

УДК 534.29:534-8:537.636

СОЗДАНИЕ ПОЛЫХ ЦИЛИНДРИЧЕСКИХ КОНСТРУКТОВ ИЗ ТКАНЕВЫХ СФЕРОИДОВ С ПОМОЩЬЮ АКУСТИЧЕСКОЙ РАДИАЦИОННОЙ СИЛЫ

© 2021 г. А. А. Крохмаль^{1, *}, О. А. Сапожников¹, Е. В. Кудан², А. А. Грядунова², С. А. Цысарь¹,
С. В. Петров², Ф. Перейра², Ю. Д. Хесуани², В. А. Миронов², В. А. Парфенов²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

²Частное учреждение “Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”,
Москва, Россия

*E-mail: aa.krokhmal@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

Предложен и экспериментально апробирован метод фабрикации трубчатых конструктов из тканевых сфероидов (сферических конгломератов клеток диаметром около 200 мкм) в питательной среде 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°C привело к слиянию сфероидов в сплошной трубчатый жизнеспособный тканевый конструкт.

DOI: 10.31857/S0367676521060144

ВВЕДЕНИЕ

Одним из бурно развивающихся междисциплинарных научных направлений является биофабрикация, нацеленная на создание двумерных и трехмерных объектов из клеточного материала. Такие объекты, являющиеся функциональными и жизнеспособными клеточными образованиями, получили название органных конструктов. Существуют разные подходы к осуществлению процесса биофабрикации. Одним из них является трехмерная (3D) биопечать, при которой клеточный материал послойно наносится на некоторую биосовместимую основу [1]. Другим перспективным подходом является магнитная биофабрикация, при которой органный конструкт формируется под действием магнитных сил непосредственно в питательном растворе [2]. Существующие методы, однако, имеют свои ограничения и пока не позволяют создавать трехмерные объекты произвольной формы. Так, например, аддитивный метод 3D печати требует наличия поддерживающей структуры, позволяющей клеточным структурам сохранять взаимную ориентацию до момента их слияния. Данную поддерживающую структуру затем требуется неинвазивно удалить, что является довольно сложной задачей. Биофабрикация в магнитном поле не требует таких поддерживающих структур, но, в силу немагнитных свойств самих биологи-

ческих клеток, требуется помещать их в растворы с магнитными свойствами (используются, например, растворы солей гадолиния), обладающие при рабочих концентрациях токсическими свойствами. Дополнительной сложностью при создании органоного конструкта является необходимость его васкуляризации – для создания функциональной модели органа необходимо также сформировать сосуды для обеспечения питанием всех клеток конструкта. Поэтому первостепенной задачей в области биофабрикации является разработка методики по созданию конструктов трубчатой формы.

В наших недавних работах [3–7] был представлен метод биофабрикации тканевых конструктов, основанный на магнитоакустической левитации. В результате удалось получить кольцевые и трубчатые конструкты [3, 4]. Для этого создавался сильный градиент магнитного поля, который компенсировал гравитацию в вертикальном направлении, а цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь, помещаемый в магнитное поле, создавал стоячую цилиндрическую ультразвуковую (УЗ) волну. Для создания сложных конструктов удобно использовать не отдельные клетки, а тканевые сфероиды – предварительно собранные сферические агрегаты клеток диаметром около 0.2 мм, содержащие несколько тысяч жизнеспособных клеток [8]. Сфероиды, помещенные в

описанное магнитоакустическое поле, формировали кольцевые структуры, радиус которых мог варьироваться в зависимости от частоты ультразвука до момента их слияния.

Ограничением экспериментов по магнитоакустической биофабрикации с использованием постоянных магнитов являлось то, что неоднородность градиента магнитного поля от постоянных магнитов позволяла компенсировать гравитационную силу лишь в малой области, поэтому удавалось формировать лишь относительно тонкие кольцевые объекты диаметром порядка 1.5 мм и высотой в 1–2 слоя сфероидов – до 0.5 мм. В работе [7] был разработан подход по созданию более вытянутых объемных трубчатых конструкций. С этой целью был использован соленоид Биттера – большой электромагнит, способный создавать плавно изменяющееся магнитное поле с индукцией до 32 Тл. Совместное использование акустической радиационной силы, создаваемой полем цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя, и сильного магнитного поля, создаваемого соленоидом Биттера, позволило создать жизнеспособные тканевые конструкции в форме трубочки из гладкомышечных клеток диаметром 1 мм и высотой 0.6 мм, причем конструктор обладал требуемой функцией – сжимался в ответ на раздражитель. Использование сильного магнитного поля позволило уменьшить концентрацию парамагнетика в питательном растворе до безопасного для клеток уровня.

