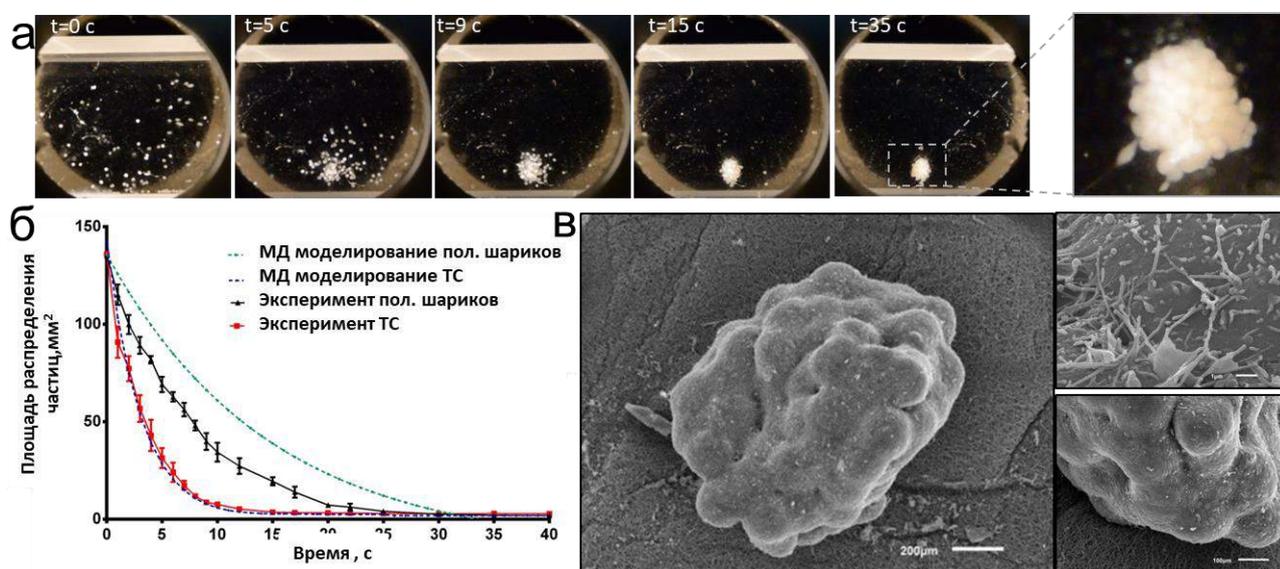


Рисунок 4.2.5 — Левитационное формирование ТКМ в магнитном поле: а) пошаговое формирование ТКМ из хондросфер; б) кинетика формирования моделируемых и экспериментальных ТКМ из полистирольных шариков и хондросфер; в) изображение СЭМ ТКМ хондросфер, собранной в магнитном поле в течение 24 ч. Вставки демонстрируют типичные поверхностные структуры хондроцитов, включая множественные микроворсинки при большом увеличении [40]

Анализ СЭМ показал слияние ТС в ТКМ (рисунок 4.2.5 в). Несмотря на

наличие некоторых канавок и ямок, соответствующих отдельным хондросферам, продолжающийся процесс слияния тканей был очевиден с постепенным сглаживанием поверхности образца.

Поведение слияния ТС было проиллюстрировано с помощью программного обеспечения с открытым исходным кодом Surface Evolver [178]. ТС были аппроксимированы и смоделированы в виде шаровидных капель жидкости стандартного размера и объема. Начальные положения близко соприкасающихся ТС были случайными, а затем эволюционировали путем градиентного спуска, чтобы минимизировать расстояние между центрами при условии, что центры находятся по крайней мере в диаметре друг от друга (рисунок 4.2.6).

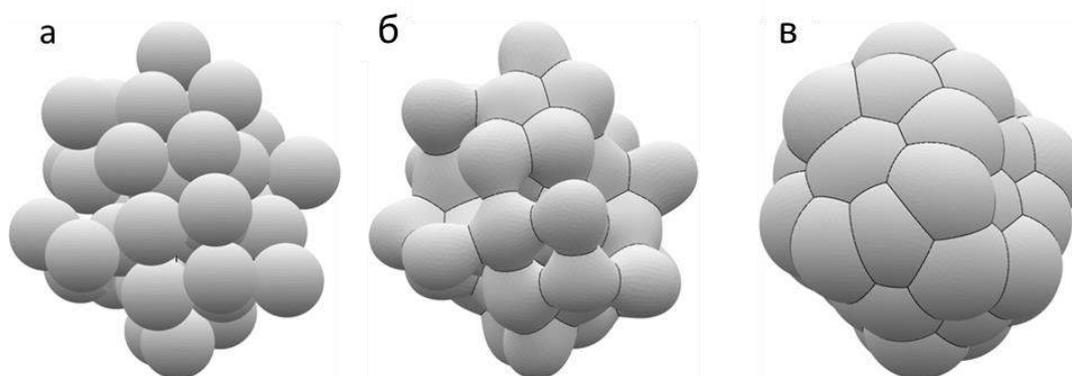


Рисунок 4.2.6 —Компьютерное моделирование с использованием программного обеспечения Surface Evolver продемонстрировали образование полости и пустых пространств между ТС в результате их неполного слияния: а) первоначальное соприкосновение ТС друг с другом; б) промежуточная стадия слияния ТС; в) теоретическая результирующая форма ТКМ, обусловленная слиянием ТС [40]

Прогрессивный процесс слияния ТС моделировался итерационным градиентным спуском, чтобы минимизировать поверхностную энергию при условии ограничения постоянных объемов ТС, пока движение не остановилось. Сценарий эволюции создал интерфейсы между ТС, где ТС соприкасаются.

Достигнутая конфигурация является локальным минимумом энергии, но не обязательно глобальным минимумом. Визуализированы прогрессирующие изменения формы одиночных ТС, контактирующих друг с другом внутри, образуя уплотненные образцы ТКМ. Моделирование было проведено для 40 шт. ТС. Данное моделирование позволяет прогнозировать поведение изменение формы в

процессе клеточного слияния.

Моделирование показало, что образование канавок неизбежно при случайной упаковке. Таким образом, образование пустого пространства можно объяснить либо неполным процессом слияния, либо жесткостью хондросфер. Предварительные эксперименты с участием более мягких ТС, таких как эмбриональные эксплантаты щитовидной железы мыши, показали полное слияние ТС в округлую и компактный ТКМ без каких-либо отверстий и пустого пространства.

С целью оценки жизнеспособности ТКМ был проведен гистологический анализ для визуализации состояния хондросфер и их слияния в сформированном ТКМ (рисунок 4.2.7). Показано, что жизнеспособные хондроциты плотно упакованы внутри ТС. Кинетика слияния ТС в ТКМ была иной. В результате были некоторые области полного слияния и были некоторые пробелы или неполное слияние в ТКМ, что, вероятно, отражает в том числе случайную начальную упаковку хондросфер. Подобные пустотные области были показаны ранее при слиянии клеточных агрегатов на предварительно растянутых электроспиннинговых матриксах [76], а также при слиянии хондросфер из клеток, меченых магнитными наночастицами оксида железа [179,180].

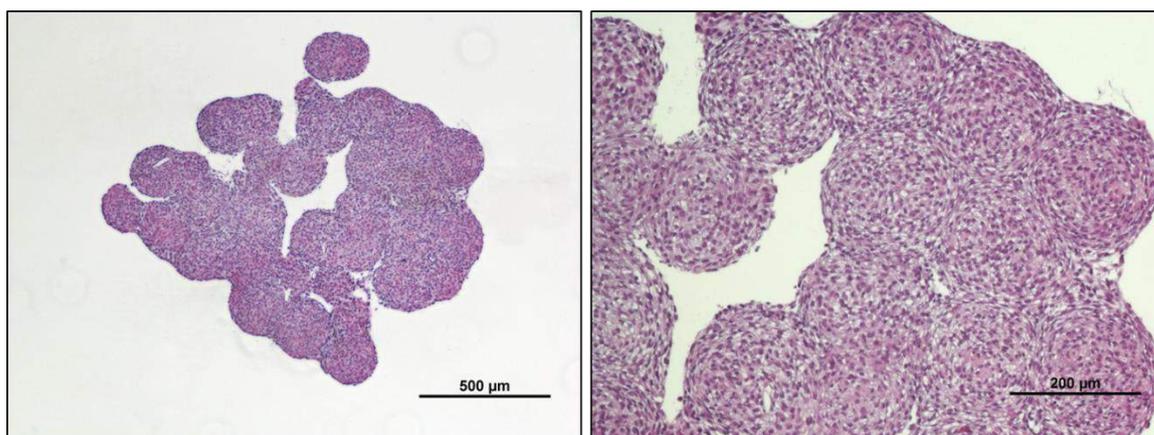


Рисунок 4.2.7 — Гистология ТКМ продемонстрировала продолжающееся слияние ТС и подтвердила образование случайных разрывов в результате незавершенного слияния тканей [40]

Основным результатом представленного раздела является доказательство концепции магнитно-левитационного формирования ТКМ с использованием жизнеспособных ТС.

В ходе эксперимента получены данные о кинетике формирования ТКМ и ее пространственных характеристиках, которые подтвердили достоверность рассчитанного распределения магнитного поля в рабочей зоне магнитной системы.

Данные показали, что использование постоянных магнитов с определенной формой и относительным положением значительно ускоряет формирование объектов. Количественная оценка цитоплазматической продукции АТФ, гистологический анализ и подтвержденная способность ТС к слиянию подтвердили жизнеспособность хондросфер, подвергнутых воздействию парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) в концентрации 50 мМоль в процессе магнитной левитации.

Для формирования ТКМ значительно больших размеров необходимо либо использовать сверхпроводящие магниты, обеспечивающие необходимый градиент и силу магнитного поля по всему рабочему объему или использовать космическую микрогравитацию, которая позволит значительно снизить концентрацию  $Gd^{3+}$ .

Далее будут рассмотрены вопросы использования высокоинтенсивных магнитных полей.

#### **4.2.2 В сильном магнитном поле на базе магнита Биттера из хрящевого клеточного материала**

Для снижения концентрации парамагнетика в питательной среде проведены исследования в магните Биттера. Использование мощных магнитов Биттера позволяет значительно повысить градиент и силу магнитного поля (вплоть до 31 Тл).

Формирование при левитации ТС проводилось при напряженности магнитного поля 19 Тл и концентрации гадоптротрола 0,8 мМоль. Процесс формирования образцов из ТС (рисунок 4.2.8 а) занимал 40 мин. После того как ТС

сгруппировались вместе, образец выдерживали в тех же условиях левитации в течение 3 ч, чтобы обеспечить слияние ТС в единый ТКМ (рисунок 4.2.8 б). Гистология части ТКМ (круг вставки) демонстрирует интактную морфологию ТС. Проведена серия экспериментов, чтобы показать взаимозависимость между концентрацией парамагнетика в среде, свойствами ТС и интенсивностью магнитного поля для поддержания стабильной левитации, позволяющей формировать ТКМ. Результаты показывают, что концентрация гадобутрола и сила приложенного магнитного поля напрямую связаны (рисунок 4.2.8 в).

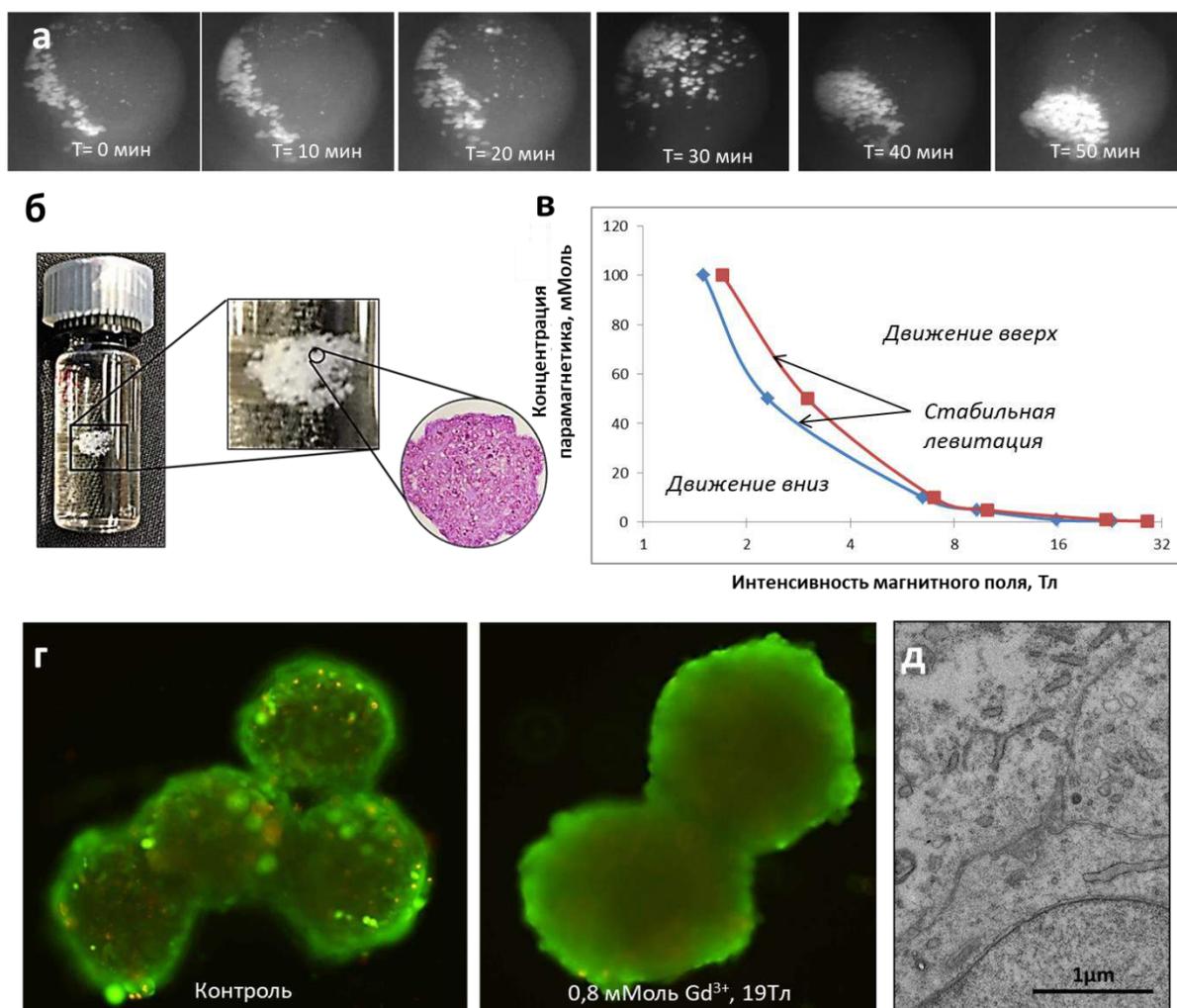


Рисунок 4.2.8 — Формирование ТКМ при левитации в сильном магнитном поле: а) этапы формирования ТС при концентрации парамагнетика 0,8 мМоль и напряженности магнитного поля 19 Тл; б) ТКМ после слияния в течение 3 ч (круг вставки показывает гистологический срез ТКМ); в) кривые условий левитации в зависимости от концентрации гадобутрола и напряженности магнитного поля, для ТС (красная кривая) и полистирольных шариков (синяя кривая); г) Живой/Мертвый анализ ТС после 1 ч воздействия магнитного поля 19 Тл при 0,8 мМоль гадобутрола; д) ТЭМ ТС после 1 ч воздействия магнитного поля 19 Тл при 0,8 мМоль гадобутрола [155]

При прикладывании магнитного поля с различной силой и концентрацией гадобутрола можно было определить зависимости, которые использовались для определения пороговых значений достижения состояния стабильной левитации. На рисунке 4.2.8 в показаны пороговые значения, необходимые для левитации полистирольных шариков и ТС. Области выше кривой означают, что объекты движутся в вертикальном направлении вверх, а область ниже кривой означает, что объекты падают. Непосредственно значения, лежащие на кривой, обеспечивают условия стабильной левитации. Эти данные показывают, что магнитная левитация объектов возможна в сильном магнитном поле при низкой нетоксичной концентрации парамагнетика в среде.

Проведен Live / Dead (Живой / Мертвый) анализ ТС после инкубации в 0,8 мМоль гадобутроле в условиях сильного магнитного поля (19 Тл), который показал, что условия левитации при низкой концентрации гадобутрола и высоком магнитном поле не влияют на их жизнеспособность (рисунок 4.2.8 г). Это также было подтверждено ТЭМ, которая не выявила сильных ультраструктурных изменений (рисунок 4.2.8 д). Взятые вместе эти данные убедительно свидетельствуют о высоком уровне жизнеспособности ТС, подвергнутых сочетанию условий формирования. Таким образом, приведенные теоретические и экспериментальные данные впервые демонстрируют, что магнитно-левитационное формирование на основе слияния ТС при нетоксичной концентрации гадолина в сильном магнитном поле технологически осуществима и может быть реализована.

В качестве клеток выбрана клеточная линия хондросаркомы человека SW1353 в качестве надежного, хорошо охарактеризованного источника клеток человека для изготовления ТС [24-26]. Примененный метод изготовления позволил получить ТС правильного размера и формы, что существенно для стандартизации экспериментов по формированию в условиях магнитной левитации, а также для оценки возможной токсичности сильного магнитного поля и парамагнитной среды (рисунок 4.2.9 а). Анализ слияния ТС показал, что при низкой концентрации хелаты гадолина (0,8 мМоль гадобутрола) ТС могут сливаться, что подтверждает их

жизнеспособность и способность живых клеток на поверхности ТС мигрировать в процессе слияния тканей (рисунок 4.2.9 б). Межсферный угол увеличивался в зависимости от времени, и через 20 ч после начала инкубации межсферный угол увеличивался до  $179^\circ$ , что указывало на полное слияние ТС.

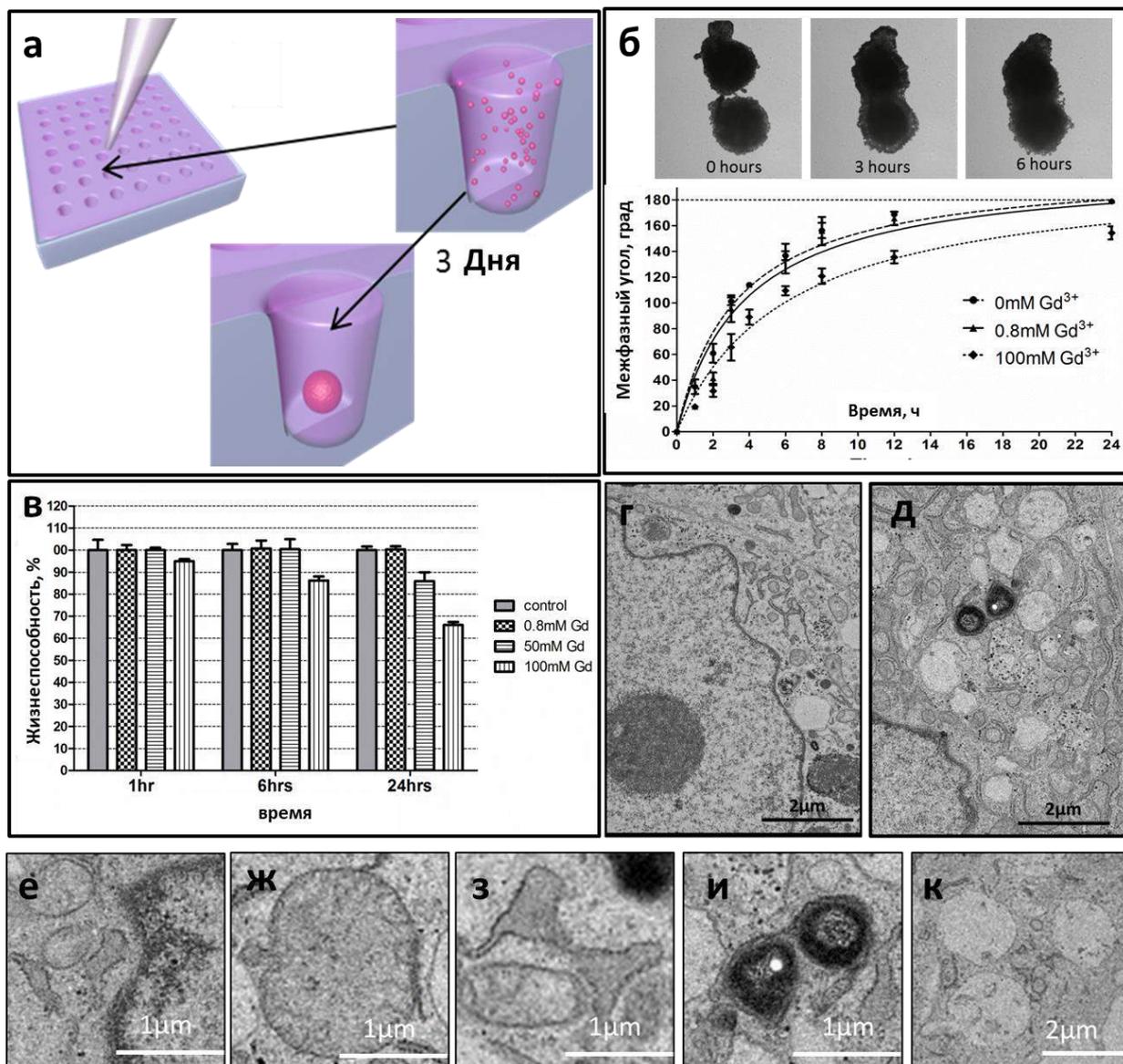


Рисунок 4.2.9 - Токсичность гадобутрола и магнитного поля на клеточный материал:  
 а) изготовление ТС с использованием неадгезивных агарозных форм; б) слияние ТС в присутствии 0,8 мМоль гадобутрола (вверху) и кривая межсферный углов при слиянии (внизу);  
 в) жизнеспособность ТС при различных концентрациях гадобутрола (0, 0,8, 50, 100 мМоль);  
 г) ТЭМ ТС в отсутствие гадобутрола (контроль); д) ТЭМ ТС в присутствии 50 мМоль гадобутрола (образец); е-к) ультраструктурные изменения в клетках внутри ТС, вызванные высокой концентрацией гадобутрола (50 мМоль): е) маргинация ядерного хроматина; ж) набухание и уменьшение количества крист в митохондриях; з) увеличение эндоплазматического ретикулума; и) образование фагосом; к) выраженная вакуолизация цитоплазмы [155]

Для количественной оценки токсичности гадобутрола на ТС SW1353 использовался CellTiter-Glo 3D kit. При низкой концентрации гадобутрола (0,8 мМоль) ТС были жизнеспособны на 100%, тогда как при высокой концентрации гадобутрола (100 мМоль) жизнеспособность снижалась до 70 % через 24 ч (рисунок 4.2.9 в). Учитывая тот факт, что полное слияние ТС занимает не менее 20 ч, такая цитотоксичность имеет решающее значение.

Также была проведена ТЭМ клеток и ТС, инкубированных с высокой концентрацией гадобутрола (50 мМоль). Как показано на рисунке 4.2.9 г, в отсутствие гадобутрола (контроль) ультраструктурных изменений не наблюдалось. ТЭМ показала, что 50 мМоль гадобутрола вызывают повреждение клеток (рисунок 4.2.9), сопровождающееся внутриклеточной дистрофией, что коррелирует с предыдущими сообщениями [3, 35, 36]. Токсическое действие гадобутрола на основе  $Gd^{3+}$  в высокой концентрации ( $> 50$  мМоль) на ультраструктуру клеток обычно включает: 1) маргинацию ядерного хроматина (рисунок 4.2.9 е); 2) набухание и уменьшение количества крист в митохондриях (рисунок 4.2.9 ж); 3) расширение эндоплазматического ретикулума (рисунок 4.2.9 з), 4) образование фагосом (рисунок 4.2.9 и); 5) выраженную вакуоляризацию цитоплазмы (4.2.9 к). Следует отметить, что этот комплекс ультраструктурных изменений необратим, так как не улучшается после 1-2 дней инкубации в среде, свободной от гадолиния. При низкой концентрации гадолиния ультраструктура остается нетронутой. В совокупности полученные наблюдения свидетельствуют о жизнеспособности клеток и тканей и отсутствии ультраструктурных изменений клеток ТС после их инкубации с низкими дозами гадобутрола, что позволяет применять низкие концентрации гадобутрола за счет магнитно-левитационного формирования в сильном магнитном поле.

Магнитная левитация достигалась при очень низкой концентрации парамагнитной среды ( $Gd^{3+}$ ), почти в 100 раз меньшей концентрации, которая использовалась в предыдущем разделе [113,181]. Хотя хелаты на основе гадолиния одобрены FDA в качестве контрастных веществ для применения в МРТ [112], существует ряд доказательств того, что хелаты гадолиния накапливаются в

организме человека (преимущественно в почках, что приводит к нежелательным побочным эффектам- повреждению почек в виде так называемого «нефрогенного системного фиброза» [182,183]), т.е. хелаты гадолиния в высоких концентрациях индуцируют токсические эффекты. В случае живых клеток и особенно в случае ТС необходимо уменьшить количество токсичных парамагнитных хелатов гадолиния. Применение высокого магнитного поля (19 Тл) позволило снизить цитотоксические эффекты за счет более низких концентраций хелаты гадолиния (0,8 мМоль), необходимых для магнитной левитации. Эксперименты проходили в Европейской лаборатории высокого интенсивного поля в г. Неймегене (Нидерланды). Важно отметить, что результаты магнитно-левитационного формирования объектов согласуются с разработанными математическими моделями, что свидетельствует об их сильной прогностической силе.

Известно лишь несколько исследований, в которых изучались клетки животных или человека при высоком постоянном магнитном поле ( $> 10$  Тл). Накахара и Джао и соавторы показали, что постоянные магнитные поля 10 Тл и 13 Тл не влияют на жизнеспособность клеток яичника китайского хомяка (СНО) и клеток первичных фибробластов кожи человека (AG1522) [184,185]. Валирон и соавторы использовали постоянное магнитное поле 17 Тл и не наблюдали сильного убивающего действия на клетки, но обнаружили, что 17 Тл оказывает очевидное влияние на цитоскелет интерфазы [186]. Джанг и соавторы использовали 27 Тл, самую высокую статическую напряженность магнитного поля, приложенную к клеткам до сих пор, и их результаты соответствовали данным группы Валирона [187]. Для исследования жизнеспособности ТКМ, сформированных в сильном магнитном поле (19 Тл) при низкой концентрации парамагнетика, были проведены три различных теста на жизнеспособность.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени жизнеспособности ТС после их инкубации с наименьшими дозами гадолиния в сильном магнитном поле. Для более точного изучения клеточных изменений после воздействия сильного магнитного поля необходимо провести протеомные и геномные исследования клеток и ТС.

Важно подчеркнуть, что полученные результаты подтверждают возможность применения магнитной левитации на Земле для моделирования условий микрогравитации. Это представляет собой экономически эффективную альтернативу более затратным исследованиям воздействия микрогравитации на живые объекты в космосе на борту МКС.

### 4.2.3 В акустическом поле от плоского излучателя

В ходе эксперимента излучалась периодическая волна в квазинепрерывном режиме. Чтобы достичь необходимой для режима левитации амплитуды давления, использовался усилитель мощности для увеличения амплитуды сигнала. Рассчитанная минимальная амплитуда давления для подвешивания ТС оценивалась как 65 кПа при частоте 1,09 МГц. Экспериментально был найден порог кавитации и дальнейшие исследования проводились в безопасном режиме без видимых повреждений объектов. На рисунке 4.2.10 показано поведение объектов в стоячей ультразвуковой волне. Объекты расположены в узлах стоячей волны, и расстояние между слоями периодических образцов составляет ровно половину длины волны. Кроме того, из-за неоднородности поля объекты собираются вместе в каждом слое. В эксперименте использовались ТС НИИ ЗТЗ (рисунок 4.2.10 б) и хондросферы (рисунок 4.2.10 в).

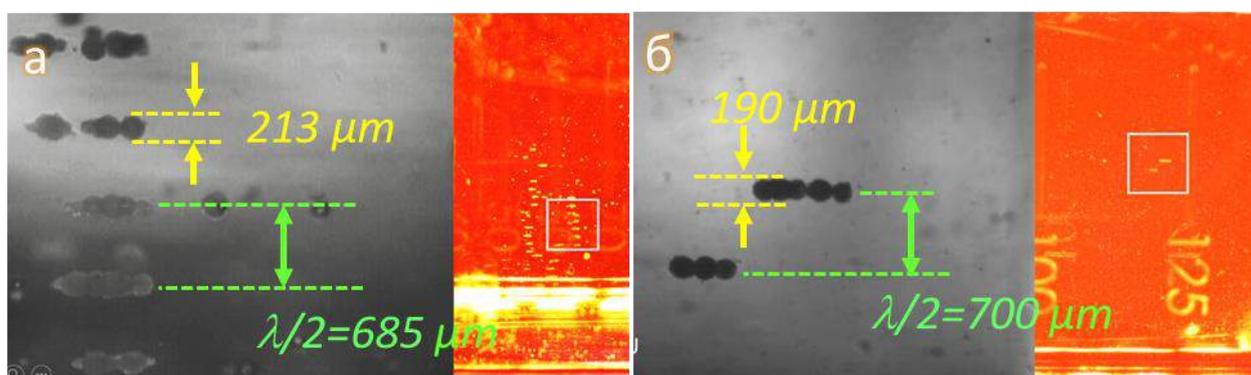


Рисунок 4.2.10 — Левитация в стоячем, горизонтальном акустическом поле:  
а) ТС НИИ ЗТЗ; б) хондросферы

В ходе эксперимента наблюдался эффект: изменение излучаемой резонансной частоты от одной к другой, что вызывало немедленную перестройку цепей и их общее движение вверх или вниз. Тот же эффект наблюдается и при увеличении амплитуды сигнала. Таким образом, изменяя параметры волн, можно перемещать объекты и трансформировать структуру формируемого образца.

Далее будет показано формирование ТКМ в цилиндрическом ультразвуковом поле.

#### 4.2.4 В акустическом поле от цилиндрического излучателя

В исследованиях использовался цилиндрический излучатель. С помощью микропипетки ТС впрыскивались внутрь агарозной кюветы в верхней ее части при излучающем на резонансной частоте пьезоэлектрическом преобразователе. Ввиду того, что в качестве источника ультразвука использовался цилиндрический преобразователь, узловая область в пространстве представляла собой цилиндр. Так как величина акустической радиационной силы была достаточно большой, ТС практически мгновенно выстраивались в форме трубки, радиус которой соответствовал радиусу первого узла стоячего цилиндрического ультразвукового поля, и под действием силы тяжести оседали на дно, формируя таким образом тубулярный ТКМ. Фотографии эксперимента и формирование ТКМ из ТС показаны на рисунке 4.2.11.

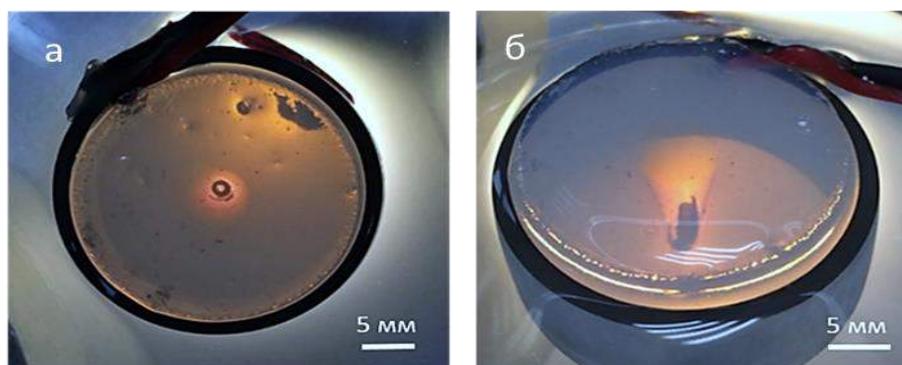


Рисунок 4.2.11 – Фотографии эксперимента. (а) и (б) – виды сверху и под углом на тубчатый ТКМ из хондросфер в агарозной форме внутри пьезоцилиндра; установка помещена в питательный раствор [160]

Если количество впрыскиваемых ТС было достаточно велико, то формировался плотный трубчатый образец с определенным диаметром, определяемым длиной акустической волны, используемой при формировании. Удержание ТС в заданной форме в термостате в течение 24 ч позволило ТС слиться в единый ТКМ. Процесс слияния ТС подтвердил их жизнеспособность. Ультразвуковая волна с частотой 800 кГц позволила создать ТКМ диаметром 1,3 мм, толщиной 0,45 мм и длиной 1,5 мм (рисунок 4.2.12).

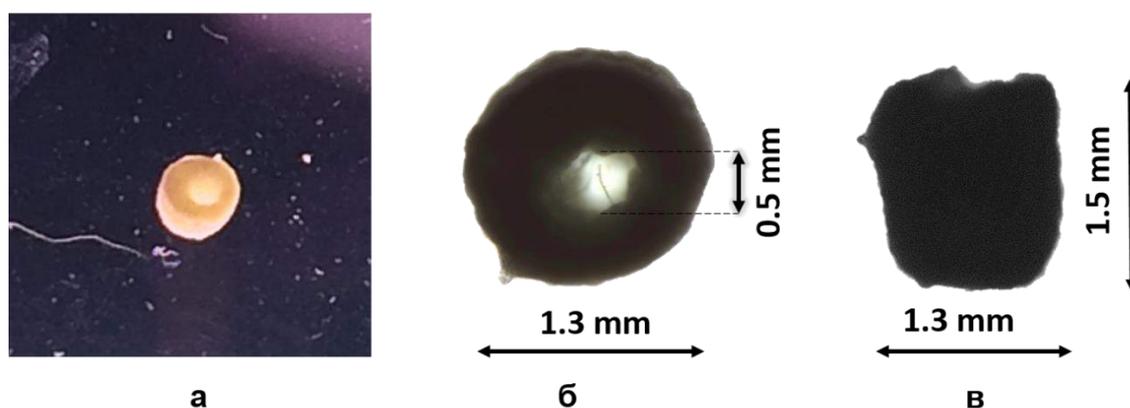


Рисунок 4.2.12 – Слившийся ТКМ из хондроцитов в форме трубочки: а) общий вид ТКМ; б) и в) вид сверху и сбоку под микроскопом [160]

С учетом небольшой вариации температуры теоретическая зависимость радиуса ТКМ от частоты волны хорошо описывает экспериментальные наблюдения.

В приведенном исследовании предложен метод манипулирования микроскопическими объектами для формирования сплошного тубулярного ТКМ с помощью стоячего цилиндрического акустического поля. Экспериментально продемонстрировано, что использованный подход позволяет формировать трехмерные трубчатые ТКМ заданного размера из живых клеток.

Систематическое исследование акустической левитации, начатое несколькими группами в качестве дополнительной альтернативной технологии ТИ [109,141], в сочетании с магнитной левитацией потенциально может позволить формировать ТКМ с повышенной сложностью. Так же использование ТС с более совершенными внутренними свойствами и составами, таких как

гетероцеллюлярные агрегаты, люменизированные сосудистые ТС, предварительно васкуляризованные органоспецифические агрегаты и жертвенные сосудистые ТС или сакросферы, могут позволить обеспечить васкуляризацию ТКМ [188–191].

#### **4.2.5 В магнитоакустическом поле на базе постоянных магнитов.**

##### **Формирование кольцеобразного ТКМ из клеточного материала**

Как и в расчетах, так и в экспериментах ТС собирались в узлах стоячего ультразвукового поля, левитируя в питательной среде. Численное моделирование показало, что самая сильная акустическая радиационная сила действует в центре пьезоэлектрического преобразователя из-за высоких градиентов потенциала Горькова в этой области. Это означает, что диаметр получившегося ТКМ в виде кольца зависит от радиуса первого узла (рисунке 4.2.13 а,б).

Объекты помещались в питательный раствор, оптимальный для выбранного типа клеток. В эксперименте использовались гладкомышечные клетки и хондроциты. Экспериментальная установка была помещена в термостат, который поддерживал температуру 37 °С. Для осуществления магнитной левитации в питательной среде были растворены парамагнетик ( $Gd^{3+}$ ) в концентрации 50 мМоль.

Радиус получившегося ТКМ соответствовал расчетному радиусу области первого от центра узла из соотношения  $r_1/\lambda = 0,3827$ . Для излучаемой частоты 780 кГц при температуре среды 37 °С, соответствующей скорости звука в жидкости 1530 м/с, расчетный радиус ТКМ должен был составить 0,74 мм.

Расчетное значение соответствовало наблюдаемому в эксперименте при тех же условиях диаметру образца ТКМ - 1,5 мм. Изменяя частоту излучаемой ультразвуковой волны, возможно контролировать диаметр формируемого образца. Более того, в случае наличия большого количества ТС, которым соответствовал большой рабочий объем, происходило образование второго кольца, которое соответствовало второму узлу стоячей волны.

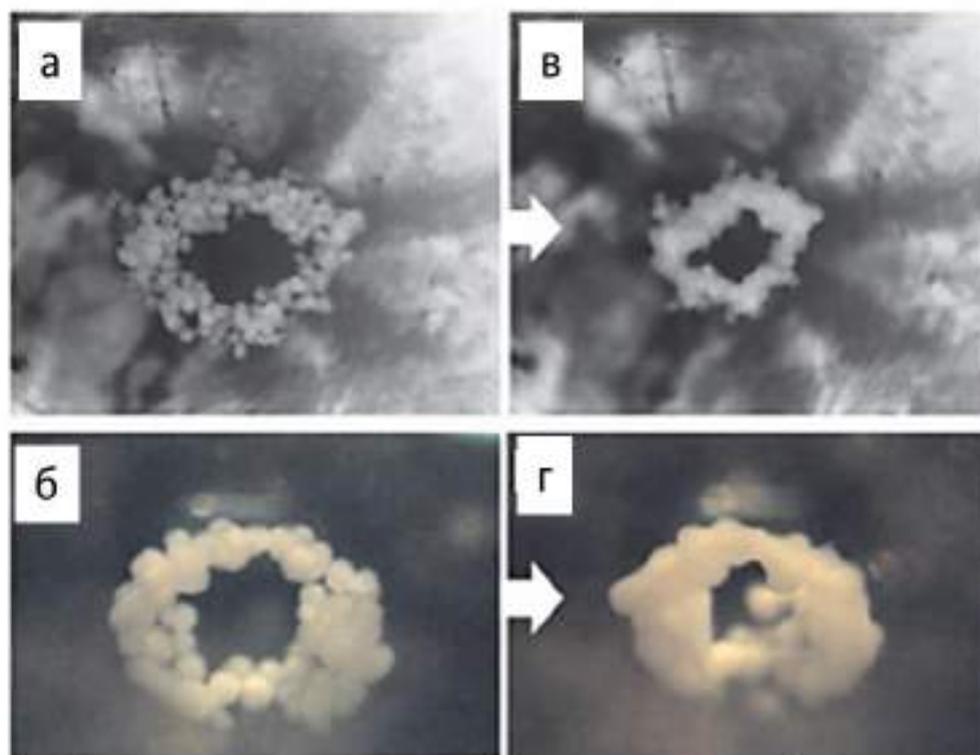


Рисунок 4.2.13 — Формирование кольцевого ТКМ из клеточного материала. Момент начала и после 20 ч слияния ТС из (а, в) гладкомышечных клеток и (б, г) хондроцитов [163]

После формирования ТС в кольцеобразный образец, их было необходимо удерживать в этом состоянии для слияния и образования единого ТКМ. Важно отметить, что интенсивность ультразвуковой волны была достаточно малой, чтобы не повредить клетки даже при столь длительном воздействии. Удержание конфигурации кольца в течение 18 ч приводило к слиянию ТС (рисунке 4.2.13 в,г), что указывает на то, что ТС оставались жизнеспособными.

В эксперименте проведено формирование кольцевого ТКМ из гладкомышечных клеток (рисунке 4.2.13 а, в), которые являются клетками стенок сосудов, а также из хондроцитов (рисунке 4.2.13 б,г), которые образуют хрящ. В конечном счете для обоих типов клеток ТС сливались и образовывали сплошное тканевое кольцо примерно за 20 ч, что свидетельствовало о том, что клетки оставались живыми в течение всего процесса слияния.

Таким образом, ТС были собраны в ТКМ с использованием комбинации магнитного и акустического полей в состоянии левитации прямо в питательной

среде. Размер сформированного ТКМ сходится с расчетным, показана возможность манипулирования ТС с помощью ультразвуковой волны для придания итоговому изделию заданного размера. Предложенный подход по использованию физических полей для создания ТКМ различной формы и функциональности является новым шагом в развитии биотехнологии и трехмерной биофабрикации.

#### **4.2.6 В магнитоакустическом поле на базе магнита Биттера. Формирование трубчатого ТКМ из клеточного материала**

В связи с тем, что постоянные магниты ограничены в создании протяженного требуемого магнитного поля для обеспечения условий формирования сложных и протяженных клеточных материалов, далее проведены исследования с использованием магнитоакустического поля в магните Биттера с использованием специальной разработанной акустической кюветы. Силы магнитного поля позволила снизить концентрации парамагнетика и увеличить рабочее пространство в направлении силы тяжести.

Одной из основных проблем при выращивании трубчатых ТКМ по-прежнему остается сложность получения сложной геометрии, имитирующей структуру естественных тканей. Это особенно важно для формирования микромасштабной организации клеточных слоев и продукции внеклеточного матрикса, которые необходимы для воссоздания сложной анатомической архитектуры сетей трубчатых органов, имеющих множественные бифуркации или физиологические утолщения в областях максимального гидростатического давления [192].

Предлагаемый способ гибридного магнитоакустического левитационного формирования направлен на преодоление существующих технологических барьеров. В частности, пространственное распределение биологических объектов может определяться только прикладываемыми полями и по сравнению с традиционными методами биотехнологии не зависит от физико-химических свойств биоматериалов, входящих в состав поддержек или «биочернил».

