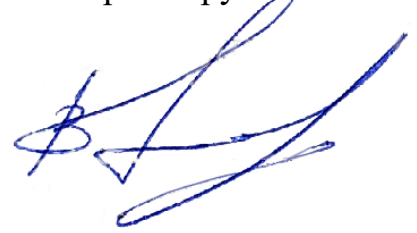


На правах рукописи



Парфенов Владислав Александрович

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

Специальность – 2.6.5 «Порошковая металлургия и
композиционные материалы»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Москва 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук (ИМЕТ РАН)

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

Официальные оппоненты: **Курганова Юлия Анатольевна**
доктор технических наук, профессор, руководитель лаборатории композиционных и неметаллических материалов, Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана

Герасименко Александр Юрьевич
доктор технических наук, доцент, начальник лаборатории биомедицинских нанотехнологий, Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

Логачёва Алла Игоревна
доктор технических наук, начальник отделения металлических материалов и металлургических технологий, акционерное общество «Композит»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Объединённый институт высоких температур РАН (ОИВТ РАН)

Защита состоится « 28 » ноября 2024 года в 14 ч 00 мин на заседании диссертационного совета 24.1.078.02 (Д 002.060.02) на базе ИМЕТ РАН по адресу: 119334, г. Москва, Ленинский проспект, д. 49, БКЗ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИМЕТ РАН, а также на официальном сайте ИМЕТ РАН <http://www.imet.ac.ru/> и на сайте ВАК РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru/main>.

Отзывы на автореферат диссертации (в двух экземплярах, заверенных печатью, с указанием почтового адреса и контактного телефона) просьба отправлять по адресу: 119334, г. Москва, Ленинский пр., д. 49, Диссертационный совет 24.1.078.02 (Д.002.060.02). Копии отзывов в электронном виде направлять по e-mail: andreev.imet.dis@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук

2



Андреев В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 десятки лет 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, 3ДБио, 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. проращение 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 α -трикальцийфосфата (α -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.

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-Д226/4888-Д) в рамках единого отраслевого тематического плана НИОКР ГК «Росатом». Получен акт от АО «ГНЦ РФ ТРИНИТИ» Госкорпорации «Росатом» от 27.05.2022 г.

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 (CET) «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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** дана общая характеристика диссертационной работы, включающая научную новизну, практическую значимость и основные положения, выносимые на защиту. Обоснована актуальность выбранной темы диссертации. Изложены цели и задачи исследования.

Первая глава посвящена аддитивному производству в биомедицине - его преимуществам и тенденциям развития. В главе представлен детальный аналитический обзор последних достижений в области тканевой инженерии. Детально рассмотрены существующие проблемы и предложения по их возможному решению. Особое внимание уделено использованию физических полей в процессе формирования композиционных материалов.

Отмечено, что существуют основные способы производства изделий: субтрактивный, аддитивный и формативный (рис. 1). В последнее время аддитивные технологии (АТ) нашли широкое применение в биомедицине, включая создание экспериментальных и функциональных трехмерных изделий из неорганических и органических материалов. Многие из современных способов АТ основаны на послойном выращивании материалов. Для стабильной поддержки биоматериалов в заданных координатах, формируемых ТКМ, необходимы временные опорные поддержки, состоящие из гидрогелей, полимеров, порошка, металлических стержней и т.п. Практически в каждом опубликованном в литературе случае тканевой инженерии 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

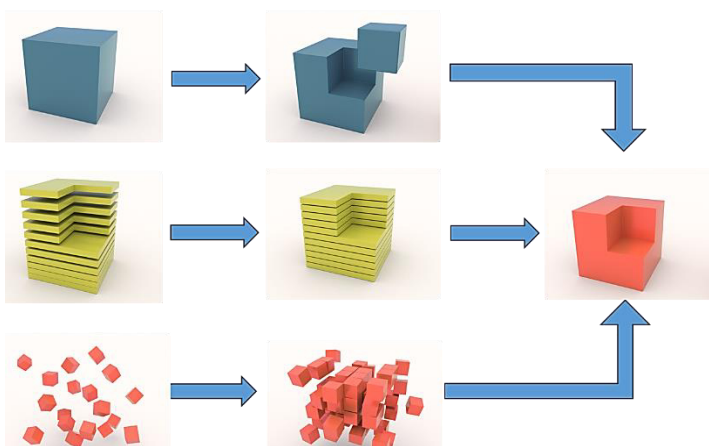


Рис. 1 – Схематическое изображение субтрактивного, аддитивного и формативного способа производства изделий

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 тканевой инженерии 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 магнитной и акустической левитационной биосборки относятся к группе методов «формативного» производства, где факторами, задающими заданную форму изделий, являются физические поля, которые могут обеспечить пространственное позиционирование материала согласно цифровому заданию.

На основании данных аналитического обзора и темы диссертации сформулированы цели и задачи исследований.

Вторая глава посвящена описанию методов и материалов, используемых в диссертационном исследовании. В качестве неорганических материалов в исследованиях выступали ФК (α -ТКФ, дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД), ОКФ) различной морфологии, дисперсности, структуры и фазово-химического состава. В качестве органических материалов использовались ТС из различных типов клеток (SHED, SW1353, hbSMC, FRTL-5) и бактериальные грамположительные и грамотрицательные бактерии (*E. coli* штаммы ATCC 43890 и JM109, *S. aureus*, *L. Monocytogenes*, *P. aeruginosa*). Представлены методики анализа и характеристики объектов и образцов исследований. В работе использовано современное оборудование и методы трансмиссионной электронной микроскопии (Теснаі Т12, Нидерланды), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Tescan Vega II, Германия), рентгенофазового анализа (РФА) (JSM -6510 LV, Shimadzu XRD-6000, Япония), люминесценции (VICTOR X3, США), флуоресцентной и световой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-S, Япония, AxioVert 2, Германия), гистологических и иммуногистохимических анализов (Microtome HMS 740, Германия, Microtome Microm HM355S, США, Autostainer 360, Великобритания, Nikon SMZ18, Япония), реологии (Anton-Paar MCR 501, Австрия), микротензиометрии (Microsquisher, Канада) и др.

В третьей главе приведены результаты по разработке стендов для магнитной, акустической и магнитоакустической направленного формирования ТКМ с использованием математического инструмента (моделирования физических полей и возникающих в них процессов). Показано влияние

размерных и конструктивных факторов на картину силовых линий магнитного поля.

Для отработки способов направленного формирования 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 ТКМ.

Экспериментальные стенды для генерации магнитных полей

Принцип действия магнитных экспериментальных установок 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. Магнитная сила применима для объектов с нейтральными зарядами, которые имеют относительную проницаемость, отличную от фоновой среды (жидкости). Эффективная магнитная сила F , действующая на объект в неоднородном магнитном поле, будет описываться следующим соотношением:

$$F = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \nabla(H^2), \quad (1)$$

где H – напряженность магнитного поля, μ_f - относительная проницаемость жидкости, μ_0 – магнитная постоянная, а K определяется как:

$$K = \frac{\mu_p - \mu_f}{\mu_p + 2\mu_f}, \quad (2)$$

Относительная магнитная проницаемость жидкости и частиц очень близка к 1. 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 («магнитную ловушку»). В условиях сил гравитации уравнивание объектов происходит на определенном расстоянии от локального минимума магнитного поля в направлении действия силы тяжести.

Для разделения магнитных восприимчивостей объектов формирования и фоновой жидкости в последнюю добавлялись парамагнитные вещества. Чем выше концентрация парамагнетика, тем больше магнитная сила, но также больше и токсический эффект на живые экспериментальные образцы.

С целью выявления необходимых параметров установки выполнялся математический расчет процесса формирования экспериментальных объектов с использованием метода молекулярно-динамического (МД) моделирования (рис. 2). Для моделирования динамики полистироловых частиц в «магнитной ловушке» численно решена система уравнений Ньютона для всех частиц ($1 < k < N$):

$$m_p \frac{d^2 \mathbf{r}_k}{dt^2} = \sum_l F(|\mathbf{r}_{kl}|) \frac{\mathbf{r}_{kl}}{|\mathbf{r}_{kl}|} + \mathbf{F}_{kB} + \mathbf{f}_k + \mathbf{f}_g + \mathbf{f}_b, \quad (3)$$

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 $|\mathbf{F}_{kB}| = (\chi_p - \chi_s) \nabla V B$, где χ_p, χ_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.

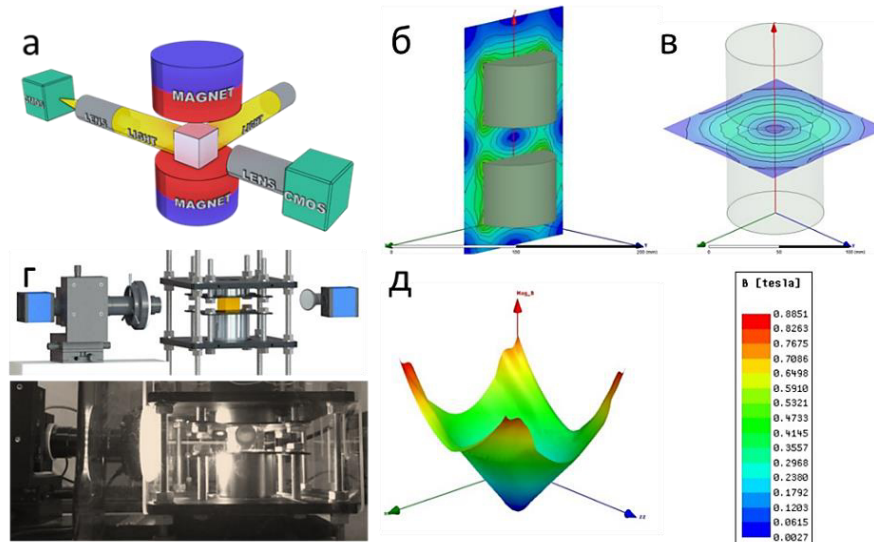


Рис. 2 – Магнитная система из цилиндрических магнитов: а) принципиальная схема магнитной системы; б) магнитное поле в вертикальном сечении, образованное между двумя постоянными цилиндрическими магнитами; в) магнитное поле в вертикальном сечении

Результаты моделирования формирования объектов и экспериментальные данные для случая системы на основе постоянных цилиндрических магнитов, сближенных друг к другу одноименными полюсами, приведены на рис. 3.

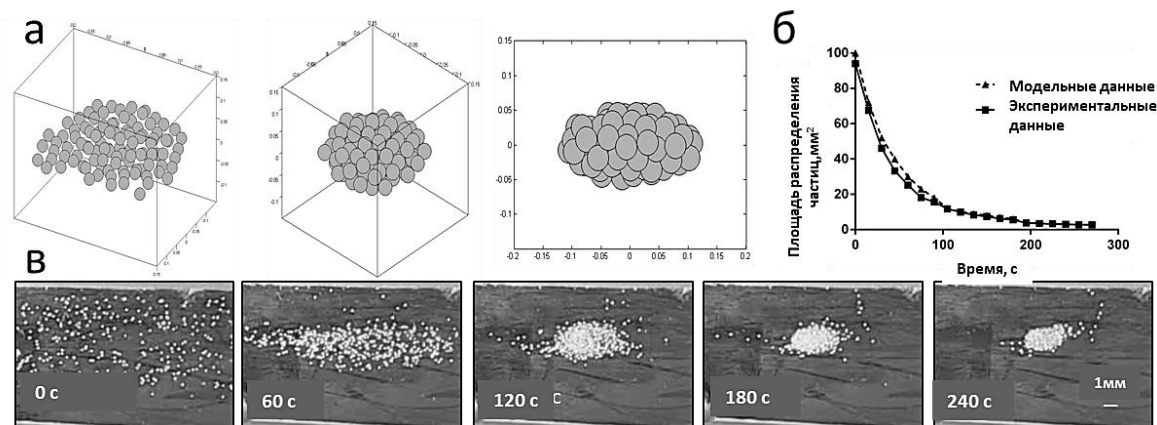


Рис. 3 – МД моделирование и экспериментальные данные формирования экспериментальных образцов из полистироловых шариков в жидкой среде с парамагнетиком (Gd^{3+} 250 мМоль): а) процесс формирования при МД моделировании. Количество частиц $N=100$; б) кинетика формирования образцов смоделированных и экспериментальных данных; в) этапы формирования образцов из полистироловых шариков в эксперименте

Исходя из результатов МД моделирования и экспериментальных исследований, было обнаружено, что для достижения левитации объектов при нетоксичной концентрации парамагнетика в жидкой среде для клеточного материала требуются высокие значения магнитной индукции (с градиентом не менее 1 Тл/см). Эти значения могут быть достигнуты с использованием магнитного поля системы, состоящей из постоянных магнитов или электромагнита Биттера.

На рис. 4 показана установка, основанная на кольцевых магнитах, расположенных близко друг к другу одноименными полюсами. Эта конфигурация позволяет создать значительный градиент магнитной индукции до 2,2 Тл/см на высоте формирования образцов в направлении противоположному силе гравитации, что позволяет существенно снизить требуемую концентрацию парамагнетика в среде до уровня 50 мМоль.

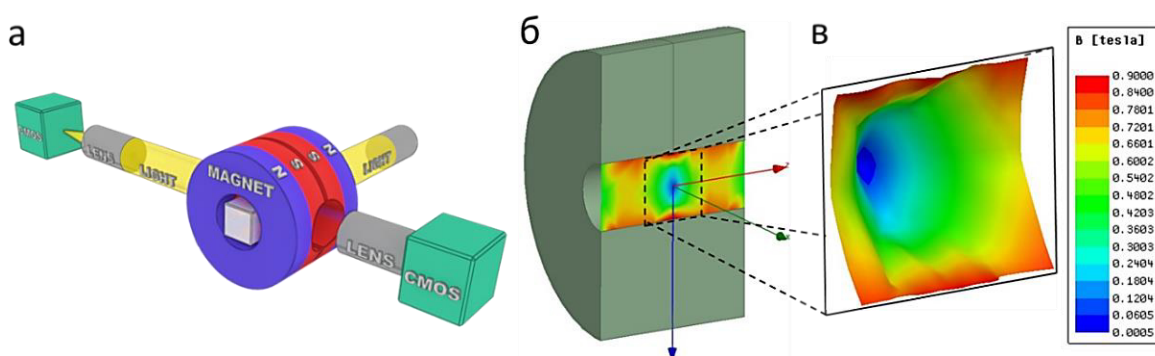


Рис. 4 – Экспериментальная магнитная установка: а) принципиальная схема магнитной установки, содержащей: два кольцевых неодимовых магнита, ориентированных одинаковыми полюсами друг к другу; стеклянную кювету, размещенную в осевом отверстии магнитов; подсветку; видеокамеры; б) вертикальное поперечное сечение магнитного поля; в) вертикальное распределение вектора магнитной индукции в рабочей зоне

С целью уменьшения потенциального токсического эффекта парамагнетика на клеточный материал рассмотрена возможность формирования образцов ТКМ с использованием сильных магнитных полей. Для создания подобных условий использовался электромагнит «Cell 1» с катушкой Биттера и отверстием 50 мм в диапазоне магнитной индукции поля от 1 до 31 Тл (рис. 5) и электрической мощностью 17 МВт. Исследования проводились в центре EMFL (European Magnetic Field Laboratory, Нидерланды).