Эксперименты на биттеровском электромагните являются довольно дорогостоящими, а также накладывают определенные ограничения на форму и размер акустических излучателей, с помощью которых формируется тканеинженерный конструктор. Поэтому актуальной задачей является разработка методики по сборке сфероидов в форме трубчатого конструктора без применения магнитов, только в акустическом поле. Такой метод является более безопасным для клеток, так как при его использовании полностью исключено токсическое воздействие парамагнитных солей, а амплитуда акустического поля выбирается минимальной, чтобы не вызвать кавитацию или перегрев среды. Другим преимуществом такого подхода является то, что сфероиды со всех сторон окружены питательным раствором.

МЕТОД АКУСТИЧЕСКОГО МАНИПУЛИРОВАНИЯ

Для того чтобы придать случайно распределенным сфероидам форму трубки постоянного сечения, использовался цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь. Он представлял собой цилиндр из пьезокерамики ЦТБС-3 с толщиной стенки 2.5 мм, внешним диаметром 33 мм

и высотой 20 мм. Между внешней и внутренней посеребренными поверхностями пьезоцилиндра с генератора сигналов Agilent 33250A прикладывалось переменное электрическое напряжение с амплитудой порядка 10 В. 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 (рис. 1а). В вертикальном направлении структура поля не являлась полностью однородной: в слое пьезоэлектрика неизбежно возникают волны Лэмба [9], являющиеся причиной вариации амплитуды излучаемого поля акустического давления.

Распределение комплексной амплитуды акустического давления P внутри гармонически колеблющегося с частотой f бесконечного цилиндра радиуса a описывается следующим образом [10]:

$$P(R) = \frac{P_0}{J_0(ka)} J_0(kR), \quad (1)$$

где R – радиальная координата, P_0 – амплитуда давления на стенке цилиндра, $k = 2\pi f/c$, 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:

$$R_1 \approx \frac{2.41}{k}. \quad (2)$$

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 [11]. Если в первом приближении принять рассеиватель за упругую сферу малого

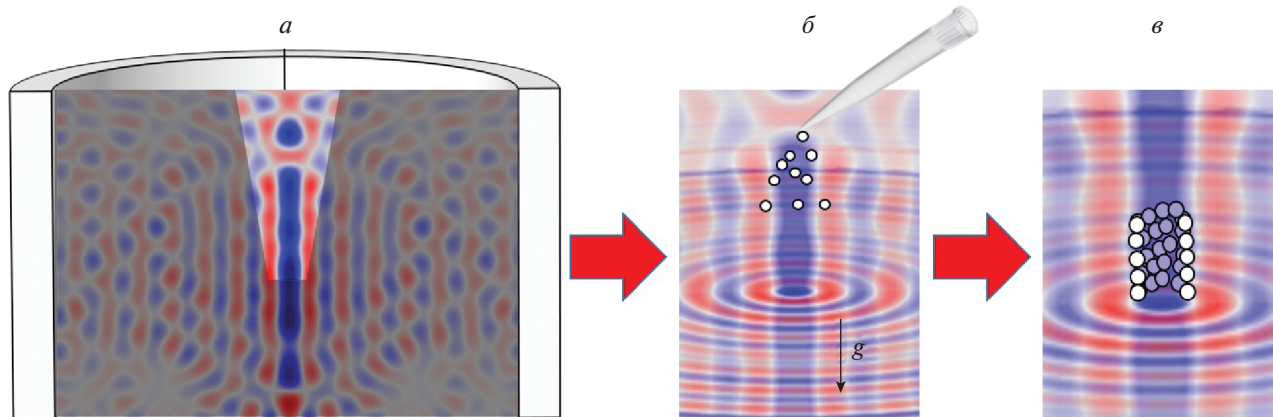


Рис. 1. Схема эксперимента по формированию трубчатого конструкта из тканевых сфероидов в акустическом поле. Стоячее поле, созданное кольцевым пьезопреобразователем, и положение контейнера из агарозы (темная область) внутри цилиндра (а); впрыскивание сфероидов в питательный раствор в области ультразвукового поля (б); формирование трубчатого конструкта в результате оседания сфероидов на агарозную форму в поле действия силы тяжести и акустической радиационной силы (в).

