

## Биофабрикация кольцеобразного конструкта из тканевых сфероидов в магнитоакустическом поле

А. А. Крохмаль<sup>1,\*</sup>, О. А. Сапожников<sup>1</sup>, С. А. Цысарь<sup>1</sup>,

Е. В. Кудан<sup>2</sup>, Е. К. Нежурина<sup>2</sup>, Ю. Д. Хесуани<sup>2</sup>, В. А. Парфенов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

<sup>2</sup>3D Bioprinting Solutions. Россия, 115409, Москва, Каширское шоссе, д. 68, стр. 2

(Статья поступила 30.10.2019; Подписана в печать 05.11.2019)

В рамках данной работы предложен новый метод биофабрикации тканеинженерных конструктов из тканевых сфероидов, основанный на манипулировании сфероидами с помощью магнитного и акустического полей. Конструкт был сформирован в области, где гравитация была компенсирована вертикальной компонентой магнитной силы, внутри цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя, который создавал стоячее цилиндрическое ультразвуковое поле в своей внутренней области. Акустическая радиационная сила действовала от пучности к узлу, формируя левитирующее кольцо из тканевых сфероидов. Удерживание сфероидов в такой ловушке в течение 18–20 часов привело к их слиянию в сплошную живую ткань в форме кольца. Изменение частоты и амплитуды ультразвуковой волны позволило регулировать диаметр и толщину конгломерата сфероидов

PACS: 43.25.Qr, 87.80.Rb, 87.50.

УДК: 534.29, 534-8, 537.636.

Ключевые слова: акустическая радиационная сила, акустическая левитация, магнитная левитация, тканевые сфероиды, биофабрикация.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается бурное развитие тканевой инженерии и ее течения — биотехнологии. Эта область направлена на выращивание искусственных тканей из живых клеток или тканевых сфероидов — плотно упакованных сферических агломератов живых клеток диаметром до 0.3 мм. Одной из наиболее актуальных задач биотехнологии является развитие трехмерной биофабрикации тканевых конструктов, которые выполняли бы те же функции, что и живые ткани человека. Существующие подходы еще не достигли в этом направлении полного успеха ввиду сложности создания трехмерного объекта. Пока наиболее удачно удается печатать лишь двумерные конструкции, например, лоскуты кожи.

Создание трехмерных тканевых конструктов позволит, с одной стороны, более эффективно тестировать новые лекарства, так как плоские и объемные конгломераты клеток реагируют на воздействия по-разному. С другой стороны, трехмерная биофабрикация открывает новые горизонты в создании органных конструкций, которые бы выполняли функции реальных органов человека. Нехватка донорских органов является важной проблемой в современной медицине, а трехмерная биофабрикация может стать перспективным решением.

В большинстве существующих методов биотехнологии используются каркасы, изготовленные из биоматериалов или наноматериалов. Такие методы имеют ряд существенных недостатков, в том числе отрицательную реакцию со стороны клеток, что не поз-

воляет создавать требуемые пространственные структуры. В настоящее время разрабатываются принципиально другие методы биофабрикации, в которых трехмерные тканевые конструкции собираются методом магнитной левитации в нетоксичной парамагнитной жидкости без использования подложек или каркасов [1]. Собранные вместе в магнитную ловушку, тканевые сфероиды контактируют друг с другом и, таким образом, сливаются, образуя трехмерный тканевый конструкт.

Магнитная левитация позволяет изготавливать структуры лишь простой формы, тогда как реальные органы содержат полые внутри кровеносные сосуды. Следовательно, важной задачей является формирование тканевых конструкций с внутренними каналами. В качестве первого шага в решении этой проблемы в данной работе представлен метод биофабрикации с помощью совместного использования акустического и магнитного полей. Акустическое поле может иметь сложную структуру, которая зависит от геометрии источника, частоты волны и граничных условий в области воздействия. Если поместить в акустическое поле частицу, то она будет рассеивать падающую на нее волну. Вследствие нелинейных эффектов возникнет радиационная сила, которая действует на рассеиватель [2, 3]. В некоторых случаях можно создать акустическую ловушку — область пространства, в которой собираются частицы; форма такой акустической ловушки определяется структурой акустического поля. При этом магнитное поле может поддерживать частицы «на весу», а комбинирование двух типов полей позволит собирать сфероиды в трехмерные конструкции прямо в толще питательной среды, без контакта с подложкой.