Широкое распространение врожденных или приобретенных дефектов мочевыделительной системы в результате травм или дегенеративных заболеваний определяет стабильную потребность в создании ТКМ (таких как уретральные трансплантаты), пригодных для реконструктивной пластической хирургии [138,139,193]. В настоящее время стало очевидно, что использование клеточных компонентов имеет решающее значение для восстановления архитектоники и функциональной активности замещенных тканей. Таким образом, было показано, что засеянные клетками (с аутологичным эпителием мочевого пузыря и SMC) трубчатые коллагеновые скаффолды могут быть использованы для восстановления длинных дефектов уретры, тогда как скаффолды без клеток приводят к плохому развитию тканей [136].

В текущем исследовании изготовлены трубчатые ТКМ из гладкомышечных клеток мочевого пузыря человека (hbSMC). Полученная конструкция состояла из трех слоев ТС, которые теоретически могут образовывать три мышечных слоя стенки зрелого мочевого пузыря - внешний продольный, средний круговой и внутренний косой, если будут созданы соответствующие условия для его созревания после формирования.

В исследовании выполнены следующие технологические этапы: 1) разработка аппаратного обеспечения, позволяющего использовать магнитоакустическое левитационное формирование (описано ранее); 2) выполнение математического моделирования и реализация формативного биотехнологического изготовления сложных биологических образцов, таких как трубки; 3) тестирование функциональности биотехнологического трубчатого ТКМ.

Схема эксперимента по левитационному магнитоакустическому формированию ТКМ из ТС показана на рисунке 4.2.14.



Рисунок 4.2.14 – Схема эксперимента по левитационной магнитоакустическому формированию трубчатому ТКМ [83]

Для оценки влияния парамагнетика на клеточный материал проведена оценка жизнеспособности при различных концентрациях гадобутрола (рисунок 4.2.15 в,г). Средний диаметр однодневного ТС составлял  $454 \pm 25$  мкм. Средняя округлость ТС составила  $0,93 \pm 0,04$  (рисунок 4.2.15 а,б).

При 20 мМоль гадобутрола ТС продемонстрировали почти 100% жизнеспособность, тогда как 50 мМоль гадобутрол вызвал снижение жизнеспособности до 87% (рисунок 4.2.15). Значительный токсический эффект на ТС был обнаружен при 250 мМоль гадобутрола. Стоит отметить, что механические свойства ТС напрямую зависят от их жизнеспособности.

Пары однодневных ТС (16000 клеток / ТС) помещали вместе в лунки и инкубировали с 0, 20 и 50 мМоль гадобутролом (Gd-DO3A-бутрол, Gadovist, «Bayer Pharma AG», Германия) на 24 ч. Изображения были получены в точках 0, 2, 4, 6 и 24 ч (рисунок 4.2.16).

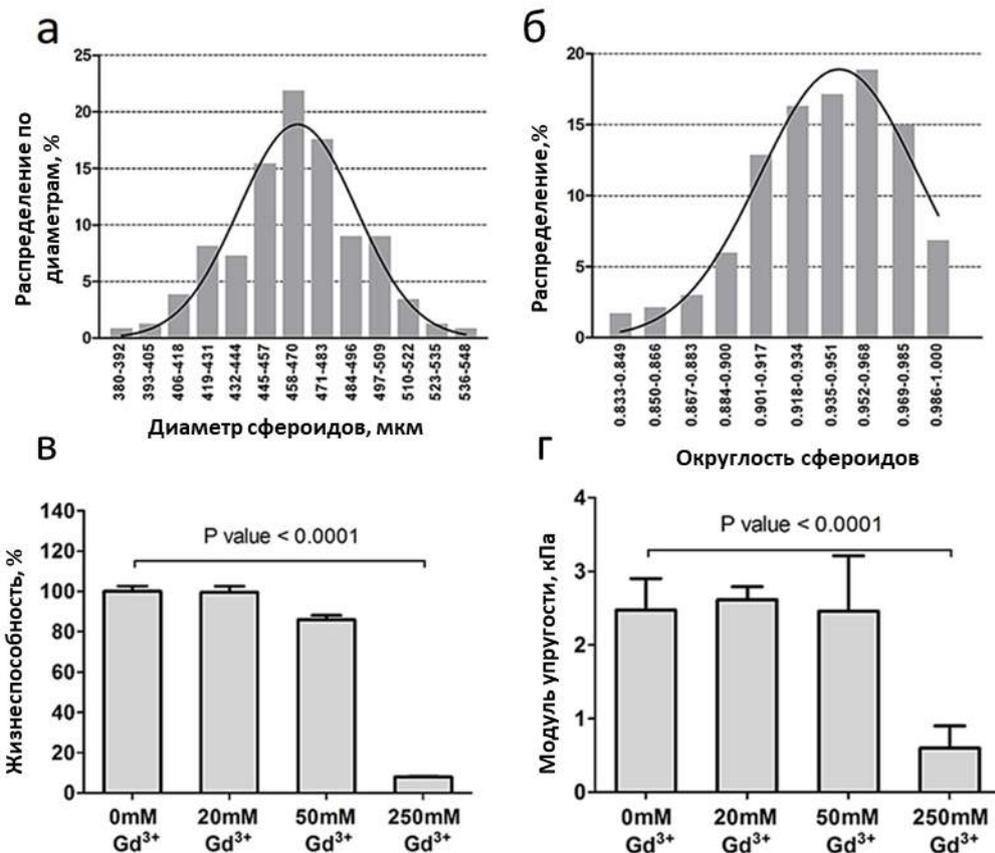


Рисунок 4.2.15 –Характеризация ТС для формирования трубчатых ТКМ. Распределение ТС по диаметру (а) и округлости (б),  $n = 324$ . Влияние различных концентраций гадобутрола на жизнеспособность (в) и механические свойства (г) ТС [83]

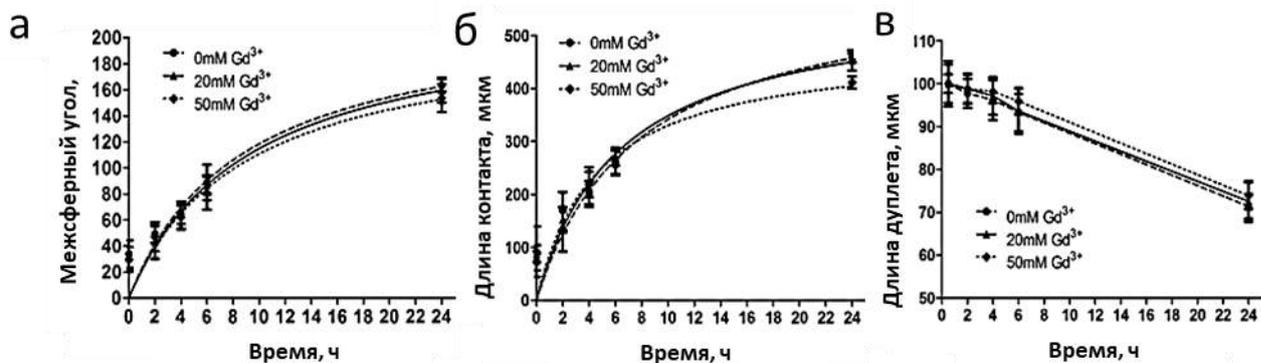


Рисунок 4.2.16 – Влияние различных концентраций гадобутрола на слияние ТС. Кривые времени межсферных углов (а), длины контакта (б) и длины дублета (в) во время слияния [83]

Все пары ТС продемонстрировали примерно одинаковую скорость слияния независимо от наличия гадобутрола. Длина контакта постепенно увеличивалась как функция времени, и через 24 ч она была равна начальному диаметру одного ТС. В то же время рост длины контакта для дублетов ТС в 50 мМоль гадобутроле был

немного медленнее, чем рост длины контакта для дублеров ТС в 20 мМоль гадобутроле и без добавления гадобутрола. Межсферный угол увеличился до 160°, что указывает на почти полное сфероидальное слияние. Двойная длина сокращалась постепенно и составляла 72% от исходного значения после 24 ч инкубации.

Показано левитационное формирование ТС в сильном магнитном поле с интенсивностью 9,5 Тл. После генерации акустического поля левитирующие ТС начали формировать трубчатый образец (рисунок 4.2.17). Изменяя частоту акустического поля, можно регулировать параметры формирования, чтобы получить желаемый диаметр формируемого образца. Зависимость диаметра формирования ТКМ от частоты была измерена. Она соответствовала теоретическим расчетам.

На рисунке 4.2.17 а-д показана трубчатый ТКМ, созданный из ТС после 8 ч магнитоакустического левитационного формирования. В течение 8 ч с трубчатым ТКМ происходят незначительные изменения в размерах (увеличение толщины стенки), но это не должно отражаться на стабильном удержании его акустическим полем.

С точки зрения биотехнологии, помимо оценки жизнеспособности и морфологических характеристик, наиболее важным свойством трубчатого ТКМ, собранного из ТС SMC, является подтверждение их функциональной активности.

В экспериментах просвет трубчатого ТКМ значительно уменьшился после добавления эндотелина - до 70% от исходного диаметра, а по сравнению с контролем - на 90%. Большая часть уменьшения площади произошла в течение первых 120 мин после добавления эндотелина-1. Инкубация в течение еще 60 мин не приводила к дальнейшему сокращению. Таким образом, демонстрировалась функциональная активность трубчатого ТКМ (рисунок 4.2.17 е,ж).

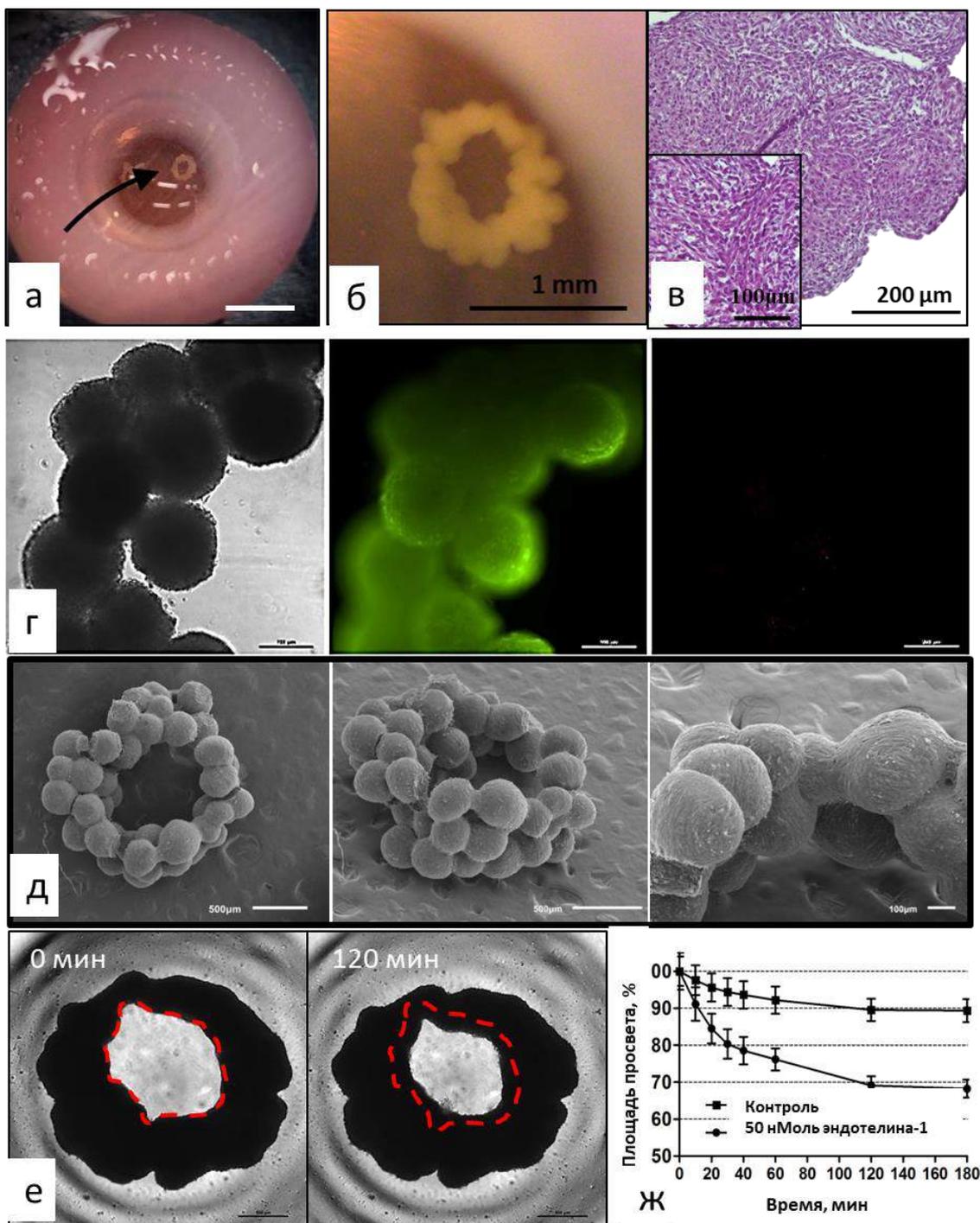


Рисунок 4.2.17 – Характеристики трубчатого ТКМ, полученного методом магнитоакустической левитации в течение 8 ч при 20 мМоль гадобутроле: а) фотография ТКМ внутри агарозной кюветы; б) стереоизображение ТКМ; в) гистология ТКМ; г) живой / мертвый анализ ТКМ: фазовый контраст, кальцеин-АМ (зеленый) и йодид пропидия (красный) слева направо; д - СЭМ ТКМ; е) сокращение ТКМ в течение 120 мин в присутствии 50 нМоль эндотелина-1; ж) динамика уменьшения площади просвета ТКМ, вызванная добавлением 50 нМоль эндотелина-1 [83]

Таким образом, способность мышечного трубчатого ТКМ сокращаться в присутствии активных компонентов или расслабляться в присутствии

сосудорасширяющего средства рассматривается как доказательство его функциональности [173,194]. Такие эффекты полученной гладкой мышечной ткани могут быть использованы в качестве потенциально прогностической модели *in vitro* для тестирования новых лекарств от бронхиальной астмы, сосудистой гипертензии и эректильной дисфункции. Этот подход может быть особенно полезным, учитывая, что модели на животных иногда не подходят для тестирования новых лекарств, поскольку они не имеют соответствующего репертуара поверхностных клеточных рецепторов, типичного для SMC человека [195].

Несмотря на то, что приведенный эксперимент описывает создание образцов ТКМ из hbSMC, следует предполагать, что данный подход также может быть применен к другим трубчатым структурам, таким как кровеносные сосуды, толстая кишка, трахея и др. Форму образца ТКМ при использовании гибридного магнитоакустического поля определяет акустическая радиационная сила. В результате возможно получить ТКМ сферической, эллиптической, кольцевой и другой формы — достаточно лишь подобрать подходящую конфигурацию источников и параметров акустического поля.

Таким образом, дальнейшее развитие магнитоакустического левитационного формирования ТКМ представляется обоснованным и может быть направлено на оптимизацию технологических параметров магнитоакустических устройств, а также на их интеграцию с системами проточного биореактора для поддержки слияния ТС, программируемой активации рецепторов клеток, визуализации внутренней структуры и т.д., таким образом формируя физиологические и структурные детерминанты в полученных ТКМ.

### **4.3 Заключение по главе 4**

В этой главе приведены результаты метода, основанного на магнитно-левитационном формировании в неоднородном магнитном поле, который позволяет получить биосовместимые неорганические материалы на основе ФК для

замены и регенерации костных дефектов. Данный способ позволяет создавать ТКМ на основе ОКФ в течение 40 ч в условиях левитации, исключая использование любого временного поддерживающего материала. Согласно данным СЭМ и РФА, парамагнетик не проникает в структуру и в поверхность частиц ФК. ТКМ имеет достаточный уровень пористости, который может обеспечить миграцию клеток внутри пористых каналов. Альтернативно, в гранулярное пространство материала могут быть помещены клетки или ТС. Все это позволяет быть ТКМ перспективным вариантом для применения в технологиях ТИ для регенерации костей. Проектирование и разработка в этом направлении может внести существенный вклад в область инженерии костной ткани.

Также в ходе исследований разработана методика магнитного формирования объектов из органических материалов. Тем не менее при формировании живых клеточных материалов возникает проблема, связанная с токсическими эффектами парамагнетиков, используемых для усиления магнитной восприимчивости. Несмотря на то, что подобные соединения широко используются в практическом здравоохранении как контрастные агенты для проведения МРТ-диагностики, токсичность в условиях представленных экспериментов обусловлена необходимостью их использования в довольно высоких концентрациях для преодоления гравитационных сил Земли и обеспечения эффективной и устойчивой левитации биообъектов.

Установлено, что минимальная концентрация парамагнетика, при которой в лабораторных условиях в постоянных магнитах на Земле возможно магнитное левитационное формирование, составляет 50 мМоль. Использование данной концентрации позволяет инкубировать ТКМ в течении 24 ч для обеспечения предварительного слияния ТС. Культивирование более продолжительное время пагубно сказывается на жизнеспособности клеток ввиду того, что гадолиний избирательно и обратимо связывается с их кальциевыми каналами, чем блокируют трансмембранный транспорт ионов и органических соединений, а также передачу межклеточных сигналов.

Преодоление выявленных биологических сложностей возможно за счет снижения концентрации парамагнетика в питательной среде, для чего было предложено использование мощных магнитов Биттера, позволяющих значительно повысить силу магнитного поля (вплоть до 31 Тл). Подобные системы находятся в инфраструктурном центре EMFL («European Magnetic Field Laboratory», г. Неймеген, Нидерланды).

На базе магнита Биттера получены ТКМ в виде живых тканей из хондросфер. Выявлена минимальная концентрация парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) 0,8 мМоль, обеспечивающая левитационные условия при формировании. Анализ живой / мертвой выявил минимальную цитотоксичность магнитного поля напряженностью до 30 Тл для ТС после 1 ч воздействия. Модельный образец из полистирольных шариков сформирован в магнитном поле напряженностью 22 Тл за 10 мин воздействия. ТКМ из ТС в виде тканевого эквивалента (клеточная линия SW-1353, остеосаркома человека) была сформирована при 19 Тл и достигала слияния через 3 ч.

Показана возможность левитационного формирования образцов на основе ФК только под действием стоячего акустического поля. Экспериментально опробован метод формирования трубчатых ТКМ из ТС в питательной жидкости с помощью акустической радиационной силы. Источником акустического поля являлся полый пьезокерамический цилиндр с резонансной частотой 800 кГц. Удержание сформированной структуры в течение суток при температуре 37 °С привело к слиянию ТС в сплошной трубчатый жизнеспособный ТКМ.

В исследованиях реализована гибридное магнитоакустическое левитационное формирование ТКМ трубчатых образцов из миосфер hbSMC. Сформированные трубчатые образцы обладали функциональной сократимостью, свойственной нативной сосудистой ткани.

Одним из основных потенциальных преимуществ развития технологии объемного левитационного формирования — это возможность формировать ТКМ со сложной геометрией. Использование сильного магнитного поля позволяет снизить концентрацию гадолиния и устранить цитотоксический эффект.

Описанные возможности магнитоакустической технологии для изготовления ТКМ сложных геометрических форм —необходимое, но недостаточное условие. Не менее важна демонстрация функциональности полученных ТКМ. Так использование гладкомышечных клеток (способных сокращаться) человека для изготовления трубчатых ТКМ, позволило провести прямую проверку функциональности сформированных ТКМ. Сократительные мышечные трубки из гладкой мышечной ткани человека могут быть использованы в качестве модели бронха для изучения бронхиальной астмы, кровеносных сосудов для выяснения механизмов гипертонии, а также для моделирования недержания мочи. На таких потенциальных человеческих моделях можно также систематически тестировать *in vitro* новые препараты, вызывающие сужение или расширение кровеносных сосудов и снижение или увеличение кровотока (вазоконстрикторы и вазодилататоры, соответственно).

Моделирование и воссоздание в виртуальном пространстве технологических процессов и взаимодействий, происходящих в процессе 3D формирования, позволяет вывести на новый технологический уровень создание ТКМ за счет сокращения временных и материальных ресурсов по поиску технологических параметров. Требуемая атомарно-структурная конфигурация состояния вещества достигается путем решения комплексных нелинейных задач процесса кристаллизации и слияния. Таким образом, развитие и внедрение формативной биофабрикации открывает новые возможности при формировании ТКМ для различного рода задачи.

В следующей главе приведены материалы применения разработанных подходов на борту РС МКС.

## **Глава 5 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ МАГНИТНОГО ФОРМИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА БОРТУ РОССИЙСКОГО СЕГМЕНТА МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ**

Настоящая глава посвящена разработке и практическому применению способа формирования образцов ТКМ в условиях микрогравитации, а также разработке и созданию конструкции магнитного биопринтера и кюветы для доставки биоматериалов на МКС, активации процессов, фиксации полученных ТКМ, а также обеспечению возврата полученных материалов на Землю.

Исследования на МКС проводились на основании решения секции № 1 «Космическая биология и физиология» Координационного научно-технического совета Роскосмоса (приложение В).

### **5.1 Разработка научной аппаратуры по космическому эксперименту «Магнитный 3D-биопринтер»**

#### **5.1.1 Разработка подхода магнитного формирования в условиях микрогравитации**

Настоящий раздел посвящен разработке способа фабрикации ТКМ из биоматериала путем магнитного левитационного формирования в космическом пространстве в условиях микрогравитации, обеспечивающего получение жизнеспособных биологических ТКМ различных типов и размеров в нетоксичной концентрации парамагнитной среды (для клеточного материала).

Способ магнитной фабрикации различных органических или неорганических материалов путем магнитного левитационного формирования подразумевает использование диамагнитных объектов, помещенных в парамагнитную среду (относительно объектов), и зону, в которой под действием магнитных сил будут собираться частицы и в течение времени образовывать неразрывный ТКМ.

В качестве органических и неорганических материалов используются ФК, ТС из различных типов клеток, клетки многоклеточных или одноклеточных организмов, а также различные синтетические материалы. Для придания среде парамагнитных свойств используются парамагнитные вещества, например, хелаты гадолиния ( $Gd^{3+}$ ) в различных концентрациях.

Процесс магнитной фабрикации осуществляется путем создания неоднородного магнитного поля с областью наименьшей напряженности поля в центре системы. Для этого создана магнитная установка, которая позволяет одновременно выполнять шесть экспериментов. Магнитная установка состоит из двух соединенных одноименными полюсами неодимовых кольцевых магнитов, выполненных из марки N52. В центре конструкции перпендикулярно оси магнитных колец сделано цилиндрическое отверстие для наблюдения за процессом формирования. На рисунке 5.1.1 изображена магнитная установка и магнитное поле, создаваемое данной магнитной установкой.

Так как направление магнитной силы зависит от градиента квадрата поля, в центре магнитной системы во всех трех направлениях наблюдается минимум всех трех пространственных компонентов напряженности магнитного поля.

В центр магнитной системы помещают кюветы со средой с разной концентрацией парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) и хаотично распределенных органических или неорганических объектов в данной среде. Концентрация парамагнетика зависит от магнитных свойств объектов/среды и от вязкости среды. Кювета помещается в отверстие магнитной установки вдоль оси  $x$  (рисунок 5.1.1а).

За счет разницы магнитных проницаемостей объектов и жидкости в неоднородном поле создается движущая магнитная сила в центр данной «магнитной ловушки».

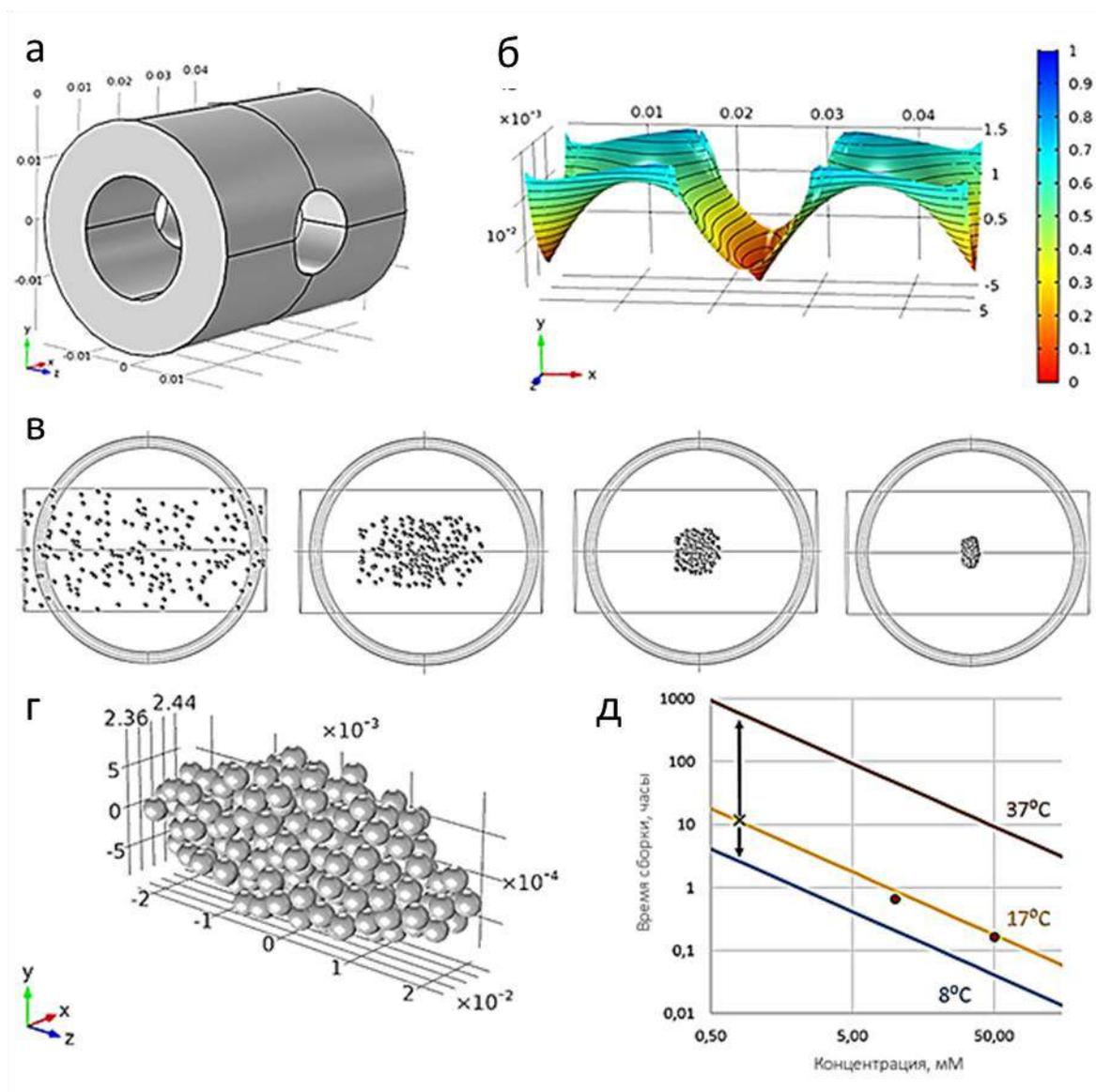


Рисунок 5.1.1 - Схематичный вид магнитной установки с характеристиками магнитного поля и с изображением поэтапного формирования ТКМ из объектов в жидкости под действием магнитного поля: а) магнитная установка; б) магнитное поле, создаваемое магнитной установкой; в) поэтапное формирование ТКМ; г) форма ТКМ после формирования; д) кинетика формирования ТКМ при различных концентрациях гадолиния ( $Gd^{3+}$ ) и температуры [196]

Данная конструкция позволяет осуществлять процесс формирования единого ТКМ из хаотично распределенных в среде различных органических и неорганических объектов. На рисунке 5.1.1 в приведены изображения поэтапного формирования ТКМ из дисперсных фаз в жидкости под действием магнитного поля.

Форма ТКМ после формирования приведена на рисунке 5.1.1 г. На рисунке 5.1.1 д отражена кинетика формирования ТКМ при различных концентрациях

гадолиния ( $Gd^{3+}$ ) и температурах (стрелкой показана теоретически допустимая концентрация парамагнетика, которую можно использовать для формирования ТКМ).

### 5.1.2 Математическое описание динамики формирования

Основная идея подхода магнитной левитации - создать зону, в которой частицы будут собираться под действием магнитных сил и образовывать неразрывный ТКМ. Создана экспериментальная установка, состоящая из двух постоянно соединенных кольцевых магнитов шириной  $L$ , соединенных одноименными полюсами. Чтобы магнитная сила действовала на частицы к центру, необходима особая структура магнитного поля. Поскольку направление магнитной силы зависит от градиента квадрата поля, минимум из всех трех пространственных компонентов напряженности магнитного поля  $H_x, H_y$  и  $H_z$  должен наблюдаться в центре установки во всех трех направлениях. В этом случае это условие выполняется: проекции магнитного поля  $\mathbf{H}$  на соответствующую ось показаны на рисунке 5.1.2 а. В силу симметрии системы остальные проекции на центральные оси равны нулю. Напряженность магнитного поля определяется только параметрами магнитов.

Изначально объекты в ячейке располагаются случайным образом. Требуется понять, какие параметры влияют на скорость схождения частиц и определить порядок времени, в течение которого образец будет собираться.

Вязкое трение действует на объекты, движущиеся в жидкости. Из-за малости скоростей движения и соответствующих чисел Рейнольдса вязкое сопротивление среды описывается законом Стокса:

$$F_{st} = 6\pi r\eta v, \quad (5.1.1)$$

где  $r$  - радиус частицы,  $v$  - ее скорость,  $\eta$  - динамическая вязкость жидкости.

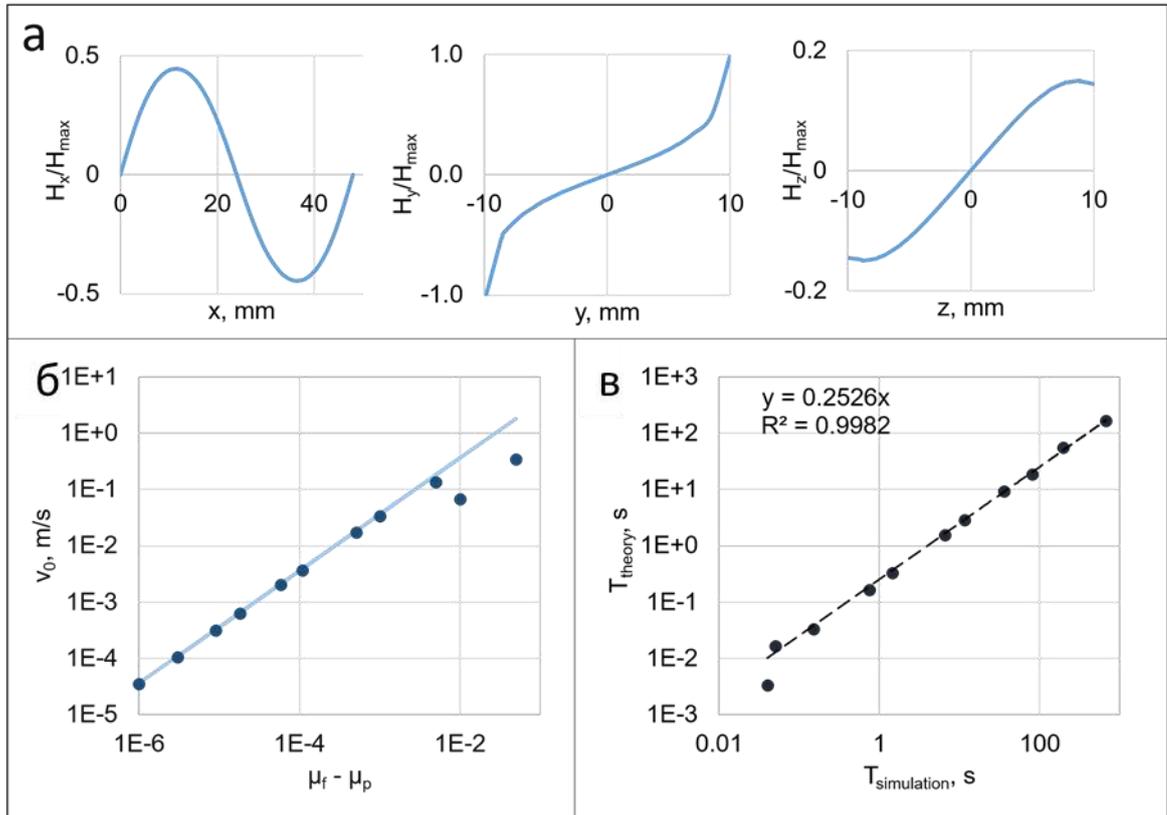


Рисунок 5.1.2 - Параметры магнитного формирования: а) проекции магнитного поля  $H$  на соответствующую ось; б) сравнение расчетной (точки) и теоретической (линия) начальной скорости в зависимости от разницы магнитных проницаемостей жидкости и частиц; в) сравнение времени построения ТКМ, полученного в результате численного моделирования, с теоретически рассчитанным  $T_{ass}$ - значение для различной магнитной восприимчивости среды [196]

Магнитная сила также действует на объекты. В зависимости от соотношения магнитных проницаемостей сила либо выталкивает объекты из области сильного магнитного поля в сторону слабого поля, либо действует в противоположном направлении. Эффективная магнитная сила, действующая на частицу в неоднородном магнитном поле, будет описана следующим образом:

$$F_m = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \nabla(H^2), \quad (5.1.2)$$

где  $\mu_0$  - магнитная постоянная,  $\mu_f$  - относительная магнитная проницаемость жидкости,  $\mu_p$  - относительная магнитная проницаемость частиц,  $K = \frac{\mu_p - \mu_f}{\mu_p + 2\mu_f}$ .

Теперь можно написать уравнение движения объектов в таком поле и оценить его динамику. Чтобы упростить задачу, было рассмотрено движение объектов по оси  $x$  в середине магнитов. Из-за симметрии магнитной системы  $x$ -компонента

магнитной силы будет выглядеть так  $F_{mx} = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \frac{\partial(H_x^2)}{\partial x}$ , а силу Стокса можно определить в следующем виде  $F_{st} = 6\pi r \eta \frac{\partial x}{\partial t}$ . Поскольку распределение  $x$ -компоненты магнитного поля  $H_x$  по координате хорошо описывается гармонической функцией, магнитная сила может быть представлена следующим образом:  $F_{mx} = f_m \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right)$ , где  $f_m = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K H_{max}^2$ . Запишем уравнение баланса сил:

$$(m + m_{ad})\ddot{x} + 6\pi r \eta \dot{x} + f_m \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right) = 0, \quad (5.1.3)$$

где  $m_{ad}$  - дополнительная масса, увлекаемая сферической частицей в жидкости. Поскольку движение частиц очень медленное, членом  $(m + m_{ad})\ddot{x}$  можно пренебречь по сравнению с другими членами. Тогда уравнение сводится к виду:

$$6\pi r \eta \dot{x} = -f_m \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right). \quad (5.1.4)$$

Разделяя переменные и интегрируя, получаем следующую зависимость координаты  $x$  от времени:

$$x(t) = \frac{L}{2\pi} \arccos\left(\frac{1-Ee^{-\delta t}}{1+Ee^{-\delta t}}\right), E = const, \delta = \frac{2f_m}{3\eta r L}. \quad (5.1.5)$$

Полученное уравнение описывает движение объектов в заданном поле. Введенное значение  $\delta$  по существу является соотношением магнитных сил и сил вязкости и определяет скорость формирования объектов. Константа  $E$ , возникающая при интегрировании, определяется начальными условиями частицы:

$$x|_{t=0} \equiv x_0 \rightarrow E = \frac{1 - \cos\left(\frac{2\pi x_0}{L}\right)}{1 + \cos\left(\frac{2\pi x_0}{L}\right)}. \quad (5.1.6)$$

Скорость частицы можно определить, дифференцируя уравнение движения:

$$v(t) = -\frac{L\delta\sqrt{E}e^{-\delta t}}{1+Ee^{-\delta t}}. \quad (5.1.7)$$

Как видно из соотношения, начальная скорость частицы оказывается ненулевой: даже в начальном состоянии покоя под действием магнитного поля частица практически мгновенно набирает скорость

$$v_0 = \dot{x}|_{t=0} = -\frac{L\delta}{4\pi} \sin\left(\frac{2\pi x_0}{L}\right). \quad (5.1.8)$$

Проведено компьютерное моделирование динамики формирования объектов в вязкой жидкости под действием магнитного поля. В процессе моделирования различия в магнитных восприимчивостях частиц и жидкости менялись, в то время как другие параметры системы оставались постоянными. В качестве начального положения частиц было выбрано  $x_0 = L/4$ , что соответствует  $E = 1$ . В этом случае выражение для зависимости координаты от времени упрощается:

$$x(t) = \frac{L}{2\pi} \arccos\left(\tanh\left(\frac{\delta t}{2}\right)\right), \quad (5.1.9)$$

$$v(t) = -\frac{L\delta e^{-\delta t}}{1+e^{-\delta t}}. \quad (5.1.10)$$

Поскольку концентрация парамагнетика в жидкости варьируется, время, в течение которого объекты будут формироваться в центре магнитной установки, зависит от ее величины. Одним из характерных значений для данных начальных условий является начальная скорость движения:

$$v_0 = -\frac{L\delta}{4\pi}. \quad (5.1.11)$$

На рисунке 5.1.2 б показано сравнение расчетной (точки) и теоретической (линия) начальной скорости в зависимости от разницы магнитных проницаемостей жидкости и частиц. Наблюдается хорошее соответствие между теоретическими расчетами и моделированием. Различия в скоростях и наибольшие отклонения в магнитной проницаемости можно объяснить тем, что движение частиц происходит быстро и не выходит за рамки принятого приближения.

Как видно из формулы (5.1.11),  $v_0$  прямо пропорционально значению  $\delta$ , которое является основным критерием времени построения. Тогда порядок времени формирования можно определить, как

$$T_{ass} \sim \pi/\delta. \quad (5.1.12)$$

На рисунке 5.1.2 в показано сравнение времени формирования ТКМ, полученного в результате численного моделирования, с теоретически рассчитанным  $T_{ass}$ - значение для различной магнитной восприимчивости среды.

Как видно из графика, соотношение между расчетными и теоретическими значениями остается постоянным - подходит линейная линия тренда. Таким образом, зная точное время формирования для конкретной магнитной восприимчивости среды, можно точно оценить время формирования той же системы с другой магнитной восприимчивостью.

### **5.1.3 Конструкция магнитного биопринтера и кювет**

В предыдущем разделе описана математическая интерпретация технологии фабрикации ТКМ, настоящий раздел посвящен созданию магнитного биопринтера и кювет, которые предназначены для проведения исследования в условиях космического пространства, в том числе на РС МКС, а именно доставки, биофабрикации, фиксации и возврата образцов на Землю.

Для применения способа магнитного формирования на МКС разработаны следующие устройства:

- магнитный биопринтер, который внедрен и сертифицирован для использования на МКС;
- кювета для биофабрикации, доставки материалов на МКС и спуска полученных ТКМ на Землю (разрез секции кюветы показан на рисунке 5.1.3.).

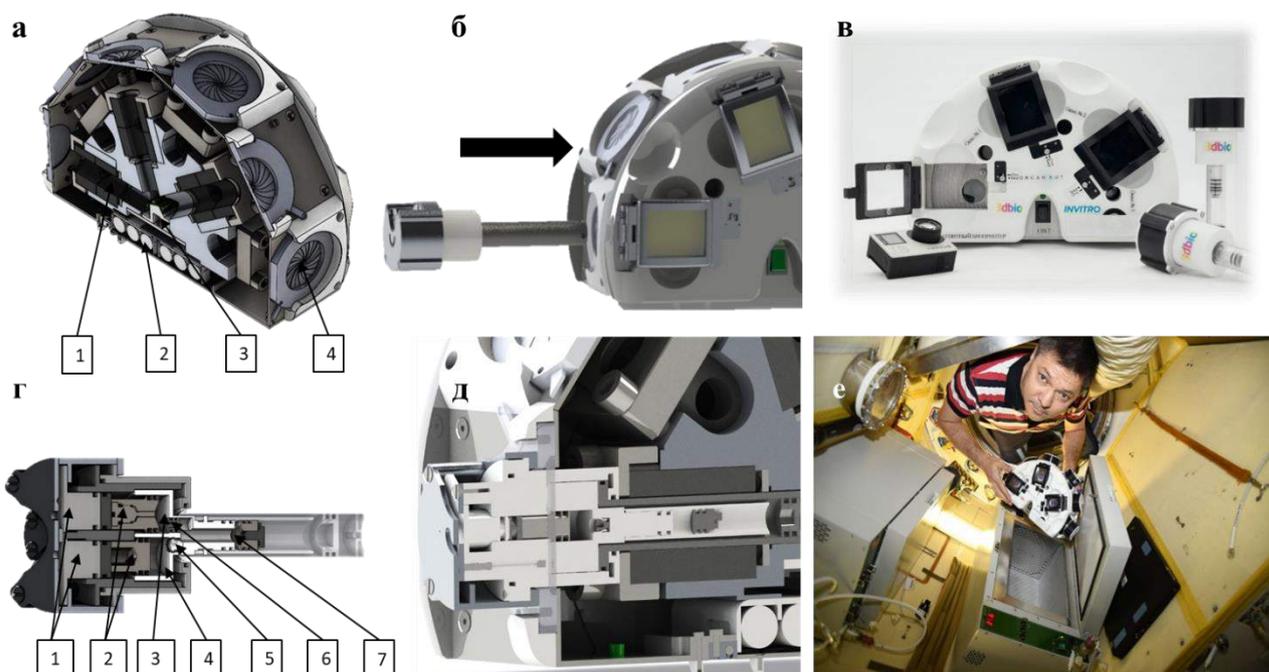


Рисунок 5.1.3 – Оборудование для проведения исследования в условиях космического пространства: а) разрез секции магнитного биопринтера; б) схема установки кюветы в биопринтер; в) внешний вид оборудования; г) разрез кюветы; д) разрез установленной кюветы в биопринтер; е) фотография космонавта с магнитным биопринтером со вставленными кюветами при установке биопринтера в термостат на 37 °С [196]

Магнитный биопринтер осуществляет формирование ТКМ путем создания в рабочей зоне неоднородного магнитного поля с «магнитной ловушкой» в центре. Для обеспечения безопасности эксплуатации магнитный принтер имеет экранирующий от постоянного магнитного поля корпус. Магнитный биопринтер обеспечивает:

- возможность установки шести кювет с биообразцами при проведении сеанса магнитного формирования;
- возможность извлечения и установки камер для видеорегистрации хода эксперимента;
- возможность освещения шести кювет с биообразцами.
- возможность установки и извлечения регистратора температуры;
- возможность замены батареек типа АА.