волнового размера, то теория для расчета радиационной силы \vec{F}_r существенно упрощается, и можно использовать приближение Горькова [12, 13]:

$$\vec{F}_r = -\nabla U, \quad (3)$$

$$U = \frac{\pi r^3}{3} \left\{ f_1 \frac{|P|^2}{\rho c^2} - \frac{3}{2} f_2 \rho |\vec{v}|^2 \right\}, \quad (4)$$

где r – радиус сферического рассеивателя, ρ – плотность жидкости, c – скорость звука в ней, $\vec{v} = \nabla P / (2\pi i \rho f)$ – комплексная амплитуда колебательной скорости, а множители f_1 и f_2 зависят от упругих свойств рассеивателя – плотности ρ_{sc} и скоростей продольной и поперечной волн c_l и c_t :

$$f_1 = 1 - \frac{\rho c^2}{\rho_{sc} c_l^2} \frac{1}{1 - \frac{4c_t^2}{3c_l^2}}, \quad (5)$$

$$f_2 = 2 \frac{\rho_{sc} - \rho}{2\rho_{sc} + \rho}. \quad (6)$$

Из формул (3)–(6) видно, что в случае плоско-волнового стоячего ультразвукового поля при $f_1 + \frac{3}{2}f_2 > 0$ радиационная сила действует в направлении от пучности к узлу акустического давления. В случае цилиндрической геометрии выписанный критерий направления радиационной силы к узлу стоячей волны приблизительно такой же. Для тканевых сфероидов выполняется именно такое условие. Таким образом, если поместить набор сфероидов в стоячее УЗ поле внутри колеблющегося пьезоэлектрического цилиндрического преобразователя, можно ожидать, что радиационная сила вызовет их перемещение в узлы акустиче-

ского 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.

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ

Акустическая радиационная сила, создаваемая цилиндрическим пьезопреобразователем, воздействует на сфероиды только в горизонтальном направлении, тогда как в вертикальном направлении сфероиды оседают в питательном растворе под действием силы тяжести. Нашей задачей было подобрать такие условия эксперимента, чтобы сфероиды после инъецирования в рабочую область успели выстроиться в форме вертикально стоящей трубочки до того, как осядут на дно контейнера. Также был необходим контакт такого конструкта с некоторой подложкой в нижней части зоны действия радиационной силы, причем такая подложка не должна препятствовать прохождению питательных веществ к сфероидам. Более того, для построения одиночного трубчатого конструкта следовало ограничить область пространства, в которой могут находиться сфероиды, чтобы они попадали только в первый узел стоячей волны и не распределялись по периферийным узловым областям. Для этих целей был предварительно изготовлен контейнер специальной формы из агарозы.

Агарозный контейнер имел форму цилиндра с конусообразным отверстием, радиус которого не превышал радиуса второй узловой зоны стоячей волны, а внешние размеры позволяли осуществить размещение контейнера внутри пьезо-

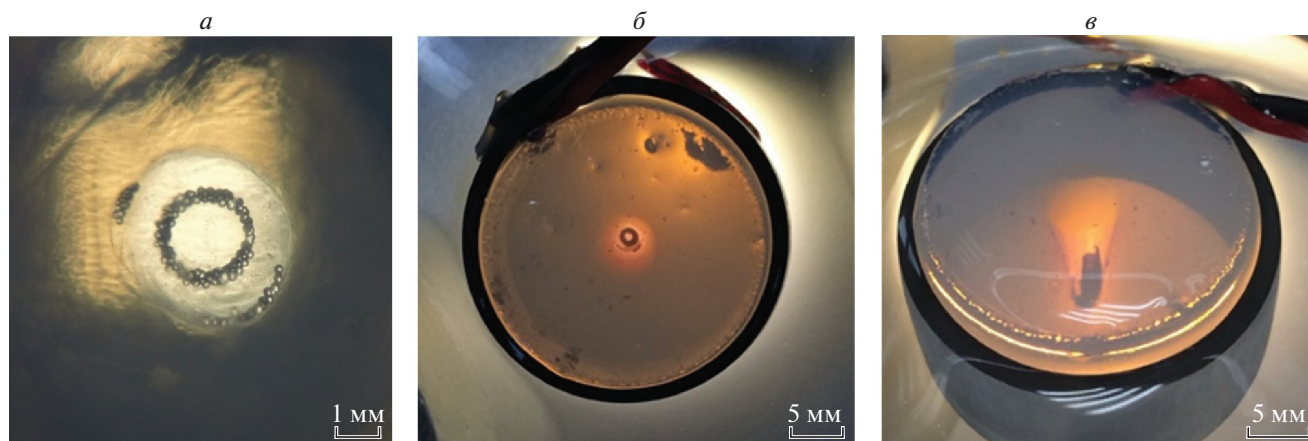


Рис. 2. Фотографии эксперимента: вид сверху, трубочка из полистироловых шариков, имитирующих тканевые сфероиды (а), виды сверху (б) и под углом (в) на трубочку из хондросфер в агарозном контейнере внутри пьезоцилиндра; установка помещена в питательный раствор.