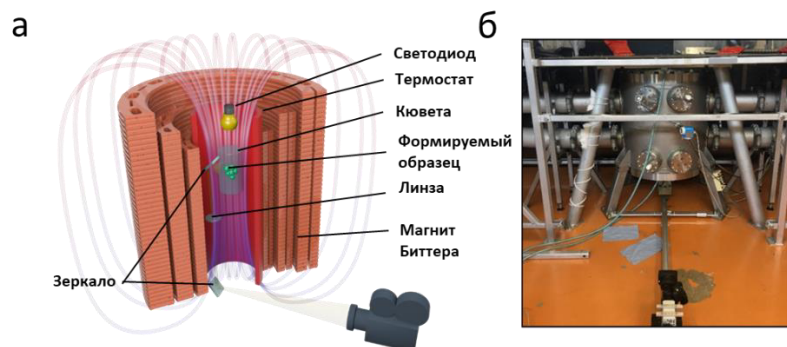


Рис. 5 – Магнитная установки на базе магнита Биттера: а) схема магнитной установки (диаметр отверстий 50 мм), мощность до 31 Тл; б) фотография магнита Биттера

Установлено, что процесс левитационного формирования образцов из дисперсных фаз за счет магнитного поля в присутствии 0,5 мМоль гадобутрола происходил при индукции магнитного поля 22 Тл. Процесс формирования происходил в течение 10 мин (рис. 6). Дальнейшее снижение концентрации парамагнетика требовало магнитной индукции более 31 Тл. Результаты магнитолевитационного формирования материалов подтвердили разработанные прогностические математические модели и расчеты, что позволило снизить используемую концентрацию парамагнетика в среде до нетоксичных на клеточный материал значений (с 50 мМоль до 0,5 мМоль).

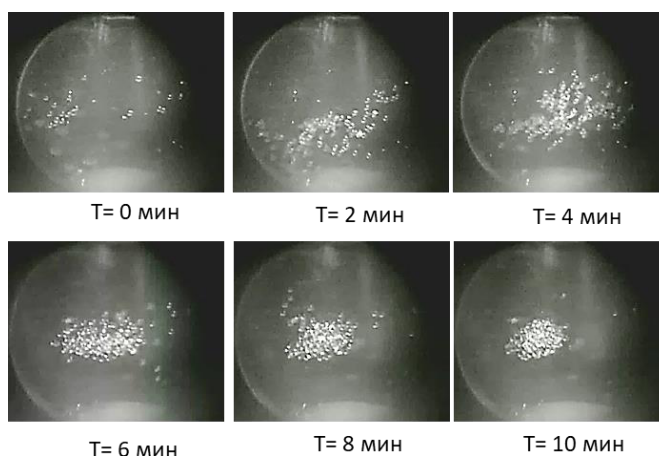


Рис. 6 — Агрегация полистироловых шариков под действием сильного магнитного поля (22 Тл)

Экспериментальные стенды по генерации акустических полей

Акустическое (ультразвуковое) поле может использоваться для левитации объектов. Благодаря зависимости акустического поля от формы и размеров ультразвукового источника, его рабочей частоты и граничных условий можно создавать сложные трехмерные «акустические ловушки». Когда объекты помещаются в объем, подвергаемый воздействию ультразвукового поля, возникает 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 объекта, то результирующая сила излучения перемещает сфероиды в узлы акустического давления.

Однако, ультразвуковое поле эффективнее для формирования небольших «акустических ловушек» и не позволяет удерживать объемные материалы, что ограничивает возможность формирования сложных трехмерных ТКМ. Для манипулирования большими изделиями только акустическим полем требуется большая мощность излучения, что может привести к разрушению экспериментального образца.

В установке с плоским излучателем сформировано стоячее ультразвуковое поле в вертикальном направлении, которое позволяет образовывать слоистые плоские кластеры (рис. 7).

Акустическая радиационная сила, создаваемая цилиндрическим пьезопреобразователем, воздействует на объекты только в горизонтальном

направлении, тогда как в вертикальном направлении объекты оседают в растворе под действием силы тяжести.

Радиационная сила F_{rad} , действующая на объекты с радиусом r в ультразвуковом поле выглядит следующим образом:

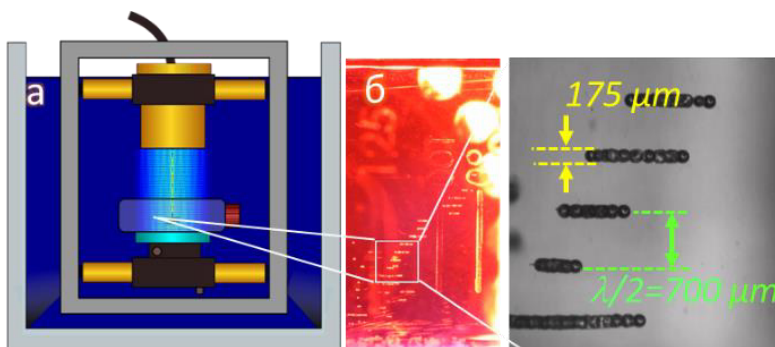


Рис. 7 – Акустическая установка на базе плоского излучателя и отражателя: а) схема; б) акустическая левитация образцов из модельных объектов

$$F_{rad} = -\nabla U, \quad (4)$$

где потенциал Горькова U выражается через амплитуды акустического давления $|P|$ и колебательной скорости $|v|$:

$$U = \frac{\pi r^3}{3} \left\{ f_1 \frac{|P|^2}{\rho c^2} - \frac{3}{2} f_2 \rho |v|^2 \right\}, \quad (5)$$

где множители f_1 и f_2 зависят от упругих свойств рассеивателя, плотности ρ_{sc} , а также продольной и поперечной скоростей упругих волн c_l и c_t и определяются как:

$$f_1 = 1 - \frac{\rho c^2}{\rho_{sc} c_l^2} \frac{1}{1 - \frac{4c_t^2}{3c_l^2}}, \quad f_2 = 2 \frac{\rho_{sc} - \rho}{2\rho_{sc} + \rho}. \quad (6)$$

Данное выражение позволяет напрямую из поля давления и колебательной скорости рассчитать поле Горьковской силы для анализа траекторий движения объектов, помещенных в это поле.

Распределение давления внутри колеблющегося с частотой f цилиндра радиуса a описывается следующим образом:

$$P(R) = \frac{P_0}{J_0(ka)} J_0(kR), \quad (7)$$

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 резонансные частоты, на которых амплитуда звукового давления будет наиболее высока. Также стоит отметить, что радиальное распределение амплитуды давления соответствует функции Бесселя. Таким образом, можно рассчитать радиусы зон, формирующих узлы и пучности.

Структура поля звукового давления была с высокой точностью радиально симметричной: узлы и пучности формировали чередующиеся друг за другом цилиндрические области (рис. 8). В вертикальном направлении структура поля не являлась полностью однородной, а именно, на границе пьезоэлектрика с жидкостью неизбежно возникают поверхностные волны Лэмба, являющиеся причиной вариации амплитуды излучаемого поля акустического давления.

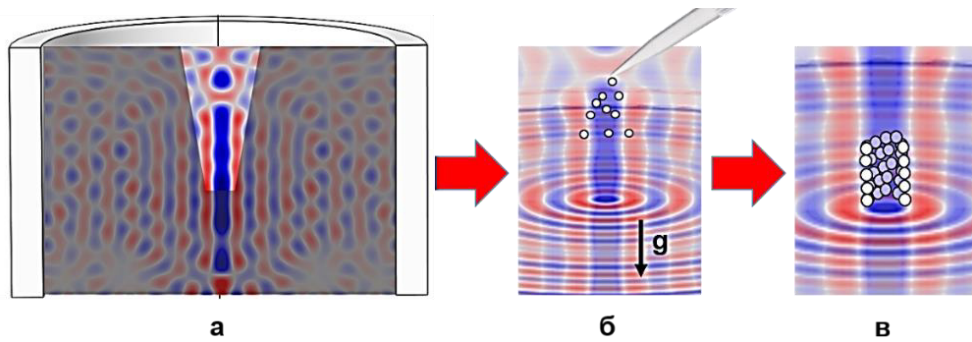


Рис. 8 – Схема эксперимента по формированию трубчатого экспериментального образца в акустическом поле: а) стоячее поле, созданное кольцевым пьезопреобразователем, и положение формы из агарозы (темная область) внутри цилиндра; б) добавление образцов в область ультразвукового поля; в) формирование экспериментального образца в результате оседания в агарозной форме и воздействия акустической радиационной силы

Таким образом, варьируя частоту, подаваемую с генератора на преобразователь, можно изменять радиус узловой области поля и, соответственно, параметры формируемого материала.

Экспериментальные стенды по генерации магнитоакустических полей

Одним из основных потенциальных преимуществ развития магнитоакустической левитационного формирования является возможность создания трехмерных экспериментальных образцов со сложной трехмерной геометрией, такие как тор, трубка и более сложные топологии, включая сеть ветвящихся каналов. Сильное магнитное поле, используемое в этом процессе, позволяет значительно снизить концентрацию парамагнетика, тем самым устранить цитотоксический эффект и обеспечить левитацию объектов. Акустическое поле, в свою очередь, используется для задания геометрии объектов.

Схематически процесс использования комбинированного магнитоакустического поля приведен на рис. 9.

Для формирования кольцевых образцов разработан подход с использованием постоянных магнитов специальной формы (рис. 10) и акустического пьезоэлектрического преобразователя в форме цилиндра.

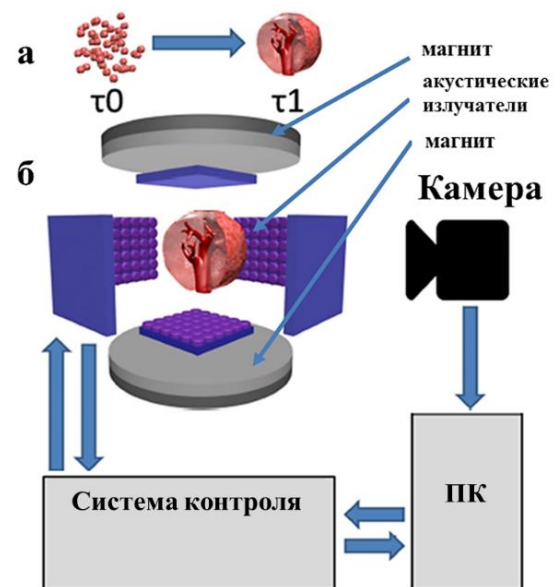


Рис. 9 – Схематическое изображение формирования образцов под воздействием магнитных и акустических полей: а) этапы формирования; б) магнитоакустическая система

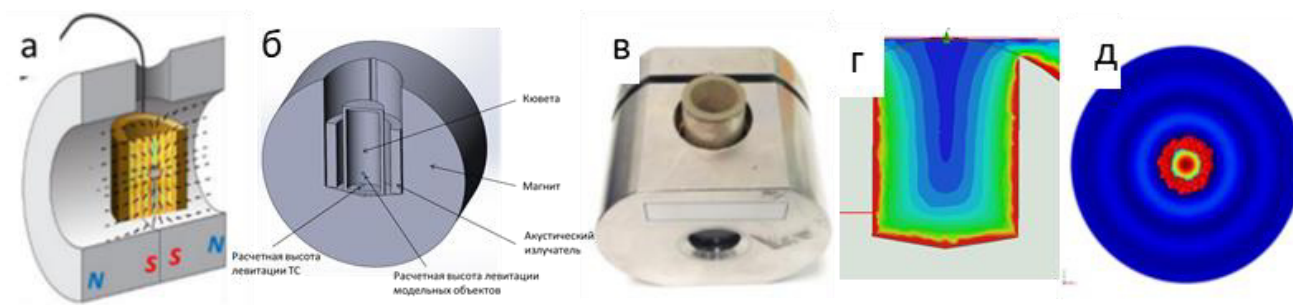


Рис. 10 –Магнитоакустическая установка на базе постоянных магнитов: а) схематическое изображение конструкции установки; б) вид в разрезе; в) магнитоакустическая установка с цилиндрическим ультразвуковым преобразователем; г) магнитное поле в вертикальном сечении; результаты численного моделирования сборки; д) модельное распределение объектов в магнитоакустическом поле

Объекты помещались в агарозную кювету с раствором. Исследовательская установка была помещена в термостат, который поддерживал температуру $37 \pm 0,5$ °С. Для осуществления магнитной левитации в питательной среде были растворены хелаты гадолиния (парамагнетик) в концентрации 50 мМоль.

С целью уменьшения токсического эффекта парамагнетика и для формирования из объектов протяженного трубчатого образца разработан подход с использованием сильного магнитного поля на базе электромагнита Биттера мощностью до 31 Тл.

Для обеспечения магнитной левитации использовали магнит Биттера с отверстием 50 мм и индукцией магнитного поля до 31 Тл. Методика контроля процесса сборки с использованием системы зеркал и цифровой камеры показана на рис. 11.

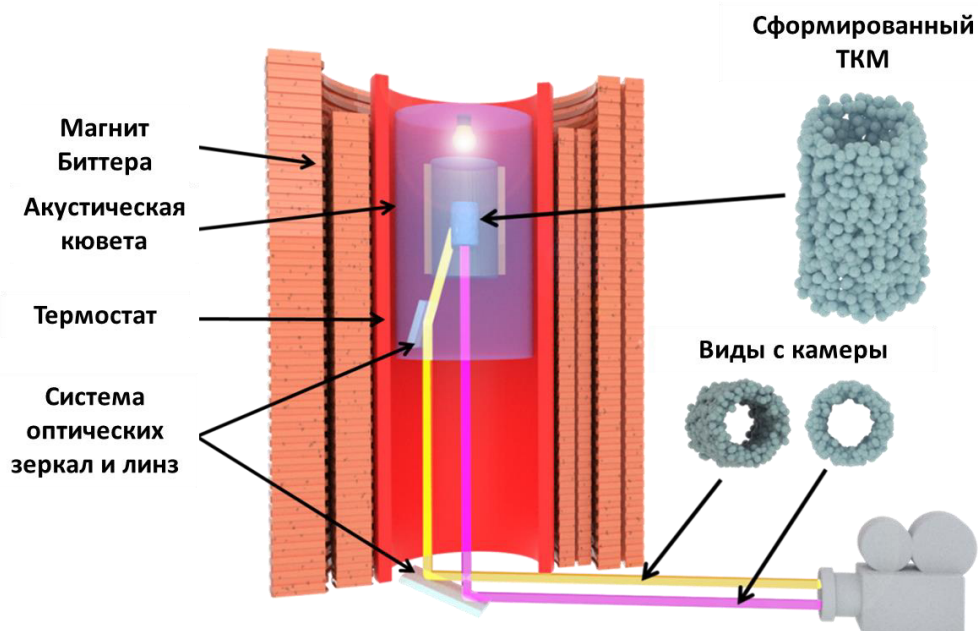


Рис. 11 — Оптическая схема, используемая для регистрации процесса формирования образцов в магнитоакустической установке

Для обеспечения процесса формирования использовалась кювета (рис. 12), содержащая пьезокерамические цилиндрический и кольцевые ультразвуковые преобразователи, светодиоды, оптическое зеркало для мониторинга, а также агарозный контейнер для объектов.