Разрез секции магнитного биопринтера показан на рисунке 5.1.3 а, где условно обозначены: 1 – магнитная установка, состоящая из двух соединенных

одноименными полюсами неодимовых магнитных колец; 2 – источник питания (в предпочтительном варианте осуществления источник питания выполнен в виде батареек типа АА), 3 – блок освещения; 4 – портал для установки кюветы.

Конструкция кюветы, которая устанавливается в портал магнитного биопринтера (схема установки приведена на рисунке 5.1.3 б) отражена на рисунке 5.1.3 г, где 1 – кнопки-поршни впрыска питательной среды и фиксатора; 2 – поршни вторичного контура безопасности; 3 – объем для фиксатора; 4 – объем для питательной среды; 5 – клапан для питательной среды; 6 – поршневой клапан для фиксатора; 7 – объем для ТС и термочувствительного гидрогеля. Разрез установленной кюветы в биопринтер изображен на рисунке 5.1.3 д. На рисунке 5.1.3 е представлена фотография космонавта с магнитным биопринтером со вставленными кюветами при установке биопринтера в термостат на 37 °С.

Основным элементом магнитного биопринтера является основание поз. 1 (рисунок 5.1.4), в котором находятся шесть магнитных установок. Основание поз. 1 выполнено в сечении в виде полуокружности, в котором радиально расположена магнитная система, которая состоит из двух соединенных одноименными полюсами неодимовых кольцевых магнитов.

Корпус выполнен из алюминиевого сплава Д16Т ГОСТ 4784-98 с использованием механической обработки. Для фиксации магнитов используются прижимы, зафиксированные винтами М8 ГОСТ 11738-84 из нержавеющей стали 12Х18Н10Т. Усилие затяжки составляет 3 Н·м. Прижимы выполнены из алюминиевого сплава Д16Т ГОСТ 4784-98 с использованием механической обработки.

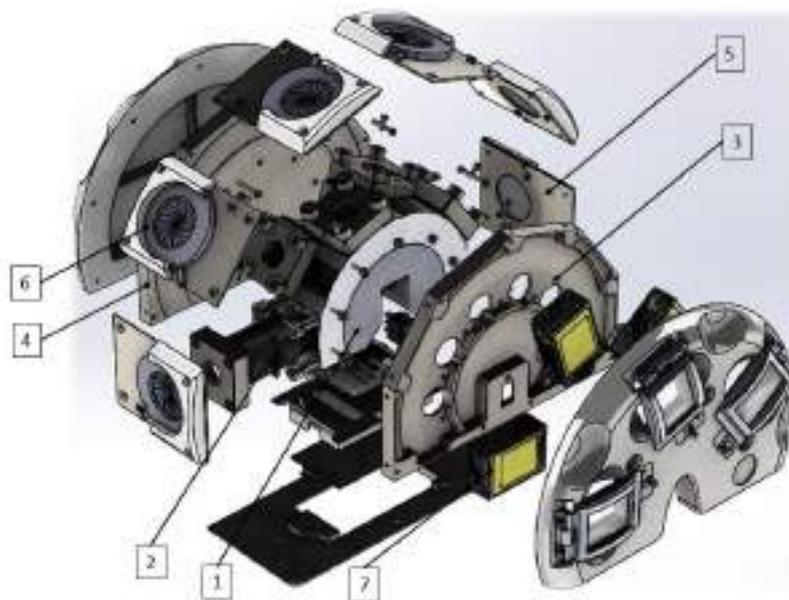


Рисунок 5.1.4 - Изображение магнитного биопринтера

Для экранирования магнитного поля предусмотрены задний и передний экраны поз. 3 и поз. 4 и боковые экраны поз. 5 (рисунок 5.1.4), выполненные из магнитной нержавеющей стали 20Х13 ГОСТ 5949-75. Крепление экранов к корпусу осуществляется винтами М4 из нержавеющей стали 12Х18Н10Т.

Для загрузки кювет в биопринтер предусмотрены шесть порталов поз. 6, выполненные в виде пластины и диафрагмы. Шесть порталов снабжены механизмами открывания и закрывания и позволяют одновременно устанавливать до шести кювет в одном космическом эксперименте. Портал (в закрытом виде) предназначен для защиты от попадания инородных частей в полости магнитного биопринтера.

Портал (в открытом виде) служит для установки кювет в магнитном биопринтере и расположен на внешней поверхности основания биопринтера так, чтобы рабочий объем камеры биофабрикации кюветы находился в центре неоднородного магнитного поля, создаваемого магнитной системой. Пластина портала представляет собой прямоугольную деталь, которая выполнена из магнитной нержавеющей стали 20Х13 ГОСТ 5949-75. Пластина служит для

экранирования магнитного поля и крепления диафрагмы с защитной декоративной накладкой.

Цифровая камера поз.7 (рисунок 5.1.4) предназначена для мониторинга и фиксации процесса магнитного формирования ТКМ. Модель цифровой камеры, вставляемой в биопринтер, «GoPro Hero 4 Silver», которая предназначена для видеозаписи.

Для освещения зон биофабрикации был спроектирован блок освещения. Для питания блока освещения используются шесть батареек типа АА фирмы «Durasell». При работе блок освещения потребляет мощность 2 Вт.

Кювета представляет собой конструкцию, состоящую из трех объемов: емкости поз. 1 для питательной среды (для среды культивирования), емкости поз. 2 для фиксирующего раствора и емкости (камеры) биофабрикации поз. 3 (рисунок 5.1.5). Данные емкости представляют собой единую деталь, выполненную из поликарбоната. Форма детали цилиндрическая.

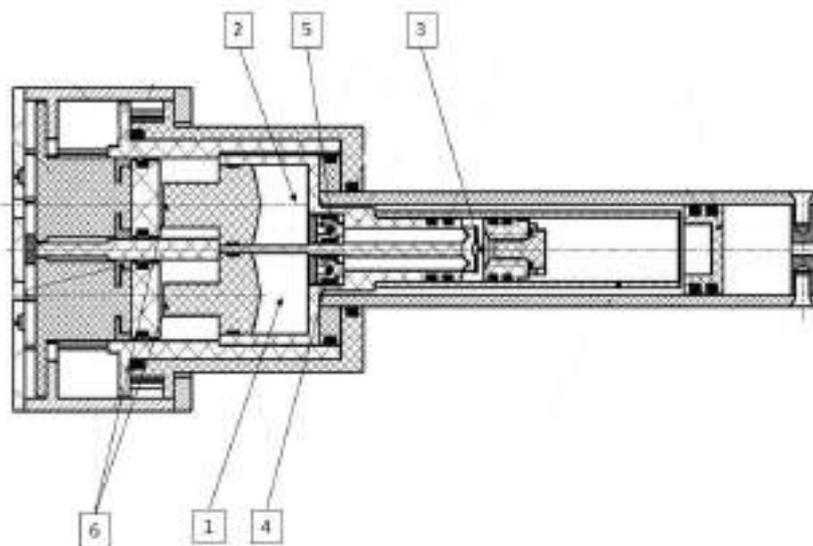


Рисунок 5.1.5 - Изображение кюветы в разрезе

Емкости имеют цилиндрическую форму со следующими характеристиками:

- Емкость для среды имеет объем  $1 \pm 0,2$  мл.
- Емкость для фиксирующего раствора имеет объем  $0,5 \pm 0,1$  мл.

- Камера биофабрикации имеет объем  $2 \pm 0,2$  мл. Стенки камеры биофабрикации прозрачны, что позволяет проводить визуальный осмотр и видеозапись экспериментов.

Две емкости 1, 2 индивидуально соединены с камерой биофабрикации 3, изолированной клапанами поз. 4, 5 (рисунок 5.1.5), чтобы избежать нежелательной утечки среды культивирования и/или фиксирующего раствора в основную камеру. Емкости для питательной среды и фиксирующего раствора имеют свои собственные независимые внешние поршни поз. 6 для нажатия пальцами.

В конструкции кюветы с биообразцами сформированы каналы для перетеснения рабочих растворов в камеру биофабрикации. Конструкция камеры биофабрикации обеспечивает компенсацию объема не менее 2 мл. Емкость для среды и емкость для фиксирующего раствора имеют персональные независимые друг от друга поршни.

Для предотвращения непроизвольного перетекания жидкостей из емкости для среды и емкости для фиксирующего раствора в камеру биофабрикации в данном исполнении конструкции предусмотрены клапанные узлы. Два клапана работают по-разному. Клапан поз. 4, установленный в емкости с питательной средой, использует принцип клапана Шредера, когда избыточное давление в камере (вызванное нажатием внешнего плунжера) расширяет резиновый элемент, позволяя жидкости течь в камеру биофабрикации. Другой клапан, установленный в емкости для фиксации раствора, работает аналогично запорному клапану, где повышение давления смещает поршень клапана в открытом положении, открывая отверстие, позволяющее перенос жидкости из емкости к камере биофабрикации. Такая разница в исполнениях необходима для обеспечения гарантированной полной изоляции фиксирующего раствора.

Кювета помещается внутрь магнитного биопринтера и после этого происходит процесс магнитного формирования. Более подробно, для формирования ТКМ кюветы с парамагнитной культуральной средой и ТС помещают в рабочую зону магнитного биопринтера.

### 5.1.4 Тепловой расчет системы из укладки и кювет в термостате ТБУ-В

Для оценки времени выхода на тепловой режим кювет из научной аппаратуры «3D-МБП» в термостате, были проведены тепловые расчеты. Для этого рассмотрена задача Коши для однородного уравнения теплопроводности:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} - a^2 \Delta u &= 0, \quad x \in \mathbb{R}^n, \quad t > 0, \\ u(x, 0) &= \varphi(x), \quad x \in \mathbb{R}^n, \end{aligned} \quad (5.1.13)$$

где  $u(x, t)$  – функция температуры от пространственной координаты  $x$  и времени  $t$ ,  $\varphi(x)$  – начальная функция, задающая температуру в начальный момент времени,  $a^2$  – коэффициент температуропроводности.

В рамках эксперимента полагаем начальные и граничные условия однородными. Сделаем замену переменных:  $u \rightarrow u - T_{\text{ср}}$ , где  $T_{\text{ср}}$  – температура окружающей среды. Она принята за 8 °С. Тогда уравнение сводится к следующему:

$$\begin{aligned} u_t &= a^2 u_{xx}, \quad 0 < x < l, \quad 0 < t \leq T \\ u(x, 0) &= \varphi(x); \quad 0 \leq x \leq l \\ \left. \begin{aligned} u(0, t) &= 0, \\ u(l, t) &= 0. \end{aligned} \right\} \quad 0 \leq t \leq T \end{aligned} \quad (5.1.14)$$

Требуется найти функцию:

$$u(x, t) \text{ для } \forall(x, t) : 0 \leq x \leq l, \quad 0 \leq t \leq T. \quad (5.1.15)$$

В рамках эксперимента считаем начальную температуру укладки постоянной и равной  $T_{\text{нач}} = 24$  °С.

Решением данного уравнения будет следующее выражение:

$$u(x, t) = \sum_{n=1}^{\infty} \left( \frac{2}{l} \int_0^l \varphi(\xi) \sin\left(\frac{\pi n}{l} \xi\right) d\xi \right) \sin\left(\frac{\pi n}{l} x\right) \exp\left(-a^2 \left(\frac{\pi n}{l}\right)^2 t\right). \quad (5.1.16)$$

Зная начальную функцию  $\varphi(x)$  и коэффициент температуропроводности укладки  $a^2$ , численно можно найти значение приведенного выражения для каждой пространственной точки и в разный момент времени. Учитывая, что укладка

состоит из разных материалов с разной теплопроводностью, (в основном воздух  $\alpha^2 = 1,9 \cdot 10^{-5}$ , поликарбонат  $\alpha^2 = 0,144 \times 10^{-6}$ , пенополистирол  $\alpha^2=1,44 \cdot 10^{-6}$ ), был выбран эффективный коэффициент теплопроводности для всей укладки  $\alpha^2 = 1 \cdot 10^{-5}$ . Расчет был проделан в среде моделирования Matlab. На рисунке 5.1.6 приведен профиль начальной функции, показан красным цветом, пространственное распределение температуры в разные моменты времени показано синим, указан момент времени, которому соответствует каждый профиль температуры.

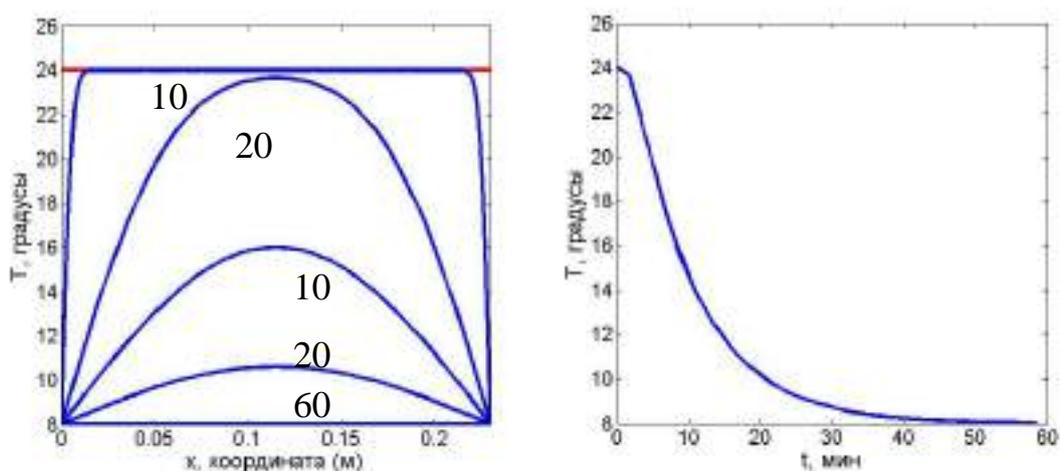


Рисунок 5.1.6 – Пространственное распределение температуры в разные моменты времени (слева); зависимость температуры в центре укладки от времени (справа)

На втором графике рисунка 5.1.6 показана зависимость температуры в центре укладки от времени. Как видно из графиков, времени 60 мин при перечисленных условиях достаточно для охлаждения укладки.

### 5.1.5 Анализ температуры в эксперименте на МКС

Проведен анализ изменения температуры в эксперименте, прошедшем на борту РС МКС. Точная теплопроводность укладки, как и начальный профиль температуры, не были известны. Датчик температуры был расположен в одной конкретной точке, положение которой не менялось со временем. Однако, если посмотреть на решение уравнения теплопроводности, видно, что с течением

времени меняется только экспоненциальный член. Таким образом, остывание укладки происходило по экспоненциальному закону.

Более упрощенно изменение температуры можно рассмотреть в соответствии с законом охлаждения Ньютона. Тогда температуру тела можно записать таким образом:

$$T(t) = T_{cp} + (T_{нач} - T_{cp})e^{-kt}, \quad (5.1.17)$$

где  $k$  – эффективный коэффициент теплопроводности.

Начальная температура  $T_{нач} = 22,5$  °С была известна достоверно, тогда как температура среды и коэффициент теплопроводности известны только приблизительно. По закону изменения температуры в эксперименте проведена оценка неизвестных параметров. Критерием подбора подходящих параметров была минимизация суммарного среднеквадратичного отклонения измеренных результатов от приведенной теоретической зависимости.

Параметры находились из условия:

$$\delta = \sum_{n=1}^{N=11} |T(t_n) - T^{exp}(t_n)|^2 \rightarrow \min \quad (5.1.18)$$

где  $\delta$  – суммарное среднеквадратичное отклонение экспериментальных значений от теоретических. Для простоты расчета выражение было прологарифмировано, и итоговое выражение для  $\delta$ :

$$\delta = \sum_{n=1}^{N=11} \left| \ln \frac{T^{exp}(t_n) - T_{cp}}{T_{нач} - T_{cp}} + kt_n \right|^2 \rightarrow \min \quad (5.1.19)$$

С учетом вышеизложенного, найдены суммарные среднеквадратичные отклонения для экспериментальных данных в зависимости от  $T_{cp}$  и эффективного коэффициента теплопроводности  $k$ . Результаты расчета приведены на рисунке 5.1.7. В легенде указан эффективный коэффициент теплопроводности, которому соответствует зависимость суммарного среднеквадратичного отклонения от  $T_{cp}$ . Из рисунка 5.1.7 наглядно видно, что лучшей аппроксимацией будет  $T_{cp} = 11$  °С и  $k = 0,0004$ . Это же соответствует минимальному значению  $\delta = 0,081$

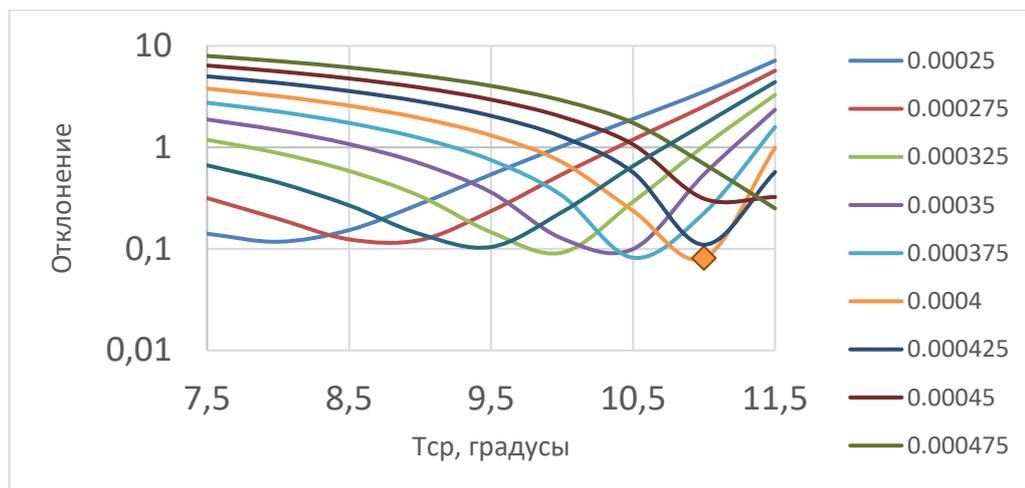


Рисунок 5.1.7 – Суммарные среднеквадратичные отклонения в зависимости от  $T_{cp}$  и  $K$

В соответствии с найденными параметрами проведена аппроксимация экспериментальных данных предложенной формулой с найденными параметрами. Погрешность в измерении температуры составила  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

На рисунке 5.1.8 приведен график зависимости температуры от времени в первом эксперименте, а также аппроксимация теоретической зависимостью. Как видно из рисунка 5.1.8, предложенная зависимость хорошо описывает экспериментальные точки и даже не выходит за рамки погрешности. Для сравнения пунктиром проведена аналогичная зависимость с наиболее подходящим значением  $k$  эффективной теплопроводности, из предположения  $T_{cp} = 8,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Такая зависимость аппроксимирует экспериментальные данные гораздо хуже предложенной нами. Таким образом, найденная из экспериментальных данных температура среды  $T_{cp} = 11\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

По результатам заседания научно-технической секции № 1 выпущено положительное решение по проведению космического эксперимента «Магнитный 3D-биопринтер».

В ходе разработки аппаратуры были выпущены и согласованы следующие документы:

- техническое задание на космический эксперимент (приложение Г).
- техническое задание на разработку научной аппаратуры (приложение Д).
- технические условия БНРС.943129.000 ТУ (приложение Е).

- комплект конструкторской документации для изготовления составных частей научной аппаратуры.

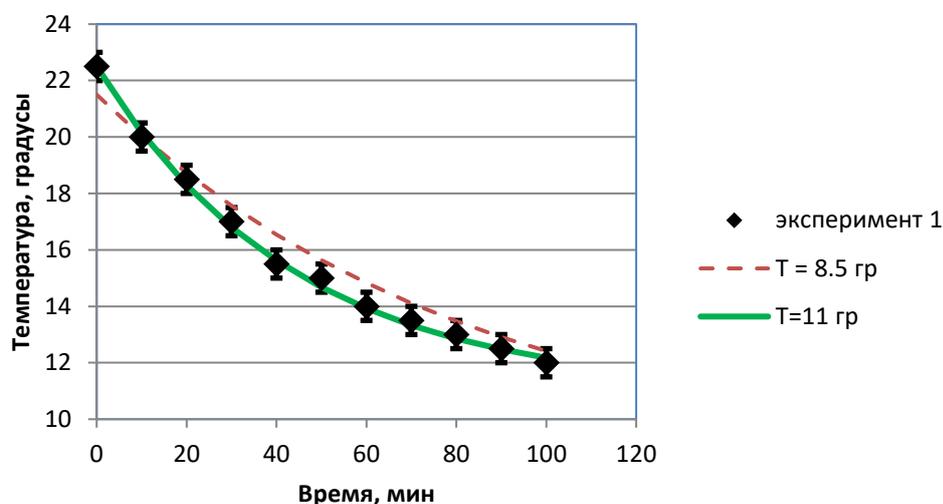


Рисунок 5.1.8 – Аппроксимация экспериментальных данных предложенной формулой с найденными параметрами

По результатам анализа проектировки научной аппаратуры было выдано положительное заключение № 1336-121-07/19 (приложение Ж) санитарно-гигиенической экспертизы биологических материалов и химических веществ для КЭ «Магнитный 3D-биопринтер» (БТХ-53) с использованием научной аппаратуры «3D-МБП», планируемой к доставке на РС МКС изделием 11Ф732 №743.

### 5.1.6 Методика заправки кюветы

Кювету можно охарактеризовать как сложную систему из множества составных элементов, обеспечивающих необходимый уровень безопасности на МКС. Первый защитный барьер включает внутренний резервуар (рисунок 5.1.9 поз.1), поршни (рисунок 5. 1.9 поз.2) и внутреннюю трубку (рисунок 5. 1.9 поз.3). Второй и третий защитные барьеры состоят из компонентов, показанных на рисунке 5. 1.9 поз. 4–11.



Рисунок 5.1.9 - Кювета, использованная в эксперименте: 1 - внутренний сосуд; 2 - поршни; 3 - внутренняя трубка; 4 - компенсатор; 5 - внешний корпус; 6 - защитные поршни; 7 - поршни; 8 - защитный скаффолд; 9 - внешняя трубка; 10 - компенсатор; 11 – фиксатор [196]

Перед заполнением кюветы биоматериалом необходимо убедиться, что кювета полностью разобрана, а ее части чистые и стерильные. Кюветы следует стерилизовать 70% этанолом перед каждым использованием.

Пошаговая процедура заправки внутреннего сосуда представлена на рисунке 5.1.10.

Среду для культивирования клеток, фиксирующий раствор и биоматериалы, содержащиеся в термообратимом гидрогеле, необходимо поместить в резервуары 1, 2 и 3 (рисунок 5.1.10) соответственно. После того, как емкость 1 будет полностью заполнена средой для культивирования клеток, необходимо установить поршень так, чтобы объем среды составлял  $1 \pm 0,1$  мл. В то время как в резервуаре 1 возникает избыточное давление, часть среды для культивирования клеток проходит в резервуар 3 через клапан. На протяжении всей процедуры следует внимательно следить за отсутствием пузырьков воздуха в резервуаре 1. После

установки поршня для среды культивирования клеток емкость 3 следует промыть дистиллированной водой.

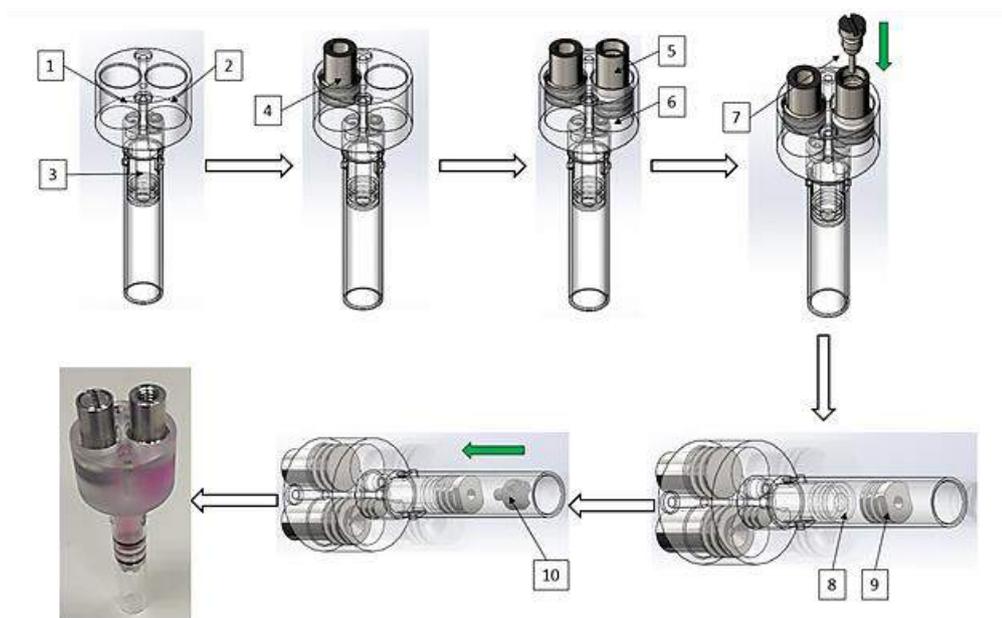


Рисунок 5.1.10 - Пошаговая процедура заправки кюветы [196]

Затем следует установить поршень для фиксирующего раствора так, чтобы объем фиксирующего раствора в резервуаре 2 составлял  $0,5 \pm 0,1$  мл. Также необходимо избегать образования пузырьков воздуха в резервуаре 2. Для герметизации отверстия в резервуаре 2 следует использовать винт с прокладкой. После предварительного охлаждения термообратимого гидрогеля (для ТС) до температуры  $+ 8$  °С в емкость 3 необходимо поместить  $0,8 \pm 0,2$  мл суспензии биоматериал-гидрогель. Компенсатор с отверстием следует устанавливать на расстоянии 4-8 мм от его конечного положения.

После завершения всех процедур заполнения внутренний сосуд помещают в центрифугу при  $+ 4$  °С, 2500 об / мин на 5 мин так, чтобы поршни для среды для культивирования клеток и фиксирующего раствора находились вертикально внизу. После процесса центрифугирования гидрогель заполняет все пустоты внутреннего сосуда, компенсатор устанавливается в крайнее положение, и пузырьки воздуха вместе с избыточным количеством суспензии выходят через отверстие компенсатора. Для герметизации отверстия следует использовать винт с

прокладкой. Внутренний сосуд следует промыть дистиллированной водой после центрифугирования.

Процесс биофабрикации в кювете запускается нажатием кнопки «П1». После этого происходит перенос среды культивирования из ее емкости в зону камеры биофабрикации. Затем кювету помещают в порт магнитного биопринтера.

ТКМ формируется, находясь в магнитном принтере, время выдержки для разных материалов разное - от 1 дня до месяца. По завершению процесса формирования кювету извлекают.

После фабрикации кювета извлекается из порта, нажимается кнопка «П2», чтобы начать фиксацию конструкции. Полученный ТКМ извлекается путем полного разбора кюветы на Земле.

Способ доставки ТС в космическое пространство выглядит следующим образом. Биоматериал помещают в емкость с неадгезивным термообратимым и биосовместимым гидрогелем, характеризующимся температурой золь-гель перехода 15-17 °С так, что при температуре ниже температуры перехода гидрогель имеет структуру золя (т.е. жидкую), а при температуре выше температуры перехода гидрогель имеет структуру неподвижного геля. Другими словами, при охлаждении гель представляет собой золь (обладает свойствами жидкостей), но становится более жестким гидрогелем при более высоких температурах. Золь-гель переход (англ. sol gel transition) - процесс превращения золя в гель, протекающий при увеличении концентрации частиц дисперсной фазы в золе или под влиянием иных внешних воздействий (в частности, изменения температуры).

Гидрогели представляют собой класс полимерных материалов, характеризующихся своей сетчатой структурой и высоким содержанием воды. Гидрогели многих видов нашли широкое применение в медицине и биологических исследованиях, ориентированных, но не ограничиваясь, трехмерным культивированием клеток, ТИ и доставкой лекарств.

Для применения в доставке биоматериала в космическое пространство гидрогель должен обладать следующими свойствами:

- неадгезивность (т.е. клетки или ТС не распластываются в данном геле),

- термообратимость (т.е. при температуре 4-8 °С гель становится жидким, при температуре выше 20 °С гель затвердевает);

- биосовместимость (т. е. гель не наносит пагубного влияния на находящиеся в нем биоматериалы).

Также, при добавлении в такой гидрогель питательной среды сверх того объема, которое необходимо для формирования гидрогеля, гидрогель теряет свое свойство термообратимости и остается жидким и при температурах выше золь-гель перехода (в связи с увеличением концентрации частиц дисперсной фазы в золе).

Дополнительным требованием к гидрогелям является прозрачность (для наблюдения за процессом биофабрикации), отсутствие биологических веществ, которые могут загрязнять биоматериал.

В экспериментальной отработке использовался Mebiol гель - термообратимый гелеобразующий полимер, представляющий собой сополимер, состоящий из термореактивных полимерных блоков [поли(N-изопропилакриламид-со-п-бутилметакрилат) поли(NIPAAm-со-BMA)] и гидрофильные полимерные блоки (полиэтиленгликоль). Мебиол гель характеризуется его температурно-зависимыми динамическими вязкоупругими свойствами. Термореактивные блоки являются гидрофильными при температурах ниже температуры перехода золь-гель и гидрофобны при температурах выше температуры золь-гель перехода. Гидрофобное взаимодействие приводит к образованию гомогенной трехмерной полимерной сети в воде. Температуру золь-гель перехода можно контролировать, изменяя химическую композицию NIPAAm-со-BMA и PEG. Клетки или ткани могут быть помещены в жидкий раствор геля Mebiol при более низких температурах и культивированы.

Свойства, очень благоприятные для применения в клеточных культурах и ТИ, привели к коммерциализации Mebiol Gel, сополимера поли (N-изопропилакриламида) и поли (этиленгликоля) (PNIPAAm-PEG) для исследовательских целей в начале 2000-х годов.

Отличительной особенностью геля Mebiol, в отличие от других коммерчески доступных гидрогелей, является его температурный золь-гель переход. При

охлаждении геля Mebiol представляет собой золь (обрабатывается как жидкость), но становится более жестким гидрогелем при более высоких температурах. На практике это означает чрезвычайно простую работу с клетками. Культуры высевают в охлажденный гель Mebiol и удобно извлекают путем охлаждения емкости для культивирования и центрифугирования. В гелеобразном состоянии высоколипофильная среда геля Mebiol представляет собой эффективную нишу для пролиферации клеток, взаимодействия между клетками, газо- и массообмена и защиты клеток и тканей от сил сдвига.

Особенности геля Mebiol: простота в обращении, нетоксичный, биосовместимый, 100% синтетический, без патогенов, высокая прозрачность для наблюдения за клетками.

Mebiol гель готовят и используют согласно рекомендациям производителя.

1. Регидратация: добавляют 10 или 50 мл холодного водного раствора, подходящего для конкретного применения (например, среда для культивирования, PBS), смачивая весь порошок из упаковки производителя. Колбу размещают в горизонтальном положении и оставляют на несколько часов при температуре 4 °С, периодически осторожно встряхивая.

2. Культивирование клеток и восстановление: клетки или ткани добавляют в охлажденный гель Mebiol (в виде золь). Культивируют при 37 °С. Восстановление клеток и тканей осуществляют путем охлаждения емкости для культивирования и добавления 30-40 мл / 150-200 мл холодной жидкости для предотвращения гелеобразования. Проводят центрифугирование в холоде.

## **5.2 Изучение процесса формирования образцов трехмерных композиционных материалов в условиях микрогравитации на борту РС МКС**

Целью КЭ являлось испытание нового способа биофабрикации ТКМ посредством магнитного формирования в условиях невесомости, а также изучение

влияния различных факторов космического полета (микрогравитации, радиации и др.) на тканевый метаболизм сформированных ТС.

В ходе эксперимента проведена отработка научной аппаратуры «3D-МБП» и отработка методики магнитной биофабрикации в условиях микрогравитации.

Для проведения космических экспериментов использовалась научная аппаратура «3D – МБП», которая имеет следующий состав:

- укладка «Кюветы»;
- укладка «Биопринт».

Укладка «Кюветы» представляет собой комплект, состоящий из следующих составных частей:

- укладка «Кюветы № 1»;
- укладка «Кюветы № 2».

Укладка «Кюветы № 1» представляет собой набор из комплекта кювет, комплекта сменных аккумуляторов, термоизолирующего контейнера, комплекта карт памяти и регистратора температуры (вшитого в чехол). Укладки «Кюветы № 1» и «Кюветы № 2» одинаковые. Каждый комплект кювет содержит шесть одинаковых кювет. Кювета с биообразцами предназначена для доставки, биофабрикации, фиксации и возврата биологических образцов. Каждая кювета располагается в персональном пакете типа «зип-лок». Комплект сменных аккумуляторов представляет собой три сменных аккумулятора для цифровых камер. Термоизолирующий контейнер представляет собой изотермический контейнер пассивного принципа действия. Комплект карт памяти представляет собой набор из трех карт памяти, необходимых для хранения видеофайлов процесса магнитной биофабрикации органных изделий. В качестве карты памяти использована карта памяти типа MicroSD.

Внешний вид упаковок «Кюветы № 1» и «Кюветы № 2» представлен на рисунке 5.2.1.



Рисунок 5.2.1 - Внешний вид упаковок «Кюветы № 1» и «Кюветы № 2»

Укладка «Биопринт» представляет собой размещенный в чехле магнитный биопринтер с установленными в нем комплектом видеокамер (3 шт.), батарейками типа АА (6 шт.) и регистратором температуры.

Магнитный биопринтер осуществляет формирование ТКМ путем создания в рабочей зоне неоднородного магнитного поля с «магнитной ловушкой» в центре магнитной ячейки. Внешний вид магнитного биопринтера представлен на рисунке 5.2.2.



Рисунок 5.2.2 - Внешний вид магнитного биопринтера

В каждой сессии использовался магнитный биопринтер, а количество специальных кювет зависело от целей каждой сессии и объектов исследований.

## **5.2.1 Формирование трехмерных композиционных материалов в виде твердых тканей на основе фосфатов кальция**

### **5.2.1.1 Формирование и перекристаллизация в неоднородном магнитном поле трехмерных композиционных материалов для замещения костных дефектов. Экспедиция МКС 60 (Союз МС-14), МКС 62 (Союз МС-16) и МКС 66 (Союз МС-19)**

В период данной сессии космического эксперимента решались следующие задачи:

- отработка методики формирования композиционных материалов из ФК, заключающейся в формировании и перекристаллизации ТКМ с различными концентрациями парамагнетика в среде;
- отработка методики фабрикации различных биологических материалов, состоящих из конгломератов микроорганизмов, клетки которых образуют пространственную структуру, характеризующуюся измененной метаболической активностью.

#### **Заправка научной аппаратуры**

Все работы по заправке научной аппаратуры биологическим материалом проводились в стерильном ламинарном боксе, используя стерильные механические дозаторы с набором наконечников и стерильные пинцеты.

Материалы, заправленные в кюветы в период экспедиции МКС 60 (Союз МС-14) и МКС 66 (Союз МС-19), представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Перечень материалов, заправленных в кюветы

| <b>№ кювет</b> | <b>Зав №</b> | <b>Емкость № 1</b>                                  | <b>Емкость № 2</b> | <b>Емкость № 3</b> |
|----------------|--------------|---|--------------------|--------------------|
| № 1-1          | 004          | 984 мкл среды (DMEM +10%FBS)<br>+16 мкл 1M гадовист | 500 мкл 16% PFA    | 600 мкл Mebiol     |

| № кювет | Зав № | Емкость № 1   | Емкость № 2                                    | Емкость № 3   |
|---------|-------|---|--|---|
| № 1-2   |       | 984 мкл среды (DMEM +10%FBS)<br>+16 мкл 1 Моль гадовист | 500 мкл 16% PFA                                | + ТС из клеток MG-63+гранулы ОКФ  |
| № 1-3   |       | 984 мкл среды (DMEM +10%FBS)<br>+16 мкл 1 Моль гадовист | 500 мкл 16% PFA                                |   |
| № 1-4   |       | 920 мкл среды (DMEM+10%FBS)<br>+80 мкл 1 Моль гадовист  | 500 мкл 16% PFA                                |   |
| № 1-5   |       |   |  |   |
| № 1-6   |       |   |  |   |
| № 2-1   |       |   | 1 мл ацетата натрия 0,228 г/мл                 |   |
| № 2-2   |       |   |  |   |
| № 2-3   |       |   |  |   |
| № 2-4   |       |   |  |   |
| № 2-5   |       |   |  |   |
| № 2-6   |       |   |  |   |
| № 1-1   | 05    | -   | 1 мл (ацетат натрия 0,1 М + хлорид натрия 13%) | 160 мкл лизоцим (100 мг/мл) + 1040 мкл ацетата натрия (0,1 М Моль + 400 мкл гадовист (1 Моль) |
| № 1-2   |       |   |  | 320 мкл лизоцим (100 мг/мл) + 880 мкл ацетата натрия (0,1 Моль) + 400 мкл гадовист (1 Моль)   |
| № 1-3   |       |   |  | 480 мкл лизоцим (100 мг/мл) + 720 мкл ацетата натрия (0,1 Моль) + 400 мкл гадовист (1 Моль)   |
| № 1-4   |       |   |  | 640 мкл лизоцим (100 мг/мл) + 560 мкл ацетата натрия (0,1 Моль) + 400 мкл гадовист (1 Моль)   |
| № 1-5   |       |   |  | 800 мкл лизоцим (100 мг/мл) + 400 мкл ацетата натрия (0,1 Моль) + 400 мкл гадовист (1 Моль)   |
| № 1-6   |       |   |  | 960 мкл лизоцим (100 мг/мл) + 240 мкл ацетата   |

| № кювет | Зав № | Емкость № 1                                | Емкость № 2                         | Емкость № 3                                    |
|---------|-------|--|-------------------------------------|--|
|         |       |  |                                     | натрия (0,1 М Моль + 400 мкл гадовист (1 Моль) |
| № 1-1   | 06    | 540 мкл среды LB + 460 мкл 1 Моль гадовист | 500 мкл 12% глутаральдегида         | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-2   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-3   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-4   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-5   |       |  | 500 мкл гентамицин 16% PFA          | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-6   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 2-1   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 2-2   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 2-3   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 2-4   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 2-5   |       |  |                                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 2-6   |       |  |                                     | 1 мл среды LB                                  |
| № 1-1   | 07    | 540 мкл среды LB + 460 мкл 1 Моль гадовист | 500 мкл 16% PFA                     | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-2   |       |  | 500 мкл 12% глутаральдегида         | 600 мкл Mebiol + бактерии E.coli (штамм M17)   |
| № 1-3   |       | 1 мл ацетата натрия 0,228 г/мл             | 500 мкл гидроксида натрия 0,04 г/мл | 600 мкл 0,5 Моль гадовист + гранулы ТКФ        |
| № 1-4   |       |  |                                     | 600 мкл 1 Моль гадовист + гранулы ТКФ          |

В период Экспедиция МКС 62 (Союз МС-16) материалы, заправленные в кюветы представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Перечень материалов, заправленных в кюветы

| № кювет | Зав № | Емкость № 1  | Емкость № 2             | Емкость № 3  |
|---------|-------|--|-------------------------|--|
| № 1-1   | 09    | 0,9 мл натрия уксуснокислого + 0,1мл забуференной фосфорной кислоты + 0,1 мл 2,5М раствора парамагнетика гадодиамида | 0,5мл гидроксида натрия | 0,6мл дистиллированной воды +100 мг гранул альфа трикальцийфосфата |
| № 1-2   |       |  |                         |  |
| № 1-3   |       |  |                         |  |
| № 1-4   |       |  |                         |  |
| № 1-5   |       |  |                         |  |
| № 1-6   |       |  |                         |  |
| № 2-1   |       |  |                         |  |
| № 2-2   |       |  |                         |  |
| № 2-3   |       |  |                         |  |
| № 2-4   |       |  |                         |  |
| № 2-5   |       |  |                         |  |
| № 2-6   |       |  |                         |  |

В соответствии с указанной методикой была реализована следующая последовательность действий:

- осуществлялась заправка верхней емкости питательной средой, содержащей вещество-парамагнетик;

- осуществлялась заправка камеры биофабрикации термообратимым гидрогелем, содержащим ТС, состоящие из хондроцитов человека или тироцитов крысы;

- осуществлялась заправка верхней емкости фиксирующим раствором (16% раствор параформальдегида);

- после заправки и сборки кювет осуществлялась их проверка на герметичность по методике, описанной в Руководстве по эксплуатации БНРС.943129.000 РЭ;

- заправленные кюветы устанавливались в укладки и проводилась дезинфицирующая обработка 3% раствором перекиси водорода.

На рисунке 5.2.3. показана схема космического эксперимента во время космической экспедиции. Материалы были доставлены на российский сегмент МКС ракетой «Союз-ФГ» и космическим кораблем «Союз МС-15».