\*E-mail: dorol212@yandex.ru

Одна из самых простых и часто встречающихся форм в тканях и органах — это кольцо или трубка, так как именно такую форму имеют кровеносные сосуды и капилляры. Проблема васкуляризации остро стоит перед биоинженерией, так как для поддержания жизнеспособности ткани необходимо не только собрать структуру из клеток, но и питать ее, а питательные вещества проникают сквозь клеточную среду не глубже чем на 0.1 мм — это и определяет максимальный радиус жизнеспособных сфероидов. Основная цель данной работы — разработать методику, позволяющую создавать тканевые структуры в форме трубочек, которые могли бы выполнять функции кровеносных сосудов. Показана возможность достижения этой цели с помощью помещения сфероидов внутрь цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя, где образуется стоячая цилиндрическая волна.

## 1. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Главной задачей данного исследования было создать методику, позволяющую осуществить быструю левитационную сборку конструкции из тканевых сфероидов, случайным образом распределенных в рабочем объеме питательной среды. В качестве основного инструмента сборки используется действующая на пробирку со средой комбинация неоднородного магнитного и стоячего акустического полей, которые создают в некоторой области магнито-акустическую ловушку (рис. 1, а).

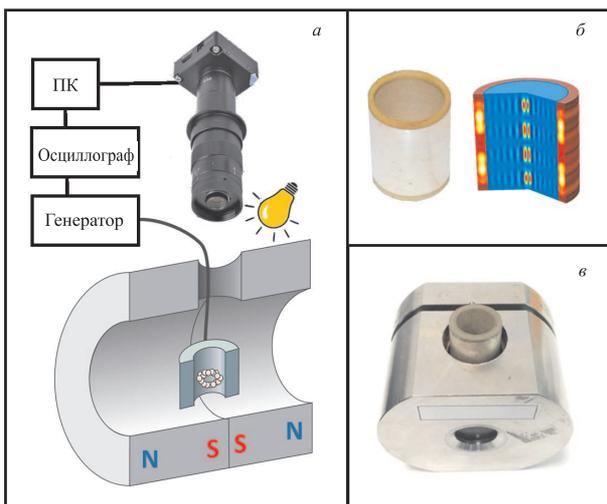


Рис. 1: а — Схема экспериментальной установки, б — пьезоэлектрический преобразователь и его численная модель, иллюстрирующая распределение амплитуды радиальной составляющей акустической радиационной силы внутри преобразователя и поле смещений в стенках преобразователя, (в) фото экспериментальной магнито-акустической установки

Сфероиды, плавающие в питательной среде, устремляются в область ловушки под действием гравита-

ции, магнитного поля и акустической радиационной силы. В области ловушки гравитационные силы компенсируются действием магнитных сил в вертикальном направлении, а в горизонтальном направлении форму конструктору придает акустическая радиационная сила. Таким образом, происходит сборка тканевого конструктора, когда сфероиды сливаются друг с другом в питательной среде без контакта с подложкой.

Магнитная сила возникает вследствие пространственной неоднородности магнитного поля и разницы магнитных восприимчивостей сфероидов и питательной среды. Чем больше разница магнитных восприимчивостей, тем больше магнитная сила. Поэтому для усиления эффекта в среду добавляют раствор солей гадолиния. Таким образом, жидкая среда становится парамагнитной, а сфероиды, как вода, диамагнитны.

Акустическая радиационная сила определяет форму конструктора. В результате возможно получить тканевые конструкторы сферической, эллиптической, кольцевой и другой формы — достаточно лишь подобрать подходящую конфигурацию источников звукового поля. Для того чтобы придать конструкции из сфероидов форму трубочки, был использован цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь. В полости внутри преобразователя создавалось стоячее поле, близкое к цилиндрическому, следовательно, узлы поля тоже имели форму цилиндра. Сфероиды, попадающие в узлы такого поля, формировали конструктор в форме трубочки. Толщину стенки трубочки определял размер сфероидов и амплитуда акустического поля, а длину — количество сфероидов. Радиус трубочки зависел от длины волны, излучаемой преобразователем. Из-за небольших размеров конструкций манипулирование тканевыми сфероидами в питательной жидкости возможно в ультразвуковой области частот — от сотен килогерц до нескольких мегагерц [3, 4].