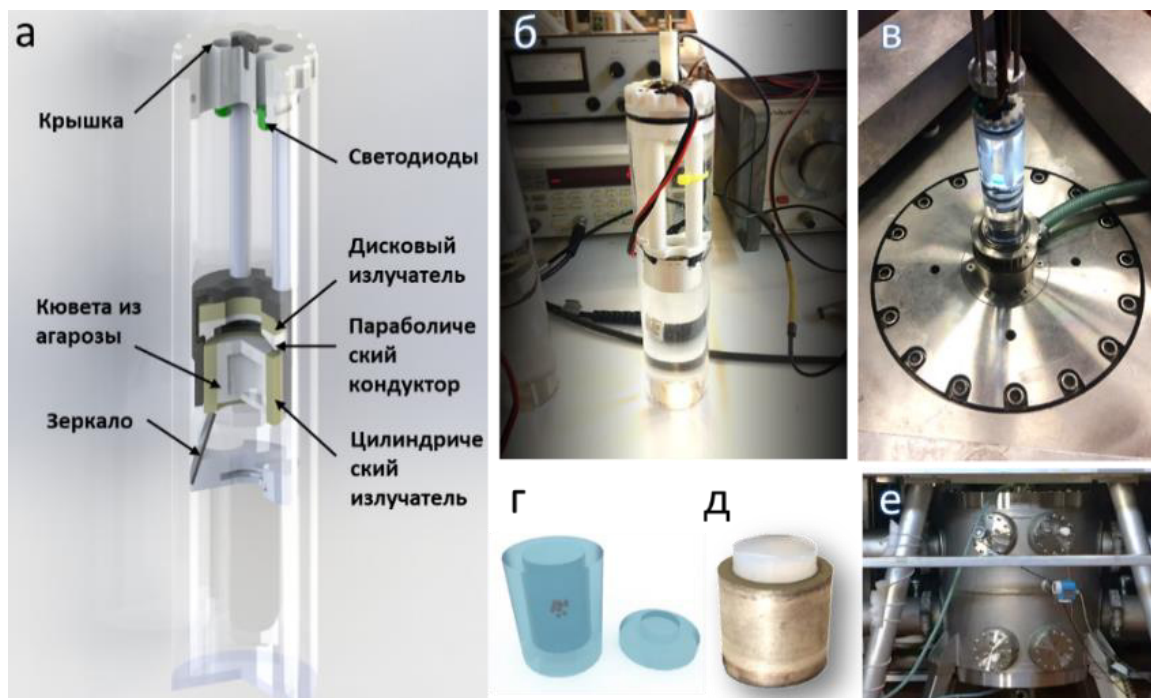


Рис. 12 — Конструкция кюветы с акустическими преобразователями: а) схема кюветы; б) вид кюветы; в) установка кюветы в магнит Биттера ; г) трехмерная модель агарозной кюветы; д) агарозная кювета в цилиндрическом преобразователе; е) магнит Биттера

Кольцевой преобразователь в сочетании с фокусирующей параболической пластиной использовался для обеспечения перемешивания объектов перед началом процесса формирования.

Проект экспериментальной установки основан на результатах численного моделирования (рис. 13). Подобная оценка необходима для определения параметров распределения акустического давления и для определения воздействия на образцы акустического излучения и магнитных сил. Оценка оптимальных

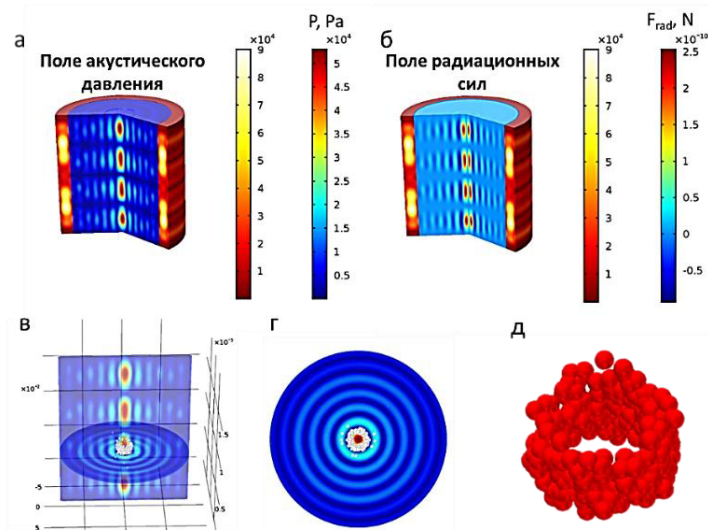


Рис. 13 – Результаты численного моделирования акустического поля и процесса формирования объектов в магнитоакустическом поле: а) распределение амплитуды акустического давления внутри преобразователя; б) распределение силы излучения; в) формирование в узлах акустического поля; г) коаксиальная структура узлов стоячей волны внутри цилиндрического преобразователя; д) геометрия трубчатого образца

параметров эксперимента проводилась методом конечных элементов с использованием программного обеспечения COMSOL Multiphysics и Matlab.

Для формирования образцов с трубчатой геометрией использовалась индукция магнитного поля $\sim 9,5$ Тл. Управление внутренним диаметром трубчатого образца происходило за счет применения акустических волн с несколькими резонансными частотами в диапазоне от 0,5 до 1,0 МГц. Номинальная амплитуда акустической волны на выходе генератора составляла до 10 В (рис. 14).

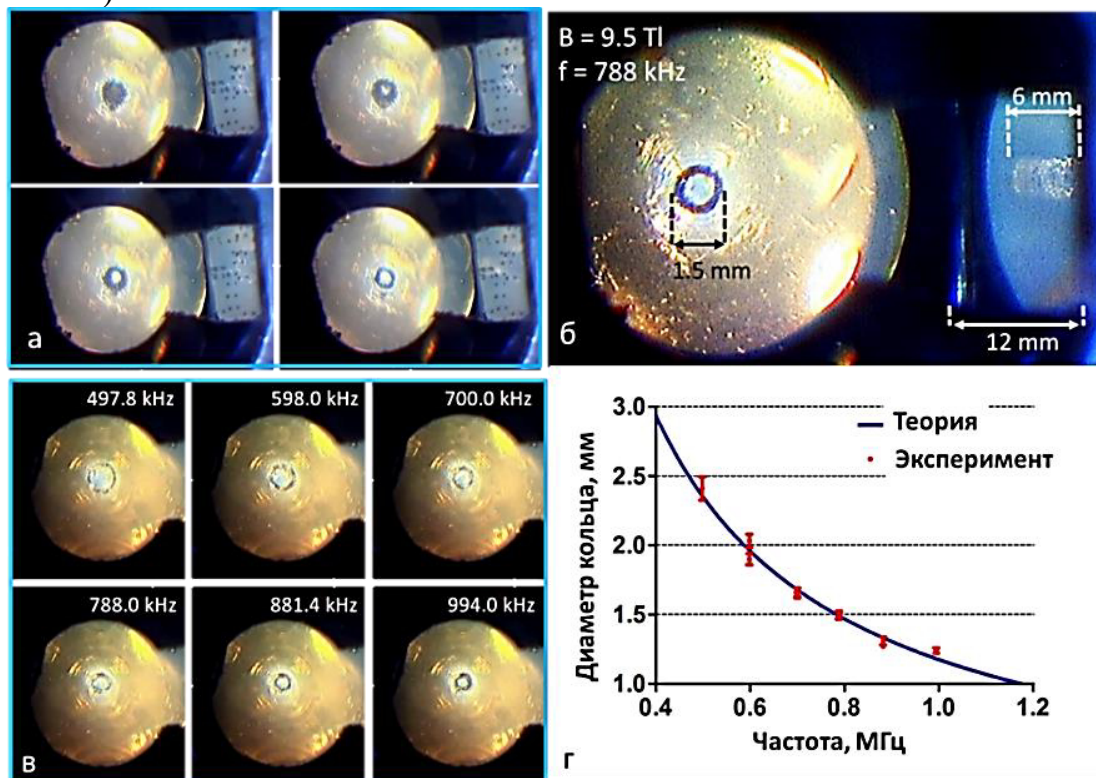


Рис. 14 – Формирование образцов из модельных объектов при различных параметрах акустического поля: а) процесс формирования в левитационном состоянии в акустическом и магнитном полях; б) левитирующий трубчатый образец; в) изменение диаметра от частоты; г) сходимость экспериментальных и рассчитанных данных

Как и ожидалось, объекты, сформированные в узлах стоячих акустических волн, левитировали под действием магнитофоретической силы и образовывали сплошную трубку с радиусом от 1,0 до 2,5 мм. Результаты численного моделирования воспроизведены в эксперименте. Форма сформированного экспериментального образца хорошо согласуется с результатами моделирования.

Таким образом, разработан способ формирования трехмерных композиционных материалов под действием магнитного, акустического полей и их комбинации, который позволяет производить биофабрикацию при незначительной концентрации парамагнетика в окружающей жидкости за счет увеличения интенсивности магнитного поля. Рассмотрены акустические параметры (фаза-частотные), необходимые для обеспечения возникновения требуемой радиационной силы и управляемого формирования ТКМ.

В четвертой главе представлены результаты формирования функциональных ТКМ для тканевой инженерии в неоднородном магнитном, акустическом полях и их комбинации.

Формирование ТКМ твердых тканей на основе фосфатов кальция

Приведены результаты способа получения биосовместимых ТКМ из неорганического материала на основе ФК для замещения и регенерации костных дефектов. Данный способ позволяет создавать ТКМ на основе ОКФ в течение 2 суток в условиях левитации, исключая использование временных поддерживающих материалов. Процесс химического преобразования исходного α -ТКФ в условиях левитационного формирования протекает многостадийно (рис. 15).

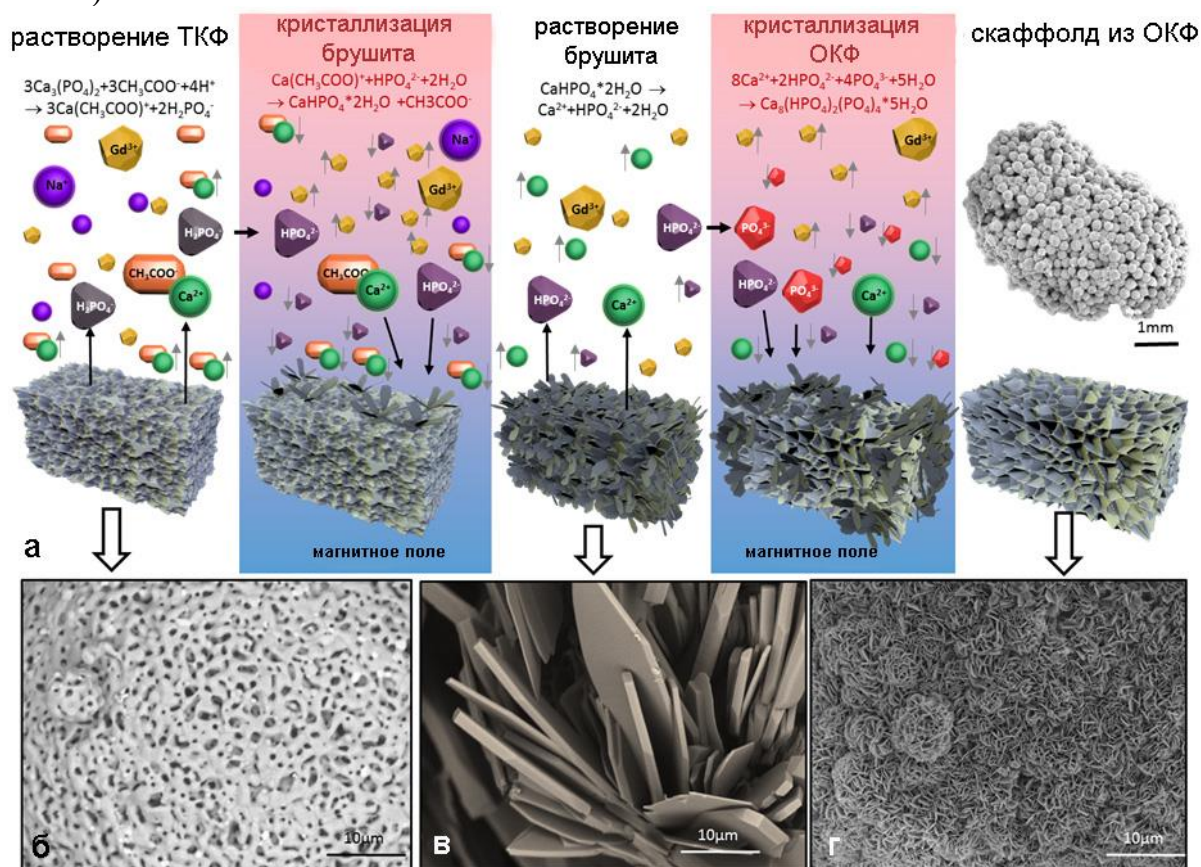


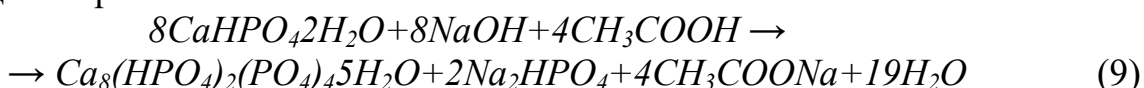
Рис. 15 — Изготовление ТКМ на основе ФК в парамагнитной среде с использованием магнитного поля (концентрация парамагнетика 3 Моль): а) схематическое изображение стадий формирования; б) изображение СЭМ поверхности исходных частиц α -ТКФ; в) изображение СЭМ фазы дикальцийфосфата дигидрата ДКФД (промежуточный продукт); г) изображение СЭМ поверхности полученного образца ТКМ (фаза ОКФ) (шкала 10 мкм)

В течение 24 ч начальная структура α -ТКФ трансформируется в ДКФД. α -ТКФ на поверхности ТКМ растворяется из-за взаимодействия поверхности с продуктами диссоциации ацетата натрия, сопровождающегося выделением Ca^{2+} , H_2PO_4^- (преобладает в растворе) и $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ в растворе. Когда концентрация этих ионов в интерфазе 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 α -ТКФ с последующим их ростом. Образование ДКФД происходит по следующей схеме:



Далее происходит взаимодействия кристаллов ДКФД с продуктами диссоциации уксусной кислоты и гидроксида натрия, которые способствуют увеличению концентрации катионов Ca^{2+} и анионов $H_2PO_4^{4-}$ и $H_2PO_4^{2-}$ 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:



Выявлено, что согласно данным СЭМ и РФА образцов ТКМ имеет мультимодальное распределение пористости (10-100 мкм), которое обеспечивает миграцию клеток внутрь сети открытых пор и рассасывание имплантируемого вещества со скоростью соответствующей образованию новой костной ткани.