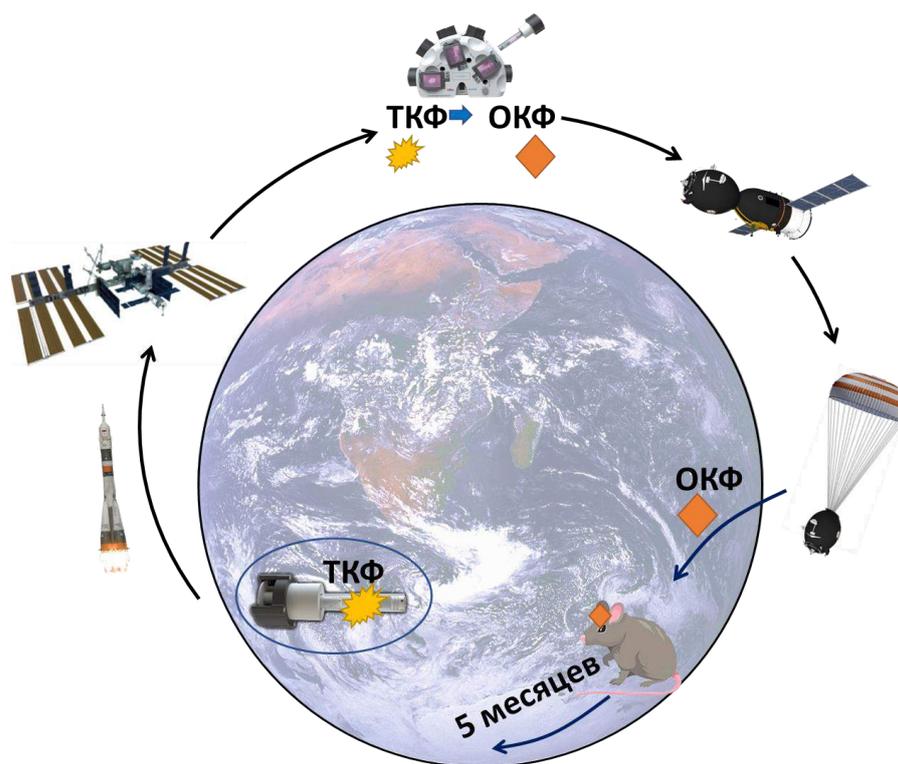


Рисунок 5.2.3 –Схема экспериментов на РС МКС в условиях микрогравитации по формированию керамических ТКМ

Экспериментальное оборудование и схема заполнения кюветы показаны на рисунок 5.2.4. Функционально кювета состоит из двух контейнеров для реагентов и рабочей камеры, в которой можно смешивать все три раствора. Для подготовки кювет к эксперименту были предприняты следующие шаги (рисунок 5.2.4):  
1) буфер № 1 был помещен в контейнер 1; 2) буфер № 2 был помещен в контейнер 2;  
3) рабочая камера заполнена частицами ФК ( $\alpha$ -ТКФ) в дистиллированной воде.

Использование дистиллированной воды предотвратило образование воздушных пузырьков во время эксперимента. Кюветы обеспечивают доставку, активацию процесса, фиксацию и возврат на Землю полученных экспериментальных образцов.

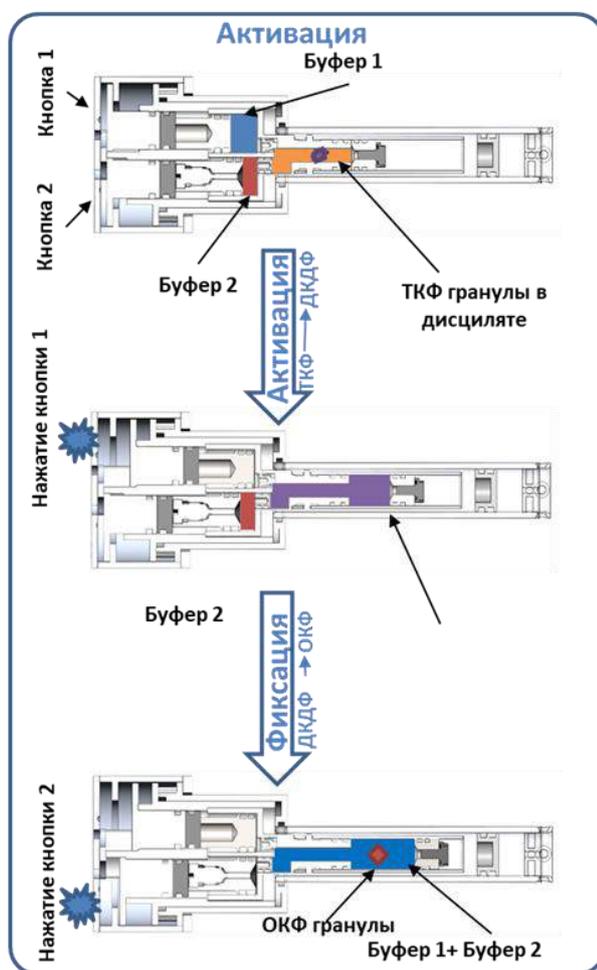


Рисунок 5.2.4 – Заправка кювет и процессы перемещения жидкостей в кювете

Для активации процесса космонавт нажал первую кнопку на кюветах и в буфер № 1 была введена дисперсная фаза ФК, соотношение массы частиц к раствору составило 1/100. Значение рН смешанного раствора увеличилось с 4,5 до 4,75 из-за снижения концентрации  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Кюветы поместили в магнитный биопринтер, и объекты ФК начали формироваться в ТКМ под действием магнитных сил и одновременно начали превращаться в ДКФД ( $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) из-за взаимодействия с буфером №1 согласно схеме 5.1:



Первый этап левитации в буфере № 1 под действием магнитной силы произошел в течение 48 ч.

На втором этапе космонавт нажал кнопку 2 и буфер № 2 был введен в кюветы с левитирующими ТКМ. Соотношение массы объектов к раствору стало 1/200, значение pH увеличилось до 8,2. Превращение ДКФД в октакальцийфосфат (ОКФ,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) прошло в течение дополнительных 48 ч согласно схеме 5.2:



Те же процессы проводились на Земле, контрольные ТКМ для костных тканей получены при тех же условиях, исключая гравитацию Земли.

Анализ химического состава конечного продукта показал, что концентрация  $\text{Gd}^{3+}$  в образце МКС была ниже 0,001 мас. %. С другой стороны, земные образцы характеризовались 0,85 мас. %  $\text{Gd}^{3+}$  (таблица 5.3). Расчет соотношения (Ca + Gd)/P оценивал более полные процессы образцов МКС, которые характеризовались значением соотношения - 1,33 для стехиометрической фазы ОКФ ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Наличие  $\text{Gd}^{3+}$  в земных образцах может быть связано с гравитационными силами и морфологией материалов, что приводит к более заметной адсорбции поверхности.

Таблица 5.3- Химический состав образцов МКС и Земли.

| Образец |   | Концентрация     |                  |                 |                  |                  |                 |                 |
|---------|---|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
|         |   | Ca<br>масс,<br>% | Gd<br>масс,<br>% | P<br>масс,<br>% | Ca<br>масс,<br>% | Gd<br>моль,<br>% | P<br>моль,<br>% | (Ca + Gd)/<br>P |
| МКС     | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 29,7             | <0.001           | 18.11           | 7.29             | 0.00             | 5.74            | 1.33            |
| Земля   | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 27,21            | 0.850            | 19.79           | 6.68             | 0.05             | 6.27            | 1.07            |

Согласно данным рентгенографии (рисунок 5.2.5 а), материалы, полученные с помощью магнитного левитационного формирования в условиях МКС, характеризуются преобладающим образованием фазы ОКФ (ICDD карта № 026-1056) до 90 мас. % с незначительным сохранением безводного гидроортофосфат

кальция (ДСРА, ICDD карта № 070–0359) и ДКФД (ICDD карта № 11–293), которые могли сохраняться в центре материалов. Начальная фаза  $\alpha$ -ТКФ (ICDD карта № 09-0348) не наблюдалась. ТКМ, полученные на Земле, демонстрировали наличие содержания до 50 мас. % примесных фаз. Это связано с низкой концентрацией парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ). Материалы, полученные на МКС, характеризовались низкой степенью кристалличности и значительным образованием текстуры. Таким образом, пики [020] и [110] характеризуются увеличенными значениями относительной интенсивности 28 и 30 по отношению к пику 100 [010]. В то же время образец Земли с значениями этих пиков 17 и 16 был близким к теоретическим (15 и 13, соответственно). Кроме того, для образцов МКС пики [260] и [2–41] демонстрировали уменьшенную интенсивность – 14 и 15 по сравнению с 33 и 32, представленными на карте ICDD 026-1056. Дополнительно было зафиксировано «галло» в диапазоне от 12 до 22° 2 $\Theta$ , связанное с особым характером текстуры образования кристаллов ОКФ образцов МКС. Таким образом, условия микрогравитации привели к более высокой степени трансформации, связанной с активным свободным движением под влиянием магнитных сил в буферных растворах начальных частиц  $\alpha$ -ТКФ и ДКФД, но повлияли на формирование роста кристаллов с получением ясно текстурированных материалов.

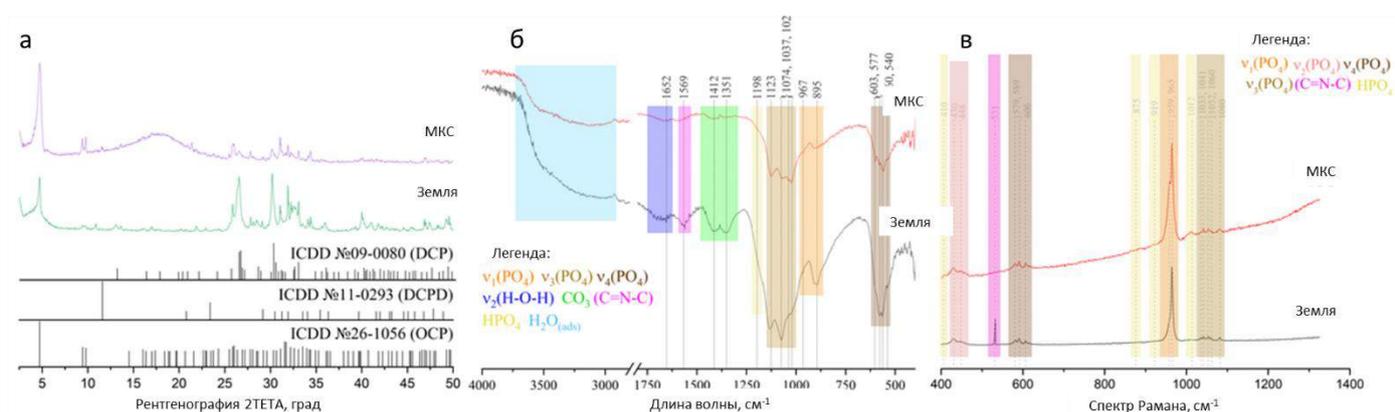


Рисунок 5.2.5 –Формирование фаз согласно спектрам рентгенографии (а), ИК-Фурье (б) и спектроскопии Рамана (в).

Специфический процесс кристаллизации основных фаз образцов МКС подтвержден результатами ИК-Фурье (рисунок 5.2.5 б). Спектры характеризуются в два раза меньшей интенсивностью всех пиков в случае образцов МКС по

сравнению с земными. Широкая полоса в диапазоне 3000 – 3700  $\text{см}^{-1}$  присвоена как Н-О-Н кристаллическая вода [197]. Группы ОКФ  $\text{HPO}_4^{3-}$  представлены режимом изгиба Р-ОН, наблюдаемым на 1198  $\text{см}^{-1}$ , и режимом растяжения Р-ОН на 914 и 876  $\text{см}^{-1}$ . Изгиб Р-ОН на 1296  $\text{см}^{-1}$ , характерный для ОКФ, не обнаруживался [198]. Это может быть связано с искаженным образованием кристаллов в условиях МКС. Р-О в группах  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  записаны на 1123, 1074, 1024, 967, 611, 578, 560 и 536  $\text{см}^{-1}$ . Полосы в диапазоне между 1540 и 1400  $\text{см}^{-1}$  присвоены как атмосферный  $\text{CO}_3^-$  [199,200].

Земные образцы характеризовались отсутствием режима изгиба Р-ОН на 1198  $\text{см}^{-1}$  и исчезновением пиков Р-О на 1123, 967 и 611  $\text{см}^{-1}$ , что указывает на более низкую степень образования ОКФ. В то же время растяжение О-Н воды приблизительно на 3544, 3491, 3290 и 3163  $\text{см}^{-1}$ , соответствующее ДКФД, не было зарегистрировано, указывая преимущественно на сохранение ДСПА в материалах [201]. Пик на 1569  $\text{см}^{-1}$  может быть связан с  $\text{C}=\text{N}$  глутаминовой кислотой. Следует отметить, что в образцах МКС аналогичный пик не обнаруживался, что может быть связано с меньшей способностью к поглощению образованных кристаллов или более сложными процессами взаимодействия глутаминовой кислоты с  $\alpha$ -ТКФ [202].

Спектры Рамана образцов Земли и МКС представлены на рисунке 5.2.5 в. Спектры демонстрируют наличие групп  $\text{PO}_4^{3-}$  для обоих материалов на 959  $\text{см}^{-1}$ , присвоенных как режим симметричного растяжения ( $\nu_1$ ), двойной ( $\nu_2$ ) и тройной ( $\nu_4$ ) вырожденные режимы изгиба (связь О – Р-О) были наблюдаемы на 430 и 448  $\text{см}^{-1}$  и в области от 579 до 606  $\text{см}^{-1}$  [203]. Область 1033–1060  $\text{см}^{-1}$  и пик на 1080  $\text{см}^{-1}$  приписаны растяжению РО [204]. Кроме того, для образцов МКС сильная полоса на 1012  $\text{см}^{-1}$ , слабые полосы на 875 и 919  $\text{см}^{-1}$  и плечо на 410  $\text{см}^{-1}$  на полосе  $\nu_2$   $\text{PO}_4^{3-}$  присвоены вибрационным режимам  $\text{HPO}_4^{2-}$  ОКФ [205]. Спектры образцов Земли характеризуются значительным уменьшением полос  $\text{HPO}_4^{2-}$ . В то же время был замечен сильный пик на 531  $\text{см}^{-1}$ , присвоенный вибрационным полосам NH [206], связанным с остаточной кислотой глюкозамина, подтверждающим результаты ИК-Фурье.

Согласно результатам СЭМ, начальные частицы  $\alpha$ -ТКФ, используемые для преобразования в магнитном поле, показаны на рисунке 5.2.6. Данные СЭМ показали, что полученные после двухстадийного преобразования ТКМ как на Земле, так и на МКС, характеризуются размером около 5 мм. Материалы для костного трансплантата того же размера применяются в хирургии и стоматологии на сегодняшний день [207]. Земные образцы были сформированы в виде конгломерированных сферических кластеров с неровными поверхностями, сформированными фасетированными пластинчатыми частицами размером до 2 мкм и толщиной около 100 нм. Образцы МКС характеризовались глобулярными структурами в виде хризантемы. Наблюдаемая структура хризантемы сформирована петалообразными тонкими кристаллами с толщиной в два-три раза меньше, чем у земных частиц, и с зазубренными краями. Материалы характеризуются очень равномерным ростом кристаллов практически без пересечений и образованием розеток из частиц, благодаря конгенерной нагрузке микрогравитации и магнитных сил. Образование так называемых сферолитов, похожих на морского ежа, было зафиксировано для ГА и кристаллов ОКФ, полученных в условиях космоса во время экспериментов «Eureca Solution Growth Facility» [208]. Образование ОКФ дополнительно к ГА происходило только в условиях космоса, и были зафиксированы хорошо кристаллизованные узкие и тонкие лезвия ОКФ, обычно около 0,1 мм длиной частиц, которые образовали сферолиты [209]. Образование ОКФ объяснялось более низкой пересыщенностью и скоростью нуклеации в условиях космоса и оценивалось как более быстрая кинетика роста ОКФ по сравнению с ГА. Аналогичная тенденция однородного роста кристаллов в условиях микрогравитации была показана ранее [210].

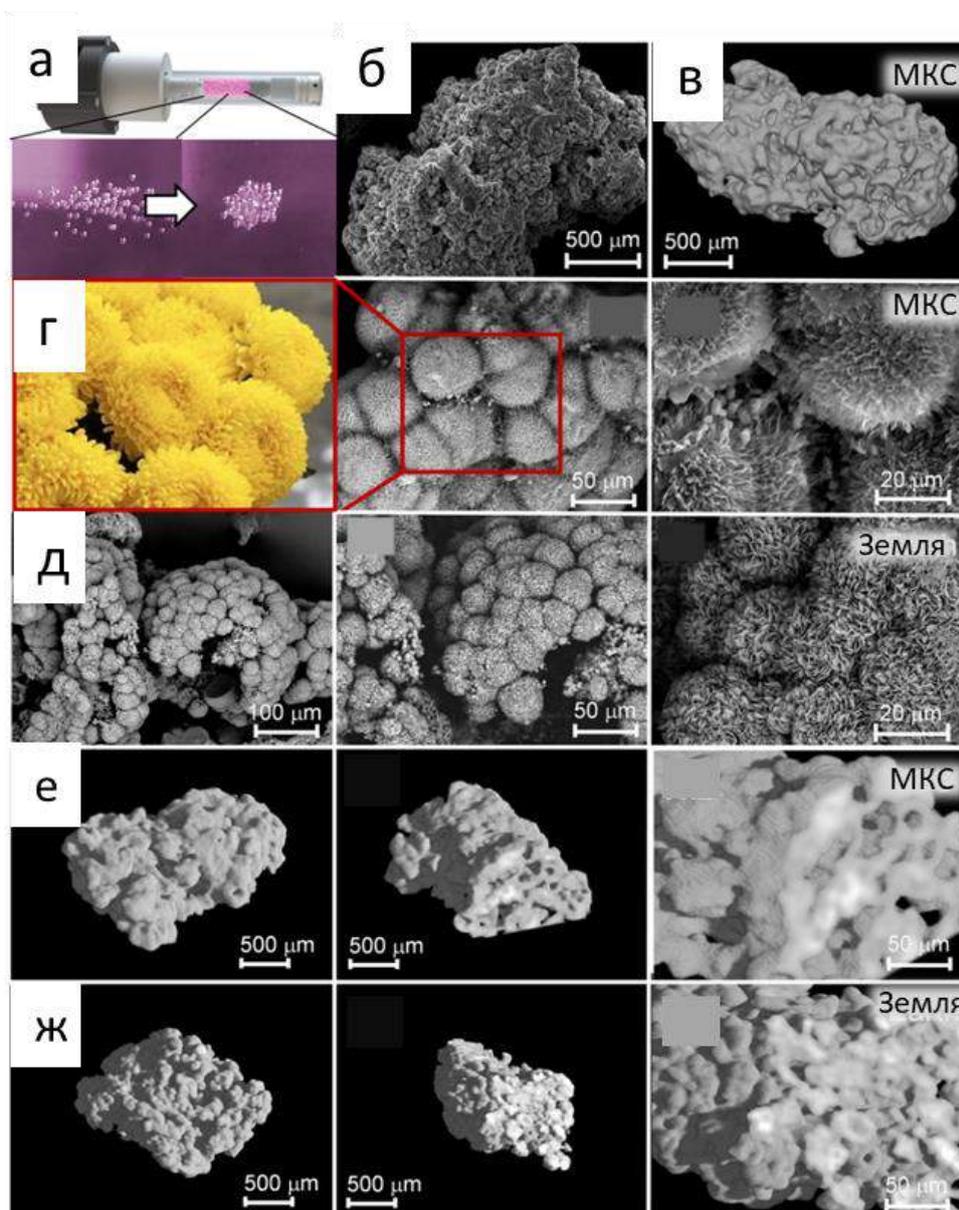


Рисунок 5.2.6 – Рекристаллизация ФК: а) - процесс формирования ТКМ (при концентрациях гадовиста 0,1875 и 0,375 Моль), микроструктура и изображения микрокомпьютерной томографии ТКМ; б,в)- образование структур, похожих на хризантему, на MKS (г), конгломерированные сферические кластеры, образованные гранеными пластинчатыми частицами с Земли (д), визуализация микро-КТ образцов MKS (е) и Земли (ж)

Образование кристаллов ОКФ на поверхности ДКФД было описано ранее, и образование тонких лезвий до 250 мкм [49,211], а также образование пластинчатых кристаллов при гидролизе ДКФД в течение 3 месяцев [212]. Структуры, образованные пластинчатой морфологией ОКФ, зафиксированы для материалов, полученных прямым методом осаждения [213]. Также была отмечена кристаллизация в условиях микрогравитации космоса [208,214] длинных, узких и

толстых лезвий ОКФ, которые образовали сферолиты. Но ОКФ был минорной фазой, и кристаллизация происходила в растворах без субстрата. Образование в виде цветка хризантемы на начальных частицах субстрата ТКФ – ДКФД было зафиксировано для ОКФ впервые и было достигнуто, благодаря сочетанию условий микрогравитации и магнитных сил.

Данные подтверждены результатами просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ВТЭМ), которые показаны на рисунке 5.2.7. Таким образом, образцы МКС характеризовались образованием кристаллов с очень малой толщиной, подтвержденной наблюдением пузырьковых дефектов после облучения электронным пучком на изображениях ВТЭМ. Эти пузырьковые дефекты были ранее представлены для исследований ВТЭМ синтетических крошечных хлопьевидных монокристаллов ОКФ с толщиной всего несколько десятков нанометров, полученных в Национальном институте стандартов и технологий США, и их появление связано с преобразованием ОКФ в структуру ГА. В то же время подобные дефекты наблюдались на изображениях образцов на Земле, потому что кристаллы были толще. Кристаллы, полученные на МКС, характеризуются размером 100–500 нм. В то же время изображения образцов на Земле продемонстрировали наличие двух фаз – ламеллоподобных и иглоподобных. Данные ВТЭМ указывали, что эта зона соответствует сосуществованию обоих поликристаллов ОКФ [215] и фаз монофосфата кальция  $(\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O})$  в земном образце. Исследование образцов МКС продемонстрировало образование довольно идеального поликристалла ОКФ (область 1) и однокристалльных точечных дифрактограмм (область 2), без каких-либо дополнительных фаз, что подтвердило улучшенную стадию преобразования образца. Была оценена ось зоны  $[-1 \ -1 \ 0]$  ОКФ, и были представлены векторы 001, -111, -110 и  $-11-1$ . Экспериментальные ячейки построены в приложении «CellViewer», и их сходство с теоретическими свидетельствовало о формировании оцененных фаз ОКФ в случае образцов МКС и обоих ОКФ и  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$  для земного образца.

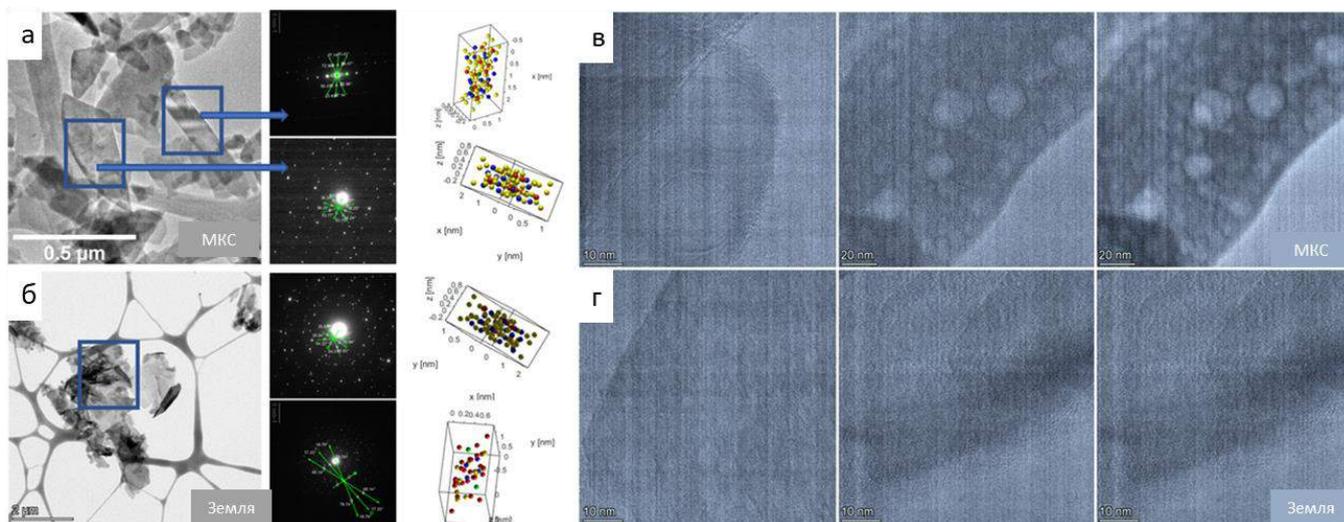


Рисунок 5.2.7 – Формирование ОКФ на МКС (а) и на Земле (б) согласно данным ВТЭМ, изображения ВТЭМ кристаллов подтвердили образование пузырьковых дефектов в образцах МКС (в,г)

Возможность разработки монокристаллов ДКФД в условиях космоса была отмечена ранее [216]. В исследовании наблюдалось образование термически нестабильного и высокорастворимого ОКФ с идеальной структурой.

Исследования с помощью микро-КТ показали образование консолидированных пористых ТКМ размером до 5 мм. Микропористость ТКМ образовалась за счет взаимосвязанных каналов, унаследованных от первоначальных пор  $\alpha$ -ТКФ [217], модифицированных превращением в ДКФД и ОКФ с диаметрами в диапазоне 20–100 мкм. Макропоры размером до 500 мкм наблюдались на всем пространстве каркаса и были результатом формирования в условиях магнитной левитации.

Данные электронного параметрического резонанса демонстрируют наличие гадолиния в полученных образцах МКС и Земли. Данные представлены на рисунке 5.2.8. В номинально чистых образцах ОКФ нет параметрических центров, поэтому сигнал ЭПР в материалах не может быть обнаружен [218]. Ион редкоземельного элемента гадолиния  $Gd^{3+}$  с электронной конфигурацией 4f<sup>7</sup> (основное состояние -  $8S_{7/2}$ ) является параметрическим и имеет электронный спин  $S = 7/2$  с нулевым орбитальным моментом  $L = 0$ . Ионы  $Gd^{2+}$  не наблюдаются в спектрах ЭПР, поэтому линии поглощения на рисунке 5.2.8 следует отнести к центру примеси  $Gd^{3+}$ .

Соответствующий спектр содержит  $2 \cdot S = 7$  спиновых переходов с центром гравитации спектра при  $g \approx 2,001$ , поскольку орбитальный магнитный момент отсутствует [219]. Воздействие градиента электрического кристаллического поля на ион  $Gd^{3+}$  приводит к образованию тонкой структуры, положения линий которой зависят от угловой ориентации нанокристалла ОКФ. Спектр электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) порошка содержит вклады от всех равновероятных положений нанокристалла относительно внешнего магнитного поля  $B_0$ , что приводит к неоднородному уширению каждой линии поглощения.

Подход ЭПР высокой частоты ( $W$  - диапазон,  $\nu = 94$  ГГц) позволяет, во-первых, проводить эксперименты на нескольких частицах образца благодаря повышенной чувствительности экспериментальной установки и уменьшению эффектов уширения порошка. Во-вторых, высокое спектроскопическое разрешение позволяет идентифицировать различные параметрические частицы с приближенно близкими  $g$ -факторами [220]. На рисунке показано, что ширина линии для образца Земли и одного, синтезированного на МКС, различается, где  $\Delta B_{\text{МКС}} > \Delta B_{\text{Земля}}$  в 15 раз, где степень уширения определяется распределением параметров нулевого поля. Можно предположить, что образцы, полученные в условиях МКС, имеют более высокий порядок (степень кристалличности). Значения действия кристаллического поля на  $Gd^{3+}$  увеличиваются, и линии становятся шире. Проявление эффектов разделения на нулевом поле указывает на локализацию иона  $Gd^{3+}$  в кристаллической решетке образца [221]. На рисунке 5.2.8 б показано дополнительное положительное влияние магнитного поля на рост нанокристалла ОКФ. Узкие линии ЭПР и наличие их слабой угловой зависимости при  $\alpha = 0^\circ$  ( $\alpha$  - угол между кристаллографической осью  $c$  и направлением  $B_0$ ) и  $20^\circ$  указывают на образование упорядоченных частиц, подобных объемным, с более высокой кристалличностью. Образец Земли не зависит от вращения образца в гониометре, указывая на беспорядочную порошкообразную структуру материалов. Таким образом, отсутствие гравитационного поля при наличии магнитного поля оказывает благоприятное влияние на качество синтезированных образцов. Чувствительность спектрометра позволяет наблюдать сигнал от ионов гадолиния с

достаточно низкой концентрацией и оценивает количество спинов  $\approx 1014$ . Сравнивая интегральную интенсивность спектра ЭПР с эталонным образцом, можно оценить массовую концентрацию  $Gd^{3+}$  как  $x < 0,001$ .

Проведено исследование методом электронно-ядерного двойного резонанса (ЭЯДР), спектр которого показан на рисунке 5.2.8 г.

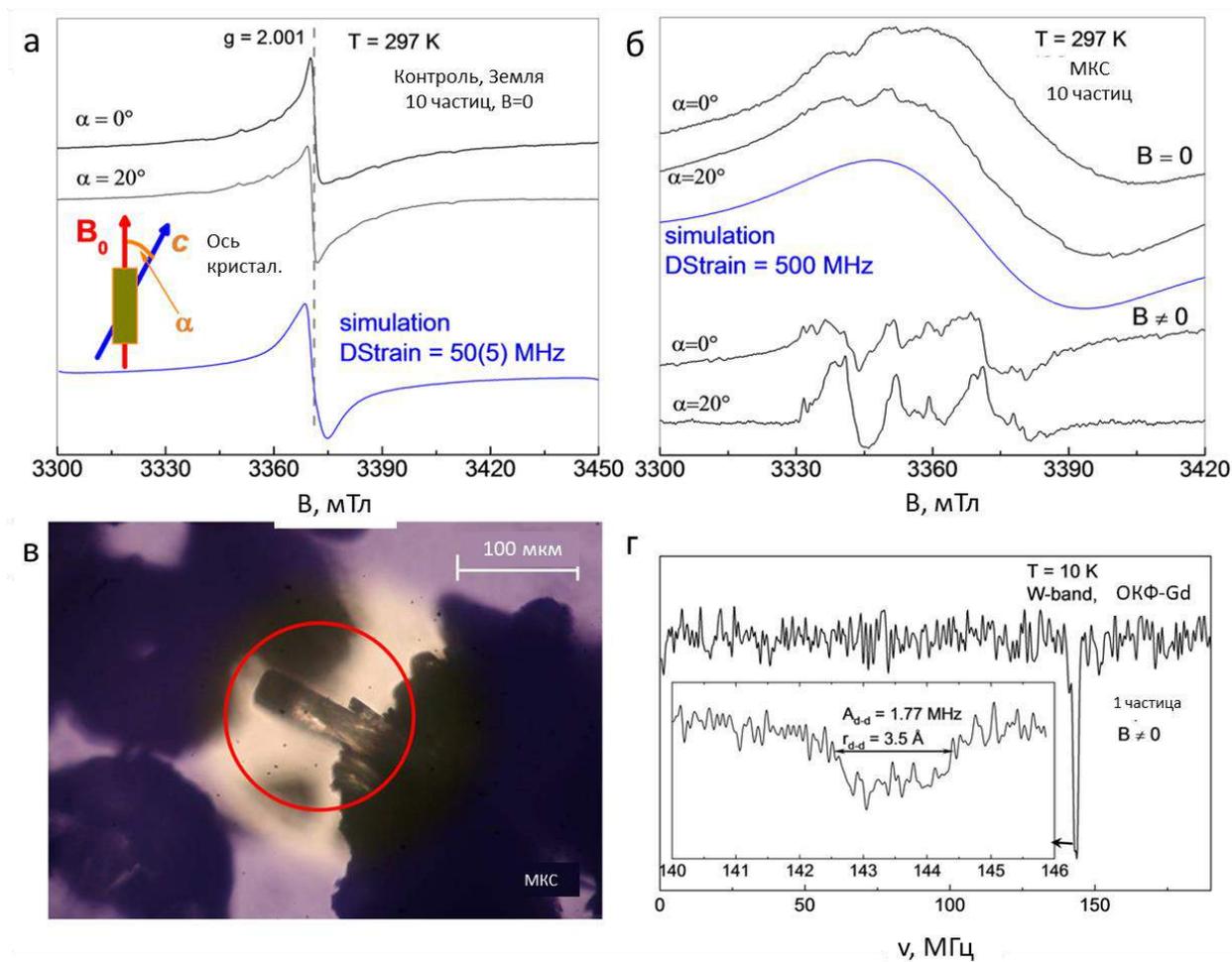


Рисунок 5.2.8 – Спектры электронно-параметрического резонанса образцов ОКФ-Gd с демонстрацией угловой зависимости, синтезированные в (а) нормальных условиях Земли и (б) на МКС; в) однокристаллические частицы образца МКС под действием магнитного поля (красный круг), спектр электронно-ядерного двойного резонанса для окружающих ядер водорода образца ОКФ-Gd, синтезированного на МКС (г).

Благодаря водороду в кристаллической решетке ОКФ можно регистрировать гипертонкое (электронно-ядерное) взаимодействие между примесными центрами и окружающими лигандами [222]. Исходя из предположения об анизотропном диполь-дипольном взаимодействии со значением гипертонкой постоянной  $A_{d-d} = 1,77$  МГц, можно рассчитать расстояние  $Gd^{3+} - {}^1H$   $r_{d-d} = 3,5 \text{ \AA}$ , что является средним

межмолекулярным расстоянием. Следовательно, наличие в спектрах ЭПР тонкой структуры (нулевого поля) и сигнала ЭЯДР от окружающих ион гадолиния водородов однозначно устанавливает наличие  $Gd^{3+}$  в кристаллической структуре.

Из результатов ЭПР и ЭЯДР следует, что ионы гадолиния с низкой концентрацией имеют валентность  $3+$ , с локализацией в кристаллической решетке образца ОКФ, а не на узлах или поверхности. Отсутствие гравитационных сил и наличие магнитного поля во время синтеза приводит к улучшению качества материала с увеличением степени кристалличности, создавая специально направленную ориентацию для роста частиц с значительным формированием текстуры на поверхности.

Образцы МКС были возвращены на Землю и исследовались *in vivo* в сравнении с земными образцами (рисунок 5.2.9). Через 4 недели после имплантации образцов МКС и Земли, гистологические исследования показали образование хорошо сосудистой соединительной ткани с иммунизированными костными трансплантатами в области дефекта. На границе частиц и соединительной ткани визуализируются клетки чужеродных тел. Земной образец показал ту же картину через 12 недель, но внутри некоторых частиц отмечается новообразованная костная ткань. Зона дефекта образцов МКС была заполнена сосудистой соединительной тканью с встроенными в нее частицами. Вокруг отдельных частиц находятся ободки новообразованной костной ткани. В пространстве отдельных частиц находятся новообразованная костная ткань. Наиболее значительное различие было замечено через 5 месяцев после имплантации. Для земных образцов ТКМ количество новообразованной костной ткани немного увеличивается: островки костной ткани внутри частиц, тонкие ободки костной ткани вокруг частиц и небольшие участки новообразованной костной ткани между частицами в соединительной ткани наблюдались (рисунок 5.2.9 в). Для образцов МКС уже более половины частиц ОКФ окружены широкими ободками костной ткани (рисунок 5.2.9 д). Результаты патогистологического исследования области костного дефекта также подтверждаются данными микро-КТ, выполненными через 4, 12 и 20 недель эксперимента (рисунок 5.2.9 в,г). Таким

образом, остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства костных трансплантатов значительно улучшились, когда образцы формировались в условиях микрогравитации на МКС.

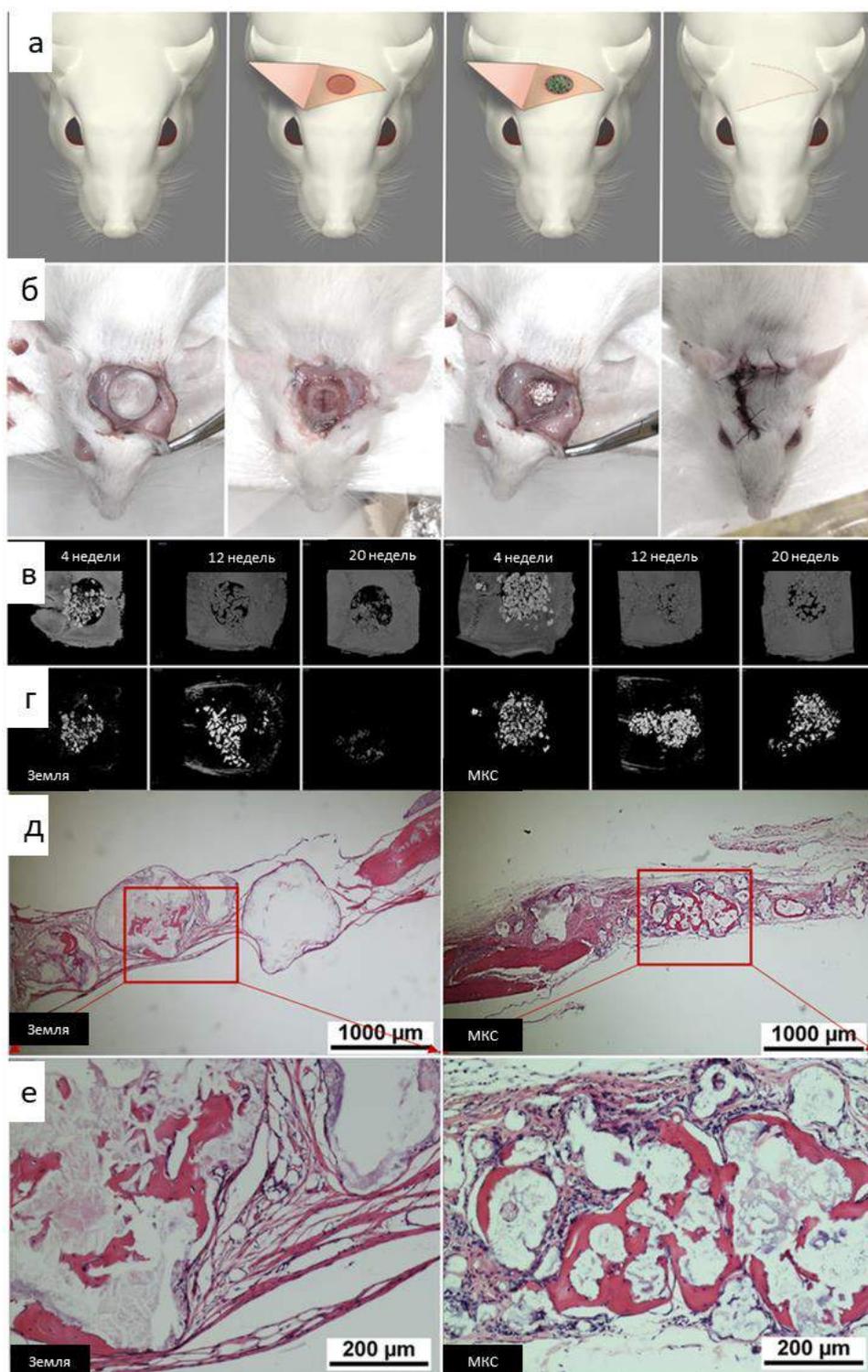


Рисунок 5.2.9 – Схема создания дефекта теменной кости черепа крысы (а), замена костного дефекта образцами МКС и Земли (б), изображения микро-КТ зоны дефекта с имплантационным материалом (20 недель после операции) (в,г), патогистологическое исследование зоны дефекта с имплантационным материалом (20 недель после операции) (д,е).

В исследованиях продемонстрировано влияние условий микрогравитации на быстрое формирование каркасов ОКФ. Был разработан оригинальный состав буферного раствора, включающий низкоконцентрированный гадоутрол и глутаминовую кислоту, и проведено сравнение образцов Космоса и Земли. Условия микрогравитации привели к образованию впервые наблюдаемой хризантемоподобной микроструктуры ОКФ с исчезающе низкой концентрацией гадолиния, полученные кристаллы были весьма совершенны, а также согласно рентгенографии, была оценена текстурная структура. Ранее образование ОКФ как малой фазы в условиях космоса наблюдалось вместе с образованием ГА во время 5-месячных процессов осаждения, и была продемонстрирована возможность высококристаллической структуры. В данном исследовании специально созданы условия, оптимальные для кристаллизации ОКФ, что дало возможность получить материал за очень короткое время - 48 ч. Комбинация микрогравитации и магнитных сил привела к получению ТКМ с прогнозируемыми геометрическими свойствами, фазовым составом и однородной структурой. Микро- и макропористость ТКМ обеспечивала адсорбцию клеток на поверхности каркаса.

#### **5.2.1.2 Формирование в неоднородном магнитном поле трехмерных бактериальных конгломератов**

Помимо исследований на цитотоксичность и остеогенные свойства ТКМ в рамках доклинических испытаний важно проводить исследования на антибактериальную восприимчивость микроорганизмов на ТКМ. Это вызвано тем, что инфекции в области хирургического вмешательства продолжают оставаться потенциально опасными для жизни осложнениями.

Образование и распространение биопленок в организме приводит к развитию патологического процесса, что негативно сказывается на процессе восстановления

поврежденных тканей. В связи с этим исследования на антибактериальную восприимчивость микроорганизмов на ТКМ имеют особое значение.

Общеизвестно, что бактерии существуют в двух состояниях: единичные плавающие планктонные клетки и связанные с поверхностью клеточные агрегаты, известные как биопленки [223]. Биопленки представляют собой связанные с поверхностью трехмерные многослойные структуры, образованные бактериями или другими микроорганизмами (такими как археи (архебактерии), грибы, микроводоросли, простейшие) или их консорциумами и самопродуцируемой матрицей, состоящей из экзополисахаридов, белков, внеклеточной ДНК и липидов [224,225]. Обычно биопленки описываются как структуры, образованные на твердой поверхности и реже – на поверхности жидкости [226]. Это биопленки, связанные с твердой поверхностью, которые лучше всего изучены с использованием нескольких моделей *in vitro*. Наиболее популярными моделями биопленок являются системы микротитровальных планшетов и ферментеры с постоянным потоком [227]. Эти модели сыграли ключевую роль в понимании основных этапов роста и созревания биопленок и механизмов, которые ими управляют. Большинство исследований, в которых установлена исключительная роль биопленок в защите бактерий от антибиотиков и других вредных внешних воздействий, проводились с использованием *in vitro* моделей биопленок, связанных с поверхностью [228]. Образование биопленки усиливает устойчивость бактерий к антибиотикам в сотни раз по сравнению с одноклеточными планктонными бактериями [229]. Механизмы защиты, обеспечиваемые биопленками, включают ограниченную диффузию некоторых антибиотиков через матрицу, накопление антибиотико-модифицирующих ферментов в матрице, и дифференциальный метаболический статус микробной популяции, включая наличие в популяции так называемых голодных бактерий, генерирующих строгий ответ, обеспечивающий выживание бактериальных клеток в неблагоприятных условиях за счет экономии ресурсов, а также наличие метаболически инертных клеток, известных как персисторы [230].