электрического преобразователя (рис. 1а, серая область). Высота агарозного контейнера соответствовала высоте пьезоцилиндра, а дно конусообразного отверстия находилось на расстоянии 7 мм от нижнего края преобразователя. Использование агарозного контейнера вместо стандартной пластиковой или стеклянной чюветы было обусловлено несколькими причинами. Во-первых, наличие твердых стенок у пластиковой чюветы вызывает дополнительное отражение и поглощение ультразвуковой волны, а в случае неидеального совпадения оси чюветы с осью цилиндрического пьезопреобразователя нарушаются условия резонанса, и радиационная сила уменьшается. В то же время, агароза очень близка по физическим свойствам к воде, и поэтому стенки из такого материала не вызывают сильного отражения 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 чюветы адгезивно для тканевых сфероидов и полистироловых шариков, тогда как к агарозе они не прилипают. Пористая структура агарозы позволяет сфероидам получать питательные вещества, даже контактируя с таким контейнером.

Пьезопреобразователь с расположенным внутри агарозным контейнером помещался в стеклянную емкость, которая также была заполнена питательным раствором. Затем установка перемещалась в термостат, поддерживающий температуру 37°C и необходимую для клеток концентрацию CO₂ в воздухе. Наличие дополнительного объема питательного раствора в емкости с преобразователем гарантировало более стабильный температурный режим внутри преобразователя во время излуче-

ния ультразвука и защищало сфероиды от перегрева.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

В ходе эксперимента с помощью микропипетки тканевые сфероиды из хондроцитов — клеток хрящевой ткани — аккуратно впрыскивались внутрь отверстия в агарозной форме в верхней его части (рис. 1б) 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, сфероиды 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 конструкт (рис. 1в). Фотографии эксперимента и формирование конструкта из сфероидов показаны на рис. 2.

Если количество впрыскиваемых сфероидов было достаточно велико, то формировался плотный цилиндр с фиксированным радиусом, определяемым длиной акустической волны. Удержание сфероидов в форме трубочки в термостате в течение 24 ч позволило сфероидам слиться в сплошной тканевый конструкт. Процесс слияния сфероидов подтвердил их жизнеспособность. Ультразвуковая волна с частотой 800 кГц позволила создать цилиндр диаметром 1.3 мм, толщиной 0.45 мм и высотой 1.5 мм, что составляло порядка 7–9 слоев сфероидов в вертикальном направлении (рис. 3). С учетом небольшой вариации температуры теоретическая зависимость радиуса конструкта от частоты

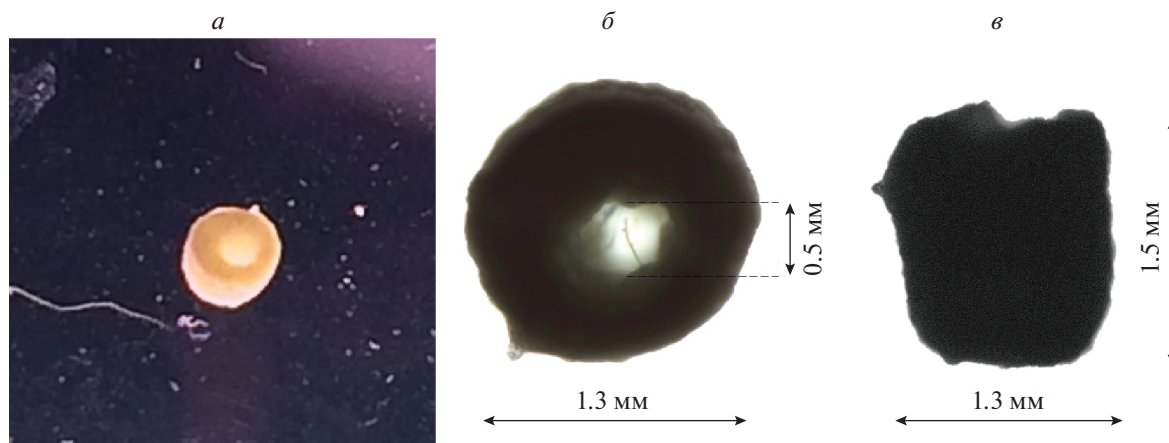


Рис. 3. Слившийся тканеинженерный конструкт из хондроцитов в форме трубочки: общий вид конструкта (а), вид сверху (б) и сбоку (в) под микроскопом.