Проведены исследования по цитотоксичности, адгезии и пролиферации клеток, полученных ТКМ. Результаты доклинических исследований приведены на рис. 16.

Формирование ТКМ мягких тканей из клеточного материала

Для биофабрикации органических функциональных ТКМ проведены исследования по формированию образцов из ТС. Теоретически и эмпирически было установлено, что минимальная обратимо токсичная концентрация парамагнетика, при которой в лабораторных условиях на базе установки из неодимовых магнитов возможно магнитное левитационное формирование, составляет 50 мМоль. Использование данной концентрации позволяет инкубировать тканевой эквивалент в течении 24 ч для обеспечения процесса

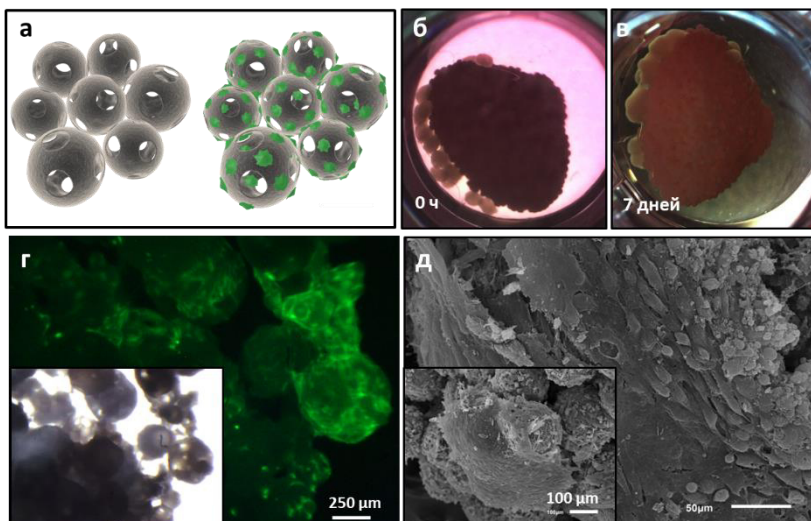


Рис. 16 — Биосовместимость ТКМ полученного в магнитном поле: а) схематическое изображение прикрепления и миграции клеток SHED (зеленого цвета) на поверхности и внутри ТКМ; б,в) ТКМ инкубированный с ТС SHED (0 ч-7 дн.); г) изображения флуоресцентной и световой микроскопии 3ДКМ, инкубированного с ТС SHED (зеленого цвета) в течение 7 дн.; д) СЭМ ТКМ с ТС SHED на поверхности после 7-дн. инкубации (шкала 50, 100 мкм)

частичного слияния ТС. Культивирование более продолжительное время пагубно сказывается на жизнеспособности клеток, ввиду того, что гадолиний избирательно и обратимо связывается с кальциевыми каналами, чем блокирует трансмембранный транспорт ионов и органических соединений, а также передачу межклеточных сигналов (рис. 17).

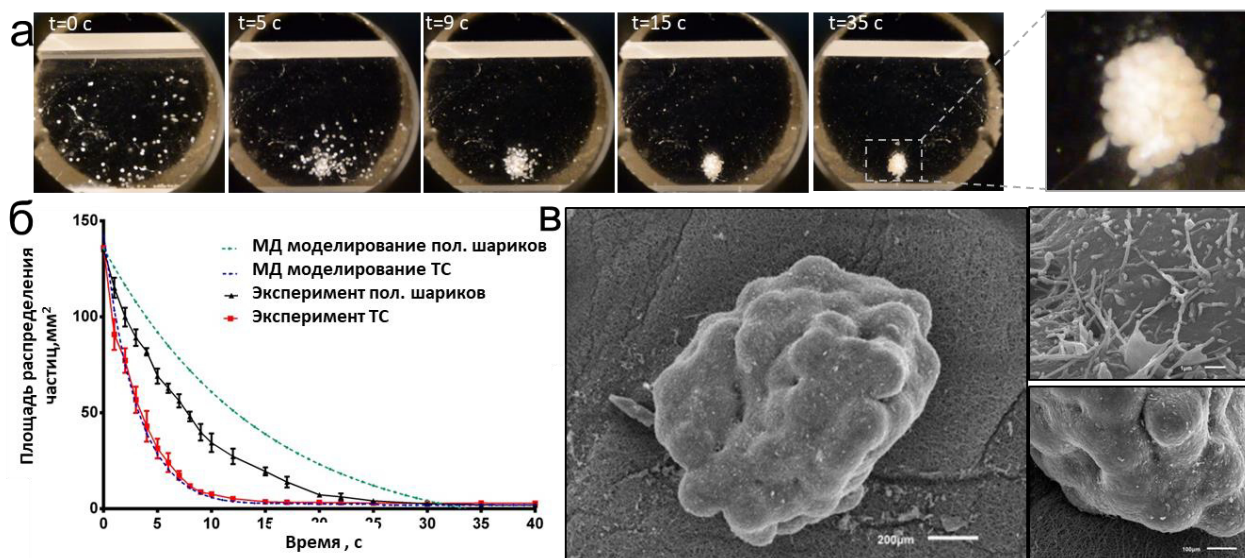


Рис. 17 — Левитационное формирование ТКМ на основе клеточного материала в магнитном поле: а) этапы формирования из объектов хондросфер; б) кинетика формообразования моделируемых и экспериментальных образцов ТКМ; в) СЭМ изображение ТКМ из хондросфер, сформированного в магнитном поле в течение 24 ч. Вставки демонстрируют типичные поверхностные структуры хондроцитов, включая множественные микроворсинки при большом увеличении

Для снижения концентрации парамагнетика в питательной среде были проведены исследования в магните Биттера (рис. 18). Использование мощных магнитов Биттера позволяет значительно повысить градиент и интенсивность магнитного поля (вплоть до 31 Тл).

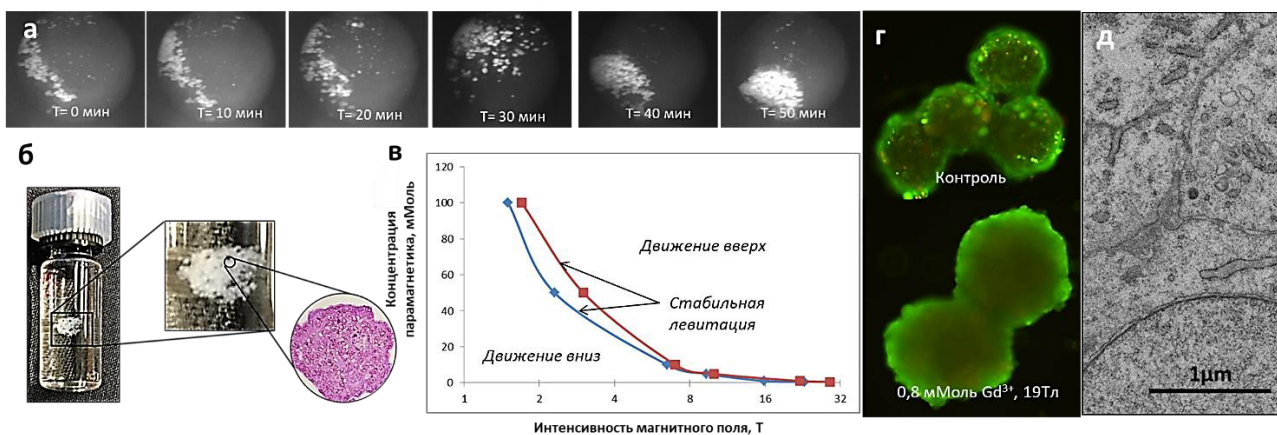


Рис. 18 — Формирование ТКМ при левитации в сильном магнитном поле: а) из ТС при концентрации парамагнетика 0,8 мМоль и 19 Тл магнитного поля; б) материал полученный в течении 3 ч при 19 Тл (круглая вставка- гистологический срез); в) кривые условий левитации в зависимости от концентрации парамагнетика и силы магнитного поля, для ТС (красная кривая) и модельных объектов (синяя кривая); г) Live / Dead анализ ТС после 1 ч воздействия магнитного поля 19 Тл при 0,8 мМоль гадоутрола; д) ТЭМ ТС после 1 ч воздействия магнитного поля 19 Тл при 0,8 мМоль гадоутрола

Разработан способ биофабрикации ТКМ в сильных магнитных полях. Жизнеспособные клеточные эквиваленты получены из хондросфер в парамагнитной среде с использованием нетоксичной концентрации Gd^{3+} . Выявлена минимальная концентрация парамагнетика Gd^{3+} (0,8 мМоль), обеспечивающая магнитное левитационное формирование.

Анализ выявил минимальную цитотоксичность магнитного поля с индукцией до 30 Тл для ТС после 1 ч воздействия. ТКМ из ТС (клеточная линия SW-1353, остеосаркома человека) формировались при 19 Тл и достигали слияния через 3 ч.

Результаты по формированию периодических и плоских форм в условиях левитации из ТС приведены на рис. 19. Рассчитанная минимальная амплитуда давления для левитирования объектов оценивалась как 65 кПа при частоте 1,09 МГц.

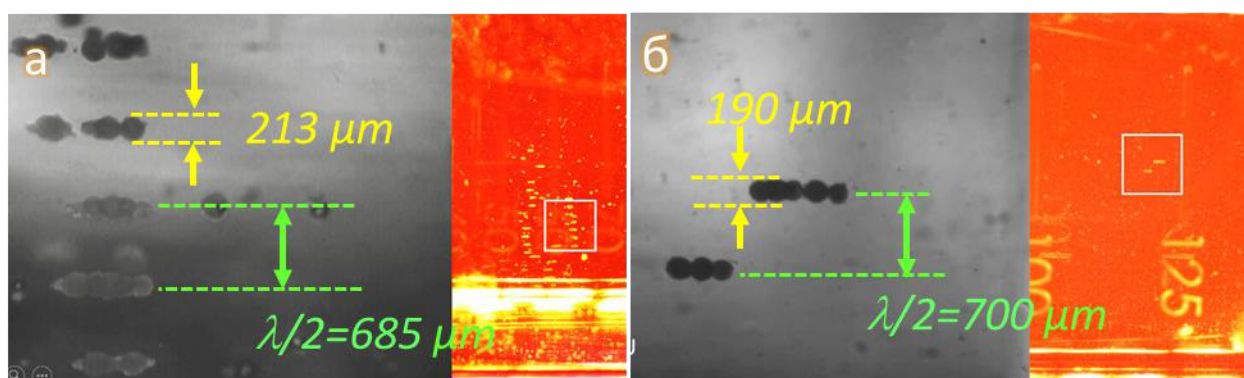


Рис. 19 – Левитация объектов в стоячем горизонтальном акустическом поле: а) ТС из NIH 3T3; б) ТС из хондроцитов. Сила гравитации направлена вниз

В случае формирования кольцевых и трубчатых геометрий для создания клеточных протяженных эквивалентов сосуда разработан подход по формированию ТКМ тканевых эквивалентов трубчатой геометрии в цилиндрическом акустическом поле. В ходе эксперимента ТС помещались внутри агарозной формы 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 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 тубулярную форму изделия. Фотографии эксперимента по формированию ТКМ тканевого эквивалента показаны на рис. 20.

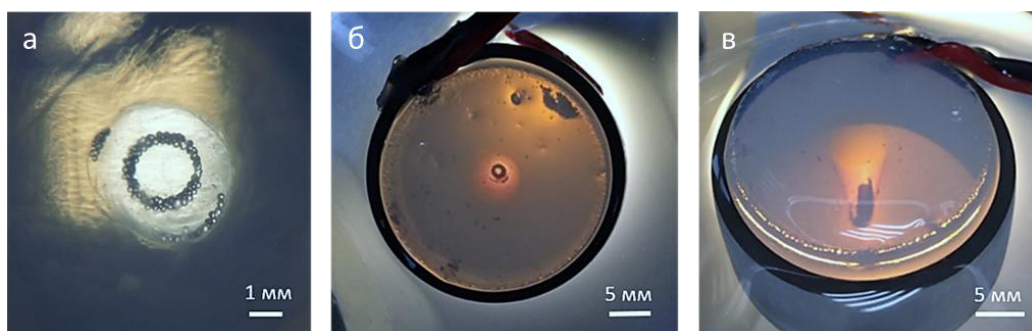


Рис. 20 – Фотографии эксперимента по формированию ТКМ в акустическом поле: а) вид сверху формируемого ТКМ; б, в) виды сверху и под углом на ТКМ с трубчатой геометрией из ТС в агарозной форме внутри пьезоцилиндра

Источником акустического поля являлся полый пьезокерамический цилиндр с резонансной частотой 800 кГц. Удержание сформированного материала в течение суток при температуре 37 °С привело к слиянию ТС в сплошной тубулярный жизнеспособный тканевой ТКМ. Размер получившегося образца приближался к расчетным. Показана возможность манипулирования ТС с помощью ультразвуковой волны для придания формы ТКМ желаемого диаметра. Однако, в данной конфигурации установки имеется фактор ограничения поступления питательных веществ в протяженный клеточный материал, вызванный влиянием агарозной стенки кюветы. В связи с этим разработан метод, основанный на комбинации акустического и магнитного полей.

Проведена оценка принципиальной возможности управляемого формирования свободно левитирующего клеточного материала в магнитоакустическом поле. Выполнены исследования на базе постоянных магнитов при концентрации парамагнетика в среде 50 мМоль. В результате формирования кольцевого ТКМ из ТС (из гладкомышечных клеток и хондроцитов) в условиях инкубатора (поддержание температуры и CO₂) в течение 24 ч происходило слияние клеток, что указывает на то, что ТС в образце оставались жизнеспособными (рис. 21).