Биопленки, образованные патогенными микроорганизмами, особенно бактериями, играют важную роль в клинической патологии. Помимо известной роли в развитии внутрибольничных инфекций, связанных с формированием биопленок на медицинских устройствах, имплантатах, катетерах и др., биопленки участвуют в развитии хронических инфекций [231]. Биопленки, образованные бактериальными патогенами, являются доказанным фактором развития хронического бронхита, отита и риносинусита [232]. Бактерии в биопленках защищены от гуморального и клеточного иммунного ответа, поскольку диффузия растворимых факторов ограничена матрицей, а иммунные клетки не способны прорываться через биопленки [233].

Между тем, разработка методов микроскопии позволила проводить анализ биопленок *in vivo* в образцах тканей. Во многих случаях было показано, что связанные с хроническими заболеваниями биопленки не связаны с поверхностями тканей человека, а скорее левитируют в физиологических жидкостях [234]. Это различие указывает на ограничения существующих *in vitro* моделей биопленок [235]. Несмотря на то, что морфологические особенности биопленок, сформированных на абиотических поверхностях и *in vivo*, оказались сходными, механизмы, лежащие в основе образования прикрепленных к поверхности биопленок и неприкрепленных биопленкоподобных агрегатов, и особенно начальных стадий этих процессов, могут, если не отличаться, то иметь иной характер. Важность исследований неприкрепленных биопленкообразных агрегатов еще более возросла с описанием агрегатов, образующихся бактериями, выращенными в условиях микрогравитации [236].

Поскольку модели *in vitro* поверхностно прикрепленных биопленок не всегда полно и точно моделируют процессы, происходящие в формируемых микроорганизмами биопленках в реальных условиях, для исследователей, работающих в области микробиологии и связанных с ней областях, весьма актуальным является создание моделей биопленок, максимально приближенных к реальным.

Отсутствие внешней опорной поверхности в совокупности формирования является важным отличием, что указывает на ограниченность существующих в пробирке моделей биопленки (обзор Роберта с соавторами [235]). Другой особенностью клинически значимых бактериальных агрегатов является отсутствие напряжения сдвига в тканях хозяина [229,237–242]. Для изучения свойств неприсоединенных агрегатов в последние несколько лет появилось все больше моделей *in vitro*. Мониторинг бактериальной агрегации в невстряхиваемых культурах в высоковязкой среде, внутри агаровых блоков или в присутствии физиологических продемонстрировал, что неприсоединенные агрегаты имеют некоторые важные характеристики с поверхностно прикрепленными биопленками, включая присутствие внеклеточного матрикса, необходимость размножения бактерий, и повышенная устойчивость к противомикробным препаратам [243–246]. С другой стороны, такие особенности, как потребность в подвижности бактерий, состав матрикса и механизмы регуляции, могут отличаться между неприсоединенными агрегатами и классическими биопленками [234,247,248]. Основным ограничением для моделей неприсоединенных агрегатов *in vitro* является осаждение агрегатов под действием силы тяжести даже в высоковязких средах, что ограничивает время наблюдения.

Альтернативный подход, который обеспечивает образование неприсоединенных неосаждающихся бактериальных агрегатов в условиях магнитной левитации, является актуальным направлением. Магнитная левитация широко используется в промышленности и исследованиях для создания условий, при которых объект подвешивается без какой-либо поддержки, кроме магнитных полей, противодействующих гравитации [249]. Для достижения эффекта обычно используется комбинация постоянных магнитов и диамагнетиков или сверхпроводников. В биологии магнитная левитация используется в микрофлюидных исследованиях для разработки систем сбора и анализа клеток [101,250,251]. Применение системы магнитной левитации для изучения неприсоединенных агрегатов, образованных тремя штаммами *Escherichia coli*, может позволить проводить исследования не прикрепленных к поверхности,

поверхностно-независимых бактериальных агрегатов для поиска оптимальной терапии антибиотико резистивных бактериальных пленок.

Ранее был описан целый ряд моделей *in vitro*, обеспечивающих левитацию бактерий. Так, для создания условий диамагнитной левитации использовался сверхпроводящий магнит, который генерировал высокоградиентное сильное магнитное поле (17 Тл) [252]. В указанных условиях наблюдался повышенный рост бактерий, однако образования агрегатов не наблюдалось.

В статье [253] описано моделирование поведения *P. aeruginosa* в альвеолах пациентов с муковисцидозом (МВ) - наследственным заболеванием, вызванным мутациями, вызывающими дефицит секреции хлорида с последующим накоплением густой застойной слизи в альвеолах легких. В данной работе патогены выращены в высоковязкой синтетической слизистой среде ASM, включающей муцин и внеклеточную ДНК. Бактерии *P. aeruginosa*, выращенные в этих условиях, образовывали стабильные неприкрепленные к поверхности полистирола или стекла биопленкоподобные структуры, имитирующие структуры, наблюдаемые в условиях *in vivo*, однако при этом микроорганизмы росли в плотных микроколониях, прикрепленных к компонентам мокроты. Полученные таким образом биопленкоподобные структуры являются примером двумерных биопленок, тестирование антибиотиков с помощью которых показывает завышенную эффективность, не подтверждаемую в дальнейшем при проведении клинических исследований.

Сосуд с вращающейся стенкой («Rotating Wall Vessel»), разработанный в Космическом Центре Джонсона (Хьюстон, Техас), который является наиболее популярной моделью микрогравитации на Земле, обеспечивает образование неприкрепленных бактериальных агрегатов в условиях постоянного вращения [254]. Однако, «Rotating Wall Vessel» не может обеспечить образование стабильных трехмерных биопленкоподобных агрегатов микроорганизмов по причине турбулентности и гемодинамического напряжения, возникающих вследствие постоянного перемещения жидкости в сосуде. В биологии магнитная левитация

используется в микрофлюидных исследованиях для разработки систем сбора и анализа клеток [250].

### Формирование левитирующих трехмерных бактериальных конгломератов

Разработан подход, основанный на росте бактерий в условиях магнитной левитации. Магнитная левитация достигается путем помещения растущей бактериальной культуры в «магнитную ловушку». Эффект улавливания основан на дифференциальных магнитных свойствах клеток, которые являются диамагнитными, и содержащей гадолиний среды, которая является парамагнитной, в неоднородном магнитном поле. Далее приведено подробное описание методики, которая позволяет получить *in vitro* биопленкоподобные агрегаты микроорганизмов, не связанные с субстратом, а также продемонстрировано, что такие агрегаты обладают основными характеристиками, присущими биопленкам.

Используя эту систему, достигается формирование левитирующих агрегатов микроорганизмов. Эти агрегаты имеют признаки, характерные для бактериальных биопленок. Тем не менее, было продемонстрировано важное различие в механизмах, лежащих в основе образования биопленок на примере *E. coli* и биопленкоподобных агрегатов.

Поскольку формирование биопленкоподобных агрегатов запускает процессы синтеза и накопления внеклеточного матрикса, это стабилизирует трехмерную структуру, и постепенно обеспечивая высокую стабильность и жизнеспособность трехмерных бактериальных конгломератов (ТБК).

Методика применима для создания, не связанных с поверхностью агрегатов микроорганизмов, таких как грамотрицательные, и грамположительные бактерии, простейшие, грибы, микроводоросли и их консорциумы, и могут быть использованы при проведении исследований независимых от поверхности (т.е. неприкрепленных к субстрату) биопленок, для тестирования и разработки лекарственных средств против хронических и не поддающихся лечению инфекций, при разработке антисептических препаратов и/или растворов в целях обработки

различных поверхностей, а также для других применений, в которых требуется модель биопленок или неприкрепленных биопленкоподобных агрегатов. Результаты тестов антибиотиков и других противомикробных средств и препаратов на таких культурах намного ближе к ситуации *in vivo* по сравнению с двумерными прикрепленными биопленками, которые во многих случаях показывают слишком высокий эффект, который потом не подтверждается при клинических исследованиях.

Процесс получения биопленкоподобных агрегатов микроорганизмов, не связанных с субстратом, включает в себя следующие основные этапы:

- культуру микроорганизмов помещают в парамагнитную среду, представляющую собой среду для культивирования микроорганизмов, содержащую парамагнетик;

- культуру помещают в центральную область неоднородного магнитного поля, обеспечивая условия магнитной левитации; другие условия культивирования (состав питательной среды, температура, давление, атмосфера культивирования и др.) выбирают в зависимости от вида и штамма микроорганизмов или их консорциумов так, чтобы обеспечить оптимальные параметры культивирования для роста и размножения культур в зависимости от поставленных целей; длительность культивирования зависит от штамма, конечной цели эксперимента и может составлять от нескольких часов до суток, недель и более.

Исследуемые бактерии образовывали ТБК, левитирующие в жидкости (рисунок 5.2.10). Геометрические параметры шариков были различными в зависимости от штамма (рисунок 5.5.10 б). Среди 3-х штаммов *E. coli* шарик, образованный лабораторным штаммом JM109, был значительно больше шариков, образованных патогенным штаммом ATCC 43890 и пробиотическим штаммом M17 ( $p < 0,05$ ). *E. coli* ATCC 43890, и *S. aureus* образовали шарики удлиненной формы, в то время как *E. coli* M-17 и, в особенности, *L. monocytogenes* образовали более круглые шарики.

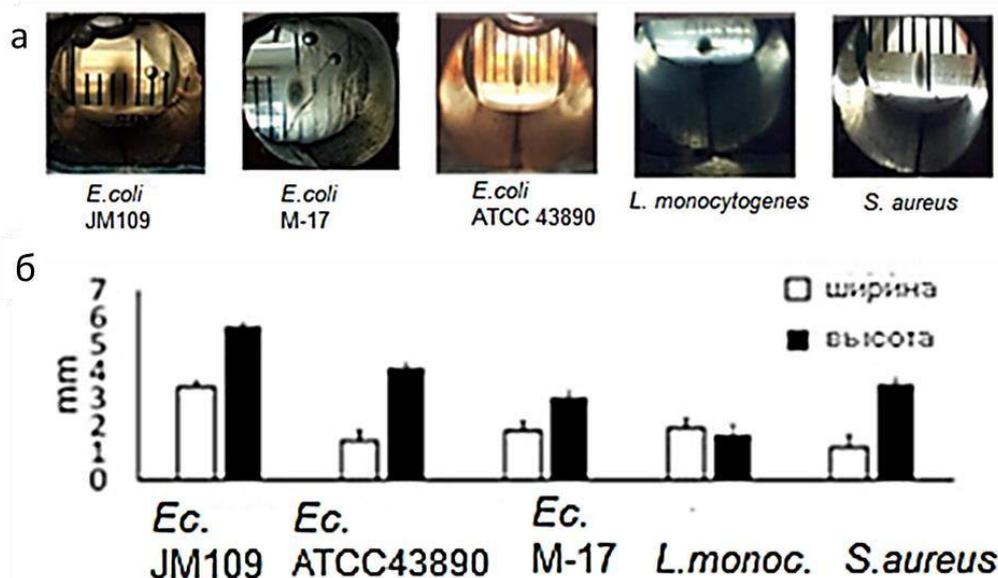


Рисунок 5.2.10 – Культуры бактерий выращивали в условиях магнитной левитации. Бактерий разводили в соотношении 1:100 0,2 Моль парамагнитной питательной средой инкубировали в биопринтере при 37 °С в течение 24 ч: а) изображения маленьких шариков, образованных различными штаммами бактерий внутри биопринтера, полученные через глазок биопринтера; б) высота и ширина шариков. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) в трех экспериментах [255]

Для анализа жизнеспособности бактерий в присутствии гадобутрола оценивали концентрации *E. coli* ATCC 43890, выращенных в различных условиях. Исходный посев показал концентрации  $2,3 \times 10^9$ ,  $2,1 \times 10^9$  и  $1,9 \times 10^8$  КОЕ/мл для свежей ночной культуры, выращенной на бульоне LB на протяжении ночи (1), для культуры, выращенной на бульоне LB на протяжении ночи, и далее инкубированной с 0,2 Моль гадобутролом в биопринтере в течение еще 24 ч (2), и для культуры, выращенной в условиях магнитной левитации в парамагнитной питательной среде (3), соответственно (рисунок 5.2.11 а).

Полученные результаты продемонстрировали, что после инкубации с 0,2 Моль гадобутролом бактерии выживали без потери жизнеспособности. Более того, результаты показали, что бактерии размножились в парамагнитной питательной среде, что было видно по увеличению концентрации в процессе культивирования: начальная концентрация бактерий, разведенных в свежей парамагнитной питательной среде, составляла  $2,3 \times 10^7$  КОЕ/мл (1/100 от свежей ночной культуры), в то время как конечная концентрация составляла  $1,9 \times 10^8$  КОЕ/мл.

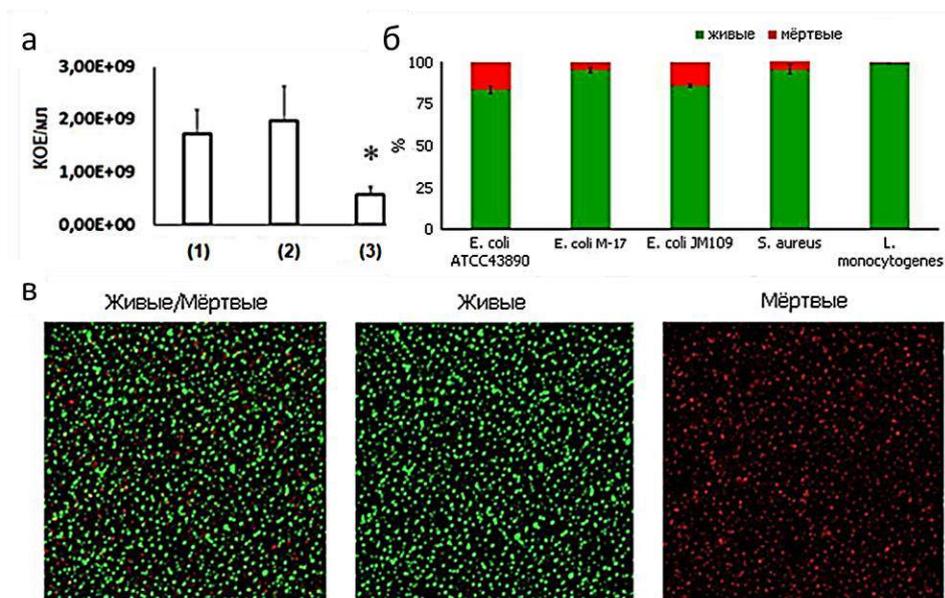


Рисунок 5.2.11 – Жизнеспособность бактерий, выращенных в «магнитной ловушке»: а) (1) Культура бактерий *E. coli* ATCC 43890, выращенных на бульоне LB (2) культура бактерий, выращенных на бульоне LB и затем инкубированных с добавлением 0,2 Моль гадобутрола в магнитном биопринтере в течение 24 ч и (3) культура бактерий, выращенных в парамагнитной питательной среде, содержащей 0,2 Моль гадобутрола, в магнитном биопринтере в течение 24 ч; бактерии высевали в десятичных разведениях; на диаграмме показаны концентрации, рассчитанные по трем независимым экспериментам; б) относительное количество живых (зеленый) и мертвых (красный) бактерий в культурах, выращенных в «магнитной ловушке» в течение 24 ч; в) пример микрофотографий бактерий *E. coli* ATCC 43890, использованных для автоматического подсчета клеток. Данные представляют собой среднее значение ( $\pm$  SD), рассчитанное по 10 фотографиям, сделанным в трех независимых экспериментах [255]

Анализ бактериального посева показал, что маленькие шарики, образованные *E. coli* ATCC 43890, выращенные в магнитном биопринтере, содержали, по меньшей мере, в 10 раз меньше колониеобразующих единиц, чем ночная культура, выращенная в стандартных условиях на мешалке (рисунок 5.2.11 а). Это различие может быть вызвано ограниченным ростом в «магнитной ловушке» или гибелью части популяции бактерий в условиях магнитной левитации. Чтобы выявить мертвые клетки, к бактериальным шарикам, образованным *E. coli* ATC43890 и другими штаммами в условиях магнитной левитации, было применено дифференциальное окрашивание (методика Live/Dead Assay) (рисунок 5.2.11 б). Приблизительно 16% бактерий ATCC 43890 были мертвыми. Мертвые клетки были обнаружены в шариках, образованных всеми штаммами, хотя процент мертвых клеток различался для разных штаммов (рисунок 5.2.11 в). *L. monocytogenes*

показали лучшие результаты - только 0,77% мертвых клеток, а результаты для ATCC 43890 и JM109 были худшими (16,58 и 14,3% мертвых клеток соответственно). Тем не менее, это составило лишь небольшой процент от общей популяции, что свидетельствует в пользу других ограничений размножения бактерий в магнитной ловушке, помимо прямой летальности. Визуализация с помощью электронной микроскопии структур, выращенных в магнитной ловушке, выявила агрегаты с признаками, характерными для биопленок.

Первоначальные попытки получить ТБК, образованные агрегированными бактериями, в магнитном биопринтере, показали, что инкубированные в течение 24 ч ТБК были хрупкими и легко ломались, когда их извлекали из шприца. Инкубация была продлена до 5 и 7 дней. 5- и 7-дневные ТБК не были настолько хрупкими и поддерживали макроскопические агрегаты, которые сохраняли свою структуру, что предполагает, что бактерии были каким-то образом связаны между собой. Самый хрупкий ТБК, который распался на мелкие осколки, был сформирован лабораторным штаммом *E. coli* JM109. Наиболее стабильные ТБК, которые распадались на большие фрагменты или даже не распадались, а сохраняли стабильную макроскопическую трехмерную структуру длительное время, были сформированы *E. coli* ATCC 43890 и *S. aureus*. 7-дневный ТБК, образованный *E. coli* ATCC 43890, выращенный в условиях магнитной левитации, фиксировали глутаровым альдегидом, извлекали из шприца, и сохранившие свою структуру агрегаты подвергали микроскопическим исследованиям. Фиксированный образец метили флуоресцентным красителем, связывающим нуклеиновую кислоту «Sybr Green» и красителем FilmTracer™ «Sypro Ruby Biopilm Matrix Stain» и исследовали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). «Sybr Green», который преимущественно окрашивает ядерную ДНК, продемонстрировал присутствие множества одиночных бактериальных клеток (рисунок 5.2.12 а).

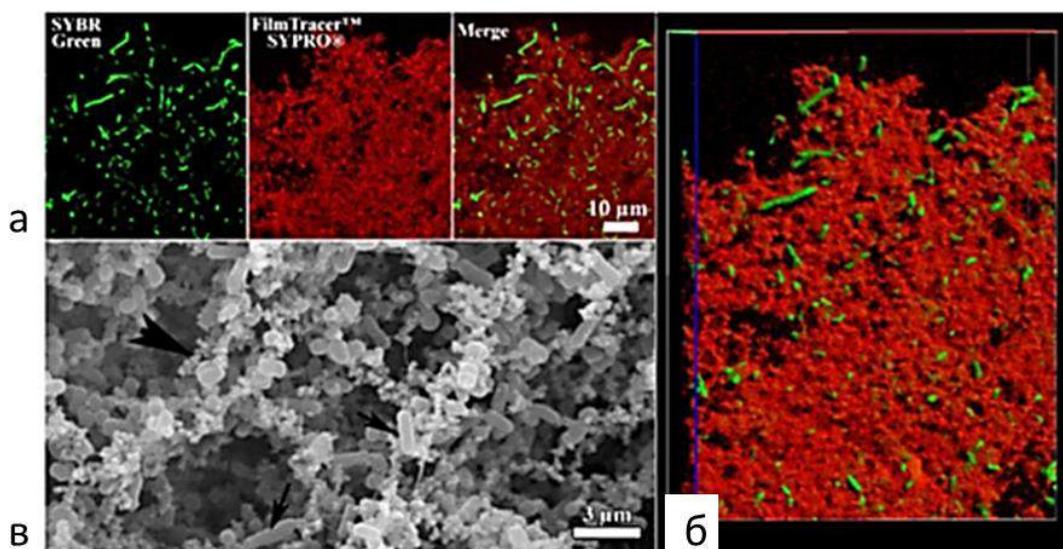


Рисунок 5.5.12 – Микроскопическое изображение ТБК, образованных *E. coli* ATCC 43890. Бактерии были выращены в «магнитной ловушке» в течение 7 дней и зафиксированы 2,5% глутаровым альдегидом. После этого часть образца окрашивали SYBR Green и FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (А и В), а другую часть подготовили для СЭМ -анализа: а) по результатам КЛСМ -анализа было показано, что бактериальные агрегаты образованы бактериями и внеклеточным матриксом; детектируются удлиненные, а также нормальные бактериальные клетки. б) 3D реконструкция образца. в) СЭМ -анализ подтверждает мнение, что агрегаты образованы бактериями (небольшие стрелки) и матрицей с везикулярной структурой (наконечник большой стрелки) [255]

Некоторые из клеток были удлинены и достигали 4- или 5-кратной длины нормальной клетки. Бактериальные клетки были погружены в матрицу, окрашенную «Ruby Biofilm Matrix Stain», образуя трехмерную структуру (рисунок 5.2.12 б).

Чтобы лучше охарактеризовать морфологию ТБК, образованных в условиях магнитной левитации, штамм *E. coli* ATCC 43890 изучался с помощью СЭМ. Наблюдаемая трехмерная структура подтвердила, что агрегаты образованы бактериальными клетками и продуцируемой ими внеклеточной матрицей. С помощью КЛСМ внутри агрегатов были обнаружены окруженные внеклеточным матриксом длинные бактериальные клетки, а с помощью СЭМ были выявлены окруженные внеклеточным матриксом короткие и почти овальные клетки.

## Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

Чувствительность определяли путем высева 10-кратных разведений содержимого кювет на чашки Петри с питательным агаром LB. Чашки инкубировали при 37 °С. Подсчет выросших колоний (КОЕ) проводили через 24 ч. Результаты подсчета КОЕ представлены на рисунке 5.2.13.

Результаты подсчета высеянных колоний показали, что, в отличие от образцов, выращенных на Земле, после экспозиции гентамицином в кюветах с сформировавшимися агрегатами оставались выжившие бактерии. При этом наличие (кюветы 2-1 и 2-2) или отсутствие (кювета 2-5) гадовиста практически не влияло на жизнеспособность бактерий, что выражалось в примерно одинаковом количестве высеянных КОЕ.

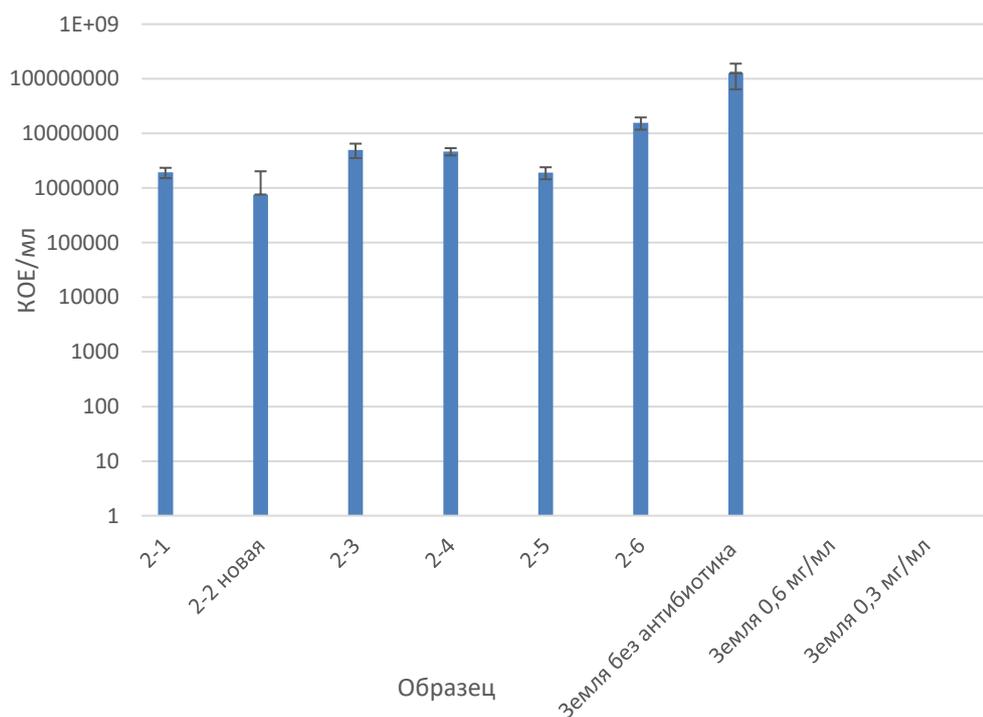


Рисунок 5.2.13 - Подсчет КОЕ/мл с посевов из образцов

На рисунке 5.2.14 представлено изображение фрагмента агрегата бактерий на фильтровальная бумаге, полученное методом СЭМ.

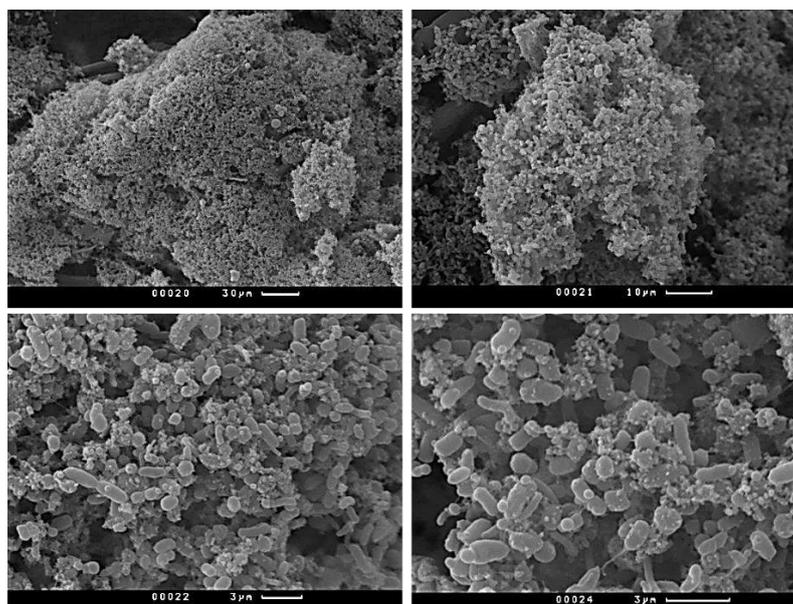


Рисунок 5.2.14 - Изображение фрагмента агрегата, полученное методом СЭМ (фильтровальная бумага)

На рисунке 5.2.15 представлено изображение агрегата, полученное методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

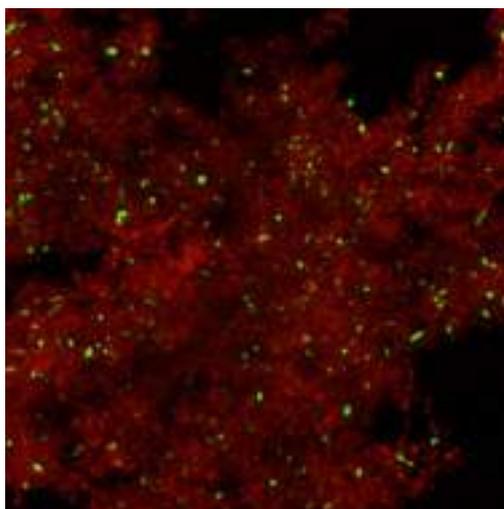


Рисунок 5.2.15 - Изображение агрегата, полученное методом КЛСМ

На снимках видно, что в магнитном биопринтере бактерии образовали сгустки, состоящие из клеток и выделяемого ими внеклеточного матрикса. Эти сгустки, в свою очередь, стали основой изучаемых агрегатов.

Карлин, который строго необходим для формирования двумерных прикрепленных биопленок *E. coli*, не имел значения для формирования биопленкоподобных агрегатов в условиях магнитной левитации.

Сходство между левитирующими агрегатами, полученными в «магнитной ловушке» и двумерными прикрепленными биопленками позволяет предположить, что формирование агрегатов может быть вызвано механизмами, подобными образованию биопленок. Кишечная палочка является одной из наиболее изученных моделей с точки зрения формирования биопленок. Как показано выше, размер и стабильность агрегатов, образованных в «магнитной ловушке», были разными для различных штаммов *E. coli*, использованных в исследовании. Чтобы продолжить сравнение левитирующих агрегатов с двумерными прикрепленными биопленками, изучали образование двумерных прикрепленных биопленок на абиотических поверхностях тремя штаммами *E. coli*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что способность образовывать ТБК и способность образовывать биопленки на абиотической поверхности не всегда полностью коррелируют и являются скорее совпадением, а не обусловлены идентичными механизмами формирования.

В данном исследовании впервые был разработан способ, позволяющий создавать в условиях *in vitro* несвязанные с поверхностью (т.е. неприкрепленные к поверхности) ТБК. Продемонстрировано, что в результате осуществления предлагаемого способа различные микроорганизмы (грамотрицательные и грамположительные бактерии) образуют ТБК, которые не связаны с какими-либо поверхностями или другими субстратами и имеют трехмерную структуру, образованную микроорганизмами (в частности, бактериями) и внеклеточным матриксом. При этом рост микроорганизмов является необходимым условием для формирования агрегатов. Получаемые биопленкоподобные агрегаты обладают высокой стабильностью и жизнеспособностью. В экспериментах показано, что после 3-дневного роста жизнеспособность бактерий в агрегатах варьировала от 83,4 до 99,7% в зависимости от штамма. При этом показано, что получаемые биопленкоподобные агрегаты по своим свойствам похожи на биопленки, образуемые микроорганизмами в естественных условиях. Показано, что образование биопленкоподобных агрегатов при осуществлении предлагаемого способа происходит в результате размножения и роста микроорганизмов; это

свойство аналогично образованию микроколоний, как важного этапа формирования биопленок.

Макроскопический размер получаемых биопленкоподобных агрегатов позволяет в реальном времени отслеживать процессы роста агрегатов. Масштабирование процесса получения биопленок возможно при использовании магнитной установки с обеспечением постоянного пополнения / притока парамагнитной среды культивирования, в которую дополнительно также могут быть включены антибиотики, специальные маркеры и другие компоненты, в зависимости от поставленных целей. Способ может быть полезен для моделирования поведения различных микроорганизмов, а также влияния на их развитие различных условий и внесения тестируемых препаратов, например, моделирования поведения бактерий при развитии хронических инфекций, таких как хронический бронхит, отит и риносинусит, а также для моделирования роста микроорганизмов в условиях микрогравитации в земных условиях.

#### Результаты

- Впервые разработан способ, позволяющий создавать в условиях *in vitro* несвязанные с поверхностью (т.е. неприкрепленные к поверхности) ТБК.

- ТБК не связаны с какими-либо поверхностями или другими субстратами и имеют трехмерную структуру, образованную микроорганизмами (в частности, бактериями) и внеклеточным матриксом.

- ТБК по своим свойствам похожи на биопленки. Эти свойства включают:

1) образование биопленкоподобных агрегатов происходит в результате размножения и роста микроорганизмов; это свойство аналогично образованию микроколоний, как важного этапа формирования биопленок;

2) образуемые агрегаты представляют собой трехмерные структуры, образованные микроорганизмами и внеклеточным матриксом, при этом внеклеточный матрикс является продуктом микроорганизмов, формируемым по мере их роста и развития, а не образован белками питательной среды;

- Получаемые ТБК обладают высокой стабильностью и жизнеспособностью и пригодны для их использования при тестировании и разработке лекарственных

средств против инфекций, вызываемых микроорганизмами, в патогенезе которых участвует биопленкообразование, в том числе хронических и не поддающихся лечению инфекций, при разработке антисептических препаратов и/или растворов в целях обработки различных поверхностей, а также для других применений, в которых требуется модель биопленок или неприкрепленных биопленкоподобных агрегатов; результаты тестов антибиотиков и других противомикробных средств и препаратов на таких культурах намного ближе к ситуации *in vivo* по сравнению с двумерными биопленкоподобными агрегатами.

### **5.2.1.3 Антибактериальная восприимчивость трехмерных бактериальных конгломератов на трехмерных композиционных материалах**

Проведены исследования по формированию комбинированных образцов ТБК с гранулами ОКФ. Для этого стационарную культуру *E.coli* JM109 развели со средой LB (Luria-Bertani) в соотношении 1:100 с добавлением частиц ОКФ и поместили в термостат для инкубации в течение 48 ч при температуре 37 °С.

После инкубации частицы ОКФ промыли от оставшихся планктонных (свободноплавающих, не находящихся в биопленке) клеток 3 раза стерильным раствором фосфатно-солевого буфера. Затем частицы поместили в магнитный биопринтер в среду LB с концентрацией гадобутрола 2 Моль и антибиотика гентамицина в концентрации 50 мкг/мл, что в 10 раз выше минимальной ингибирующей концентрации для данного штамма.

Образцы в магнитном биопринтере с ОКФ инкубировали при 37 °С в течение 24 ч (рисунок 5.2.16 а). После инкубации с антибиотиком сформированные ТБК с ОКФ были исследованы путем покраски комбинацией флуоресцентных красителей СУТО 9 / пропидий йодид (живой / мертвый), для определения жизнеспособности клеток бактерий.

В результате анализа установлено, что гранулы ОКФ были скреплены друг с другом синтезированной биопленкой. На снимках в ультрафиолетовом свете видно

как зеленое, так и красное свечение, что свидетельствует о наличии живых и мертвых клеток после инкубации с антибиотиком. При этом количество живых клеток имеет подавляющее значение.

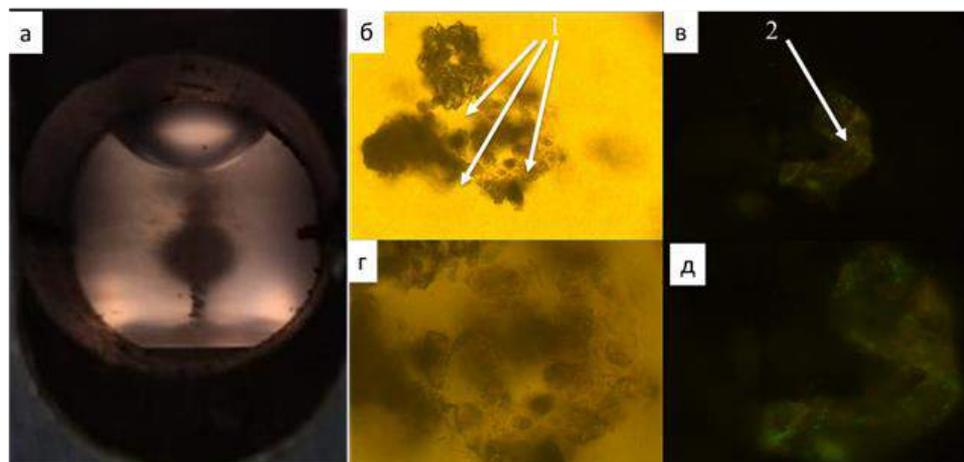


Рисунок 5.2.16 - Формирование ТБК с ТКМ в магнитном поле:

а) частицы ОКФ с био пленками в магнитном биопринтере; б, в) частицы ОКФ, скрепленные ТБК, в белом свете (б) и в ультрафиолете (в), увеличение 200х; г,д) ОКФ скрепленный ТБК, в белом свете (г) и в ультрафиолете (д), увеличение 400х. 1 – ОКФ, 2 – ТБК, сформированная бактериями после воздействия антибиотиком

Показано, что разработанная *in vitro* модель определения антибактериальной восприимчивости позволяет создать условия, приближенные к среде *in vivo*. Использование данного подхода позволяет скорректировать минимальную подавляющую концентрацию антибиотика в случае локализации возбудителя на ТКМ в ТБК и уменьшить случаи использования антимикробных препаратов в дозах, не способных оказать пагубное воздействие на микроорганизм, что снижает риски развития резистентности микрофлоры.

Таким образом, полученные ТБК характеризуются возможностью создавать или моделировать объемные условия жизнедеятельности, при которых бактериальные клетки демонстрируют иные показатели роста и синтетической активности по сравнению с культивированием на плоских поверхностях.

Показано, что разработанная *in vitro* модель определения антибактериальной восприимчивости позволяет создать условия, приближенные к среде *in vivo*. Использование данного подхода позволяет скорректировать минимальную

подавляющую концентрацию антибиотика в случае локализации возбудителя на ТКМ в ТБК и уменьшить случаи использования антимикробных препаратов в дозах, не способных оказать пагубное воздействие на микроорганизм, что снижает риски развития резистентности микрофлоры.

Таким образом, полученные ТБК характеризуются возможностью создавать или моделировать объемные условия жизнедеятельности, при которых бактериальные клетки демонстрируют иные показатели роста и синтетической активности по сравнению с культивированием на плоских поверхностях.

### **5.2.2 Формирование трехмерных композиционных материалов из клеточного материала в виде мягких тканей**

В период данной сессии КЭ решались следующие задачи:

- отработка методики биофабрикации хрящевой ткани человека и щитовидной железы мыши из ТС в условиях микрогравитации;
- получение исходных данных для определения оптимальных концентраций вещества-парамагнетика, необходимых для создания подходящих параметров магнитной восприимчивости внутренней среды камеры для биофабрикации жизнеспособных биологических объектов.

Направлениями исследований, проводимых в данной сессии были:

- ТКМ, формируемые в условиях микрогравитации при помощи формативной магнитной трехмерной биопечати ТС, состоящими из хрящевых клеток (хондроцитов) человека, а также ТС из эмбриональных эксплантов щитовидной железы мыши;
- способ формирования образцов при помощи магнитной трехмерной биопечати;
- способ доставки ТС на борт РС МКС.

Исследование проводилось в несколько этапов:

- 1) Подготовка оборудования для проведения космического эксперимента.

Подготовка оборудования включала в себя проведения стерилизации и заправка оборудования необходимыми для исследования материалами.

#### *Стерилизация оборудования*

Стерилизация проводилась для всех кювет с биологическими образцами из состава укладок «Кюветы № 1» и «Кюветы № 2» по методике, описанной в Руководстве по эксплуатации БНРС.943129.000 РЭ.

Укладка «Биопринт» проходила дезинфицирующую обработку 3% раствором перекиси водорода.

#### *Заправка научной аппаратуры*

Все работы по заправке научной аппаратуры биологическим материалом проводились в стерильном ламинарном боксе, используя стерильные механические дозаторы с набором наконечников и стерильные пинцеты.

Заправка проводилась по методике БНРС.943129.000 РЭ.

Материалы, заправленные в кюветы представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4. Перечень материалов, заправленных в кюветы

| <b>№ кювет</b> | <b>Емкость № 1</b>   | <b>Емкость № 2</b> | <b>Емкость № 3</b>                  |
|----------------|--|--------------------|-------------------------------------|
| № 1-1<br>№ 1-2 | 988,72 мкл среды<br>(DMEM+F12(1:1)+10%FBS) +1,28 мкл<br>1М гадовист    | 500 мкл<br>16% PFA | 500 мкл<br>Mebiol<br>+тиросфер<br>ы |
| № 1-3<br>№ 1-4 | 984,00 мкл среды<br>(DMEM+F12(1:1)+10%FBS)+16 мкл 1<br>Моль гадовист   |                    |                                     |
| № 1-5<br>№ 1-6 | 920,00 мкл среды<br>(DMEM+F12(1:1)+10%FBS)+80 мкл 1<br>Моль гадовист   |                    |                                     |
| № 2-1<br>№ 2-2 | 988,72 мкл среды<br>(DMEM+F12(1:1)+10%FBS)+1,28 мкл 1<br>Моль гадовист |                    | 500 мкл<br>Mebiol                   |

| № кювет        | Емкость № 1  | Емкость № 2 | Емкость № 3  |
|----------------|--|-------------|--------------|
| № 2-3<br>№ 2-4 | 984,00 мкл среды<br>(DMEM+F12(1:1)+10%FBS)+16 мкл 1<br>Моль гадовист |             | +хондросферы |
| № 2-5<br>№ 2-6 | 920,00 мкл среды<br>(DMEM+F12(1:1)+10%FBS)+80 мкл 1<br>Моль гадовист |             |              |

В соответствии с указанной методикой реализована следующая последовательность действий:

- осуществлялась заправка верхней емкости питательной средой, содержащей вещество-парамагнетик в концентрациях;
- осуществлялась заправка камеры биофабрикации термообратимым гидрогелем, содержащим ТС, состоящие из хондроцитов человека или тиреоцитов крысы;
- осуществлялась заправка верхней емкости фиксирующим раствором (16% раствор параформальдегида);
- после заправки и сборки кювет осуществлялась их проверка на герметичность по методике, описанной в Руководстве по эксплуатации БНРС.943129.000 РЭ.
- заправленные кюветы устанавливались в укладки и проводилась дезинфицирующая обработка 3% раствором перекиси водорода.

## 2) Бортовая реализация эксперимента.

Суммарное время экипажа составило 12,25 ч.

Замечаний к работе экипажа нет, экипаж выполнил экспериментальную работу в соответствии с бортовой документацией в полном объеме.

## 3) Анализ полученных результатов.

По завершении экспедиции МКС-57 в лабораторию «3Д Биопринтинг Солюшенс» были доставлены укладки «Кюветы №1» и «Кюветы №2» с летными образцами ТКМ.

### 5.2.2.1 Формирование в магнитном поле трехмерных композиционных материалов в виде хрящевой ткани. Экспедиция МКС 57 (Союз МС-11)

Экспериментальный план исследования включал несколько последовательных шагов (рисунок 5.2.17). ТС подготовлены в лаборатории на Земле на космодроме Байконур (Казахстан), а затем помещены в кюветы, заполненные термообратимым гидрогелем, который обеспечивал жизнеспособность ТС и предотвращал их нежелательное преждевременное слияние и распластывание. После этого кюветы вместе с оригинальным магнитным биопринтером доставлены на российский сегмент МКС российским космическим кораблем «Союз МС-11».