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТ

В эксперименте использовался ультразвуковой преобразователь из пьезокерамики ЦТС-4, с внутренним радиусом  $R_{in} = 16$  мм, внешним — 22 мм, и длиной 20 мм (рис. 1, б). Толщина стенки 2 мм соответствовала частоте толщинного 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:

$$J_0(kR_{in}) = 0,$$

где  $k = 2\pi f/c$  — волновое число,  $J_0$  — функция Бесселя 0-го порядка [5]. В то же время частота излучения должны быть близка к частоте толщинного резонанса для эффективного электроакустического преобразования. В условиях эксперимента, чтобы получить трубоч-

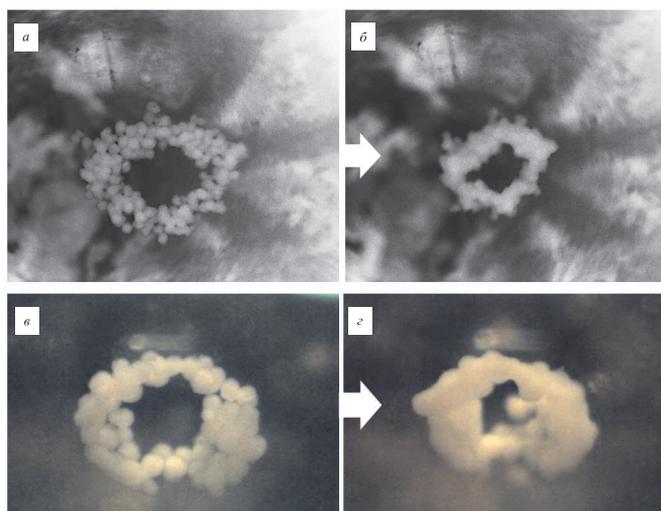


Рис. 2: Формирование кольца из сфероидов в начале эксперимента и после 20 часов слияния из (а, б) гладкомышечных клеток и (в, з) хондроцитов

ку диаметром 1.5 мм, требовалось излучить ультразвуковую волну частотой 780 кГц.

Для достижения наибольшего градиента магнитного поля была установка состояла из двух противоположно ориентированных кольцевых магнитов с выемкой между ними. В нее был помещен цилиндрический ультразвуковой преобразователь, а внутри пьезокерамического цилиндра находилась среда с тканевыми сфероидами (рис. 1, в).

Чтобы определить область пространства, в которой будут собираться сфероиды, с помощью численного моделирования было рассчитано поле акустического давления от преобразователя. Затем был найден потенциал Горькова — потенциал акустической радиационной силы в приближении малости рассеивателя по отношению к длине волны, что выполнялось в эксперименте [2, 3]. Минимум потенциала соответствует области, в которую направлены силы радиационного давления и куда будут устремляться сфероиды. Градиент потенциала Горькова соответствует радиационной силе, действующей на сфероиды. Так как структура поля внутри преобразователя концентрическая, как и поле радиационной силы (рис. 1, б), то при сильном акустическом поле возможно образование не одной трубочки из сфероидов, а нескольких вложенных друг в друга концентрических структур. Однако магнитная сила имела еще и горизонтальную составляющую, притягивающую сфероиды к центру магнитной установки. Поэтому амплитуда излучаемой ультразвуковой волны подбиралась опытным путем исходя из двух требований: она должна была быть больше магнитной силы в центре рабочей зоны, чтобы сформировать кольцо, то есть оттолкнуть сфероиды от центра, но меньше в области второго минимума потенциала радиационной силы, чтобы все сфероиды из рабочего объема были задействованы в формировании единого кольца.

Сфероиды 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 соли гадолиния (парамагнетика) в концентрации 50 ммоль/моль.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Как и предполагалось, сфероиды собрались в узлах цилиндрического стоячего звукового поля, левитируя в питательной среде под действием магнитной силы. Радиус получившейся конструкции соответствовал расчетному радиусу области первого от центра узла: его можно найти 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 конструкции должен был составить 0.74 мм. Расчетное значение соответствовало наблюдаемому в эксперименте при тех же условиях диаметру конструкции 1.5 мм. Изменяя частоту излучаемой ультразвуковой волны, было возможно контролировать диаметр конгломерата сфероидов.