В связи с тем, что постоянные магниты не способны создать протяженное требуемое магнитное поле для обеспечения условий формирования протяженных

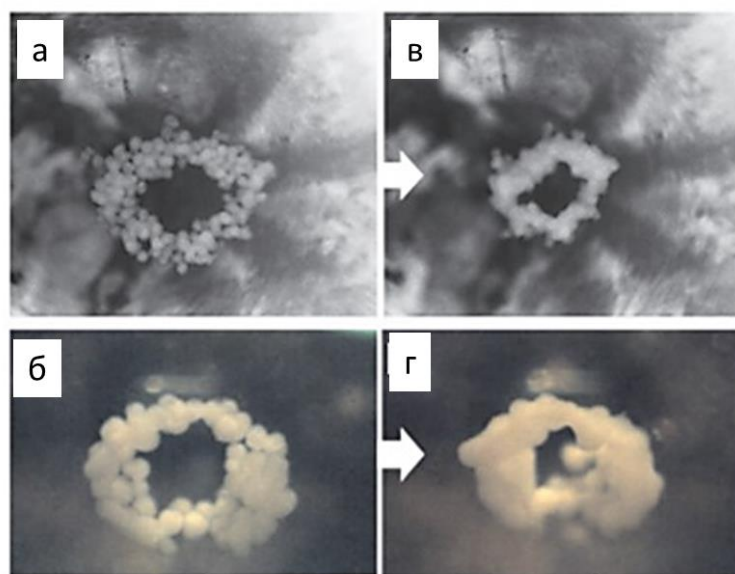


Рис. 21 — Формирование кольцевого образца ТКМ из ТС в начале эксперимента и после 20 ч слияния из (а, в) гладкомышечных клеток и (б, г) хондроцитов

клеточных материалов, проведены исследования с использованием магнитоакустического поля в магните Биттера с использованием специальной разработанной акустической кюветы. Сильное магнитное поле позволило снизить концентрации парамагнетика и увеличить рабочее пространство в направлении силы тяжести. На рис. 22 приведена схема эксперимента по формированию функционального трубчатого ТКМ.



Рис.22 – Схема эксперимента по левитационной магнитоакустического формирования ТКМ из ТС

В исследованиях реализована магнитоакустическая левитационная биофабрикация при силе магнитного поля 10 Тл с формированием функциональных ТКМ (тканевых эквивалентов кровеносного сосуда) трубчатой геометрии из миосфер (hbSMCs). Сформированные трубчатые ТКМ обладали функциональной сократимостью (вазоконстрикцией), свойственной нативным кровеносным сосудам. Просвет трубчатого образца значительно уменьшился после добавления эндотелина до 70 % от исходного диаметра, по сравнению с контролем - 90 % (рис. 23), что соответствует биомеханике нативной сосудистой ткани.

Использование гладкомышечных клеток человека для формирования трубчатых образцов, способных сокращаться, позволило провести прямую проверку функциональности полученных ТКМ. Сократительные мышечные кольца и 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 механизма 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).

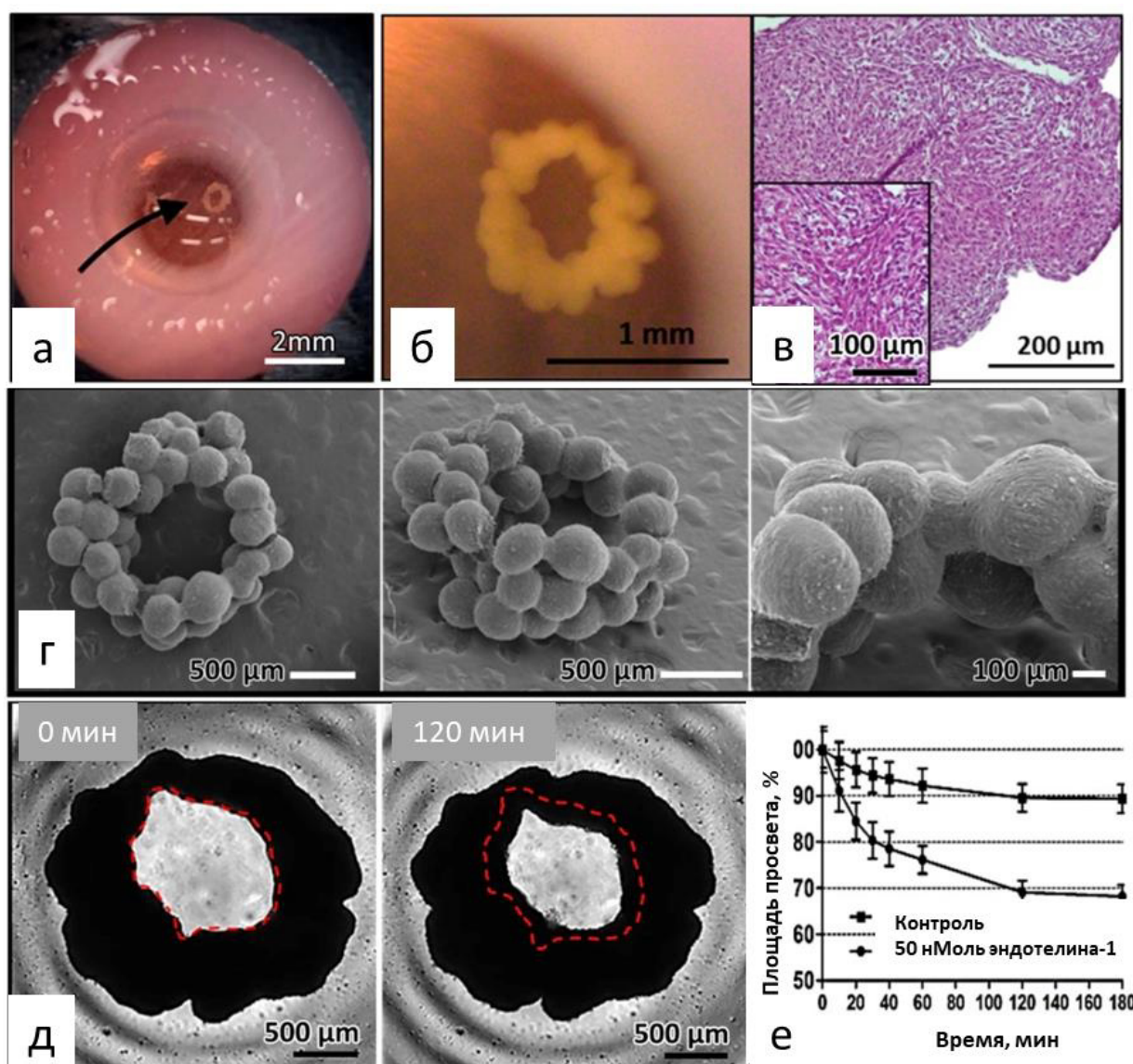


Рис. 23 – Характеристика трубчатого образца ТКМ, изготовленного методом магнитоакустической левитации в течение 8 ч при 20 мМоль гадобутроле: а) фотография ТКМ внутри агарозной кюветы; б) стереоизображение ТКМ; в) гистология образца; г) СЭМ ТКМ; д) сокращение просвета образца ТКМ в течение 120 мин в присутствии 50 нМоль эндотелина-1; е) динамика уменьшения площади, вызванная добавлением 50 нМоль эндотелина-1

Таким образом, впервые показана возможность магнитоакустического изготовления функциональных ТКМ сложных геометрических форм.

В пятой главе приведены результаты практической реализации магнитного формирования в условиях микрогравитации на РС МКС. Разработанная научная аппаратура «3D-МБП», состоящая из магнитного биопринтера «Орган.Авт» и набора многофункциональных кювет, была доставлена на орбиту 03 декабря 2018 г. и использована в период миссий МКС 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 66 и 70 (рис. 24).

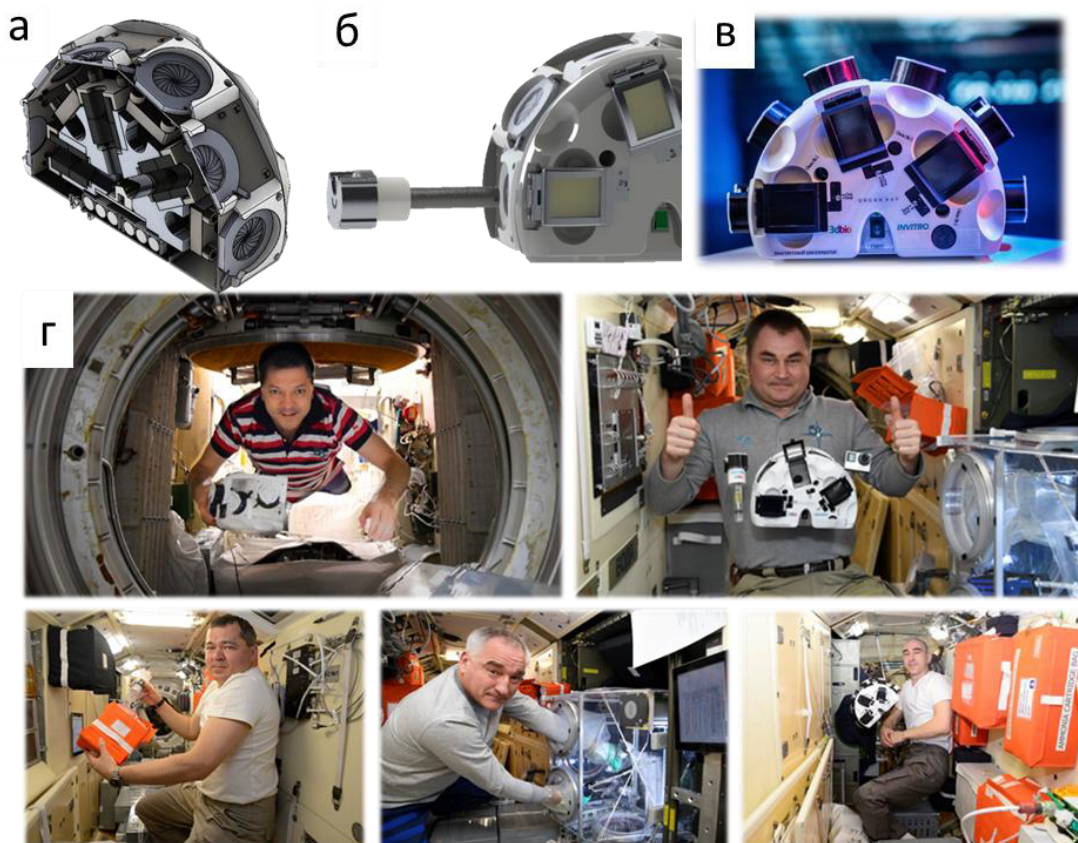


Рис. 24 – Оборудование для проведения исследования в условиях космического пространства: а) разрез магнитного биопринтера «Орган.Авт»; б) схема установки кюветы в биопринтер; в) внешний вид оборудования; г) космонавты Роскосмоса (Олег Кононенко, Алексей Овчинин, Олег Скрипочка, Александр Скворцов, Анатолий Иванишин) работают с биопринтером в период миссий МКС 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 66 и 70

Оборудование имеет три контура безопасности для защиты космонавтов от токсичных веществ. Аппаратура позволяет проводить и регистрировать на видео сеансы исследования, обеспечивать фиксацию (например, гистологическую) экспериментальных образцов для их последующего анализа после возврата на Землю. «3D-МБП» имеет 6 рабочих зон биофабрикации, в каждой из которых постоянные магниты специальной формы, сближенные вплотную друг к другу одноименными полюсами, создают «магнитные ловушки». Для ограничения воздействия магнитного поля на внешнее пространство аппаратура обладает экранированным корпусом. Для обеспечения подсветки камеры биофабрикации оборудование оснащено автономным источником питания и светодиодной системой.

Устройство кюветы (рис. 25) представляет собой конструкцию, состоящую из

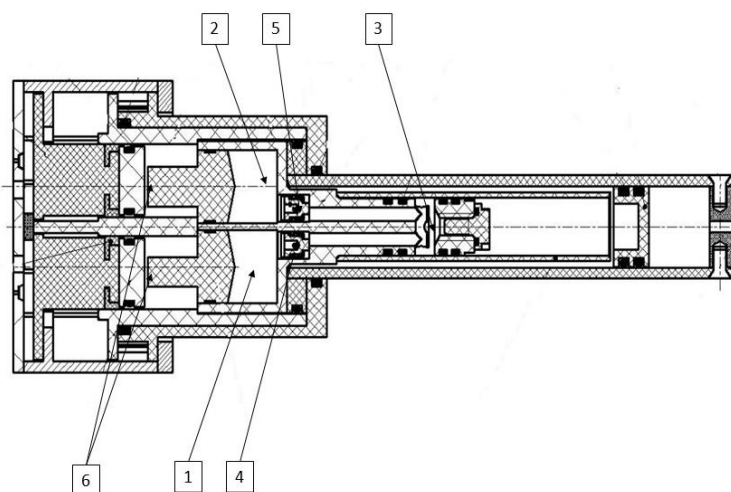


Рис. 25 - Изображение кюветы в разрезе

трех емкостей: емкости поз. 1 (рис. 25) для среды (например, питательной), емкости поз. 2 для фиксирующего раствора и емкости поз. 3 для осуществления процесса формирования ТКМ (рабочая камера биофабрикации). Емкости цилиндрической формы имеют следующие характеристики: для среды с объемом $1\pm 0,2$ мл; для фиксирующего раствора с объемом $0,5\pm 0,1$ мл; камера биофабрикации с объемом $2\pm 0,2$ мл. Стенки камеры биофабрикации прозрачны, что позволяет проводить визуальный осмотр и видеозапись экспериментов.

Две емкости поз. 1, 2 индивидуально соединены с камерой биофабрикации поз. 3, изолированной клапанами поз. 4, 5 (рис. 25), чтобы избежать утечки среды и/или фиксирующего раствора в камеру биофабрикации. Емкости для среды и фиксирующего раствора содержат свои собственные независимые поршни поз. 6 (рис.25) для ручного управления подачи материала в камеру биофабрикации.

В конструкции кюветы выполнены каналы для подачи экспериментальных растворов в камеру биофабрикации. Конструкция камеры биофабрикации обеспечивает компенсацию объема не менее 2 мл.

Схема проведения экспериментов в условиях микрогравитации на борту РС МКС по формированию тканеинженерных ТКМ приведена на рис. 26.