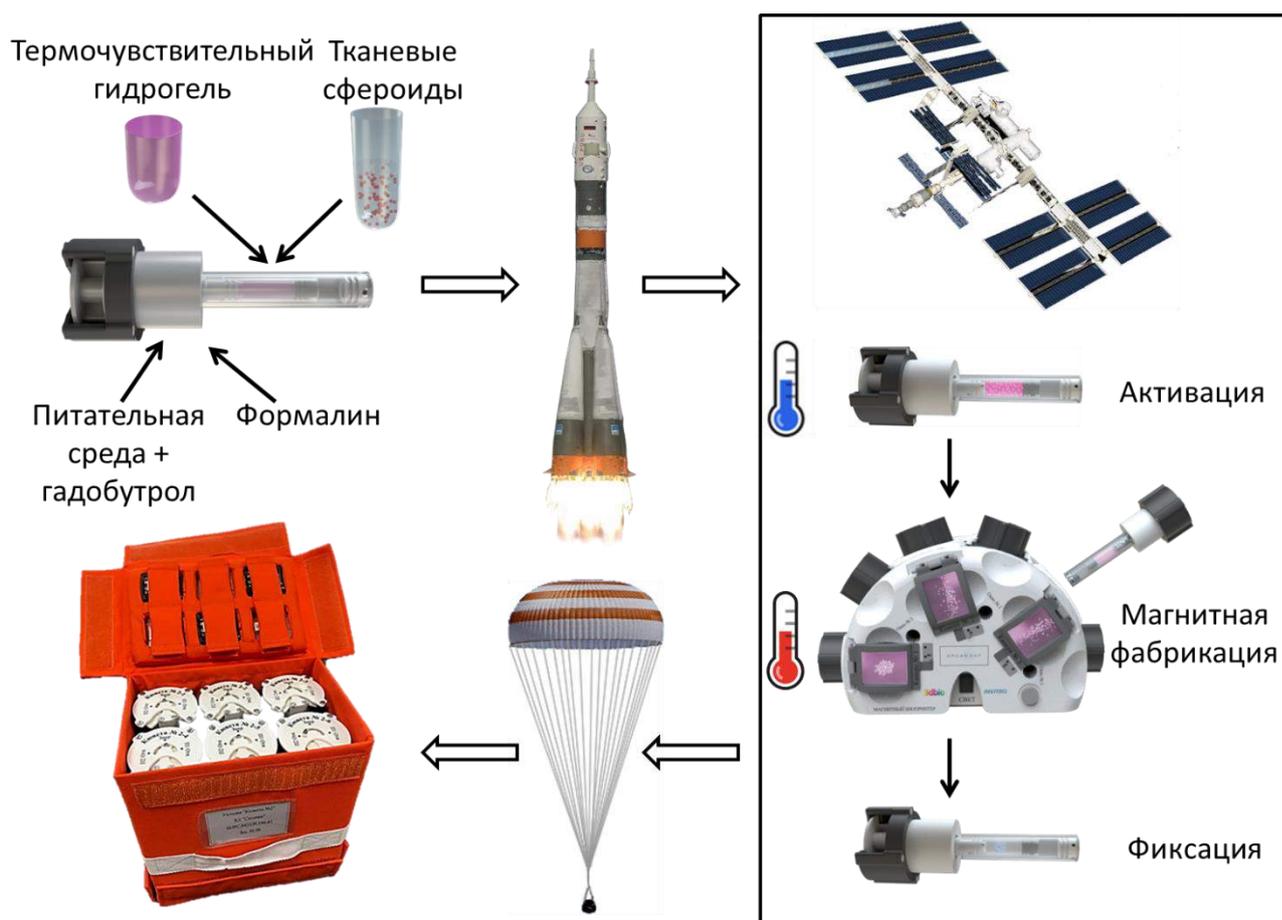


Рисунок 5.2.17 - Схема космического эксперимента [196]

На МКС космонавт нажал кнопку «П1» на кюветах (тем самым произвел впрыск к ТС питательной среды с парамагнетиком) и произвел охлаждение кюветы с ТС до 15 °С с помощью термостата, что привело к превращению термообратимого гидрогеля из геля в золь и, таким образом, обеспечило свободное движение ТС. После этого кюветы были помещены в магнитный биопринтер на 48 ч для выполнения биоформирования в условиях магнитной левитации и для обеспечения слияние сформированного ТКМ. Для записи магнитного левитационного биоформирования использовалась видеокамера, встроенная в магнитный биопринтер.

Для оценки цитотоксичности геля Mebiol, используемого для безопасной доставки ТС с Земли в космос, 2-хдневные хондросферы помещали в гель Mebiol при комнатной температуре на 72 ч, после чего их жизнеспособность оценивали с использованием набора для окрашивания живых / мертвых клеток Double Staining Kit (рисунок 5.2.18 а,г) и набора CellTiter-Glo 3D (рисунок 5.2.18 б). Качественная оценка жизнеспособности хондроцитов выявила одинаковое количество живых клеток в ТС, инкубированных в геле Mebiol, и в контрольных ТС. Количественная жизнеспособность клеток составила  $97 \pm 6\%$ . Эти результаты подтвердили отсутствие токсичности у геля Mebiol и возможность его использования для доставки ТС в космос.

Использование ТС в качестве строительных блоков требует стандартизации их размера и формы. Диаметр ТС (рисунок 5.2.18 в,е) и округлость измеряли через 2 дня культивирования. Средний диаметр ТС составлял  $299,3 \pm 13,32$  мкм. Средняя округлость ТС была  $0,911 \pm 0,053$ . Эти данные показали, что хондросферы имеют единую стандартизованную геометрию и могут использоваться для биофабрикации ТКМ.

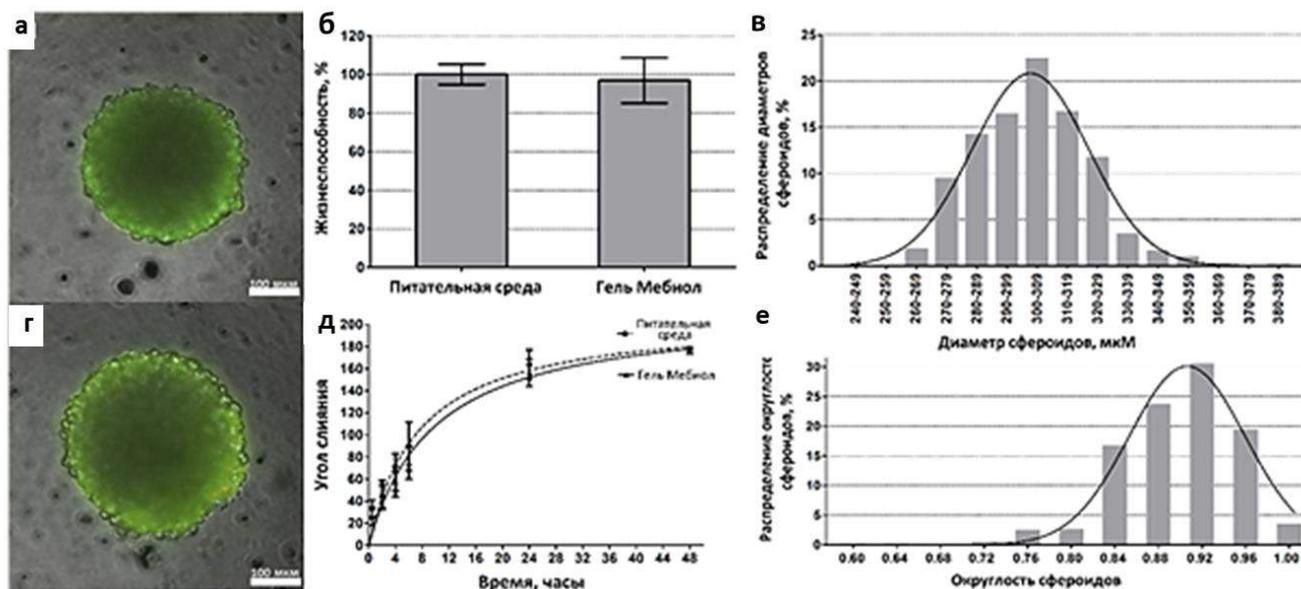


Рисунок 5.2.18 - Характеристика и жизнеспособность ТС: а) хондросферы после 72 ч инкубации в Мебиол геле (анализ живых/мертвых клеток, живые клетки окрашиваются в зеленый цвет); б) количественная оценка жизнеспособности хондросфер после 72 ч инкубации в Мебиол геле и среде культивирования с использованием набора CellTiter-Glo; в) распределение диаметров 2-хдневных хондросфер; г) хондросферы после 72 ч инкубации в среде культивирования (контроль); д) временная кривая межсферных углов для пар хондросфер при слиянии; е) округлость 2-хдневных хондросфер [196]

Основным преимуществом использования микромасштабной системы испытаний на сжатие между двумя параллельными пластинами является возможность измерения биомеханических свойств всего ТС. Это позволяет максимально точно определить общий биомеханический профиль каждого ТС. По результатам не наблюдалось каких-либо существенных различий между биомеханикой ТС, инкубированных как в геле Mebiol, так и в культуральных средах. Однако ТС ткани после инкубации в геле Mebiol продемонстрировали несколько повышенный модуль упругости по сравнению с контрольной группой:  $3,51 \pm 0,80$  кПа и  $3,38 \pm 0,79$  кПа, соответственно (рисунок 5.2.19).

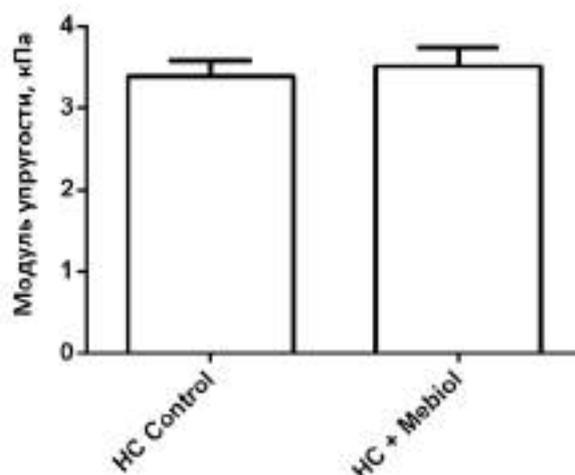


Рисунок 5.2.19 - Эластичность ТС в присутствии и без термообратимого гидрогеля [196]

Транспортировка жизнеспособных ТС с Земли на МКС и предотвращение нежелательного предварительного слияния тканей во время доставки была одной из ключевых задач этого исследования. Это было достигнуто с помощью коммерческого термообратимого гидрогеля, который представляет собой гель при температуре 37 °С и превращается в золь при низкой температуре (16 °С) в закрытых кюветах (рисунок 5.2.20), пригодных для использования космонавтами. Полученные данные показали, что ТС могут выживать в течение нескольких дней (до 7 дней) в кюветах, заполненных термообратимым гидрогелем. Альтернативные подходы, такие как изготовление ТС из монослоев клеток, меченых магнитными наночастицами [256], или спонтанное образование ТС из монослоя в космосе, описанные группой Даниэлы Гримм [257], не позволяют обеспечить формирование достаточного количества ТС стандартного размера и формы для воспроизводимых экспериментов. Более того, открытые системы для манипулирования ТС не подходят для МКС из-за строгих санитарных правил. Применение таких систем требует специального оборудования для культивирования стерильных клеток, а также соответствующих навыков космонавта по работе с клеточными культурами.

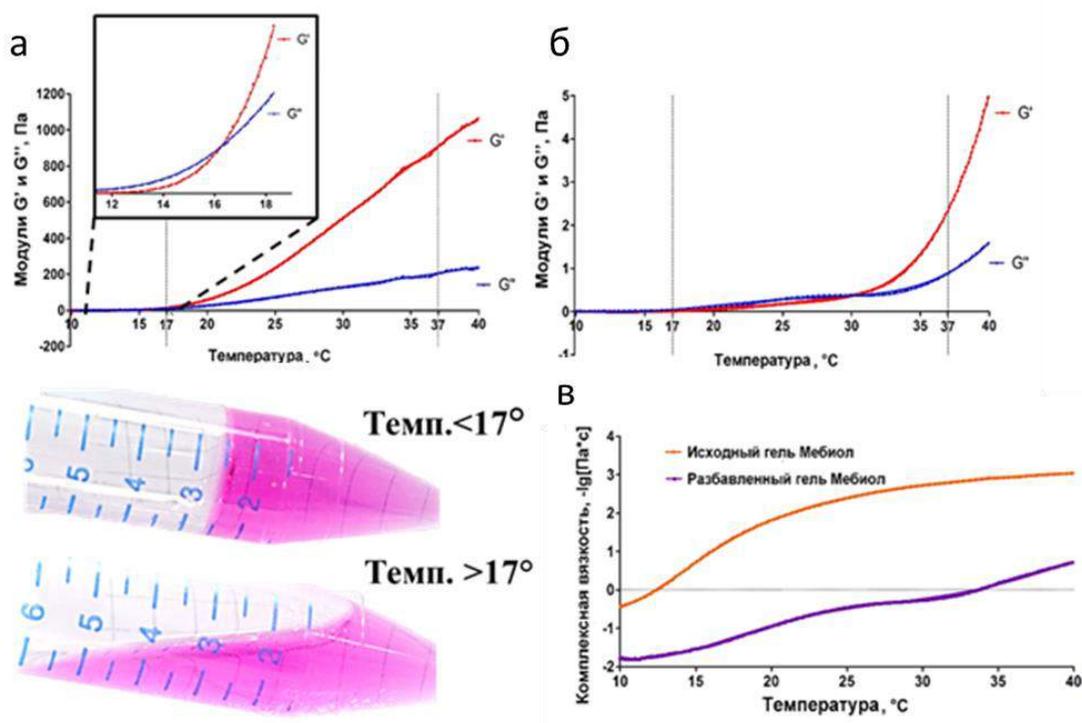


Рисунок 5.2.20 - Оценка влияния геля Мебиол на хондросферы: а) характеристики термочувствительного гидрогеля до разбавления; б) характеристики термочувствительного гидрогеля после разбавления; в) вязкость чистого и разбавленного гидрогеля [196]

Магнитное формирование ТКМ из ТС включало в себя два последовательных этапа. Во-первых, конфигурация магнитного поля в магнитном биопринтере заставляет ТС двигаться в одно место и формировать ТКМ. На этой стадии ТС плотно упакованы, но все еще не имеют плотных контактов между клетками на поверхности ТС. На второй стадии ТС начинают сливаться и формируют ТКМ. Используемое программное обеспечение «Surface Evolver» позволяет визуализировать последовательные этапы слияния ТС. Сравнение реального изображения с компьютерным моделированием показывает, что полученные ТКМ представляют собой стадии слияния ТС (рисунок 5.2.21 а,б). Согласно данным моделирования, уровень полноты процесса слияния ТС более 50% и в определенной области достигает даже почти 100% полноты процесса слияния тканей. Принимая это во внимание, удлинение времени биофабрикации позволяет полностью объединить ТС в один неделимый ТКМ.

Демонстрация жизнеспособности ТКМ, изготовленных с использованием магнитной левитации при низкой концентрации, является критическим аспектом

данного исследования. Жизнеспособность ТКМ из клеток подтверждена различными методами. Гистологические и гистохимические исследования продемонстрировали отсутствие признаков апоптоза и гибели клеток (рисунок 5.2.21 б). Тот факт, что сформированные ТКМ подвергаются процессу тканевого слияния, является еще одним прямым доказательством их жизнеспособности.

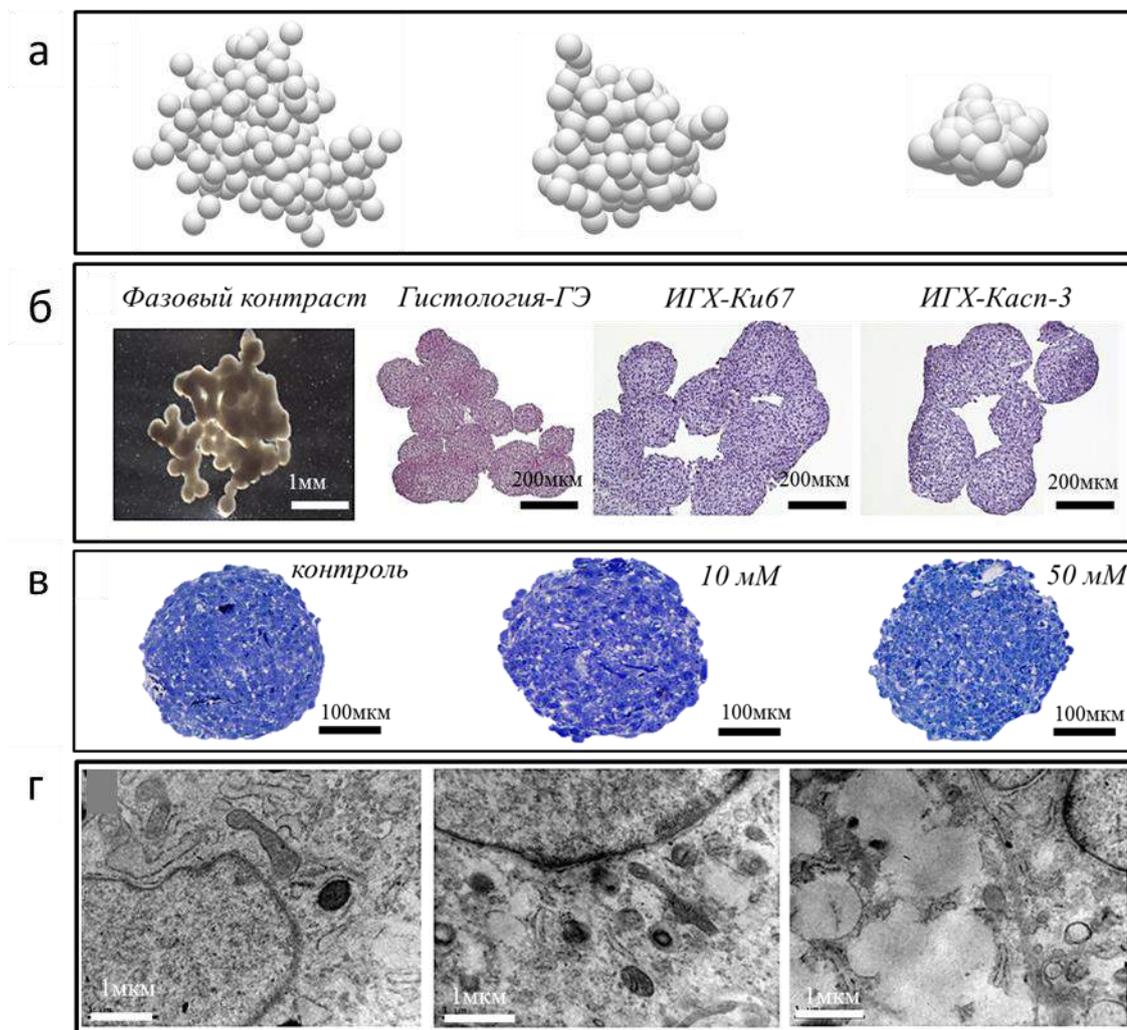


Рисунок 5.2.21 - Морфологические исследования ТКМ, полученных после магнитной левитации в космосе: а) компьютерное моделирование последовательных этапов биоформирования ТС в ТКМ с использованием программного обеспечения «Surface Evolver»; б) морфология, гистология (окрашивание гематоксилин-эозином, ГЭ) и иммуногистохимия (Ki-67, Casp3) ТКМ, полученных в космическом эксперименте; в) иммуногистохимическое окрашивание хондросфер, подвергшихся воздействию 10 мМоль и 50 мМоль гадобутрола в течение 24 ч; г) изображения ТЭМ клеток в хондросферах без выдерживания в гадолинии и после воздействия 10 мМоль и 50 мМоль гадобутрола [196]

В дополнительных экспериментах показано, что при низких концентрациях парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ) большинство клеток сохраняют неповрежденную

нормальную ультраструктуру в ТС, тогда как при концентрации гадолиния 50 мМоль имеются свидетельства токсического действия в виде внутриклеточной дистрофии, включая маргинализацию хроматина, отек митохондрий и эндоплазматического ретикулума, накопление фагосом и множественных вакуолей внутриклеточной мембраны (рисунок 5.2.21 в,г).

Результаты исследований показали, что формирование ТКМ из ТС возможно при низкой, нетоксичной концентрации парамагнитной среды. В данном исследовании возникла очевидная дилемма. С одной стороны, использование парамагнитной среды крайне важно для обеспечения возможности магнитной левитации. С другой стороны, токсическое действие гадолиния, используемого в качестве парамагнитной среды, хорошо известно и подтверждено с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В предыдущих исследованиях магнитная левитация ТС достигалась при таких концентрациях парамагнетика ( $Gd^{3+}$ ), которые могут подорвать практическую ценность биофабрикации ТКМ как надежной трехмерной модели тканей *in vitro*. Используя гадолиний в концентрации 50 мМоль, видны типичные изменения клеточной ультраструктуры, аналогичные ранее описанным в токсикологических исследованиях гадолиния, включая маргинализацию ядерного хроматина, отек митохондрий и эндоплазматического ретикулума, накопление фагосом и множественных мембранных вакуолей, которые можно рассматривать как очевидные признаки вызванной гадолинием внутриклеточной дистрофии (рисунок 5.2.21). Однако, при низкой концентрации гадолиния ультраструктура клеток практически не повреждалась. Более того, высокий уровень жизнеспособности ТС при низкой концентрации гадолиния подтверждает их неизменную способность сливаться в ТКМ.

В результате проведенной работы выполнено магнитное левитационное формирование ТКМ из ТС (хондросфер) без использования скаффолдов в условиях микрогравитации. Продемонстрировано, что использование термообратимого гидрогеля обеспечивает доставку жизнеспособных ТС на космическую станцию и предотвращает их нежелательное преждевременное слияние и распластывание.

### **5.2.2.2 Формирование в магнитном поле трехмерных композиционных материалов в виде щитовидной железы мыши. Экспедиция МКС 57 (Союз МС-11)**

Методы исследования полученных в данном исследовании ТКМ соответствует методу исследования проведенным в п. 5.2.2.1 за исключением проведения дополнительного гистологического исследования.

Методы гистологического исследования включают приготовление гистологических препаратов с последующим их изучением с помощью световой микроскопии. Гистологические препараты представляют собой тонкие (4-5 мкм толщиной) срезы фрагментов органических изделий, окрашенные специальным красителем, помещенные на предметное стекло микроскопа, заключенные в консервирующую среду и покрытые покровным стеклом.

#### 1) Анализ кинетики формирования полученных ТКМ

Кинетика формирования ТКМ представлена в таблице 5.5. Данные по кинетике формирования ТКМ представлены только для образцов, зафиксированных на видеокамеры, установленные в магнитном биопринтере.

Анализ фотоснимков и видеозаписей, сделанных на МКС, показал, что в кюветах, содержащих вещество-парамагнетик в концентрациях 10 и 50 мМоль, происходит постепенное формирование ТКМ. При этом скорость формирования зависит от концентрации вещества-парамагнетика, т.е. в кюветах, содержащих парамагнетик в концентрации 50 мМоль, формирования ТКМ проходит быстрее, чем в кюветах, в которых концентрация парамагнетика составляет 10 мМоль.

Таблица 5.5 – Кинетика формирования ТКМ

| № Кюветы       | Концентрация парамагнетика, мМ | Фото собранного конструкта   | Время сборки, мин |
|----------------|--------------------------------|--|-------------------|
| Кювета № 2 - 1 | 0,8                            | -  | >2880             |
| Кювета № 2 - 3 | 10,0                           |  | 23                |
| Кювета № 2 - 5 | 50,0                           |  | 12                |

В кюветах, в которых концентрация парамагнетика равна 0,8 мМоль, формирования ТКМ в рамках эксперимента не произошло. Для осуществления формирования при данной концентрации необходимо значительно больше времени – более 48 ч.

2) Оценка целостности полученных ТКМ методом световой микроскопии

Из кювет были изъяты ТКМ и произведена их оценка методом световой микроскопии. Фотографии ТКМ представлены в таблице 5.6

Таблица 5.6 – Фотографии ТКМ

| № кюветы     | Фото ТКМ   |
|--------------|--|
| Кювета № 2-1 |  |

| № кюветы     | Фото ТКМ   |
|--------------|--|
| Кювета № 2-2 |    |
| Кювета № 2-3 |    |
| Кювета № 2-4 |   |
| Кювета № 2-5 |  |
| Кювета № 2-6 |  |

Как видно на фотографиях, при концентрациях парамагнетика 10 мМоль и 50 мМоль образуются ТКМ, состоящие из полностью слившихся ТС. В случае ТКМ из клеток щитовидной железы крысы границы отдельных ТС практически неразличимы.

### 3) Гистологическое исследование полученных ТКМ

Далее была произведена гистологическая оценка ТКМ из кюветы № 2-6, собранного в условиях микрогравитации из ТС,

Гистологический анализ ТКМ 2-6 показывает, что клетки внутри ТКМ клетки живы и обладают правильной морфологией (рисунок 5.5.9).

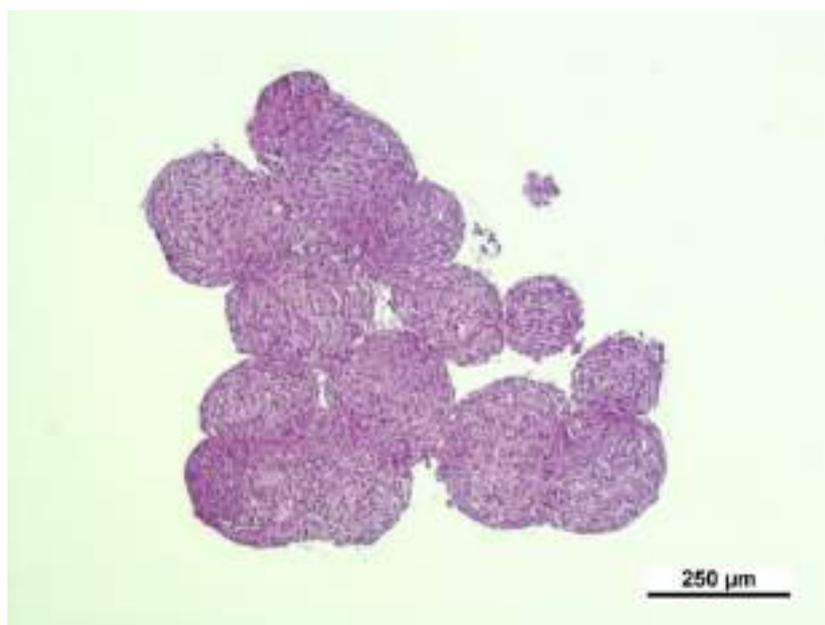


Рисунок 5.5.9 – Гистологический анализ ТКМ

Учитывая, что образец 2-6 сформирован при максимальной концентрации парамагнетика, можно ожидать также что клетки внутри ТКМ во всех остальных кюветах 2.1-2.5 также сохраняли жизнеспособность и сохраняли тканеспецифическую морфологию.

В ходе проведенных исследований материалов КЭ «Магнитный 3D-биопринтер» полученных в период экспедиции МКС-57 получены следующие результаты и выводы:

1. Подтверждена работоспособность метода формативной биофабрикации ТКМ в условиях микрогравитации орбитального полета. Процесс биофабрикации

зависит от температуры культивирования, концентрации парамагнетика в среде, и времени экспозиции.

2. Получены данные, подтверждающие работоспособность созданной научной аппаратуры. Эти данные могут быть использованы для оптимизации технологии биофабрикации, в целях улучшения свойств управляемости и наблюдаемости процессов формативной биофабрикации ТКМ в условиях орбитального полета.

3. Проведен гистологический анализ ТКМ, полученных в результате КЭ. Показано, что клетки внутри ТКМ клетки живы и обладают правильной морфологией.

4. Анализ фотоснимков и видеозаписей, сделанных на МКС, показал, что в кюветах, содержащих вещество-парамагнетик в концентрациях 10 и 50 мМоль, происходит постепенное формирование ТКМ. При этом скорость сборки зависит от концентрации вещества-парамагнетика, т.е. в кюветах, содержащих парамагнетик в концентрации 50 мМоль формирование ТКМ проходит быстрее, чем в кюветах, в которых концентрация парамагнетика составляет 10 мМоль.

5. Замечаний по условиям реализации КЭ экипажем нет, экипаж выполнил все этапы экспериментальной работы в соответствии с бортовой документацией.

### **5.2.2.3 Формирование в магнитном поле трехмерных композиционных материалов в виде мышечной ткани. Экспедиция МКС 61 (Союз МС-13)**

В период данной сессии космического эксперимента решалась задача отработки методики формирования образцов мышечной ткани.

Все работы по заправке научной аппаратуры биологическим материалом проводились в стерильном ламинарном боксе, используя стерильные механические дозаторы с набором наконечников и стерильные пинцеты.

Заправка проводилась по методике, описанной в Руководстве по эксплуатации БНРС.943129.000 РЭ. Материалы, заправленные в кюветы представлены в таблице 5.7

Таблице 5.7 – Материалы, заправленные в кюветы

| № кювет | Зав № | Емкость № 1   | Емкость № 2        | Емкость № 3<br>600 мкл Mebiol +<br>ТС из               |          |
|---------|-------|---|--------------------|--|----------|
| № 1-1   | 08    | 984 мкл среды (DMEM +2%HS)<br>+16 мкл 1 Моль гадовист   | 500 мкл<br>16% PFA | клеток<br>BEM:BEF=4:1                                  |          |
| № 1-2   |       |   |                    | клеток<br>BEM:BEF=4:1                                  |          |
| № 1-3   |       | 984 мкл среды (DMEM +2%HS)<br>+16 мкл 1 Моль гадовист   |                    | клеток<br>BEM:BEF=4:1                                  |          |
| № 1-4   |       |   |                    | клеток<br>BEM:BEF=4:1                                  |          |
| № 1-5   |       | 984 мкл среды (DMEM+10%FBS)<br>+16 мкл 1М гадовист      |                    | миобластов<br>кролика                                  |          |
| № 1-6   |       |   |                    | миобластов<br>кролика                                  |          |
| № 2-1   |       | 960 мкл среды (DMEM +10%FBS)<br>+40 мкл 1 Моль гадовист |                    | хондроцитов<br>человека                                |          |
| № 2-2   |       |   |                    | хондроцитов<br>человека                                |          |
| № 2-3   |       |   |                    | хондроцитов<br>человека                                |          |
| № 2-4   |       |   |                    | хондроцитов<br>человека                                |          |
| № 2-5   |       |   |                    | 984 мкл среды (L-15+10%FBS)<br>+16 мкл 1 Моль гадовист | KFE-5    |
| № 2-6   |       |   |                    | 984 мкл среды (L-15+10%FBS)<br>+16 мкл 1 Моль гадовист | из KFE-5 |

Для создания ТС из миобластов кролика использовались клетки первичной культуры миобластов кролика RM-1. Для создания ТС из миобластов и фибробластов теленка использовались клетки линии эмбриональных миобластов теленка BEM и линии эмбриональных фибробластов теленка BEF.

Миобласты кролика и теленка, а также фибробласты теленка культивировали при стандартных условиях (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>) в культуральных флаконах, производя смену питательной среды каждые три-четыре дня. Миобласты рыбы культивировали при 26 °С в культуральных флаконах, производя смену питательной среды каждые 3-4 дня. При достижении 85-95% конfluenceности клетки аккуратно снимали с культуральных флаконов с использованием мягкой ферментативной диссоциации раствором Версена и 0,25% раствором трипсина / ЭДТА. Готовили клеточную суспензию необходимой концентрации.

Для создания ТС в каждую агарозную форму, содержащую 256 лунок, помещали 190 мкл суспензии с концентрацией  $1,35 \times 10^6$  клеток/мл, таким образом, каждый ТС включал в себя 1000 клеток.

Полученные ТКМ были изъяты из кювет и была произведена их оценка методом световой микроскопии. Фотографии ТКМ представлены на рисунке 5.5.21. Как видно на фотографиях, в ходе проведения 2 и 3 сеансов КЭ образовывались ТКМ, состоящие из полностью слившихся ТС. В случае кювет 1-1, 1-2 и 2-6 границы отдельных ТС были практически неразличимы. В остальных случаях внутри ТКМ можно было различить отдельные ТС, однако сами ТКМ представляли собой единые структуры.

Далее была произведена гистологическая оценка полученных ТКМ. Фотографии гистологических срезов, окрашенных с помощью гематоксилина и эозина, представлены на рисунке 5.5.21. В связи с тем, что кюветы 1-3 и 1-4, 1-5 и 1-6, 2-5 и 2-6 являлись экспериментальными повторами и содержали ТКМ, полученные в одинаковых условиях, на рисунке 5.5.21 приведено по одному репрезентативному изображению для каждого типа ТКМ.

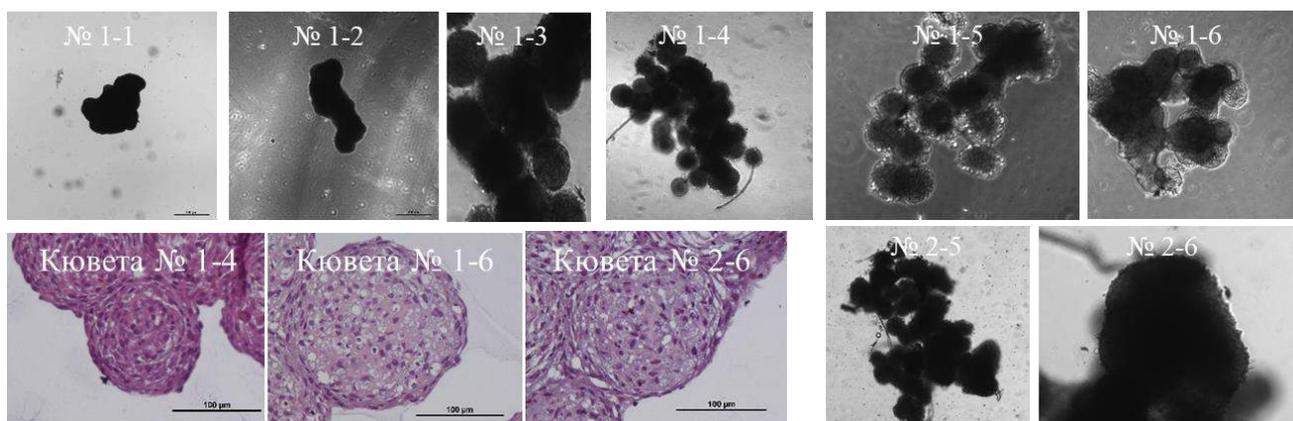


Рисунок 5.5.21 – Фотографии органных изделий, полученных из ТС. Фотографии гистологических срезов, окрашенных с помощью гематоксилина/эозина

Гистологический анализ ТКМ показывает, что клетки внутри ТКМ сохраняли жизнеспособность и обладали морфологией, характерной для миобластов. В случае кюветы 1-4 также можно видеть наличие фибробластоподобных клеток внутри смешанного образца.

Проведено исследование ТКМ, сформированных из эмбриональных миобластов и фибробластов теленка (кюветы 1-1 и 1-2), методом сканирующей электронной микроскопии. Изображения СЭМ ТКМ приведены на рисунке 5.5.22. Результаты СЭМ анализа демонстрируют, что ТС полностью слились, образовав единые ТКМ, окруженные плотной соединительнотканной капсулой. На основании морфологии клеток на поверхности ТКМ можно предположить, что капсула образована фибробластами, в то время как миобласты равномерно распределены внутри структуры.

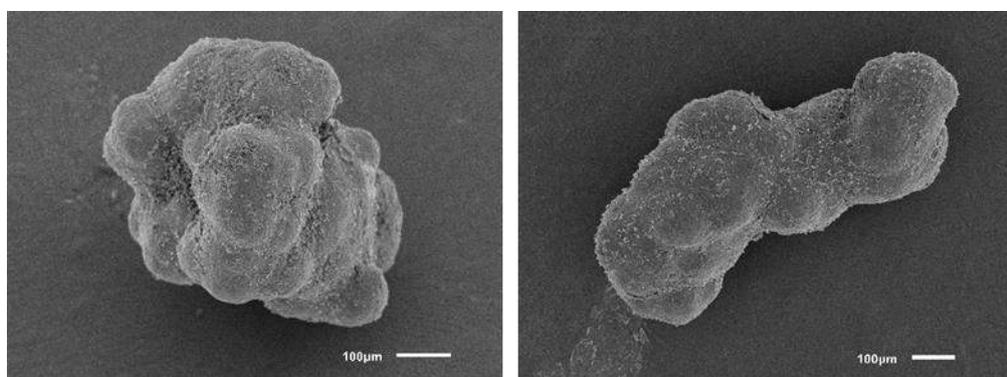


Рисунок 5.5.22 – Изображения СЭМ ТКМ, состоящих из эмбриональных миобластов и фибробластов теленка и полученных в условиях микрогравитации

В ходе проведения сеанса КЭ осуществлено успешное формирование в магнитном поле жизнеспособных слитых ТКМ из ТС, состоящих из мышечных клеток различного биологического происхождения.

### 5.3 Заключение по главе 5

Для реализации метода магнитного формирования ТКМ в условиях микрогравитации на борту РС МКС разработана и создана специализированная научная аппаратура «Магнитный 3D-биопринтер». Эта аппаратура состоит из магнитного биопринтера и набора многофункциональных прозрачных кювет, которые позволяют доставлять материал в космос, проводить и записывать на видео сеансы биофабрикации, а также обеспечивать фиксацию полученных ТКМ для последующего анализа на Земле. Данная аппаратура была доставлена на РС МКС в декабре 2018 года.

Впервые в мире в условиях микрогравитации с помощью метода магнитного формирования было успешно выполнено формирование ТКМ в виде твердых тканей из ФК и мягких тканей (хрящ, щитовидная железа, мышечная ткань). Процесс работы с аппаратурой представлен на рисунке 5.5.23.



Рисунок 5.5.23 – Космонавты (а) О.Д Кононенко, (б) А.Н. Овчинин, (в) А.А Иванишин, (г) А.А. Скворцов и (д) О.И. Скрипочка выполняют сеансы эксперимента «Магнитный 3D-биопринтер»

Метод магнитного формирования является мультиплатформенным, так как позволяет осуществлять направленное формирование неорганических и органических ТКМ из ФК, ТС или различных типов бактерий, а также изучать поведение кристаллических форм химических соединений (неорганические компоненты матрикса костной ткани, лекарственные препараты, ферменты, гормоны и др.), помещенных в неоднородное магнитное поле с высоким градиентом напряженности.

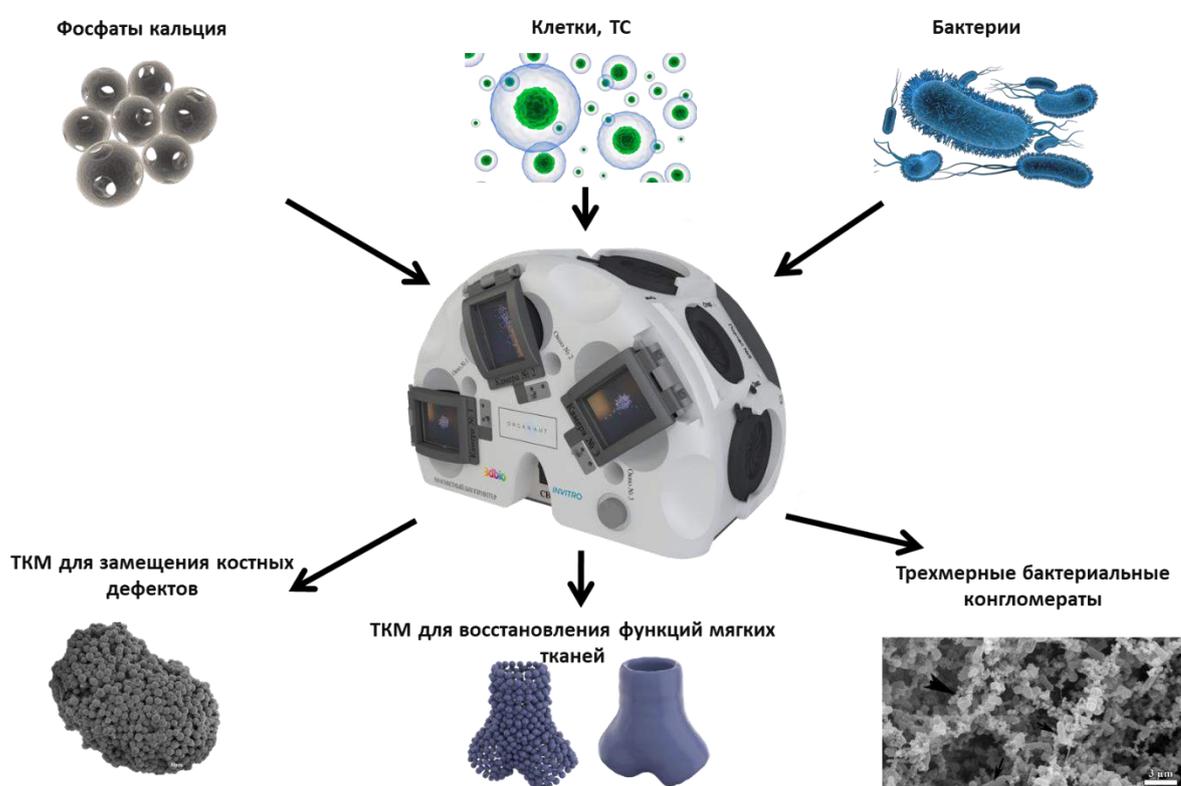


Рис. 5.5.24 – Направления использования магнитного биопринтера на борту РС МКС в период экспедиций МКС 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 66 и 70

Результаты исследований показали, что магнитные поля, используемые в биопринтере, могут индуцировать более интенсивную перекристаллизацию синтетических ФК по сравнению с традиционными методами неорганического синтеза, что позволяет с высокой эффективностью получать перспективные материалы для костной пластики.