После сборки сфероидов в кольцеобразную структуру, их было необходимо удерживать в этом состоянии в течение суток для слияния и образования сплошного тканевого конструктора. Важно отметить, что интенсивность ультразвуковой волны была достаточно малой, чтобы не повредить сфероиды даже при столь длительном воздействии. В эксперименте была проведена биофабрикация кольцеобразных структур из гладкомышечных клеток (рис. 2, а, б), которые являются клетками стенок сосудов, а также из хондроцитов (рис. 2, в, з), которые образуют хрящ. В конечном счете

для обоих типов клеток сфероида сливались и образовывали сплошное тканевое кольцо примерно за 20 часов, что свидетельствовало о том, что клетки оставались живыми в течение всего процесса слияния.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тканевые сфероиды были собраны в сплошной тканевый конструкт с использованием комбинации магнитного и акустического полей, в состоянии левитации прямо в питательной среде. Размер получившегося

конструкта согласован с расчетным, показана возможность манипулирования сфероидами с помощью ультразвуковой волны для придания итоговой структуре желаемого размера. Предложенный подход по использованию физических полей для создания тканевых структур различной формы и функциональности является новым шагом в развитии биотехнологии и трехмерной биофабрикации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-32-00659, РФФИ № 17-02-00261, РФФИ № 18-29-11076 и Фонда развития теоретической физики «Базис».

- [1] Parfenov V. A., Koudan E. V., Bulanova E. A., Karalkin P. A., Pereira F. D., Norkin N. E., Knyazeva A. D., Gryadunova A. A., Petrov O. F., Vasiliev M. M. et al. // *Biofabrication*. 2018. **10**, N 3. P. 034104.  
[2] Горьков Л. П. // Докл. АН СССР. 1961. **140**, № 1. С. 88.  
[3] Sapozhnikov O. A., Bailey M. R. // *J. Acoust. Soc. Am.*

2013. **133**, N 2. P. 661.

- [4] Николаева А. В., Сапожников О. А. // Изв. РАН. серия физ. 2017. **81**, № 1. С. 89.  
[5] Тихонов А. Н., Самарский А. А. Уравнения математической физики. М.: Наука, 1966.

## Biofabrication of a ring-shaped construct from tissue spheroids in a magnetoacoustic field

A. A. Krokhmal<sup>1,2,a</sup>, O. A. Sapozhnikov<sup>1</sup>, S. A. Tsysar<sup>1</sup>, E. V. Koudan<sup>2</sup>, E. K. Nezhourina<sup>2</sup>, Y. D. Khesuani<sup>2</sup>, V. A. Parfenov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia*

<sup>2</sup>*3D Bioprinting Solutions. Moscow 115409, Russia*

*E-mail: <sup>a</sup>doro1212@yandex.ru*

A new method for the biofabrication of tissue engineering constructs from tissue spheroids was proposed, based on the manipulation of spheroids using magnetic and acoustic radiation forces. Unlike most modern methods that use scaffolds to shape the structure, the proposed method fabricates levitating spheroids. The levitation effect is achieved due to the strong magnetic field gradient and the difference in the paramagnetic susceptibilities of the spheroids and the solution in which they are located.

The structure was formed in an area where gravity was compensated by magnetic forces in the vertical direction, and due to the magnetic gradient in the horizontal plane, the tissue spheroids moved towards each other, rising above the bottom of the container. In turn, the acoustic field formed the structure of the assembled tissue-engineering structure. One of the most desirable forms is a ring or a tube, since it is precisely this form that vessels in human tissues have. This shape was fabricated using a cylindrical piezoelectric transducer, which created a standing cylindrical ultrasonic field. The acoustic radiation force acted from the antinode to the node, forming a ring of tissue spheroids. Holding spheroids in such a trap for 18–20 hours led to their fusion into continuous living tissue in the form of a ring. Changing the frequency and amplitude of the ultrasonic wave made it possible to regulate the diameter and thickness of the conglomerate of spheroids.

PACS: 43.35.Bf, 87.80.Rb, 87.50.

*Keywords:* acoustic radiation force, acoustical levitation, magnetic levitation, tissue spheroids.

*Received 30 October 2019.*

### Сведения об авторах

1. Крохмаль Алиса Александровна — аспирант; тел.: (495) 939-29-52, e-mail: doro1212@yandex.ru.
2. Сапожников Олег Анатольевич — доктор физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-29-52, e-mail: oleg@acs366.phys.msu.ru.
3. Цысарь Сергей Алексеевич — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (495) 939-29-52, e-mail: sergey@acs366.phys.msu.ru.
4. Кудан Елизавета Валерьевна — канд. химических наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (499) 769-50-18, e-mail: koudan1980@gmail.com.
5. Нежурина Елизавета Константиновна — ст. лаборант; тел.: (499) 769-50-18, e-mail: eliznezhurina@gmail.com.
6. Хесуани Юсеф Джорджович — управляющий партнер; тел.: (499) 769-50-18, e-mail: usefhesuani@yandex.ru.
7. Парфенов Владислав Александрович — главный конструктор; тел.: (499) 769-50-18, e-mail: vapar@mail.ru.