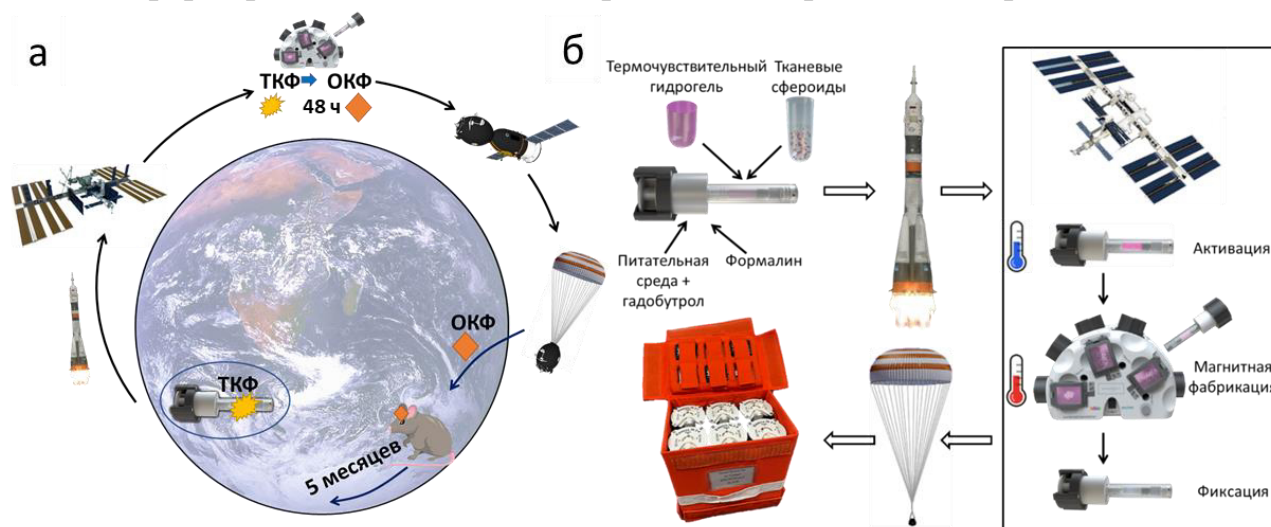


Рис. 26 - Схема экспериментов на РС МКС в условиях микрогравитации:
а) формирование керамических ТКМ; б) формирование органических ТКМ (тканевых эквивалентов) из хондросфер, тиросфер, миосфер

Формирование трехмерных материалов твердых тканей на основе фосфатов кальция

Создание ТКМ в условиях микрогравитации осуществлялось по схеме, представленной в главе 4 согласно рис. 27 а. В качестве контроля эксперимент проводился на Земле. Схема проведения процесса была организована следующим образом. В условиях кислого буферного раствора α -ТКФ перекристаллизуется в ДКФД, при этом наследуя структурные особенности материала на микро- и макроуровнях. Химическое склеивание материала происходит за счет растворения поверхностного слоя гранул α -ТКФ и перекристаллизации его в ДКФД. Условия микрогравитации и наличие магнитного поля приводит к росту кристаллов ДКФД, их размер превышает

100 мкм в длину, ширина достигает 80 мкм, а толщина 10 мкм. Морфологические особенности поверхности экспериментальных образцов представлены на рис. 27 (в, д, е). Согласно результатам РФА фазовый состав экспериментальных образцов соответствует ДКФД с основными пиками (0 2 0); (0 2 1); (0 4 1); (-2 2 1) при 2Θ 11,68; 20,93; 29,26; 30,51° соответственно.

Процесс трансформации ДКФД в ОКФ можно характеризовать в несколько этапов. При выдержке в буферном растворе происходит растворение поверхности кристаллов ДКФД с образованием на границе ФК / буферный раствор пересыщенного слоя относительно катионов кальция и фосфат-ионов. Далее условия буферной системы обеспечивают кристаллизацию ОКФ на поверхности керамического матрикса. Установлено, что условия проведения процесса зависят от температуры, значения рН и элементов примесей. Условия микрогравитации и магнитного поля приводят к росту кристаллов до 10 мкм в ширину с четко выраженной границей, при этом наблюдается уменьшение количества крупных пор на поверхности матрикса за счет скоплений плотноупакованных кристаллов. Согласно результатам РФА фазовый состав экспериментальных образцов соответствует ОКФ с основными пиками (0 0 2); (2 6 0); (2 -4 1); (0 7 0) при 2Θ 26,00; 31,55; 31,70; 33,52° соответственно, при этом отмечается уширение пиков, что указывает на уменьшение общей кристалличности материала при приложении магнитных полей.

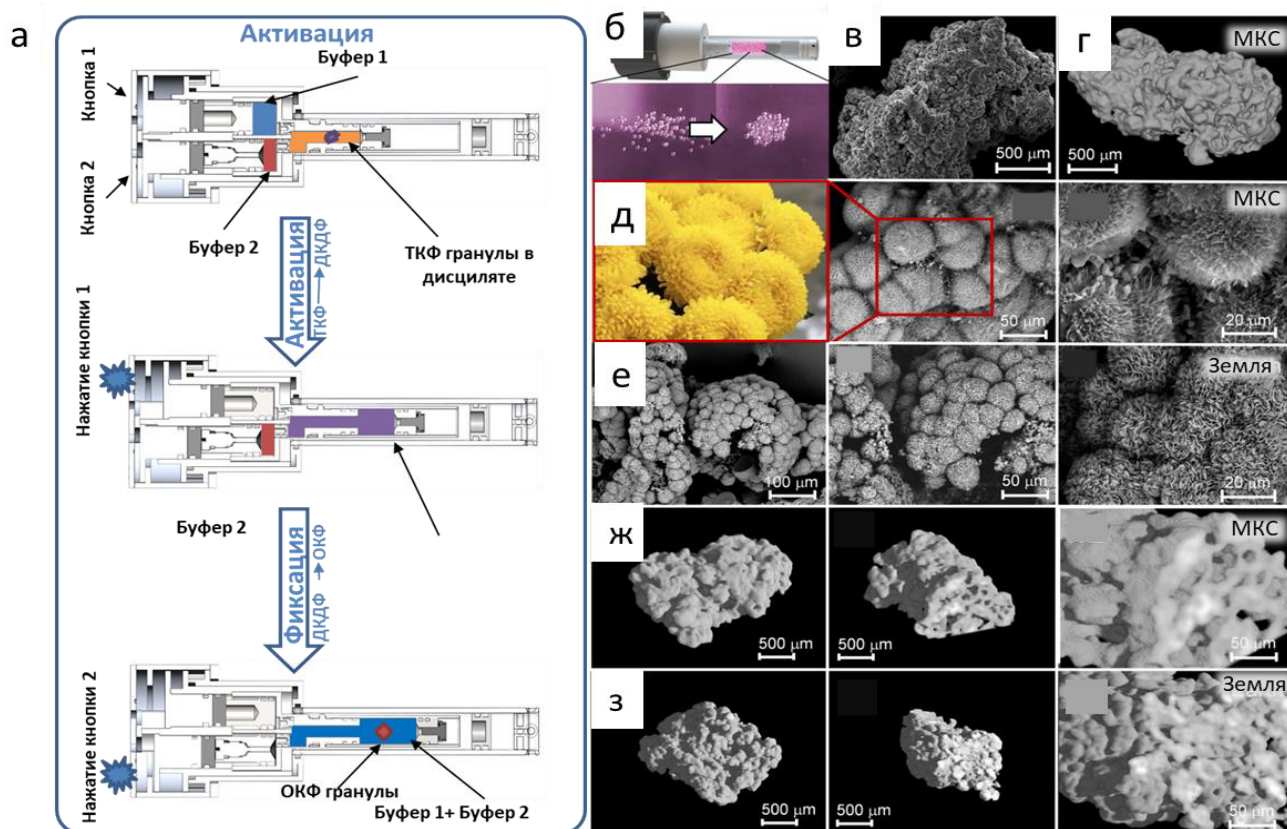


Рис. 27 - Формирование ТКМ в условиях микрогравитации и на Земле: а) схема заполнения кюветы, показывающая движение жидкостей во время эксперимента; б) процесс сборки ТКМ, микроструктура и микрокомпьютерные томографические снимки (в - е), где (д) формирование хризантемоподобных структур; ж,з) микро КТ-визуализация образцов МКС и Земля

На рис. 27 (в-з) приведены фотографии микро- и макроструктуры образцов ОКФ, полученные в присутствии магнитных полей в условиях микрогравитации и на Земле. Приложение магнитного поля и условия микрогравитации оказывают влияние на образование и рост кристаллов ДКФД и ОКФ, что может быть связано с перераспределением ориентации комплексных соединений, присутствующих в буферном растворе. Магнитное поле влияет на процесс перекристаллизации керамического каркаса. При растворении ФК в буферной системе на основе ацетата натрия формируются комплексные соединения ацетатных групп CH_3COO^- и катионов кальция Ca^{2+} , фосфатных групп PO_4^{2-} и катионов Na^+ . Можно предположить, что воздействие магнитного поля оказывает влияние на данные комплексы, изменяя концентрацию компонентов системы в направлении магнитного поля, вызывает направленный рост и укрупнение кристаллов. Условия микрогравитации исключают конвекции любого вида и обеспечивает формирование материала в осесимметричных условиях по центру «магнитной ловушки».

Согласно данным РФА материалы, полученные с помощью сборки в магнитном поле в условиях микрогравитации, характеризуются преобладающим образованием фазы ОКФ. ТКМ, полученные на Земле, продемонстрировали присутствие до 50% по массе примесных фаз. Условия микрогравитации привели к более высокой степени трансформации, связанной с активным свободным движением под воздействием магнитных сил в буферных растворах исходных частиц α -ТКФ и ДКФД, что повлияло на формирование роста кристаллов с получением текстурированных материалов.

Образцы, полученные на МКС, были возвращены на Землю для проведения доклинических исследований (рис. 28). Сравнительный гистологический анализ космических (К) и Земных (З) образцов показал, что после 1 мес. имплантации у образцов К наблюдается формирование васкуляризованной соединительной ткани в области дефектов, а у образцов З наблюдается та же картина только через 3 мес. Экспериментальная зона дефекта образцов была заполнена васкуляризованной соединительной тканью с внедренными в нее частицами ТКМ. Вокруг отдельных частиц присутствуют ободки новообразованной костной ткани. В пространстве отдельных частиц определяется новообразованная костная ткань. Наиболее значительная разница между образцами К и З наблюдалась через 5 мес. после имплантации. В образцах К частицы ОКФ окружены широкими ободками костной ткани. В образцах З тонкие ободки костной ткани вокруг частиц и небольшие участки новообразованной

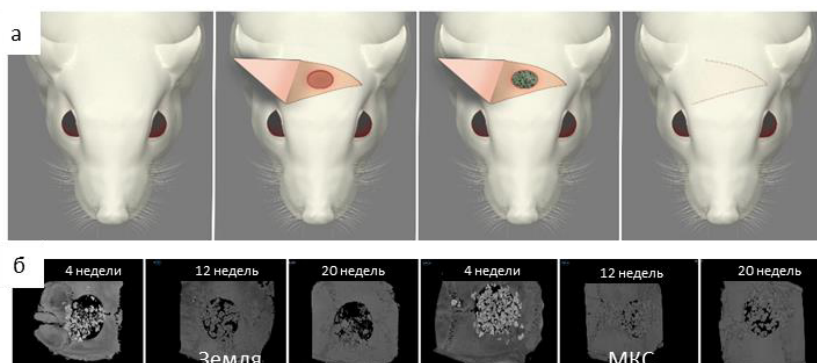


Рис. 28 - *In vivo* исследования: а) схема создания дефекта теменной кости черепа крысы; б) микро КТ зоны дефекта с имплантационным материалом

костной ткани между частицами в соединительной ткани. Результаты гистологического исследования области костного дефекта были также подтверждены данными микро КТ, выполненными через 1, 3 и 5 мес. после эксперимента.

Таким образом, экспериментальные образцы, полученные в условиях микрогравитации на МКС, обладали выраженными остеоиндуктивными потенциальными по сравнению с образцами, полученными в условиях гравитации Земли.

Тем не менее, 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.

Известно, что и в естественных условиях, и в организме человека и животных все микробы существуют не как самостоятельные и изолированные клетки, а находятся в составе биопленок. 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.

Для определения антибактериальной активности в отношении патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* и пр., были проведены *in vitro* исследования с использованием ТБК. Такие агрегаты являются более резистентными к противомикробным препаратам. Формирование 3D неприкрепленных к окружающим поверхностям структур из бактерий было осуществлено в условиях микрогравитации на борту МКС с помощью магнитного поля, в то время как контрольные ТБК были сформированы на Земле.

Исследован процесс формирования ТБК при использовании 50 мМоль парамагнетика (рис. 29). Установлено, что формирование ТБК происходит в результате размножения и роста микроорганизмов, что аналогично образованию

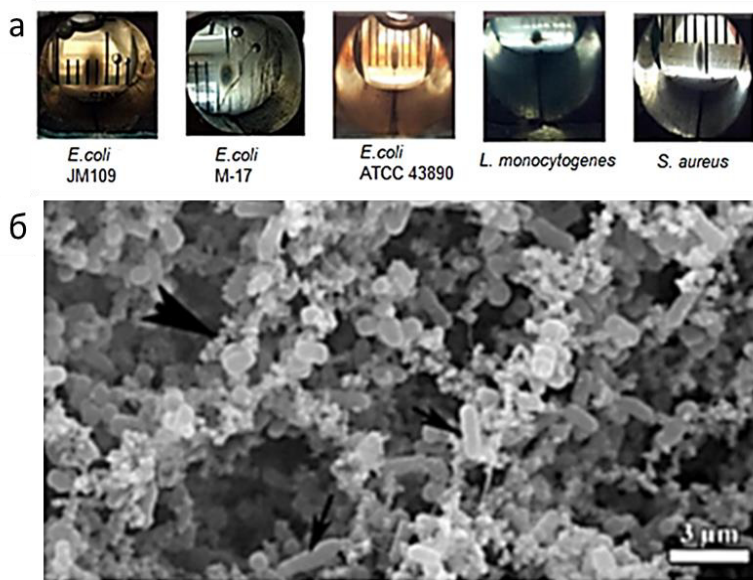


Рис. 29 - Изображение ТБК:
а) неприкрепленные образцы, образованные разными видами бактерий; б) СЭМ фотография ТБК, образованного бактериями (небольшие стрелки) и матрицей с везикулярной структурой

микроколоний, являющихся важным этапом образования биопленок. ТБК представляют собой трехмерные объекты, образованные микроорганизмами и внеклеточным матриксом, при этом внеклеточный матрикс является продуктом роста и развития микроорганизмов, а не образуется из белков питательной среды. При формировании ТБК наблюдается снижение подвижности бактерий, увеличение продукции специальных ферментов и белковых соединений. Добавление парамагнетика в среду не оказало влияния на жизнеспособность бактерий.

ТБК обладают высокой стабильностью и жизнеспособностью, что делает их подходящими для использования в тестировании и разработке лекарственных средств против инфекций, связанных с образованием биопленок. Они также могут быть использованы при разработке антисептических препаратов и растворов для обработки различных поверхностей, а также для других приложений, где требуется модель биопленок или неприкрепленных биопленкоподобных агрегатов. Результаты тестов антибиотиков и других противомикробных препаратов на таких культурах гораздо ближе к ситуации *in vivo* по сравнению с двумерными биопленкоподобными агрегатами. Исследования показали, что в отличие от агрегатов, выращенных на Земле, после экспозиции гентамицином в кюветах со сформировавшимися агрегатами в условиях микрогравитации оставались выжившие бактерии.

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 °C.

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 °C в течение 24 ч (рис. 30). После инкубации с антибиотиком сформированные ТБК с ОКФ были исследованы путем покраски комбинацией флуоресцентных красителей SYTO 9 / пропидий йодид (Live/dead) 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.