Одним из направлений применения оборудования является формирование ТБК в магнитном поле и оценка материалов на антибактериальную восприимчивость. Такие структуры характеризуются возможностью создавать или моделировать объемные условия жизнедеятельности, при которых бактериальные клетки демонстрируют иные показатели роста и синтетической активности, по сравнению с культивированием на плоских поверхностях.

В ближайшей перспективе актуальным является расширение технологических возможностей разрабатываемой научной аппаратуры за счет интеграции в конструкцию универсальных кювет для создания стоячих акустических волн. Это предоставит дополнительные возможности для пространственного распределения объектов, удерживаемых «магнитной ловушкой».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании теоретических и экспериментальных исследований раскрыты механизмы формирования ТКМ из неорганических и органических материалов с использованием магнитных, акустических полей, а также их комбинации.

По результатам проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Разработаны магнитные системы на базе постоянных неодимовых магнитов для левитационного направленного формирования трехмерных композиционных материалов (ТКМ) из дисперсных фаз. Установлено, что основным фактором влияния на градиент магнитного поля в областях пространства формирования материала является расстояние между одноименными полюсами магнитов. В рабочей области кольцевой магнитной системы средний градиент магнитного поля составил до 5,5 Тл/см, что в 15 раз больше, чем в системе на базе цилиндрических магнитов. Показана возможность формирования осесимметричных вогнутых и тороидальных «магнитных ловушек» для формирования ТКМ в форме эллипсоид вращения с размером не более 10 мм и тороидальных ТКМ с радиусом от 3 мм, при этом в случае тороидальной «магнитной ловушки» градиент магнитного поля составил не более 2,4 Тл/см.

2. Исследовано влияние конфигурации магнитных систем на базе постоянных магнитов на условия формирования ТКМ в «магнитных ловушках». В исследованиях с использованием ФК установлено, что процесс перехода из  $\alpha$ -ТКФ в ДКФД происходит за 24 ч с последующим переходом из ДКФД в ОКФ в следующие 24 ч. Значения минимальной концентрации парамагнетика для обеспечения левитации ФК составили от 2,5 до 3,0 Моль. В исследованиях с использованием ТС установлено, что время формирования ТКМ составляет не менее 50 с, максимальный размер конструкции составляет не более 10 мм. Для достижения левитации ТС требуется концентрация парамагнетика не ниже 50 мМоль, при которой жизнеспособность ТС составляет более 90%, а механические свойства - 100 % по сравнению с контролем при воздействии менее 24 ч.

3. Разработаны акустические системы на базе плоских и цилиндрических пьезокерамических излучателей для левитационного направленного формирования ТКМ на основе ТС в стоячих ультразвуковых волнах. Выявлено, что системы позволяют генерировать повторяемые и прогнозируемые резонансные колебания среды с достаточной интенсивностью для левитации объектов. Установлена прямая зависимость между размерами формируемых образцов ТКМ и резонансной частотой. Минимум потенциала Горькова для объектов достигается в узлах акустического давления. Определено, что амплитуда излучения не должна превышать 10 В для избежание негативного влияния на клеточный материал. Частота колебаний для эффективного манипулирования ТС с диаметрами 150-300 мкм находится в диапазоне от 0,4 до 1,2 МГц.

4. Изучено влияние конфигурации акустических свойств колеблющейся среды для формирования ТКМ на основе ТС различной пространственной топологии. Установлено, что: а) для случая с цилиндрическим излучателем формирование трубчатых образцов под действием волновой среды происходит при условии удержания ТС в течение 20 ч, при этом размер сформированного образца составил: диаметр 1,3 мм, толщина 0,45 мм, длина 1,5 мм., что соответствовало ультразвуковой волне с частотой 800 кГц.; б) для случая с плоским излучателем минимальная амплитуда давления среды для подвешивания объектов составляет 65 кПа при частоте 1,085 МГц.

5. Установлены расчетные и экспериментальные закономерности динамического процесса формирования ТКМ на основе ТС в сильных магнитных полях. Так, определена концентрация парамагнетика в среде в диапазоне индукции магнитного поля от 1 до 31 Тл, при которой происходит левитационное формирование ТКМ. Произведено формирование ТКМ в магните Биттера при нетоксичной для клеток концентрации парамагнетика 0,8 мМоль в магнитном поле с индукцией 19 Тл. Установлено, что время формирования ТКМ из хаотично распределенных ТС составило 10 мин, время слияния - 180 мин. Анализ ТС не выявил цитотоксичного воздействия магнитного поля напряженностью до 30 Тл в течении 1 ч воздействия.

6. Теоретически и экспериментально выявлены условия магнитоакустического формирования функциональных трубчатых образцов ТКМ эквивалентов ткани. Установлено, что: а) в магнитном поле на базе постоянных магнитов радиус тороидального образца соответствовал расчетному значению радиуса первого от центра акустического узла. Для излучаемой частоты 780 кГц расчетный и практический радиус конструкции составил 0,74 мм. Удержание полем тороидальной образца в течение 18 ч приводило к слиянию ТС, что подтверждает жизнеспособность клеток; б) в сильном магнитном поле магнита Биттера в условиях левитации в течение 120 мин сформирована ТКМ из миосфер hbSMCs при концентрации парамагнетика в среде 10 мМоль и индукции магнитного поля 10 Тл. Показаны функциональные характеристики трубчатого образца путем воздействия эндотелина-1 с концентрацией 50 нМоль, в результате чего произошло уменьшение на 30% просвета (площади поперечного сечения) образца, что свидетельствует о функциональных характеристиках материала, свойственных тканевому эквиваленту сосуда.

7. В результате исследования возможности формирования ТКМ в виде биоэквивалентов тканей различной этиологии в условиях микрогравитации на борту РС МКС в период экспедиций МКС 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63 и 66 установлено, что сформированные ТКМ из ФК обладали выраженными остеоиндуктивными потенциями в исследованиях *in vivo* по сравнению с образцами, полученными в условиях гравитации Земли. ТКМ с МКС характеризуются преобладающим образованием фазы ОКФ в отличие от образцов, полученных на Земле, где имеется до 50 % по массе примесных фаз. Антибактериальная восприимчивость ТКМ в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (*E. coli*) зависит от синтеза ТБК, при этом минимальная ингибирующая концентрация антибиотика (гентамицина) для подавления бактерий в ТБК должна быть более чем в 10 раз выше минимальной ингибирующей концентрации.

8. Установлено, что для формирования ТКМ на борту РС МКС в виде тканеинженерных образцов мягких тканей из хондросфер, тиросфер и миосфер

требовало не менее 24 ч и 48 ч в зависимости от типа использованных клеток. Минимальная концентрация парамагнетика для преодоления сил вязкостного трения среды с растворенным термочувствительным гидрогелем составила 10 мМоль. Полученные ТКМ обладали высокой жизнеспособностью и морфологией клеток характерной нативной ткани.

9. Развито новое научное направление по формированию ТКМ в условиях левитации из различных неорганических и органических материалов под воздействием физических полей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Galletti P.M., Boretos J.W. Report on the Consensus Development Conference on “Clinical Applications of Biomaterials,” 1–3 November 1983 // *J. Biomed. Mater. Res.* 1983.
2. Barinov S.M. Calcium phosphate-based ceramic and composite materials for medicine // *Russ. Chem. Rev.* 2010.
3. Santo V.E. и др. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering-part i: Recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems // *Tissue Engineering - Part B: Reviews.* 2013.
4. Hallab N.J., Jacobs J.J. Biologic effects of implant debris // *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases.* 2009.
5. Elliott J.C. (James C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. 387 с.
6. Vallet-Regí M., González-Calbet J.M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues // *Progress in Solid State Chemistry.* 2004.
7. Hull C.W. US Patent for Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography Patent (Patent # 4,575,330 issued March 11, 1986).
8. Deckard Carl R. Method and apparatus for producing parts by selective sintering: пат. US4863538A USA. 1986.
9. Sachs Emanuel M. и др. Three-dimensional printing techniques : пат. US5340656A USA. 1989.
10. Crump S. Scott. - Apparatus and method for creating three-dimensional objects - Google Patents: пат. US5121329A USA. 1989.
11. Reichert J.C. и др. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones // *Sci. Transl. Med. Sci Transl Med,* 2012. Т. 4, № 141.
12. Hutmacher D.W. A road map for a tissue engineering concept for restoring structure and function after limb loss // *J. Mater. Sci. Mater. Med. J Mater Sci Mater Med,* 2013. Т. 24, № 11. С. 2659–2663.
13. Murphy S. V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs // *Nature*

- Biotechnology. Nature Publishing Group, 2014. Т. 32, № 8. С. 773–785.
14. Chang C.C. и др. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011. Т. 98, № 1. С. 160–170.
  15. Jeong C.G., Atala A. 3D Printing and Biofabrication for Load Bearing Tissue Engineering // *Adv. Exp. Med. Biol. Adv Exp Med Biol*, 2015. Т. 881. С. 3–14.
  16. Pati F. и др. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink // *Nat. Commun. Nat Commun*, 2014. Т. 5.
  17. Nakamura M. и др. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication // *Biofabrication. Biofabrication*, 2010. Т. 2, № 1.
  18. Murphy S. V., Skardal A., Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications // *J. Biomed. Mater. Res. A. J Biomed Mater Res A*, 2013. Т. 101, № 1. С. 272–284.
  19. Skardal A., Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting // *Ann. Biomed. Eng. Ann Biomed Eng*, 2015. Т. 43, № 3. С. 730–746.
  20. Kang H.W. и др. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity // *Nat. Biotechnol. Nat Biotechnol*, 2016. Т. 34, № 3. С. 312–319.
  21. Devillard R. и др. Cell patterning by laser-assisted bioprinting // *Methods Cell Biol. Methods Cell Biol*, 2014. Т. 119. С. 159–174.
  22. Xiong R. и др. Freeform drop-on-demand laser printing of 3D alginate and cellular constructs // *Biofabrication. Biofabrication*, 2015. Т. 7, № 4.
  23. Kolesky D.B. и др. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. Т. 113, № 12. С. 3179–3184.
  24. Nair K. и др. Characterization of cell viability during bioprinting processes // *Biotechnol. J. Biotechnol J*, 2009. Т. 4, № 8. С. 1168–1177.
  25. Jang J. и др. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair // *Biomaterials. Biomaterials*, 2017. Т. 112. С. 264–274.

26. Mironov V. и др. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks // *Biomaterials*. *Biomaterials*, 2009. Т. 30, № 12. С. 2164–2174.
27. Moldovan L. и др. iPSC-Derived Vascular Cell Spheroids as Building Blocks for Scaffold-Free Biofabrication // *Biotechnol. J.* *Biotechnol J*, 2017. Т. 12, № 12.
28. Vallières K. и др. Human adipose-derived stromal cells for the production of completely autologous self-assembled tissue-engineered vascular substitutes // *Acta Biomater.* *Acta Biomater*, 2015. Т. 24. С. 209–219.
29. Moldovan N.I., Hibino N., Nakayama K. Principles of the kenzan method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting // *Tissue Eng. - Part B Rev.* *Mary Ann Liebert Inc.*, 2017. Т. 23, № 3. С. 237–244.
30. Gettler B.C. и др. Formation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cell-Laden Spheroids Using a Three-Dimensional Bioprinter and Superhydrophobic Surfaces // *Tissue Eng. Part C. Methods.* *Tissue Eng Part C Methods*, 2017. Т. 23, № 9. С. 516–524.
31. Yipeng J. и др. Microtissues Enhance Smooth Muscle Differentiation and Cell Viability of hADSCs for Three Dimensional Bioprinting // *Front. Physiol.* *Front Physiol*, 2017. Т. 8, № JUL.
32. Foty R.A. и др. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior // *Development.* *Development*, 1996. Т. 122, № 5. С. 1611–1620.
33. Foty R.A., Steinberg M.S. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation // *Dev. Biol.* *Dev Biol*, 2005. Т. 278, № 1. С. 255–263.
34. Shafiee A. и др. Post-deposition bioink self-assembly: a quantitative study // *Biofabrication.* *Biofabrication*, 2015. Т. 7, № 4.
35. McCune M. и др. Predictive modeling of post bioprinting structure formation // *Soft Matter.* *Soft Matter*, 2014. Т. 10, № 11. С. 1790–1800.
36. Sego T.J. и др. A heuristic computational model of basic cellular processes and oxygenation during spheroid-dependent biofabrication // *Biofabrication.* *Biofabrication*, 2017. Т. 9, № 2.
37. R L., JP V. Tissue engineering // *Science.* *Science*, 1993. Т. 260, № 5110. С. 920–

- 926.
38. JPK A., MM S. Using Remote Fields for Complex Tissue Engineering // Trends Biotechnol. Trends Biotechnol, 2020. Т. 38, № 3. С. 254–263.
  39. Парфенов Владислав Александрович и др. Формативная фабрикация: новая индустрия // Природа. 2022. Т. 1278, № 2.
  40. Parfenov V.A. и др. Scaffold-free, label-free and nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly. // Biofabrication. 2018. Т. 10, № 3. С. 34104.
  41. Thomson W. Reprint of Papers on Electrostatics and Magnetism // undefined. Springer Nature, 1873. Т. 7, № 169. С. 218–221.
  42. Berry M.V., Geim. A.K. Of Flying Frogs and Levitrons // Eur. J. Phys. 1997. Т. 18. С. 307–313.
  43. Petrov O.F. и др. Coulomb clusters of dust particles in a cusp magnetic trap under microgravity conditions // Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys. 2012. Т. 86, № 3.
  44. Giraud-Guille M.-M., Belamie E., Mosser G. Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials // Comptes Rendus Palevol. Elsevier Masson, 2004. Т. 3, № 6–7. С. 503–513.
  45. Suba Z. и др. [Quantitative and qualitative comparison of the maxillary bone regeneration after beta-tricalcium phosphate and autogenous bone implantation]. // Fogorv. Sz. 2006. Т. 99, № 1. С. 21–28.
  46. Horowitz R.A. и др. Clinical evaluation alveolar ridge preservation with a beta-tricalcium phosphate socket graft. // Compend. Contin. Educ. Dent. Т. 30, № 9. С. 588--90, 592, 594 passim; quiz 604, 606.
  47. Stavropoulos A. и др. Clinical and histologic evaluation of granular Beta-tricalcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects: a report on five cases. // J. Periodontol. 2010. Т. 81, № 2. С. 325–334.
  48. Raksujarit A. и др. Processing and properties of nanoporous hydroxyapatite ceramics // Mater. Des. 2010. Т. 31, № 4. С. 1658–1660.
  49. Brown W.E. и др. Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystallographic

- and Chemical Relations between Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite // Nature. Nature Publishing Group, 1962. T. 196, № 4859. С. 1050–1055.
50. Komlev V.S. и др. 3D Printing of Octacalcium Phosphate Bone Substitutes. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. Т. 3. С. 81.
  51. Guo D., Xu K., Han Y. The in situ synthesis of biphasic calcium phosphate scaffolds with controllable compositions, structures, and adjustable properties. // J. Biomed. Mater. Res. A. 2009. Т. 88, № 1. С. 43–52.
  52. Schumacher M. и др. Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2010. Т. 21, № 12. С. 3119–3127.
  53. Detsch R. и др. In vitro -Osteoclastic Activity Studies on Surfaces of 3D Printed Calcium Phosphate Scaffolds // J. Biomater. Appl. 2011. Т. 26, № 3. С. 359–380.
  54. Rath S.N. и др. Osteoinduction and survival of osteoblasts and bone-marrow stromal cells in 3D biphasic calcium phosphate scaffolds under static and dynamic culture conditions. // J. Cell. Mol. Med. 2012. Т. 16, № 10. С. 2350–2361.
  55. Melchels F.P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering // Biomaterials. 2010. Т. 31, № 24. С. 6121–6130.
  56. Shirazi S.F.S. и др. A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: Selective laser sintering and inkjet 3D printing // Science and Technology of Advanced Materials. 2015.
  57. Negro A., Cherbuin T., Lutolf M.P. 3D Inkjet Printing of Complex, Cell-Laden Hydrogel Structures // Sci. Rep. 2018. Т. 8, № 1. С. 17099.
  58. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // Biotechnology Journal. Wiley-VCH Verlag, 2008. Т. 3, № 9–10. С. 1172–1184.
  59. Achilli T.M., Meyer J., Morgan J.R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids // Expert Opinion on Biological Therapy. Expert Opin Biol Ther, 2012. Т. 12, № 10. С. 1347–1360.

60. Fennema E. и др. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues // Trends Biotechnol. Elsevier Ltd, 2013. Т. 31, № 2. С. 108–115.
61. Chatzinikolaidou M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation // Drug Discovery Today. Elsevier Ltd, 2016. Т. 21, № 9. С. 1553–1560.
62. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation // Journal of the Royal Society Interface. Royal Society, 2017. Т. 14, № 127.
63. Kelm J.M. и др. A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: Self-assembly of microtissue building blocks // J. Biotechnol. J Biotechnol, 2010. Т. 148, № 1. С. 46–55.
64. Mattix B. и др. Biological magnetic cellular spheroids as building blocks for tissue engineering // Acta Biomater. Elsevier Ltd, 2014. Т. 10, № 2. С. 623–629.
65. Mehesz A.N. и др. Scalable robotic biofabrication of tissue spheroids // Biofabrication. Biofabrication, 2011. Т. 3, № 2.
66. Koudan E. V. и др. The Scalable Standardized Biofabrication of Tissue Spheroids from Different Cell Types Using Nonadhesive Technology // 3D Print. Addit. Manuf. Mary Ann Liebert Inc., 2017. Т. 4, № 1. С. 53–60.
67. Hesvani Y.D. и др. Design and implementation of novel multifunctional 3d bioprinter // 3D Print. Addit. Manuf. Mary Ann Liebert Inc., 2016. Т. 3, № 1. С. 65–68.
68. Gutzweiler L. и др. Large scale production and controlled deposition of single HUVEC spheroids for bioprinting applications // Biofabrication. Institute of Physics Publishing, 2017. Т. 9, № 2.
69. Bulanova E.A. и др. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct // Biofabrication. 2017. Т. 9, № 3.
70. Kelm J.M. и др. Design of custom-shaped vascularized tissues using microtissue spheroids as minimal building units // Tissue Eng. Tissue Eng, 2006. Т. 12, № 8. С. 2151–2160.
71. Pérez-Pomares J.M., Foty R.A. Tissue fusion and cell sorting in embryonic development and disease: Biomedical implications // BioEssays. Bioessays, 2006.

- T. 28, № 8. С. 809–821.
72. Kim T.G. и др. Hierarchically assembled mesenchymal stem cell spheroids using biomimicking nanofilaments and microstructured scaffolds for vascularized adipose tissue engineering // *Adv. Funct. Mater.* 2010. Т. 20, № 14. С. 2303–2309.
  73. Schon B.S. и др. Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs // *Cell and Tissue Research. Cell Tissue Res*, 2012. Т. 347, № 3. С. 629–642.
  74. Laronda M.M. и др. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2017. Т. 8.
  75. Chua K.N. и др. Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold // *Biomaterials. Biomaterials*, 2005. Т. 26, № 15. С. 2537–2547.
  76. Beachley V. и др. The fusion of tissue spheroids attached to pre-stretched electrospun polyurethane scaffolds // *J. Tissue Eng. SAGE Publications Ltd*, 2014. Т. 5.
  77. Koudan E. V. и др. Patterning of tissue spheroids biofabricated from human fibroblasts on the surface of electrospun polyurethane matrix using 3D bioprinter // *Int. J. Bioprinting. Whioce Publishing Pte. Ltd.*, 2016. Т. 2, № 1. С. 45–52.
  78. Lin R.Z. и др. Magnetic reconstruction of three-dimensional tissues from multicellular spheroids // *Tissue Eng. - Part C Methods. Mary Ann Liebert Inc.*, 2008. Т. 14, № 3. С. 197–205.
  79. Ho V.H.B. и др. Generation and manipulation of magnetic multicellular spheroids // *Biomaterials. Biomaterials*, 2010. Т. 31, № 11. С. 3095–3102.
  80. Bratt-Leal A.M. и др. Magnetic manipulation and spatial patterning of multicellular stem cell aggregates // *Integr. Biol. Integr Biol (Camb)*, 2011. Т. 3, № 12. С. 1224–1232.
  81. Whatley B.R. и др. Magnetic-directed patterning of cell spheroids // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A. John Wiley and Sons Inc.*, 2014. Т. 102, № 5. С. 1537–1547.
  82. Luciani N. и др. Successful chondrogenesis within scaffolds, using magnetic stem

- cell confinement and bioreactor maturation // *Acta Biomater.* Elsevier Ltd, 2016. Т. 37. С. 101–110.
83. Parfenov V.A. и др. Biofabrication of a Functional Tubular Construct from Tissue Spheroids Using Magnetoacoustic Levitational Directed Assembly // *Adv. Healthc. Mater.* Wiley-VCH Verlag, 2020.
84. Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2012. Т. 338, № 6109. С. 921–926.
85. Устройство для биопечати одиночными тканевыми сфероидами и используемая в нем печатающая головка: патент 2701330 С1 Рос. Федерация: МПК C12N5/07 C12M3/00.
86. Cell structure production device: патент WO2012176751A1 Япония: C12M33/04.
87. Lang M. и др. Integrated system for 3D assembly of bio-scaffolds and cells // 2010 IEEE International Conference on Automation Science and Engineering, CASE 2010. 2010. С. 786–791.
88. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // *Biomater. Silver Jubil. Compend.* 2000. Т. 21. С. 175–189.
89. DuRaine G.D. и др. Emergence of Scaffold-Free Approaches for Tissue Engineering Musculoskeletal Cartilages // *Ann. Biomed. Eng.* 2015. Т. 43, № 3. С. 543–554.
90. Norotte C. и др. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting // *Biomaterials.* 2009. Т. 30, № 30. С. 5910–5917.
91. Ito A. и др. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. // *Tissue Eng.* 2005. Т. 11, № 9–10. С. 1553–1561.
92. Mironov V., Kasyanov V., Markwald R.R. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication // *Trends in Biotechnology.* Trends Biotechnol, 2008. Т. 26, № 6. С. 338–344.
93. Ito A. и др. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force // *Tissue Eng.* Tissue Eng, 2004. Т. 10, № 5–6. С. 873–880.

94. Chaudhary S. и др. Elucidating the function of penetratin and a static magnetic field in cellular uptake of magnetic nanoparticles // *Pharmaceuticals*. MDPI AG, 2013. Т. 6, № 2. С. 204–222.
95. Lewis E.E.L. и др. The influence of particle size and static magnetic fields on the uptake of magnetic nanoparticles into three dimensional cell-seeded collagen gel cultures // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* John Wiley and Sons Inc., 2015. Т. 103, № 6. С. 1294–1301.
96. Jeong Y.G. и др. A scaffold-free surface culture of B16F10 murine melanoma cells based on magnetic levitation // *Cytotechnology*. Springer Netherlands, 2016. Т. 68, № 6. С. 2323–2334.
97. Mazuel F. и др. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2016. Т. 10, № 8. С. 7627–7638.
98. Simon M.D., Geim A.K. Diamagnetic levitation: Flying frogs and floating magnets "(nvited)) // *J. Appl. Phys.* 2000. Т. 87, № 9.
99. Mirica K.A. и др. Using Magnetic Levitation for Three Dimensional Self-Assembly // *Adv. Mater.* 2011. Т. 23, № 36. С. 4134–4140.
100. Tasoglu S. и др. Levitational Image Cytometry with Temporal Resolution // *Adv. Mater.* Wiley-VCH Verlag, 2015. Т. 27, № 26. С. 3901–3908.
101. Durmus N.G. и др. Magnetic levitation of single cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. Т. 112, № 28. С. E3661–E3668.
102. BEAUGNON E., TOURNIER R. Levitation of organic materials // *Nature*. 1991. Т. 349, № 6309. С. 470.
103. Ikezoe Y. и др. Making water levitate // *Nature*. 1998. Т. 393, № 6687. С. 749–750.
104. GE S. и др. Magnetic Levitation in Chemistry, Materials Science, and Biochemistry // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2019.
105. Winkleman A. и др. A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer // *Appl. Phys. Lett.* 2004. Т. 85, № 12. С. 2411–2413.
106. Xu F. и др. Three-Dimensional Magnetic Assembly of Microscale Hydrogels // *Adv. Mater.* 2011. Т. 23, № 37. С. 4254–4260.

107. Tocchio A. и др. Magnetically Guided Self-Assembly and Coding of 3D Living Architectures. // *Adv. Mater.* 2018. Т. 30, № 4. С. 1705034.
108. Chen P. и др. Microscale assembly directed by liquid-based template // *Adv. Mater.* 2014.
109. Bouyer C. и др. A Bio-Acoustic Levitational (BAL) Assembly Method for Engineering of Multilayered, 3D Brain-Like Constructs, Using Human Embryonic Stem Cell Derived Neuro-Progenitors // *Adv. Mater.* 2016.
110. Desai P.K., Tseng H., Souza G.R. Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Т. 18, № 5. С. 1085.
111. Raji M.A. и др. Cytotoxicity of synthesized Iron Oxide nanoparticles: toward novel biomarkers of colon cancer. // *Conf. Proc. ... Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf. IEEE, 2014.* Т. 2014. С. 6179–6182.
112. Rogosnitzky M., Branch S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms // *BioMetals.* Springer Netherlands, 2016. Т. 29, № 3. С. 365–376.
113. Anil-Inevi M. и др. Biofabrication of in situ Self Assembled 3D Cell Cultures in a Weightlessness Environment Generated using Magnetic Levitation // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2018. Т. 8, № 1.
114. Freed L.E. и др. Tissue engineering of cartilage in space // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A,* 1997. Т. 94, № 25. С. 13885–13890.
115. Grimm D. и др. Growing tissues in real and simulated microgravity: New methods for tissue engineering // *Tissue Engineering - Part B: Reviews.* Mary Ann Liebert Inc., 2014. Т. 20, № 6. С. 555–566.
116. Kopp S. и др. Mechanisms of three-dimensional growth of thyroid cells during long-term simulated microgravity // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2015. Т. 5.
117. Frasca G. и др. Magnetically shaped cell aggregates: From granular to contractile materials // *Soft Matter.* Royal Society of Chemistry, 2014. Т. 10, № 28. С. 5045–5054.

118. Singh D. и др. Bench-to-bedside translation of magnetic nanoparticles // *Nanomedicine. Future Medicine Ltd.*, 2014. Т. 9, № 4. С. 501–516.
119. McLeod B.R., Sandvik E.L. A biofilm growth protocol and the design of a magnetic field exposure setup to be used in the study of magnetic fields as a means of controlling bacterial biofilms // *Bioelectromagnetics. Bioelectromagnetics*, 2010. Т. 31, № 1. С. 56–63.
120. Basu J., Ludlow J.W. Platform technologies for tubular organ regeneration. // *Trends Biotechnol.* 2010. Т. 28, № 10. С. 526–533.
121. Weinberg C.B., Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells // *Science (80-. )*. 1986. Т. 231, № 4736. С. 397–400.
122. L'heureux N. и др. A completely biological tissue-engineered human blood vessel // *FASEB J.* 1998. Т. 12, № 1. С. 47–56.
123. Seliktar D. и др. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro // *Ann. Biomed. Eng. Am Inst Phys*, 2000. Т. 28, № 4. С. 351–362.
124. Kubo H. и др. Creation of myocardial tubes using cardiomyocyte sheets and an in vitro cell sheet-wrapping device. // *Biomaterials.* 2007. Т. 28, № 24. С. 3508–3516.
125. Othman R. и др. An automated fabrication strategy to create patterned tubular architectures at cell and tissue scales // *Biofabrication. IOP Publishing*, 2015. Т. 7, № 2. С. 25003.
126. Cattani V. и др. Mechanical stimuli-induced urothelial differentiation in a human tissue-engineered tubular genitourinary graft. // *Eur. Urol.* 2011. Т. 60, № 6. С. 1291–1298.
127. van Velthoven M.J.J. и др. Gel casting as an approach for tissue engineering of multilayered tubular structures // *Tissue Eng. Part C Methods.* 2020. С. 1–22.
128. Yang J. и др. Generation of Human Liver Chimeric Mice with Hepatocytes from Familial Hypercholesterolemia Induced Pluripotent Stem Cells. // *Stem cell reports.* 2017. Т. 8, № 3. С. 605–618.
129. L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini R.L. и др. Functional arteries grown in vitro. // *Science (80-. )*. 1999. Т. 284, № April. С. 286

- 489–493.
130. Hibino N. и др. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. Mosby Inc., 2010. Т. 139, № 2. С. 431--6, 436.e1--2.
  131. Schutte S.C. и др. Cyclic strain improves strength and function of a collagen-based tissue-engineered vascular media // Tissue Eng. - Part A. Mary Ann Liebert Inc., 2010. Т. 16, № 10. С. 3149–3157.
  132. Tillman B.W. и др. Bioengineered vascular access maintains structural integrity in response to arteriovenous flow and repeated needle puncture. // J. Vasc. Surg. 2012. Т. 56, № 3. С. 783–793.
  133. Olausson M. и др. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: A proof-of-concept study // Lancet. Lancet Publishing Group, 2012. Т. 380, № 9838. С. 230–237.
  134. Versteegden L.R. и др. Tubular collagen scaffolds with radial elasticity for hollow organ regeneration. // Acta Biomater. Acta Materialia Inc, 2017. Т. 52. С. 1–8.
  135. De Filippo R.E. и др. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices. // J. Tissue Eng. Regen. Med. John Wiley and Sons Ltd, 2015. Т. 9, № 3. С. 257–264.
  136. Orabi H. и др. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: a preclinical study. // Eur. Urol. 2013. Т. 63, № 3. С. 531–538.
  137. Raya-Rivera A. и др. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: An observational study // Lancet. 2011. Т. 377, № 9772. С. 1175–1182.
  138. Zhang K. и др. 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment. // Acta Biomater. Elsevier Ltd, 2017. Т. 50. С. 154–164.
  139. Pi Q. и др. Digitally Tunable Microfluidic Bioprinting of Multilayered Cannular Tissues. // Adv. Mater. Wiley-VCH Verlag, 2018. Т. 30, № 43. С. e1706913.
  140. Itoh M. и др. Scaffold-free tubular tissues created by a bio-3D printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in rat aortae // PLoS One. Public

Library of Science, 2015. Т. 10, № 9.

141. Chen P. и др. Bioacoustic-enabled patterning of human iPSC-derived cardiomyocytes into 3D cardiac tissue // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2017. Т. 131. С. 47–57.
142. Zhu Y. и др. Tissue Engineering of 3D Organotypic Microtissues by Acoustic Assembly. // *Methods Mol. Biol.* Humana Press Inc., 2019. Т. 1576. С. 301–312.
143. Ren T. и др. Soft Ring-Shaped Cellu-Robots with Simultaneous Locomotion in Batches. // *Adv. Mater.* Wiley-VCH Verlag, 2020. Т. 32, № 8. С. e1905713.
144. Free-form spatial 3-D printing using part levitation: патент US9908288B2 США.
145. Printer device using acoustic levitation: патент WO2019078639A1.
146. Method for 3d printing and 3d printer using ultrasound: патент KR102140967B1.
147. Parfenov V.A. и др. Fabrication of calcium phosphate 3D scaffolds for bone repair using magnetic levitational assembly // *Sci. Rep.* 2020. Т. 10, № 1.
148. Dominici M. и др. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. Cytotherapy, 2006. Т. 8, № 4. С. 315–317.
149. Iñiguez-Moreno M., Gutiérrez-Lomelí M., Avila-Novoa M.G. Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries // *Int. J. Food Microbiol.* Elsevier B.V., 2019. Т. 303. С. 32–41.
150. Olaf Ronneberger, Thomas Brox. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation // *arXiv*. 2015.
151. Suzuki S., be K.A. Topological structural analysis of digitized binary images by border following // *Comput. Vision, Graph. Image Process.* 1985. Т. 30, № 1. С. 32–46.
152. D'Yachkov L.G. и др. Two-dimensional and three-dimensional Coulomb clusters in parabolic traps // *Phys. Plasmas*. 2014. Т. 21, № 9.
153. Myasnikov M.I. и др. Coulomb Scatter of Diamagnetic Dust Particles in a Cusp Magnetic Trap under Microgravity Conditions. 2017. Т. 124, № 2. С. 318–319.
154. Tasoglu S. и др. Magnetic Levitational Assembly for Living Material Fabrication.

- // Adv. Healthc. Mater. 2015. Т. 4, № 10. С. 1422,1469-1476.
155. Parfenov V.A. и др. Scaffold-free and label-free biofabrication technology using levitational assembly in a high magnetic field // Biofabrication. 2020. Т. 12, № 4.
  156. Cathignol D., Sapozhnikov O.A., Zhang J. // J. Acoust. Soc. Amer. 1997. V. 101. P. 1286.
  157. Тихонов А.Н., Самарский А.А. Уравнения математической физики. М.: Наука, 1966.
  158. Андреев В.Г., Демин И.Ю., Корольков З.А., Шанин А.В. // Изв. РАН. Сер. физ. 2016. Т. 80. № 10. С. 1321; Andreev V.G., Demin I.Y., Korolkov Z.A., Shanin A.V. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2016. V. 80. No. 10. P. 1191.
  159. Горьков Л.П. // Докл. АН СССР. 1961. Т. 140. № 1. С. 88; Gorkov L.P. // Sov. Phys. Dokl. 1962. V. 6. P. 773.
  160. Крохмаль А.А. и др. Создание полых цилиндрических конструкторов из тканевых сфероидов с помощью акустической радиационной силы // Известия РАН. Серия физическая. 2021. Т. 85, № 6. С. 883–888.
  161. Sapozhnikov O.A., Bailey M.R. // J. Acoust. Soc. Amer. 2013. V. 133. No. 2. P. 661.
  162. Gor'kov L.P., P. L. On the Forces Acting on a Small Particle in an Acoustical Field in an Ideal Fluid // SPhD. 1962. Т. 6. С. 773.
  163. Krokhamal A. и др. Assembly of a ring-shaped construct from tissue spheroids in a magneto-acoustic field // Proceedings of Meetings on Acoustics. 2019. Т. 38, № 1.
  164. [https://www.hfml.ru.nl/luong/cal\\_cell1.htm](https://www.hfml.ru.nl/luong/cal_cell1.htm) [Электронный ресурс].
  165. A.V. Nikolaeva, et al., “Simulating and measuring the acoustic radiation force of a focused ultrasonic beam on elastic spheres in water”, Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics 83, pp. 77–81 (2019).
  166. Chiba S. и др. Effect of resorption rate and osteoconductivity of biodegradable calcium phosphate materials on the acquisition of natural bone strength in the repaired bone // J. Biomed. Mater. Res. Part A. 2016. Т. 104, № 11. С. 2833–2842.
  167. Komlev V.S. и др. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behavior. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014. Т. 6, № 19. С.

- 16610–16620.
168. Sazaki G. Crystal quality enhancement by magnetic fields. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009. Т. 101, № 1–3. С. 45–55.
  169. Doremus R.H. *Bioceramics* // *J. Mater. Sci.* Kluwer Academic Publishers, 1992. Т. 27, № 2. С. 285–297.
  170. Marcacci M. и др. Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. // *Calcif. Tissue Int.* 1999. Т. 64, № 1. С. 83–90.
  171. Kotobuki N. и др. Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. // *Biomaterials.* 2005. Т. 26, № 7. С. 779–785.
  172. Subramaniam A.B. и др. Noncontact orientation of objects in three-dimensional space using magnetic levitation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2014. Т. 111, № 36. С. 12980–12985.
  173. Susienka M.J., Wilks B.T., Morgan J.R. Quantifying the kinetics and morphological changes of the fusion of spheroid building blocks. // *Biofabrication.* 2016. Т. 8, № 4. С. 45003.
  174. Siebold R. и др. Good clinical and MRI outcome after arthroscopic autologous chondrocyte implantation for cartilage repair in the knee // *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* Springer Verlag, 2018. Т. 26, № 3. С. 831–839.
  175. Bartz C. и др. An ex vivo human cartilage repair model to evaluate the potency of a cartilage cell transplant // *J. Transl. Med.* BioMed Central Ltd., 2016. Т. 14, № 1.
  176. Jörg Handschel U.M. Cartilage defect regeneration by ex vivo engineered autologous microtissue--preliminary results - PubMed // *In Vivo.* Mar-Apr 2012;26(2):251-7. 2012.
  177. Patil U.S. и др. In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles // *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG, 2015. Т. 16, № 10. С. 24417–24450.
  178. Li F. и др. Computation of Equilibrium Bilayer Monodisperse Foam Structures Using the Surface Evolver // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2017. Т. 7, № 1.
  179. Fayol D. и др. Use of magnetic forces to promote stem cell aggregation during

- differentiation, and cartilage tissue modeling // *Adv. Mater.* Adv Mater, 2013. T. 25, № 18. С. 2611–2616.
180. Van de Walle A., Wilhelm C., Luciani N. 3D magnetic stem cell aggregation and bioreactor maturation for cartilage regeneration // *J. Vis. Exp. Journal of Visualized Experiments*, 2017. T. 2017, № 122.
181. Türker E., Demirçak N., Arslan-Yildiz A. Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation // *Biomater. Sci. Royal Society of Chemistry*, 2018. T. 6, № 7. С. 1745–1753.
182. Todd D.J., Kay J. Gadolinium-Induced Fibrosis // *Annu. Rev. Med.* 2016. T. 67, № 1. С. 273–291.
183. Shah A.H., Olivero J.J. Gadolinium-Induced Nephrogenic Systemic Fibrosis. // *Methodist Debaquey Cardiovasc. J.* T. 13, № 3. С. 172–173.
184. Nakahara T. и др. Effects of Exposure of CHO-K1 Cells to a 10-T Static Magnetic Field // *Radiology*. 2002. T. 224, № 3. С. 817–822.
185. Guoping Z. и др. Effects of 13 T Static Magnetic Fields (SMF) in the Cell Cycle Distribution and Cell Viability in Immortalized Hamster Cells and Human Primary Fibroblasts Cells // *Plasma Sci. Technol.* IOP Publishing, 2010. T. 12, № 1. С. 123–128.
186. Valiron O. и др. Cellular disorders induced by high magnetic fields // *J. Magn. Reson. Imaging*. 2005. T. 22, № 3. С. 334–340.
187. Zhang L. и др. 27 T ultra-high static magnetic field changes orientation and morphology of mitotic spindles in human cells. // *Elife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 2017. T. 6.
188. Laschke M.W., Menger M.D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering // *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 2017. T. 35, № 2. С. 133–144.
189. Gentile C. и др. VEGF-mediated fusion in the generation of uniluminal vascular spheroids // *Dev. Dyn.* Dev Dyn, 2008. T. 237, № 10. С. 2918–2925.
190. Fleming P.A. и др. Fusion of uniluminal vascular spheroids: A model for assembly of blood vessels // *Dev. Dyn.* Dev Dyn, 2010. T. 239, № 2. С. 398–406.

191. Laschke M.W., Menger M.D. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications // *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 2017. Т. 35, № 6. С. 782–791.
192. Holland I. и др. 3D biofabrication for tubular tissue engineering // *Bio-Design and Manufacturing*. Springer, 2018. Т. 1, № 2. С. 89–100.
193. Zhou S. и др. Fabrication of Tissue-Engineered Bionic Urethra Using Cell Sheet Technology and Labeling By Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide for Full-Thickness Urethral Reconstruction. // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2017. Т. 7, № 9. С. 2509–2523.
194. Roby T., Olsen S., Nagatomi J. Effect of sustained tension on bladder smooth muscle cells in three-dimensional culture // *Ann. Biomed. Eng.* Ann Biomed Eng, 2008. Т. 36, № 10. С. 1744–1751.
195. Fusto A. и др. Cored in the act: The use of models to understand core myopathies // *DMM Disease Models and Mechanisms*. Company of Biologists Ltd, 2019. Т. 12, № 12.
196. Parfenov V.A. и др. Magnetic levitational bioassembly of 3D tissue construct in space // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science, 2020. Т. 6, № 29.
197. Mandel S., Tas A.C. Brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) to octacalcium phosphate ( $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) transformation in DMEM solutions at 36.5 °C // *Mater. Sci. Eng.* С. 2010.
198. Petrakova N. V. и др. In Vitro Study of Octacalcium Phosphate Behavior in Different Model Solutions // *ACS Omega*. 2021.
199. Barinov S.M. и др. Carbonate loss from two magnesium-substituted carbonated apatites prepared by different synthesis techniques // *Mater. Res. Bull.* 2006.
200. Barinov S.M. и др. Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006.
201. Tortet L. и др. Study of Protonic Mobility in  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Brushite) and  $\text{CaHPO}_4$ (Monetite) by Infrared Spectroscopy and Neutron Scattering // *J. Solid State Chem.* 1997.

202. El-Habeeb A.A., Refat M.S. Three New Complexes of Theophylline Drug with Sc(III), Nb(V), and W(VI) Ions: Spectroscopic, Thermal Stability, and Antimicrobial Studies // Russ. J. Gen. Chem. 2018.
203. Bakan F. A systematic study of the effect of pH on the initialization of Ca-deficient hydroxyapatite to  $\beta$ -TCP nanoparticles // Materials (Basel). 2019.
204. Xu J., Butler I.S., Gilson D.F.R. FT-Raman and high-pressure infrared spectroscopic studies of dicalcium phosphate dihydrate ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and anhydrous dicalcium phosphate ( $\text{CaHPO}_4$ ) // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 1999.
205. Tuncer M. и др. Capacitive behaviour of nanocrystalline octacalcium phosphate (OCP) ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) as an electrode material for supercapacitors: Biosupercaps // Nanoscale. 2019.
206. Jehlička J., Culka A. Raman spectra of nitrogen-containing organic compounds obtained using a portable instrument at  $-15^\circ\text{C}$  at 2860 m above sea level // J. Raman Spectrosc. 2010.
207. Kim J.S. и др. Octacalcium phosphate bone substitute (Bontree®): From basic research to clinical case study // Appl. Sci. 2021.
208. Lundager Madsen H.E. и др. Crystallization of calcium phosphate in microgravity // Adv. Sp. Res. 1995.
209. Suvorova E.I. и др. Terrestrial and space-grown HAP and OCP crystals: Effect of growth conditions on perfection and morphology // J. Cryst. Growth. 1998.
210. Bergeon N. и др. Dynamics of interface pattern formation in 3D alloy solidification: First results from experiments in the DECLIC directional solidification insert on the International Space Station // Journal of Materials Science. 2011.
211. Brown W.E. и др. Crystallography of octacalcium phosphate [5] // Journal of the American Chemical Society. 1957.
212. Chickerur N.S., Tung M.S., Brown W.E. A mechanism for incorporation of carbonate into apatite // Calcif. Tissue Int. 1980.
213. Mathew M. и др. Crystal structure of octacalcium bis(hydrogenphosphate) tetrakis(phosphate)pentahydrate,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  // J. Crystallogr.