ты волны (2) хорошо описывает экспериментальные наблюдения. Высота трубчатого конструкта, сформированного с помощью метода акустической левитации, в несколько раз превосходит максимальную высоту конструкта, получаемую методом магнитной и магнито-акустической сборки. Высоту конструкта можно существенно увеличить, если использовать большее количество сфероидов и передвинуть дно контейнера ближе к середине излучателя по высоте: в таком случае сфероиды окажутся в зоне, где структура волна наиболее близка к цилиндрической. В экспериментах без слияния сфероидов удавалось достигнуть высоты конструкта порядка 5–6 мм, поэтому есть основания полагать, что аналогичный размер слившегося конструкта может быть достигнут в рамках указанного метода.

Жизнеспособность полученного конструкта оценивалась по двум признакам. Во-первых, отчетливо наблюдаемое превращение конструкта из отдельных сфер в сплошную ткань свидетельствовало о том, что клетки активно сливались, то есть были живы и функциональны. Во-вторых, при аналогичных экспериментах с гладкомышечными клетками на поверхности конструкта образовывались миотрубки, что также говорило о жизнеспособности ткани в результате описанного акустического воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен метод манипулирования микроскопическими объектами для формирования сплошного трубчатого тканевого конструкта с помощью стоячего цилиндрического акустического поля. Экспериментально продемонстрировано, что использованный подход позволяет создавать трехмерные трубчатые конструкции заданного радиуса из живых клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 20-32-90093, 20-02-00139, 18-29-11076) и Фонда развития теоретической физики “Базис”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hesuan Y.D., Pereira F.D., Parfenov V.A. et al.* // 3D Print. Addit. Manufact. 2016. V. 3. No. 1. P. 64.
2. *Parfenov V.A., Koudan E.V., Bulanova E.A. et al.* // Bio-fabrication. 2018. V. 10. No. 3. Art. No. 034104.
3. *Krokhmal A., Sapozhnikov O., Koudan E. et al.* // Proc. Meet. Acoust. 2019. V. 38. No. 1. Art. No. 020006.
4. *Крохмаль А.А., Сапожников О.А., Цысарь С.А. и др.* // Уч. зап. физ. фак-та МГУ. 2020. № 1. С. 2010902.
5. *Parfenov V.A., Mironov V.A., Koudan E.V. et al.* // Sci. Rep. 2020. V. 10. No. 1. P. 1.
6. *Parfenov V.A., Khesuan Y.D., Petrov S.V. et al.* // Sci. Adv. V. 6. No. 29. Art. No. eaba4174.
7. *Parfenov V.A., Koudan E.V., Krokhmal A.A. et al.* // Adv. Health. Mat. 2020. Art. No. 2000721.
8. *Грядунова А.А., Буланова Е.А., Кудан Е.В. и др.* // Клини. эксп. морф. 2019. Т. 8. № 2. С. 12.
9. *Cathignol D., Sapozhnikov O.A., Zhang J.* // J. Acoust. Soc. Amer. 1997. V. 101. P. 1286.
10. *Тихонов А.Н., Самарский А.А.* Уравнения математической физики. М.: Наука, 1966.
11. *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.
12. *Горьков Л.П.* // Докл. АН СССР. 1961. Т. 140. № 1. С. 88; *Gorkov L.P.* // Sov. Phys. Dokl. 1962. V. 6. P. 773.
13. *Sapozhnikov O.A., Bailey M.R.* // J. Acoust. Soc. Amer. 2013. V. 133. No. 2. P. 661.

Creation of tubular structures from tissue spheroids using acoustic radiation force

**A. A. Krokhmal^{a, *}, O. A. Sapozhnikov^a, E. V. Koudan^b, A. A. Gryadunova^b, S. A. Tsysar^a,
C. V. Petrov^b, F. Pereira^b, Y. D. Hesvani^b, V. A. Mironov^b, V. A. Parfenov^b**

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^bLaboratory of biotechnical research "3D bioprinting solutions", Moscow, Russia

**e-mail: aa.krokhmal@physics.msu.ru*

A method for fabricating tubular constructs from tissue spheroids (conglomerates of cells up to 200 microns in size) in a nutrient fluid using acoustic radiation force is proposed. The source of the acoustic field was a hollow piezoceramic cylinder with a resonant frequency of 800 kHz. Retention of the formed structure within 24 hours at 37°C led to the fusion of spheroids into a solid tubular viable tissue construct.