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.

Формирование трехмерных материалов мягких тканей из клеточного материала

Проведены исследования по возможности формирования тканеинженерных ТКМ для замещения мягких тканей (хрящевой, мышечной ткани и щитовидной железы). В качестве клеточного материала использовались ТС из различных клеток (хондроциты человека SHED, тироциты FRTL-5, миобласты кролика, теленка и рыбы, фибробласты теленка), которые жизнеспособными были доставлены на борт РС МКС в кюветах с использованием геля PNIPAAm-PEG (рис. 25).

В условиях микрогравитации методом магнитного формирования была осуществлена биофабрикация тканеинженерных ТКМ хряща человека из изолированных ТС (хондросфер), образцов щитовидной железы крысы из тиросфер, мышечного эквивалента ткани из миосфер при концентрациях парамагнетика гадолиния в питательной среде 10 мМоль. Формирование ТКМ происходило в течение 45 мин, последующее тканевое слияние материала осуществлялось в течение 24 и 48 ч. Гистологическая оценка экспериментальных образцов показала высокую жизнеспособность клеток при низких концентрациях парамагнетика. Большинство клеток сохраняют неповрежденную нормальную ультраструктуру в ТС, тогда как при концентрации гадолиния (Gd^{3+}) 50 мМоль имеются свидетельства токсического действия в виде внутриклеточной дистрофии, включая маргинализацию хроматина, отек митохондрий и эндоплазматического ретикулула, накопление фагосом и множественных вакуолей внутриклеточной мембраны (рис. 31).

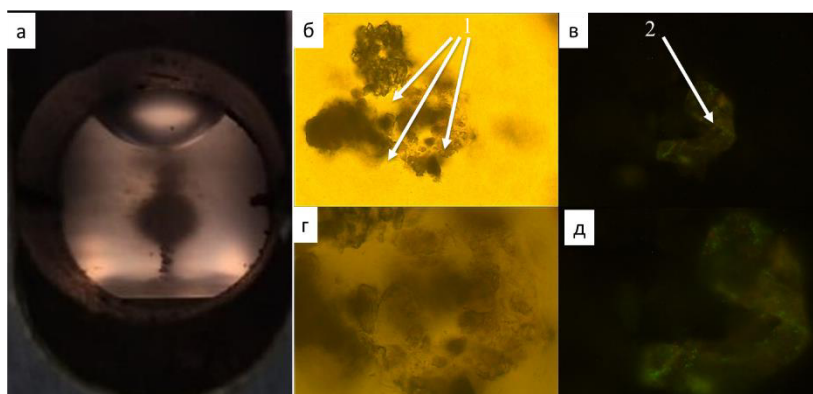


Рис. 30 - Формирование ТБК с ТКМ в магнитном поле: а) частицы ОКФ с ТБК в магнитном биопринтере; б, в) частицы ОКФ, скрепленные био пленкой, в белом свете (б) и в ультрафиолете (в), увеличение 200х; г, д) частицы ОКФ, скрепленные био пленкой, в белом свете (г) и в ультрафиолете (д), увеличение 400х. 1 – ОКФ, 2 – ТБК, сформированная бактериями после воздействия антибиотиком

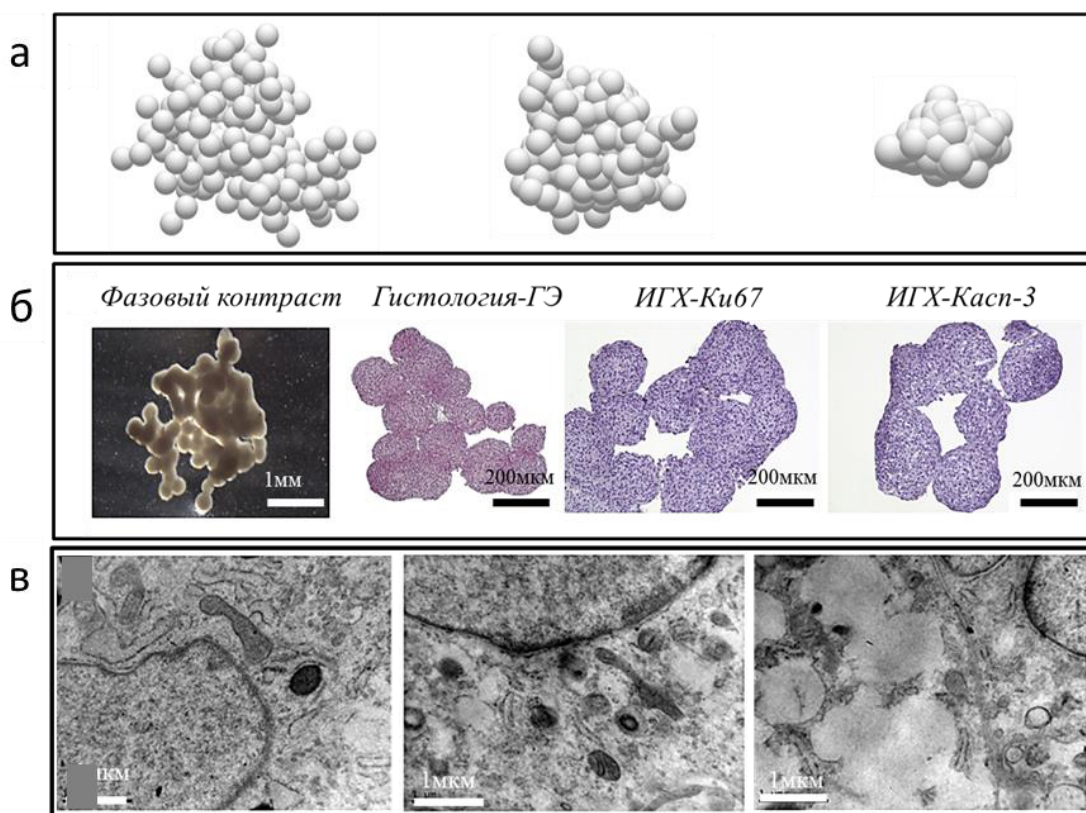


Рис. 31 – Результаты формирования ТКМ (хряща) в условиях микрогравитации: а) моделирование слияния ТС образца ТКМ; б) морфология, гистология (окрашивание гематоксилин-эозином, ГЭ) и иммуногистохимия (Ki-67, Casp3) ТКМ, полученных в космическом эксперименте; в) ТЭМ при концентрации парамагнетика 0, 1 и 50 мМоль соответственно

Результаты СЭМ ТКМ показали (рис. 32), что ТС полностью слились, образовав единый композиционный материал, окруженный плотной соединительнотканной капсулой. Клетки внутри ТКМ имеют морфологические особенности характерные для миобластов, образуя многоядерные мышечные трубочки (миотубы), что свидетельствует о формировании мягких тканей.

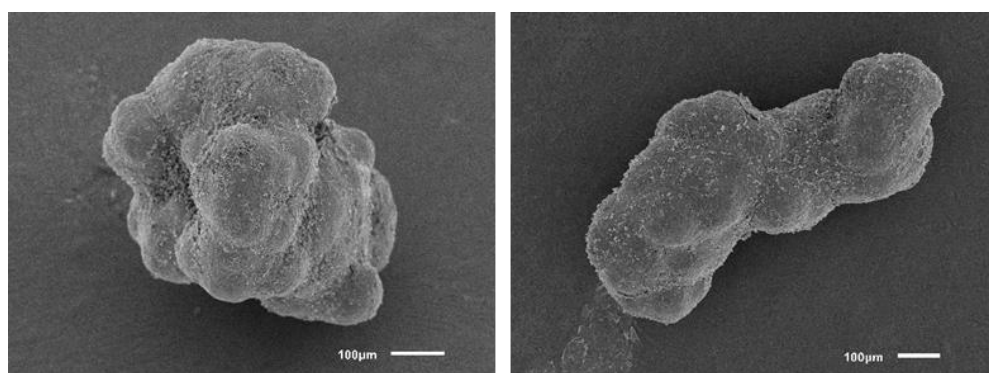


Рис. 32 – СЭМ изображения ТКМ, состоящих из эмбриональных миобластов и фибробластов телянка

Таким образом, магнитная биофабрикация в условиях микрогравитации на МКС является универсальным методом для различных сфер применения (рис. 33).

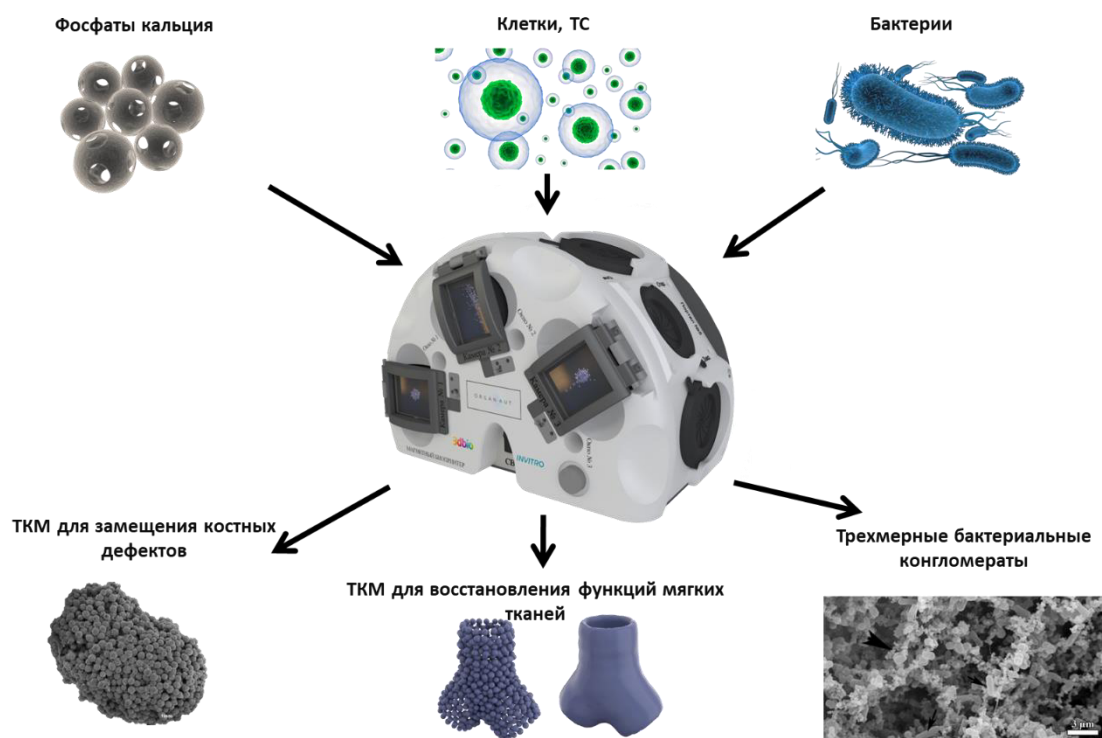


Рис. 33 – Направления использования магнитного биопринтера на борту РС МКС в период экспедиций МКС 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 66 и 70

Разработанный подход позволяет осуществлять направленное формирование различных неорганических и органических объектов, например, формировать кристаллические формы химических соединений (неорганические компоненты матрикса костной ткани, лекарственные препараты, ферменты, гормоны и др.), тканевые образцы из клеточного материала и трехмерные бактериальные конгломераты.

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 α -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 цитотоксического 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.

Список основных публикаций

Публикации в изданиях, определенных ВАК

Индексируемых RSCI (K1)

1. Крохмаль А.А., Сапожников О.А., Кудан Е.В., Грядунова А.А., Цысарь С.А., Петров С.В., Перейра Ф.Д.А.С., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., **Парфенов В.А.** Создание полых цилиндрических конструкторов из тканевых сфероидов с помощью акустической радиационной силы // Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2021. Т. 85. № 6. С. 883-888. (K1)

2. Ефимов А.Е., Агапова О.И., **Парфенов В.А.**, Перейра Ф.Д.А.С., Буланова Е.А., Миронов В.А., Агапов И.И. Исследование микро- и

наноструктуры микроволокнистого биосовместимого полиуретанового матрикса методом сканирующей зондовой нанотомографии // Российские нанотехнологии. 2015. Т. 10. № 11-12. С. 118-123. (К1)

3. Касьянов В.А., Перейра Ф.Д.А.С., **Парфенов В.А.**, Кудан Е.В., Буланова Е.А., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Разработка и имплантация биосовместимого протеза ушной раковины // Медицинская техника. 2015. № 6 (294). С. 1-3. (К1)

4. Кудан Е.В., Перейра Ф.Д.А.С., **Парфенов В.А.**, Касьянов В.А., Хесуани Ю.Д., Буланова Е.А., Миронов В.А. Распластывание тканевых сфероидов, сформированных из первичных фибробластов человека, на поверхности микроволокнистого электроспиннингового полиуретанового матрикса (сканирующее электронно-микроскопическое исследование) // Морфология. 2015. Т. 148. № 6. С. 70-74. (К1)

5. Ефимов А.Е., Агапова О.И., Сафонова Л.А., Боброва М.М., **Парфенов В.А.**, Кудан Е.В., Перейра Ф.Д.А.С., Буланова Е.А., Миронов В.А., Агапов И.И. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса // Российские нанотехнологии. 2016. Т. 11. № 11-12. С. 128-131. (К1)

6. Кудан Е.В., Буланова Е.А., Перейра Ф.Д.А.С., **Парфенов В.А.**, Касьянов В.А., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Распластывание тканевых сфероидов на электроспинновом полиуретановом матриксе // Медицинская техника. 2016. № 1 (295). С. 1-4. (К1)

7. Каралкин П.А., Грядунова А.А., Перейра Ф.Д.А.С., **Парфенов В.А.**, Касьянов В.А., Буланова Е.А., Кудан Е.В., Князева А.Д., Сергеева Н.С., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Морфологический анализ *in vivo* биосовместимости напечатанного протеза ушной раковины // Морфология. 2017. Т. 152. № 6. С. 61-66. (К1)

8. Вахрушев И.В., Цветкова А.В., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Нежурина Е.К., Грядунова А.А., Кудан Е.В., Каралкин П.А., Петров С.В., **Парфенов В.А.**, Крохмаль А.А., Перейра Ф.Д.А.С., Буланова Е.А., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., Ярыгин К.Н. Новые подходы к биопечати тканей человека с использованием мезенхимальных стромальных клеток различного происхождения // Гены и Клетки. 2019. Т. 14. № 5. С. 51. (К1)

В журналах К2 и К3

9. Буйнов М.А., Воротников А.А., Климов Д.Д., Малышев И.Ю., Миронов В.А., **Парфенов В.А.**, Перейра Ф.Д.А.С., Подураев Ю.В., Хесуани Ю.Д. Роботические технологии в медицине и биопринтинге: состояние проблемы и современные тенденции // Вестник МГТУ "Станкин". 2017. № 1 (40). С. 127-131. (К2)