- Spectrosc. Res. 1988.
214. Madsen H.E.L. и др. Calcium phosphate crystallization under terrestrial and microgravity conditions // *J. Cryst. Growth*. 1995.
  215. Arellano-Jiménez M.J., García-García R., Reyes-Gasga J. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction // *J. Phys. Chem. Solids*. 2009.
  216. Robert M.C., Lefauchaux F., Authier A. Simulation and results of a Spacelab growth experiment. Growth and characterization of brushite and lead monetite // *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr*. 1984.
  217. Komlev V.S., Barinov S.M., Koplík E. V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release // *Biomaterials*. 2002.
  218. Murzakhanov F.F. и др. Radiation-induced stable radicals in calcium phosphates: Results of multifrequency epr, ednmr, eseem, and endor studies // *Appl. Sci*. 2021.
  219. Singh V. и др. Electron paramagnetic resonance and photoluminescence investigation on ultraviolet-emitting gadolinium-ion-doped CaAl<sub>12</sub>O<sub>19</sub> phosphors // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2015.
  220. Rau J. V. и др. Sic Parvis Magna: Manganese-Substituted Tricalcium Phosphate and Its Biophysical Properties // *ACS Biomater. Sci. Eng*. 2019.
  221. Clayton J.A. и др. Quantitative analysis of zero-field splitting parameter distributions in Gd(III) complexes // *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2018.
  222. Goldberg M. и др. Influence of Al on the Structure and in Vitro Behavior of Hydroxyapatite Nanopowders // *J. Phys. Chem. B*. 2019.
  223. Costerton J.W. и др. Microbial biofilms // *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews Inc., 1995. Т. 49. С. 711–745.
  224. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // *Nature Reviews Microbiology*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. Т. 8, № 9. С. 623–633.
  225. Zhang R. и др. Biofilm dynamics and EPS production of a thermoacidophilic bioleaching archaeon // *N. Biotechnol. Elsevier B.V.*, 2019. Т. 51. С. 21–30.
  226. Gilbert P., Allison D.G., McBain A.J. Biofilms in vitro and in vivo: Do singular

- mechanisms imply cross-resistance? // *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 2002. T. 92, № 1.
227. McBain A.J. Chapter 4 In Vitro Biofilm Models. An Overview // *Advances in Applied Microbiology*. *Adv Appl Microbiol*, 2009. T. 69. C. 99–132.
228. Jass J., Costerton J.W., Lappin-Scott H.M. The effect of electrical currents and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *J. Ind. Microbiol*. Springer-Verlag, 1995. T. 15, № 3. C. 234–242.
229. Høiby N. и др. Antibiotic resistance of bacterial biofilms // *International Journal of Antimicrobial Agents*. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. T. 35, № 4. C. 322–332.
230. Walters M.C. и др. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin // *Antimicrob. Agents Chemother*. American Society for Microbiology, 2003. T. 47, № 1. C. 317–323.
231. Gominet M. и др. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? // *APMIS*. Blackwell Munksgaard, 2017. T. 125, № 4. C. 365–375.
232. Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis // *Future Microbiology*. *Future Microbiol*, 2010. T. 5, № 11. C. 1663–1674.
233. Alhede M. и др. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes // *Microbiology*. *Microbiology (Reading)*, 2009. T. 155, № 11. C. 3500–3508.
234. Alhede M. и др. Phenotypes of non-attached *pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm // *PLoS One*. *PLoS One*, 2011. T. 6, № 11.
235. Roberts A.E.L. и др. The Limitations of in Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection // *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 2015. T. 427, № 23. C. 3646–3661.
236. Zea L. и др. Phenotypic changes exhibited by *E. coli* cultured in space // *Front. Microbiol*. *Frontiers Media S.A.*, 2017. T. 8, № AUG.
237. Homøe P. и др. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media // *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009. T. 266, № 10. C. 1533–1538.

238. Nielsen S. и др. *Achromobacter* Species Isolated from Cystic Fibrosis Patients Reveal Distinctly Different Biofilm Morphotypes // *Microorganisms*. MDPI AG, 2016. Т. 4, № 3. С. 33.
239. Stoodley P. и др. Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty: A case report // *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A. Journal of Bone and Joint Surgery Inc.*, 2008. Т. 90, № 8. С. 1751–1758.
240. Fazli M. и др. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds // *J. Clin. Microbiol. J Clin Microbiol*, 2009. Т. 47, № 12. С. 4084–4089.
241. Bjarsholt T. и др. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients // *Pediatr. Pulmonol. Pediatr Pulmonol*, 2009. Т. 44, № 6. С. 547–558.
242. Jensen L.K. и др. Combined Staining Techniques for Demonstration of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Routine Histopathology // *J. Bone Jt. Infect. Copernicus GmbH*, 2018. Т. 3, № 1. С. 27–36.
243. Jung Y.G. и др. Embedded biofilm, a new biofilm model based on the embedded growth of bacteria // *Appl. Environ. Microbiol. American Society for Microbiology*, 2015. Т. 81, № 1. С. 211–219.
244. Gilbertie J.M. и др. Equine or porcine synovial fluid as a novel ex vivo model for the study of bacterial free-floating biofilms that form in human joint infections // *PLoS One. Public Library of Science*, 2019. Т. 14, № 8.
245. Haley C.L., Colmer-Hamood J.A., Hamood A.N. Characterization of biofilm-like structures formed by *Pseudomonas aeruginosa* in a synthetic mucus medium // *BMC Microbiol. BMC Microbiol*, 2012. Т. 12.
246. Goltermann L., Tolker-Nielsen T. Importance of the exopolysaccharide matrix in antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* aggregates // *Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology*, 2017. Т. 61, № 4.
247. Demirdjian S. и др. Motility-Independent Formation of Antibiotic-Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates // *Appl. Environ. Microbiol. American Society for Microbiology*, 2019. Т. 85, № 14. С. 1–12.

248. Walker J.N. и др. The Staphylococcus aureus ArlRS Two-Component System Is a Novel Regulator of Agglutination and Pathogenesis // PLoS Pathog. Public Library of Science, 2013. Т. 9, № 12. С. 1–17.
249. Sadiku M.N.O., Kujuobi C.M. Magnetic levitation // IEEE Potentials. 2006. Т. 25, № 2. С. 41–42.
250. Wang Z.M. и др. Magnetic Trapping of Bacteria at Low Magnetic Fields // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2016. Т. 6.
251. Zhou R., Wang C. Multiphase ferrofluid flows for micro-particle focusing and separation // Biomicrofluidics. American Institute of Physics Inc., 2016. Т. 10, № 3.
252. Dijkstra C.E. и др. Diamagnetic levitation enhances growth of liquid bacterial cultures by increasing oxygen availability // Journal of the Royal Society Interface. Royal Society, 2011. Т. 8, № 56. С. 334–344.
253. Sriramulu D.D. и др. Microcolony formation: A novel biofilm model of Pseudomonas aeruginosa for the cystic fibrosis lung // J. Med. Microbiol. J Med Microbiol, 2005. Т. 54, № 7. С. 667–676.
254. Nickerson C.A. и др. Microbial Responses to Microgravity and Other Low-Shear Environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev. American Society for Microbiology, 2004. Т. 68, № 2. С. 345–361.
255. Domnin P. и др. An in vitro model of nonattached biofilm-like bacterial aggregates based on magnetic levitation // Appl. Environ. Microbiol. 2020. Т. 86, № 18.
256. Souza G.R. и др. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation // Nat. Nanotechnol. Nature Publishing Group, 2010. Т. 5, № 4. С. 291–296.
257. Aleshcheva G. и др. Scaffold-free Tissue Formation Under Real and Simulated Microgravity Conditions // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2016. Т. 119. С. 26–33.

## Перечень принятых сокращений

|       |   |   |
|-------|---|---|
| 2D    | - | Двухмерная  |
| 3D    | - | Трёхмерная  |
| CAD   | - | Средства автоматизированного проектирования                                     |
| DCPA  | - | Гидроортофосфат кальция   |
| FDA   | - | Агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США                   |
| FDM   | - | Моделирование методом послойного наплавления                                    |
| hbSMC | - | Гладкомышечные клетки мочевого пузыря человека                                  |
| MSC   |   | Мезенхимальные стволовые клетки   |
| HBSS  | - | Сбалансированный солевой раствор Хэнкса   |
| IPSC  | - | Индукцированная плюрипотентная стволовая клетка                                 |
| MSC   | - | Мезенхимальные стволовые клетки   |
| NASA  | - | Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства |
| PBS   | - | Фосфатно-буферный физиологический раствор                                       |
| SHED  | - | Стволовые клетки из молочных зубов  |
| SLA   | - | Стереолитография  |
| SMC   | - | Гладкомышечная клетка   |
| XRD   | - | Рентгеновская дифрактометрия  |
| АП    | - | Аддитивное производство   |
| АТФ   | - | Аденозинтрифосфорная кислота  |
| БП    | - | Быстрое прототипирование  |
| ВТЭМ  | - | Просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения                      |
| ГА    | - | Гидроксиапатит  |
| ГКЛ   | - | Галактические космические лучи  |
| ДКФД  | - | Дикальцийфосфата дигидрата (Брушит)   |

|        |   |  |
|--------|---|--|
| КЛСМ   | - | Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия        |
| КОЭ    | - | Колониеобразующая единица                            |
| КЭ     | - | Космический эксперимент                              |
| МВ     | - | Муковисцидозом                                       |
| МД     | - | Молекулярно-динамическое моделирование               |
| МРТ    | - | Магнитно-резонансная томография                      |
| ОКФ    | - | Октакальцийфосфат                                    |
| РС МКС | - | Российский сегмент Международной космической станции |
| САПР   | - | Системы автоматизированного проектирования           |
| СЛС    | - | Селективное лазерное спекание                        |
| СЭМ    | - | Сканирующий электронный микроскоп                    |
| ТБК    | - | Трехмерный бактериальный конгломерат                 |
| ТИ     | - | Тканевая инженерия                                   |
| ТИКС   | - | Тканеинженерный кровеносный сосуд                    |
| ТКМ    | - | Трехмерный композиционный материал                   |
| ТКФ    | - | Трикальций фосфат                                    |
| УФ     | - | Ультрафиолет   |
| ФК     | - | Фосфаты кальция                                      |
| ЭДТА   | - | Этилендиаминтетрауксусная кислота                    |
| ЭПР    | - | Электронный парамагнитный резонанс                   |
| ЭЯДР   | - | Электронно-ядерный двойной резонанс                  |

## Приложение А. Акт об использовании результатов

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель генерального  
директора по развитию орбитальной  
группировки и перспективным  
проектам Госкорпорации «Роскосмос»  
  
Л.О.М. Урличич  
«14» сентября 2022г.

### АКТ об использовании результатов диссертационного исследования Парфенова В.А.

Настоящим актом подтверждается, что результаты докторской диссертационной работы Парфенова Владислава Александровича «Разработка технологии объемного формирования функциональных трехмерных структур из органических и неорганических материалов воздействием физических полей» были использованы при постановке и проведении космического эксперимента «Магнитный 3D-биопринтер» на борту Российского сегмента Международной космической станции (РС МКС) с 2018 по 2022 гг. в период экспедиций МКС № 57, 60/61, 61/62, 63, 66.

При выполнении сеансов космического эксперимента решались задачи по отработке следующих методик:

биофабрикации хрящевой ткани человека и щитовидной железы мыши в условиях микрогравитации;

формирования и перекристаллизации конструкторов из фосфатов кальция для замещения костных дефектов;

фабрикации биологических структур, состоящих из неприкрепленных биопленок микроорганизмов, клетки которых образуют пространственную структуру с измененной метаболической активностью;

выращивания кристаллов высокомолекулярных органических соединений в неоднородном магнитном поле и в условиях концентрационного градиента осадителя.

Созданное научное оборудование по указанной тематике исследования находится на борту РС МКС и может быть использовано в дальнейшем для проведения физических и биологических исследований.

Совокупность полученной научной информации от внедрения результатов диссертационного исследования Парфенова В.А. позволила достигнуть положительных результатов, которые могут быть использованы в целях решения комплексных задач по поддержанию жизнедеятельности участников длительных космических миссий, в том числе при планировании и реализации программ пилотируемых полетов на Луну и на Марс.

## Приложение Б. Акт об использовании результатов

Акционерное общество "Государственный научный центр Российской Федерации Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований" (АО "ГНЦ РФ ТРИНИТИ")

УТВЕРЖДАЮ

Председатель Научного совета

и его руководитель

АО "ГНЦ РФ ТРИНИТИ"



В.З. Черковец

2022 г.

М.П.

АКТ

об использовании результатов диссертационного исследования

**Парфенова В.А.**

Комиссия в составе:

Председатель секции №6 – кандидат физ.-мат. наук Д.В. Высоцкий.

Ученый секретарь секции – кандидат физ.-мат. наук И.В. Кочетов.

Члены комиссии составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Парфенова Владислава Александровича, представленной на соискание ученой степени доктора наук по теме: «Разработка технологии объемного формирования функциональных трехмерных структур из органических и неорганических материалов воздействием физических полей», были рассмотрены на очередном заседании научной секции АО "ГНЦ РФ ТРИНИТИ" в рамках формирования и выбора научно-исследовательской программы исследований для представления в Единый отраслевой тематический план НИОКР Госкорпорации «Росатом», с целью реализации научно-технической политики Госкорпорации «Росатом» и достижения технологического превосходства.

Совокупность рассмотренной научной информации диссертационного исследования Парфенова В.А. позволила обеспечить выбор перспективного направления НИР в области высокотехнологичных способов трехмерной биофабрикации и сформировать техническое задание на НИОКР по теме: «Разработка технологии биофабрикации клеточных эквивалентов сосудов при помощи акустических полей», реализация которого в кооперации с ведущими медицинскими и техническими учреждениями РФ позволит повысить уровень регенеративной медицины, заключающегося в сохранении здоровья, обеспечении долголетия и качества жизни пациентов.

Председатель секции № 6 Научного совета АО

«ГНЦ РФ ТРИНИТИ», кандидат физ.-мат. наук

 Д.В. Высоцкий

Ученый секретарь секции № 6 Научного совета АО

«ГНЦ РФ ТРИНИТИ», кандидат физ.-мат. наук

 И.В. Кочетов

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»  
(НИЯУ МИФИ)**

Каширское шоссе, д.31, г. Москва, 115409

Тел. (499) 324-77-77, факс (499) 324-21-11

<http://www.mephi.ru>

28.04.2022 № 576/21-23  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

СПРАВКА

о внедрении результатов диссертационного исследования В.А. Парфенова  
«Разработка технологии объемного формирования функциональных трехмерных структур из органических и неорганических материалов воздействием физических полей»,  
представленного на соискание ученой степени доктора технических наук

Результаты диссертационной работы Парфенова Владислава Александровича «Разработка технологии объемного формирования функциональных трехмерных структур из органических и неорганических материалов воздействием физических полей» внедрены в учебный процесс Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). Материалы исследования легли в основу лекции на тему «Новые направления в развитии технологии биопечати: четырехмерная биопечать, *in vivo* биопечать и формативная биофабрикация» в серии лекций по курсу «3D биопринтинг», входящему в учебный план студентов, обучающихся по направлению магистратуры 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» по образовательной программе «Биомедицинские нанотехнологии».

Первый проректор

Директор ИФИБ



О.В. Нагорнов

А.А. Гармаш

**Приложение В. Решение секции № 1 «Космическая биология и физиология» Координационного научно-технического совета Роскосмоса**

**РЕШЕНИЕ**

секции № 1 «Космическая биология и физиология»  
Координационного научно-технического совета Роскосмоса  
от 9 октября 2017 г.

Заслушав и обсудив материалы по коммерческому космическому эксперименту (КЭ) «Исследование возможности формативной трехмерной биофабрикации тканевых конструкций, осуществляемой методом программируемой самосборки в условиях микрогравитации посредством магнитного поля» (шифр «Магнитный 3D-биопринтер»), **секция решила:**

Учитывая новизну и научную значимость задач космического эксперимента «Магнитный 3D-биопринтер», по испытанию нового способа биофабрикации трехмерных тканевых конструкций в условиях космического полета - магнитной 3D-биопечати, что позволит получать тканевые конструкты и органоиды в условиях микрогравитации, а также что результаты КЭ могут быть использованы в целях изучения жизнеспособности тканевых конструктов и органоидов для последующего использования в длительных космических экспериментах, в том числе при реализации программы межпланетных пилотируемых полетов, рекомендовать КЭ «Магнитный 3D-биопринтер» для представления в КНТС Роскосмоса и включения в Долгосрочную программу НИИ.

Руководитель секции № 1

«Космическая биология и физиология» КНТС Роскосмоса

 академик РАН А.И. Григорьев

Врио ученого секретаря секции № 1

 А.М. Носовский

# Приложение Г. Техническое задание на космический эксперимент

**СОГЛАСОВАНО**

Генеральный директор  
«3Д Биопринтинг Солюшенс»

  
М.С. Баканов  
« 01 сентября » 2017 г.

2017 г.

**УТВЕРЖДАЮ**

Начальник Центра  
пилотируемых программ  
ФГУП ЦНИИ «Маш»

  
О.В. Котов  
« 01 сентября » 2017 г.

2017 г.

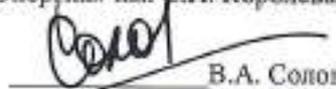
## Техническое задание на космический эксперимент

«Исследование возможности формативной трехмерной биофабрикации  
тканевых конструкций, осуществляемой методом программируемой  
самосборки в условиях микрогравитации посредством магнитного поля»  
Шифр «Магнитный 3D-биопринтер»

Инв. № 1301-30/2017

**СОГЛАСОВАНО**

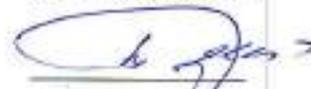
Первый заместитель генерального  
конструктора ПАО «РКК  
«Энергия» им. С.П. Королева»

  
В.А. Соловьёв  
« 13 » ноября 2017 г.

2017 г.

**СОГЛАСОВАНО**

Руководитель секции №1  
«Космическая биология и физиология»  
КНТС Роскосмоса

  
« 01 » 2017 г.

2017 г.

**СОГЛАСОВАНО**

Заместитель начальника ФГБУ  
«НИИ ЦПК имени Ю.А. Гагарина»  
по научной работе

  
В.А. Сиволап  
« 01 » 2017 г.

2017 г.

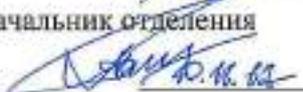
ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ

от ПАО «РКК «Энергия»  
им. С.П. Королева»

от ФГУП «ЦНИИмаш»

Руководитель НТЦ  
 А.В. Марков

Начальник отдела  
 А.В. Афанасьев

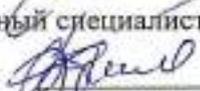
Начальник отделения  
 С.А. Бидеев

Начальник лаборатории  
 В.Н. Чикирев

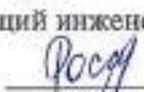
Начальник отделения  
 С.А. Фролов

Начальник сектора  
 И.Ю. Репин

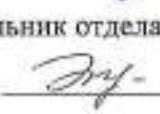
Начальник отдела  
 А.С. Соловей

Главный специалист  
 В. И. Дубинин

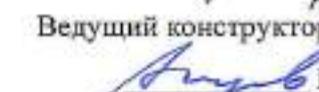
Начальник отдела  
 Р.М. Абдулхаликов

Ведущий инженер  
 Е.И. Российская

Начальник отдела  
 Е.А. Демина

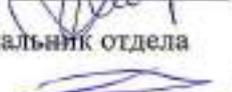
Зам. Начальник отдела  
 В.И. Станиловская  
Н.И. ТИМОФЕЕВА

от ФГБУ «НИИ ЦПК  
имени Ю.А. Гагарина»

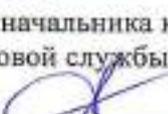
Ведущий конструктор  
 М.Ю. Виноградов

Начальник управления  
 А.А. Курицын

Ведущий инженер  
 А.В. Литвинов

Начальник отдела  
 П.А. Сабуров

Начальник отделения  
 Е.В. Попова

И.О. начальника координационно-  
плановой службы  
 Д.А. Ядренцев

 М.Ю. Виноградов  
 А.В. Литвинов / 05.11.17

## Приложение Д. Техническое задание на научную аппаратуру

СОГЛАСОВАНО

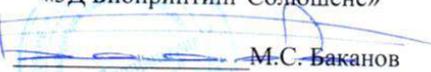
Руководитель НТЦ  
ПАО «РКК «Энергия»

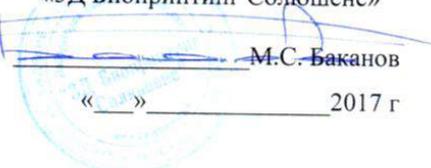
  
\_\_\_\_\_  
А.В. Марков  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор  
Частное учреждение Лаборатория  
биотехнологических исследований  
«3Д Биопринтинг Солюшенс»

  
\_\_\_\_\_  
М.С. Баканов  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г



СОГЛАСОВАНО

Зам. директора по научной работе  
ФГБУН ОИВТ РАН

  
\_\_\_\_\_  
А.В. Гавриков  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г



ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ  
НА РАЗРАБОТКУ НАУЧНОЙ АППАРАТУРЫ «3D-МБП»

№ 10-17

Всего листов 56

2017

14.12 По результатам всех наземных испытаний, а также расчетов надежности и прочности, Разработчик выпускает итоговый отчет о готовности НА «ЗД-МБП» к летным испытаниям.

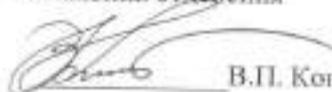
14.13 Настоящее техническое задание может изменяться и уточняться в соответствии с ГОСТ РВ 15.201-2003.

СОГЛАСОВАНО

Зам. Руководитель НТЦ

  
А.В. Марков  
А.М. Сурин

Начальник отделения

  
В.И. Коношенко

Начальник отдела

  
Р.М. Абдулхаликов  
29.09.12

Начальник отдела

  
А.С. Горджен  
29.09.12

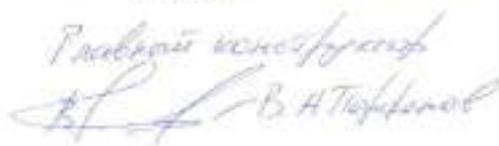
Начальник отдела

  
Д.В. Карасев  
29.09.12

/ Начальник отдела

  
М.Р. Азеев  
А.В. Монахов

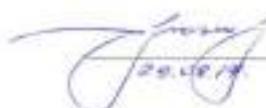
Исполнительный директор  
  
Ю.Д. Кузнецов

Главный инженер  
  
В.А. Тчуфеев

Заместитель директора  
систем А.Ф. Петров

  
Д.В. Карасев

Начальник отдела

 С.А. Прохоров

Начальник отдела

 А.С. Соловей

*Зем.* Начальник отдела

 *и.в. Милоков*  
С.В. Милоков

Начальник отдела

 С.С. Бобылев

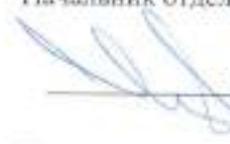
Начальник отдела

 В.И. Станиловская

*Зем.* Начальник отдела

 А.В. Захарченко

Начальник отдела

 И.В. Чурило

Ведущий научный сотрудник

 С.Ф. Савин

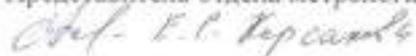
Ведущий конструктор

 М.Ю. Виноградов

Начальник отдела

 Г.В. Смолдырева

Представитель отдела метрологии

  
29.11.17

0.017  (Мяжесин П.А.)  
0.017  (Фалин В.А.)  
0.017  (Колесниченко)  
0.017  (Ильинский)  
0.017  (Климова)

 (Розина В.И.)

 (Сурин)  
02.10.17

 (Шуткин) / 29.11.17



0.311 

## Приложение Е. Технические условия на научную аппаратуру

|   |  |
|---|--|
| Согласовано   | Утверждаю  |
| Руководитель НТЦ<br>ПАО «РКК «Энергия»  | Главный конструктор<br>ЧУ Лаборатория биотехнологических исследований<br>«3Д Биопринтинг Соловьев»                               |
| <br>_____ А.В. Марков<br>«    » _____ 2018 г | <br>_____ В.А. Парфенов<br>« 12 » _____ 2018 г |
| <p>НАУЧНАЯ АППАРАТУРА<br/>«3Д – МБП»</p> <p>Технические условия</p> <p>БНРС.943129.000 ТУ</p>                                 |  |
| 2018  |  |

|         |         |         |         |
|---------|---------|---------|---------|
| Исполн. | Исполн. | Исполн. | Исполн. |
| _____   | _____   | _____   | _____   |
| Исполн. | Исполн. | Исполн. | Исполн. |
| _____   | _____   | _____   | _____   |

СОГЛАСОВАНО

От ПАО «РКК «Энергия»

От ЧУ «ЗД Биоприинтинг Соломенс»

Зам. руководителя ИТЦ

  
Д.М. Сурин



Начальник отделения

  
В.П. Коношенко

Начальник отдела

  
И.В. Чурило

И.О. Ведущего конструктора

  
К.Н. Жолоботок

|              |              |              |          |   |              |
|--------------|--------------|--------------|----------|---|--------------|
| Име. № подл. | Подп. и дата | Име. № дубл. | Взам. с. | № | Подп. и дата |
| 18/20        | 24.07.2020   |              |          |   |              |

**Приложение Ж. Заключение санитарно-гигиенической экспертизы  
№ 1336-121-07/19 биологических материалов и химических веществ для  
КЭ «Магнитный 3D-биопринтер (БТХ-53) с использованием научной  
аппаратуры «3D-МБП», планируемой к доставке на РС МКС изделием  
11Ф732 №743**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный  
центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем  
Российской академии наук (ГНЦ РФ-ИМБП РАН)  
(Дирекция Федерального космического агентства № 974К от 08.08.2008г. на осуществление  
космической деятельности)*



УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель директора  
ГНЦ РФ — ИМБП РАН  
*В. В. Богомолов*

«24» июля 2018 г.

Заключение № 1336-121-07/19  
санитарно-гигиенической экспертизы биологических материалов и химических  
веществ для КЭ «Магнитный 3D-биопринтер» (БТХ-53) с использованием научной  
аппаратуры «3D-МБП», планируемой к доставке на РС МКС изделием 11Ф732 № 743.

Санитарно-гигиеническая экспертиза проведена на основании писем и исходных данных, полученных от ПАО «РКК «Энергия» (исх. № 082-11/842 от 18.07.2019), от ЧУ «3Д Биопринтинг Соллошенс».

Представленная документация включает:

- исходные данные на 7 л;
- сводная таблица биологических и химических материалов на 22 л;
- сертификаты безопасности, паспорта на биологические объекты на 11 л.

Целью санитарно-гигиенической экспертизы биологических материалов и химических веществ для КЭ «Магнитный 3D-биопринтер» является определение соответствия их применения нормативным требованиям безопасности, указанными в ГОСТ Р 50804-95, SSP 50094, SSP 50260, ГН.2.1.6.2897-11, ГН 2.1.6.2798-10, ГН 2.2.5.2895-11.

Научная аппаратура «3D-МБП» предназначена для проведения космического эксперимента по изучению возможности формативной трехмерной биофабрикация тканевых конструкций, осуществляемой методом самосборки живых тканей и органов в условиях микрогравитации посредством магнитного поля.

Научная аппаратура «3D-МБП» доставляется на РС МКС повторно (заключение № 1247-121-07/18 от 27.07.2018). Исключением являются металлические зажимы для герметизации пакетов укладок на РС МКС, которые заменены на пластиковые хомуты из полиамида, черного цвета, запаха не имеют, с габаритами 4х300 мм. Данные пластиковые хомуты соответствуют требованиям токсикологической безопасности, указанным в ГОСТ Р 50804-95, SSP 50094, SSP 50260, ГН 2.2.5.3532-18, ГН 2.1.6.3492-17 (База данных ГНЦ РФ ИМБП РАН (свидетельство о государственной регистрации № 2018621072 от 13.07.2018 г).

могут использоваться для герметизации пакетов упаковок «Кюветы». Каждый пакет из комбинированной пленки PET/пластилен Пта-Л 05601 упаковок «Кюветы» будет зафиксирован двумя хомутами.

На РС МКС планируется доставка упаковок «Кюветы» зав. № 4, 5, 6, 7.

Кюветы с биообразцами и химическими веществами предназначены для доставки, биофабрикации, фиксации и возврата биологических образцов.

Кювета представляет собой конструкцию, состоящую из двух ёмкостей №1 и №2 с клапанными узлами для размещения питательной среды и фиксационного раствора (объемом около 0,5 мл каждая) и камеры биофабрикации (ёмкость №3, объем около 2 мл). Ёмкости имеют поршни для перемещения жидкости. Клапанные узлы предохраняют от перемещения жидкости из ёмкостей в камеру биофабрикации без нажатия на поршни.

#### Состав упаковок «Кюветы»

**Укладка «Кюветы №1» зав. №04** содержит 6 кювет (№1-1 зав. №04 - №1-6 зав. №04). Каждая кювета имеет следующее содержимое:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит питательную среду DMEM 0,765 г/мл 0,765 мл, сыворотку крови телит стандартизованную 0,085 г/мл 0,085 мл, раствор парамагнетика гадолиаида 150mM 0,15 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор параформальдегида 0,16 г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гель Mebiol (сополимер поли-н-изопропилакриламида и полиэтиленгликоля 0,1 г/мл 0,5 мл, сфериды из клеток линии остеосаркомы человека MG-63 256 сфер, гранулы октокальциевого фосфата 10 мг.

**Укладка «Кюветы №2» зав. №04** содержит 6 кювет (№2-1 зав. №04 - №2-6 зав. №04). Каждая кювета имеет следующее содержимое:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит натрий уксуснокислый 0,228 г/мл 0,9 мл, раствор парамагнетика гадолиаида 1,5M 0,1 мл, забуференная фосфорная кислота 1M 0,1 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит гидроксид натрия 0,04г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гранулы альфатрикальцийфосфата 10 мг.

**Укладка «Кюветы №1» зав. №05** содержит 6 кювет (№1-1 зав. №05 - №1-6 зав. №05). Каждая кювета имеет следующее содержимое:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит натрий уксуснокислый 0,2M 0,5 мл, хлорид натрия 130 мг/мл 0,5 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор парамагнетика

гадобутрола 1М 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит лизоцим 160 (120) мг/мл, натрий уксуснокислый 0,1М 0,5 мл.

Укладка «Кюветы №2» зав. №05 содержит 6 кювет (№2-1 зав. №05 - №2-6 зав. №05). Каждая кювета имеет следующее содержимое:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит ацетат аммония 0,2 М 0,5 мл, бис-трис буфер 0,2 М 0,5 мл

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор парамагнетика гадобутрола 1М 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит рекомбинантный чехольный белок продукт гена 76 бактериофага РаBG 12 (8) мг/мл, бис-трис буфер 0,1 М 0,5 мл.

Укладка «Кюветы №1» зав. №06 содержит 6 кювет (№1-1 зав. №06 - №1-6 зав. №06). Каждая кювета имеет следующее содержимое:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит питательный бульон LB 0,7 г/мл 0,7 мл, раствор парамагнетика гадолиама 300 мМ 0,3 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор глутаральдегида 0,1 г/мл 0,5 мл, раствор параформальдегида 0,16 г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гель Mebio1 0,1 г/мл 0,5 мл, E.coli M17  $2 \cdot 10^9$  шт.

Укладка «Кюветы №2» зав. №06 содержит 6 кювет (№2-1 зав. №06 - №2-6 зав. №06). Каждая кювета имеет следующее содержимое:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит питательный бульон LB 0,7 г/мл 0,7 мл, раствор парамагнетика гадолиама 300 мМ 0,3 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит гентамицин 120 (240) мкг/мл 0,5 мл

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гель Mebio1 0,1 г/мл 0,5 мл, E.coli M17  $2 \cdot 10^9$  шт.

Укладка «Кюветы №1» зав. №07 содержит 6 кювет (№1-1 зав. №07 - №1-6 зав. №07). Кювета № 1-1 зав. №07 содержит:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит питательный бульон LB 0,7 г/мл 0,7 мл, раствор парамагнетика гадолиама 300 мМ 0,3 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор глутаральдегида 0,1 г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гель Mebio1 0,1 г/мл 0,5 мл, E.coli M17  $2 \cdot 10^9$  шт.

Кювета № 1-2 зав. №07 содержит:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит питательный бульон LB 0,7 г/мл 0,7 мл, раствор парамагнетика галодиамида 300 мМ 0,3 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор параформальдегида 0,16 г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гель Mebiol 0,1 г/мл 0,5 мл, E.coli M17  $2 \cdot 10^9$  шт.

Кювета № 1-3 зав. №07 содержит:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит натрий уксуснокислый 0,228 г/мл 0,9 мл, раствор парамагнетика галодиамида 1,5 М 0,1 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит гидроксид натрия 0,04 г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гранулы альфатрикальцийфосфата 10 мг.

Кювета № 1-4 зав. №07 содержит:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит натрий уксуснокислый 0,228 г/мл 0,8 мл, забуференная фосфорная кислота 1М 0,1 мл, раствор парамагнетика галодиамида 1,5 М 0,1 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит гидроксид натрия 0,04 г/мл 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит гранулы альфатрикальцийфосфата 10 мг.

Кювета № 1-5 зав. №07 содержит:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит натрий уксуснокислый 0,2 М 0,5 мл, хлорид натрия 130 мг/мл 0,5 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор парамагнетика галобутрола 1М 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит лизоцим 160 мг/мл, натрий уксуснокислый 0,1 М 0,5 мл.

Кювета № 1-6 зав. №07 содержит:

- ёмкость №1 (среда для фабрикации) содержит ацетат аммония 0,2 М 0,5 мл, бис-трис буфер 0,2 М 0,5 мл;

- ёмкость №2 (фиксирующий раствор) содержит раствор парамагнетика галобутрола 1М 0,5 мл;

- ёмкость №3 (объект исследования) содержит рекомбинантный чехольный белок продукт гена 76 бактериофага PaBG 12 мг/мл, бис-трис буфер 0,1 М 0,5 мл.

Суммарная санитарно-гигиеническая характеристика применяемых химических веществ и биологических объектов представлена в таблице 1.

Таким образом, в качестве биологических объектов в КЭ «Магнитный 3D-биопринтер» используются: сыворотка крови телят стандартизованная, сферонды из клеток линии остеосаркомы человека MG-63, лизоцим, рекомбинантный чехольный белок продукт гена 76 бактериофага PaBG, E.coli M17.

Данные биологические объекты не содержат патогенных микроорганизмов и не представляют опасности для здоровья человека, что подтверждено представленными документами (паспорта и сертификаты безопасности, утвержденные Генеральным директором лаборатории биотехнологических исследований «3D BIOPRINTING SOLUTIONS» М.С. Бакановым от 12.06.2019г. от 20.06.2019; Директором ИБХ РАН академиком Ивановым В.Т.). Все биологические объекты на этапах доставки, хранения, проведения КЭ, спуска на Землю содержатся в герметичных кюветах и имеют от 2 до 3 барьеров защиты.

Используемые химические вещества, в основном, относятся к 3 и 4 классам опасности, в заданном количестве и условиях эксплуатации (от 2 до 3 герметичных барьеров безопасности на всех этапах проведения КЭ) не представляют токсикологической опасности для здоровья человека. Исключением являются водные растворы параформальдегида и гидроксида натрия. Раствор параформальдегида является источником газовыделения формальдегида – высоколетучего химического соединения 2-го класса опасности, обладающего рефлекторно-резорбтивным действием, аллерген. Гидроксид натрия – химическое соединение 2 класса опасности, обладает прижигающим действием на кожу и слизистые оболочки.

*Мероприятия по обеспечению токсикологической безопасности здоровья экипажа на этапах доставки, проведения эксперимента на РС МКС, хранения, спуска на Землю укладки «Кюветы», максимально исключающие попадание формальдегида и гидроксида натрия в воздушную среду РС МКС и КА.*

1. На этапе доставки на РС МКС 16% раствор параформальдегида и 4% раствор гидроксида натрия ограничены от внешней среды тремя герметичными контурами кюветы: цилиндр из поликарбоната, клапанные узлы внизу, поршни вверх (первый контур); корпус из материала ZEDEX ZX-100, поршня, уплотнительные кольца (второй контур); защитный цилиндрический корпус из материала ZEDEX ZX-100, уплотнительные кольца (третий контур). Кроме того, каждая кювета упакована в пакет «Зип-лок» с промазательной бумагой для индикации пролива, и затем в транспортную укладку из материала «Nomex».
2. На этапе проведения эксперимента на РС МКС (период фиксации и вжатия поршня ёмкости №2) 16% раствор параформальдегида и 4% раствор гидроксида натрия ограничены от внешней среды тремя герметичными контурами: две герметичные прозрачные трубы из поликарбоната фирмы ESALUS, аппаратура «Главбок-С». Кроме того на этом этапе

предусмотрено проведение контроля протечки формальдегида в рабочей зоне аппаратуры «Главбокс-С» индикаторными трубками фирмы Дрегер с использованием носка Асусго (для укладок, содержащих раствор параформальдегида).

3. На этапах хранения на РС МКС и спуски на Землю 16% раствор параформальдегида и 4% раствор гидроксид натрия ограничены от внешней среды тремя герметичными контурами: две герметичные прозрачные трубы из поликарбоната фирмы ESALUS, три герметично закрытых мешка из комбинированной пленки PET/пластилен Пта-Л 05601 со слоем EVON, обеспечивающим высокую газонепроницаемость.

Рекомендации по доставке и эксплуатации упаковок «Кюветы».

1. После доставки упаковок «Кюветы» на РС МКС необходимо провести входной контроль каждой упаковки на предмет обнаружения подтеков жидкости, трещин. При обнаружении подтеков жидкости и запаха формальдегида проблемная упаковка с кюветами подлежит утилизации.

2. Для предотвращения загрязнения воздушной среды РС МКС формальдегидом в концентрациях, превышающих гигиенические нормативы, вводятся следующие ограничения:

- предел обнаружения формальдегида при индикации трубками фирмы Дрегер составляет  $0,25 \text{ мг/м}^3$  (концентрации формальдегида, допустимые на МКС  $0,05-0,12 \text{ мг/м}^3$ , SSP 50260, табл.7.3.1);

- при индикации формальдегида в концентрации  $0,25 \text{ мг/м}^3$  в рабочей зоне перчаточного бокса, необходимо включение системы очистки бокса, прекращение эксперимента, упаковка упаковок для утилизации.

3. Упаковки «Кюветы» №1 и №2 зав. №5 не содержат высоко опасные химические вещества, работы с ними могут проводиться без перчаточного бокса и без дополнительной упаковки в три пакета из комбинированной пленки PET/пластилен Пта-Л 05601 на этапе спуска на Землю. При работе с остальными упаковками необходимо использовать перчаточный бокс и упаковку на этапах хранения и спуска на Землю в три пакета из комбинированной пленки PET/пластилен Пта-Л 05601 аналогично сеансу 1 КЭ «Магнитный 3D-биопринтер».

Дополнительные рекомендации по доставке и эксплуатации упаковок «Кюветы», содержащих гидроксид натрия.

1. После доставки на РС МКС входной контроль упаковок, содержащих гидроксид натрия, необходимо проводить в перчаточном боксе.

2. Перед началом проведения работ с упаковками, содержащими гидроксид натрия, подготовить средства индивидуальной защиты: полумаски 3M со сменными фильтрами 6059, защитные перчатки и очки из упаковки «Защита-ОПС» Хм4.168.625.

3. При проведении КЭ в перчаточном боксе необходимо визуально контролировать наличие пролива растворов.
4. В случае обнаружения пролива растворов из упаковок, содержащих гидроксид натрия, необходимо надеть СИЗ (полумаски 3М со сменными фильтрами 6059, защитные перчатки и очки из упаковки «Защита-ОПС» Хм4.168.625), утилизировать упаковку в мешок КБО, зафиксировать скотчем, промаркировать «токсично», хранить в нежилом помещении, подлежит первоочередному удалению с РС МКС.

Вывод. В результате санитарно-гигиенической экспертизы, проведенной на основании исходных данных, представленных ПАО «РКК «Энергия» (исх. № 082-11/842 от 18.07.2019) и ЧУ «ЗД Биопринтинг Солюшевс», анализа представленной документации (сертификаты и паспорта безопасности), перечней применяемых биологических объектов и химических веществ, установлено, что биологические объекты и химические вещества, упаковок «Кюветы» НА «ЗД-МБП» соответствуют требованиям безопасности, указанным в ГОСТ Р 50804-95, SSP 50094, SSP 50260, ГН.2.1.6.2897-11, ГН 2.1.6.2798-10, ГН 2.2.5.2895-11. Упаковки «Кюветы» зав. № 4, 5, 6, 7 могут быть доставлены на РС МКС и использоваться по назначению при выполнении указанных выше рекомендаций.

И.о. заведующего лабораторией  
«Санитарно-химическая безопасность и  
токсикология воздуха герметичных помещений»  
Ведущий научный сотрудник лаборатории  
Заведующая лабораторией  
«Лаборатория микробиологии среды обитания  
и противомикробной защиты»  
Старший научный сотрудник лаборатории

 А.А. Пахомова  
 М.Ю. Баранцева  
 Н.Д. Новикова  
 С.А. Харин