10. Малышев И.Ю., Рунова Г.С., Подураев Ю.В., Буйнов М.А., Климов Д.Д., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., **Парфенов В.А.**, Перейра Ф.Д.А.С., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Янушевич О.О. Бионические принципы в технологии роботической биопечати зубной эмали *in situ* // Патогенез. 2017. Т. 15. № 3. С. 33-42. (К2)

11. Крохмаль А.А., Сапожников О.А., Цысарь С.А., Кудан Е.В., Нежурина Е.К., Хесуани Ю.Д., **Парфенов В.А.** Биофабрикация кольцеобразного конструкта из тканевых сфероидов в магнитоакустическом поле // Ученые записки физического факультета Московского университета. 2020. № 1. (K2)

12. **Парфенов В.А.**, Комлев В.С., Петров О.Ф., Дуб А.В., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Формативная фабрикация: новая индустрия // Природа. 2022. № 2 (1278). С. 3-13. (K3)

В изданиях, входящих в наукометрические базы Web of Science и Scopus

13. Hesuan Y.D., Pereira F.D.A.S., **Parfenov V.A.**, Koudan E.V., Mitryashkin A., Replyanski N., Knyazeva A.D., Bulanova E.A., Mironov V.A., Kasyanov V.A. Design and implementation of novel multifunctional 3d bioprinter // 3D Printing and Additive Manufacturing. 2016. Т. 3. № 1. С. 65-68. (Q1)

14. Koudan E.V., Bulanova E.A., Pereira F.D.A.S., **Parfenov V.A.**, Hesuan Y.D., Mironov V.A., Kasyanov V.A. Patterning of tissue spheroids biofabricated from human fibroblasts on the surface of electrospun polyurethane matrix using 3d bioprinter // International Journal of Bioprinting. 2016. Т. 2. № 1. С. 45-52. (Q1)

15. Bulanova E.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., **Parfenov V.A.**, Khesuan Y.D., Mironov V.A., Degosserie J., Heymans C., Pierreux C.E., Sun Y., Wang Q., Akhmedova S.A., Sviridova I.K., Sergeeva N.S., Frank G.A. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct // Biofabrication. 2017. Т. 9. № 3. (Q1)

16. **Parfenov V.A.**, Koudan E.V., Bulanova E.A., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Norkin N.E., Knyazeva A.D., Gryadunova A.A., Khesuan Y.D., Mironov V.A., Petrov O.F., Vasiliev M.M., Myasnikov M.I., Chernikov V.P., Kasyanov V.A., Marchenkov A.Y., Brakke K., Demirci U. Scaffold-free, label-free and nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly // Biofabrication. 2018. Т. 10. № 3. С. 034104. (Q1)

17. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Agapov I.I., **Parfenov V.A.**, Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Mironov V.A. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold // Express Polymer Letters. 2019. Т. 13. № 7. С. 632-641. (Q2)

18. Osidak E.O., Osidak M.S., Sivogrivov D.E., Domogatsky S.P., Karalkin P.A., **Parfenov V.A.**, Pereira F.D.A.S., Gryadunova A.A., Koudan E.V., Khesuan Y.D., Bulanova E.A., Mironov V.A., Kasyanov V.A., Belousov S.I., Krashennikov S.V., Grigoriev T.E., Chvalun S.N. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3d bioprinting // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2019. Т. 30. № 3. (Q2)

19. **Parfenov V.A.**, Khesuan Y.D., Petrov S.V., Karalkin P.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Krokhmal A.A., Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Vakhrushev I.V., Mironov V.A., Nezhurina E.K., Babichenko I.I., Kasyanov V., Petrov O.F., Vasiliev M.M., Brakke K., Belousov S.I., Grigoriev T.E., Osidak E.O., Rossiyskaya E.I., Buravkova L.B., Kononenko O.D., Demirci U., Mironov V.A. Magnetic levitational

bioassembly of 3d tissue construct in space // *Science Advances*. 2020. T. 6. № 29. (Q1)

20. **Parfenov V.A.**, Mironov V.A., Karalkin P.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V., Khesuani Y.D., Van Kampen K.A., Moroni L., Mota C., Nezhurina E.K., Petrov O.F., Myasnikov M.I., Walboomers F.X., Engelkamp H., Christianen P. Scaffold-free and label-free biofabrication technology using levitational assembly in a high magnetic field // *Biofabrication*. 2020. T. 12. № 4. (Q1)

21. **Parfenov V.A.**, Koudan E.V., Annenkova E.A., Petrov S.V., Pereira F.D.A.S., Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Krokhmal A.A., Sapozhnikov O.A., Tsysar S.A., Karalkin P.A., Nezhurina E.K., Liu K., Oosterwijk E., van Beuningen H., van der Kraan P., Granneman S., Engelkamp H., Christianen P., Kasyanov V.A., Khesuani Y.D., Mironov V.A. Biofabrication of a functional tubular construct from tissue spheroids using magnetoacoustic levitational directed assembly // *Advanced Healthcare Materials*. 2020. T. 9. № 24. C. 2000721. (Q1)

22. **Parfenov V.A.**, Mironov V.A., Koudan E.V., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V., Krokhmal A.A., Aydemir T., Vakhrushev I.V., Khesuani Y.D., Zobkov Y.V., Smirnov I.V., Fedotov A.Y., Nezhurina E.K., Demirci U., Khesuani Y.D., Komlev V.S. Fabrication of calcium phosphate 3d scaffolds for bone repair using magnetic levitational assembly // *Scientific Reports*. 2020. T. 10. № 1. P. 4013. (Q1)

23. **Parfenov V.A.**, Petrov S.V., Pereira F.D.A.S., Levin A.A., Koudan E.V., Karalkin P.A., Khesuani Y.D., Komlev V.S., Nezhurina E.K., Vasiliev M.M., Petrov O.F., Mironov V.A. Scaffold-free, label-free, and nozzle-free magnetic levitational bioassembler for rapid formative biofabrication of 3d tissues and organs // *International Journal of Bioprinting*. 2020. T. 6, № 3. C. 110-119. (Q1)

24. Gryadunova A.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., **Parfenov V.A.**, Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A., Rodionov S.A., Kovalev A.V., Meteleva N.Y., Kasyanov V.A. Cytoskeleton systems contribute differently to the functional intrinsic properties of chondrospheres // *Acta Biomaterialia*. 2020. T. 118. C. 141-152. (Q1)

25. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., **Parfenov V.A.**, Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation in vitro // *Cartilage*. 2020. T. 11. № 4. C. 521-531. (Q2)

26. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., **Parfenov V.A.**, Pereira F.D.A.S., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., Volkov A.V., Rodionov S.A. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells // *Biotechnology Journal*. 2020. T. 15. № 5. (Q2)

27. Koudan E.V., Karshieva S.S., Levin A.A., **Parfenov V.A.**, Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Zharkov M.N., Gerasimov M.V., Pyataev N.A., Shirshova A.D., Chrishtop V.V., Kasyanov V.A., Sukhorukov G.B. Magnetic patterning of tissue spheroids using polymer

microcapsules containing iron oxide nanoparticles // ACS Biomaterial Science and Engineering. 2021. T. 7. № 11. (Q1)

28. Domnin P.A., **Parfenov V.A.**, Kononikhin A.S., Petrov S.V., Shevlyagina N.V., Arkhipova A.Yu., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Brzhozovskiy A.G., Bugrova A.E., Moysenovich A.M., Levin A.A., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Zhukhovitsky V.G., Lobakova E.S., Mironov V.A., Nikolaev E.N., Khesuani Y.D., Ermolaeva S.A.. Combined impact of magnetic force and spaceflight conditions on escherichia coli physiology// International Journal of Molecular Sciences. 2022. T. 23. № 3. (Q1)

29. Koudan E.V., Zorina A.I., Levin A.A., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V., Karshieva S.S., Kasyanov V.A., Manturova N.E., Ustyugov A.Y., Potekaev N.N., **Parfenov V.A.**, Karalkin P.A., Khesuani Y.D., Bulanova E.A., Kopnin P.B., Isaev A.A., Mironov V.A., Zorin V.L.. Correlation of the regenerative potential of dermal fibroblasts in 2D culture with the biological properties of fibroblast-derived tissue spheroids // Cell and Tissue Research. 2022. 390. C. 453–464. (Q1)

30. Levin A.A., Karalkin P.A., Koudan E.V., Senatov F.S., Parfenov V.A., Lvov V.A., Petrov S.V., Pereira F.D.A.S., Kovalev A.V., Osidak E.O., Domogatsky S.P., Manturova N.E., Kasyanov V.A., Sergeeva N.S., Zorin V.L., Khesuani Y.D., Mironov V.A.. Commercial articulated collaborative in situ 3D bioprinter for skin wound healing // International Journal of Bioprinting. 2023. T.9. №2 C. 675. (Q1)

31. Ermolaeva S.A., **Parfenov V.A.**, Karalkin P.A., Khesuani Y.D., Domnin P.A. Experimentally Created Magnetic Force in Microbiological Space and On-Earth Studies: Perspectives and Restrictions // Cells. 2023. 12(2), 338. (Q1)

Переводные публикации

32. Krokhmal A.A., Sapozhnikov O.A., Tsysar S.A., Koudan E.V., Gryadunova A.A., Petrov C.V., Pereira F.D.A.S., Hesuani Y.D., Mironov V.A., **Parfenov V.A.** Creating tubular structures from tissue spheroids via the acoustic radiation force // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. 2021. T. 85. № 6. C. 681-685.

33. Efimov A.E., Agapova O.I., Agapova I.I., **Parfenov V.A.**, Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Mironov V.A. Investigating the micro- and nanostructure of microfibrillar biocompatible polyurethane scaffold by scanning probe nanotomography // Nanotechnologies in Russia. 2015. T. 10. № 11. C. 925-929.

34. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Agapov I.I., **Parfenov V.A.**, Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Mironov V.A. Nanostructural features of contacts of fibroblasts with dual-scale biocompatible polyurethane scaffold // Nanotechnologies in Russia. 2016. T. 11. № 11-12. C. 830-834.

35. Kasyanov V.A., Pereira F.D.A.S., Parfenov V.A., Koudan E.V., Bulanova E.A., Khesuani Y.D., Mironov V.A. Development and implantation of a biocompatible auricular prosthesis // Biomedical Engineering. 2016. T. 49. № 6. C.327-330.

36. Koudan E.V., Bulanova E.A., Pereira F.D.A.S., Parfenov V.A., Hesuani U.J., Mironov V.A., Kasyanov V.A. Spreading of tissue spheroids on an electrospun polyurethane matrix // Biomedical Engineering. 2016. T. 50. № 1.

Монография

37. Pereira F.D.A.S., **Parfenov V.A.**, Khesuani Y.D., Ovsianikov A., Mironov V.A. Commercial 3d bioprinters // 3D Printing and Biofabrication. 2018. С. 535-549.

Патенты

38. **Парфенов В.А.**, Хесуани Ю.Д., Перейра Ф.Д.А.С., Миронов В.А., Петров С.В., Кудан Е.В., Нежурина Е.К., Буланова Е.А., Грядунова А.А., Островский А.Ю., Каралкин П.А. Устройство для биопечати одиночными тканевыми сфероидами и используемая в нем печатающая головка // Патент на изобретение RU 2701330 С1, 25.09.2019 г. Заявка № 2018141959 от 28.11.2018 г.

39. **Парфенов В.А.**, Хесуани Ю.Д., Перейра Ф.Д.А.С., Петров С.В., Кудан Е.В., Нежурина Е.К., Балаховский Я.М., Островский А.Ю., Комлев В.С., Миронов В.А., Буланова Е.А. Способ фабрикации конструкторов из фосфатов кальция // Патент на изобретение RU 2725111 С1, 29.06.2020 г. Заявка № 2019138740 от 29.11.2019 г.

40. **Парфенов В.А.**, Хесуани Ю.Д., Перейра Ф.Д.А.С., Миронов В.А., Петров С.В., Кудан Е.В., Каралкин П.А., Нежурина Е.К., Грядунова А.А., Буланова Е.А., Айдемир Т., Левин А.А., Российская Е.И., Кононенко О.Д., Овчинин А.Н., Островский А.Ю., Балаховский Я.М. Устройство и способ магнитной фабрикации // Патент на изобретение RU 2746171 С2, 08.04.2021 г. Заявка № 2019131449 от 04.10.2019 г.

41. Голоднов А.И., Логинов Ю.Н., Беликов С.В., Степанов С.И., Дуб В.А., Жедаев А.А., Кладков А.Ю., **Парфенов В.А.**, Юдин А.В. Ячеистая структура имплантата // Патент на изобретение RU 2021 124 329 А 17.02.2023 г. Заявка № от 17.08.2021 г.

42. **Парфенов В.А.**, Хесуани Ю.Д., Перейра Ф.Д.А.С., Петров С.В., Каралкин П.А., Буланова Е.А., Кудан Е.В., Островский А.Ю., Миронов В.А., Балаховский Я.М. Способ фабрикации трехмерных биопленок микроорганизмов // Патент на изобретение RU 2 769 574 С1, 04.04.2022 г. Заявка № 2021108051 от 25.03.2021 г.

43. **Parfenov V.A.**, Hesuani Y.D., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Ostrovskiy A.Y., Mironov V.A., Balakhovsky Y. Method of three-dimensional microorganisms biofilms fabrication // US Patent App. 16/837,148, 07.10.2021 г.

44. **Parfenov V.A.**, Petrov S.V., Hesuani Y.D., Pereira F.D.A.S., Koudan E.V., Mironov V.A., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Ostrovskiy A.Y., Balakhovsky Y., Nezhurina E.K., Gryadunova A.A. Apparatus and method of air-suspended biofabrication of tissue-engineered organ constructs and conglomerates of spheroids, cells and other biological objects by using magnetic field // US Patent App. 16/832,446, 2020, 01.10.2020 г.

45. **Parfenov V.A.**, Hesuani Y.D., Mironov V.A., Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Koudan E.V., Petrov S.V., Ostrovskiy A.Y., Balakhovsky Y., Sapozhnikov O.A., Khokhlova V.A., Tsysar S.A., Victor S.D. Apparatus and method for levitational

biofabrication of organ and tissue engineered constructs using tissue spheroids and magnetoacoustic bifold // US Patent App. 17/094,350, 2021, 10.06.2021 г.

46. **Parfenov V.A.**, Hesvani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V., Ostrovskiy A.Y., Balakhovsky Y. Method of constructs fabrication from calcium phosphates // US Patent App. 17/075,006, 29.04.2021 г.

47. **Parfenov V.A.**, Pereira F.D.A.S., Hesvani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Ostrovskiy A.Y., Balakhovsky Y., Kniazeva A. D., Petrov S.V. Turnstile system for tissue spheroid bioprinting // US Patent 11,597,199 B2 07.03.2023 г.