

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова

Физический факультет

На правах рукописи

Крохмаль Алиса Александровна

Позиционирование объектов с помощью акустической радиационной силы в задачах биофабрикации

Специальность: 1.3.7. Акустика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
д.ф.-м.н., доцент
Олег Анатольевич Сапожников

МОСКВА – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

Глава 1 БИОФАБРИКАЦИЯ В АКУСТИЧЕСКОМ ПОЛЕ 22

§1.1 Манипулирование малыми частицами в акустическом поле 24

1.1.1. Теоретическое описание радиационной силы, действующей на частицы малого волнового размера. Случай стоячей волны 25

1.1.2. Аналитическое описание акустического поля и радиационной силы внутри цилиндрического пьезопреобразователя 29

1.1.3. Численное моделирование акустического поля и радиационной силы внутри цилиндрического пьезопреобразователя методом конечных элементов 32

1.1.4. Выводы к первому параграфу 36

§1.2 Эксперимент по левитации частиц акустическом поле в форме плоской стоячей волны 36

1.2.1. Экспериментальное изучение левитации гранул ТКФ в поле стоячей волны 37

1.2.2. Выводы ко второму параграфу 40

§1.3 Эксперимент по биофабрикации в акустическом поле в форме цилиндрической стоячей волны 41

1.3.1. *Экспериментальная установка* 41

1.3.2. Результаты эксперимента 44

1.3.3. Выводы к третьему параграфу 46

Глава 2 АКУСТИЧЕСКАЯ РАДИАЦИОННАЯ СИЛА, ДЕЙСТВУЮЩАЯ НА СФЕРИЧЕСКИЙ РАССЕИВАТЕЛЬ ПРОИЗВОЛЬНОГО ВОЛНОВОГО РАЗМЕРА 47

§2.1 Инструмент для расчета акустической радиационной силы для сферического рассеивателя произвольного волнового размера 48

2.1.1. Метод расчета акустической радиационной силы 48

2.1.2. Оценка точности и времени расчета 51

2.1.4. Задание параметров для расчета 53

2.1.5. Результаты расчета 57

2.1.6. Выводы к первому параграфу 58

§2.2 Моделирование и эксперимент по удерживанию рассеивателя большого волнового размера в акустическом поле многоэлементного излучателя 58

2.2.1. Расчет акустической ловушки для рассеивателя большого волнового размера 60

2.2.2. Расчет акустической радиационной силы 61

2.2.3. Экспериментальная проверка результатов расчета 62

§2.3 Выводы ко второй главе 63

Глава 3 БИОФАБРИКАЦИЯ В ПОЛЕ ПОСТОЯННОГО МАГНИТА 65

§3.1 **Биофабрикация в магнитном поле постоянного магнита** 66

3.1.1. Экспериментальная установка 66

3.1.2. Численное моделирование 68

§3.2 **Биофабрикация в условиях невесомости** 70
3.2.1. Схема эксперимента по биофабрикации на МКС 71
3.2.2. Компьютерное моделирование сборки сфероидов в условиях невесомости 72
3.2.3. Влияние вязкости среды и концентрации парамагнетика на скорость сборки 73
3.2.4. Результаты эксперимента по биофабрикации в космосе 78
3.2.5. Выводы ко второму параграфу 80
§3.3 **Выводы к третьей главе** 80
Глава 4 БИОФАБРИКАЦИЯ ТРУБЧАТЫХ СТРУКТУР ПУТЁМ КОМБИНИРОВАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АКУСТИЧЕСКОГО И МАГНИТНОГО ПОЛЕЙ 82
§4.1 Эксперимент по магнито-акустической левитации в поле цилиндрической акустической стоячей волны и магнитного поля постоянного магнита 82
4.1.1. Методика эксперимента 83
4.1.2. Экспериментальная установка 84
4.1.3. Сборка и слияние сфероидов в форме кольца 86
4.1.4. Выводы к третьему параграфу 88
§4.2 Эксперимент по магнито-акустической левитации в поле магнита Биттера 88
4.2.1. Экспериментальная установка 90
4.2.2. Численное моделирование эксперимента 93
4.2.3. Эксперимент 95
4.2.4. Результаты эксперимента 97
4.2.5. Выводы к третьему параграфу 102
§4.3 Выводы к четвертой главе 103
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ 104
БЛАГОДАРНОСТИ 105
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 110

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно разрабатываются акустические методы манипулирования объектами, которые находят применение в различных областях науки и техники [1–3]. Суть методов связана, как правило, с эффектом существования акустической радиационной силы, действующей на облучаемые ультразвуком частицы. При соответствующим образом подобранных условиях таким способом удается перемещать и удерживать в жидкости или газе твердотельные объекты как малого, так и большого волнового размера. Перспективность методов акустического манипулирования частицами связана с разнообразием излучателей, которые способны формировать оптимальные конфигурации ультразвукового поля, соответствующие размеру перемещаемых объектов и пространственному масштабу задачи.

Одним из актуальных направлений по бесконтактному манипулированию частицами с помощью ультразвука являются области медицины и биологии [4]. Акустическое поле является одним из немногих излучений, способных без вреда для организма проникать внутрь человеческого тела и взаимодействовать с биологическими объектами. Например, с помощью акустической радиационной силы можно бесконтактным образом сдвигать почечные камни размером до 10 мм внутри человеческой почки, в частности, перемещать осколки почечных камней, образующихся после литотрипсии, в сторону мочеточника – такая процедура способна существенно облегчить состояние пациента и предупредить повторное образование почечных камней [5].

Активно развиваются акустические технологии в клеточной биологии для перемещения клеток и конгломератов клеток [6]. С помощью многоэлеменных ультразвуковых источников или путем использования фазовых пластин создаются волновые поля с различными пространственными распределениями акустического давления [2, 3]. Широкий диапазон используемых частот (от десятков килогерц до гигагерц) делает возможным манипулирование частицами размером от десятков нанометров до нескольких миллиметров. Ультразвуковое поле позволяет

оказывать силовое воздействие на частицы бесконтактно, не препятствуя доступу питательных веществ из жидкой среды, а необходимый для перемещения частиц уровень интенсивности поля может быть выбран достаточно низким, чтобы избежать кавитации в среде и вызванного ею разрушения клеток. Поэтому акустическое манипулирование частицами оказывается в высокой степени биосовместимой технологией. Это является неоспоримым преимуществом использования ультразвуковых волн для перемещения и левитации клеток и их конгломератов [7].

Наряду с акустической радиационной силой, одним из механизмов для перемещения клеток в жидкости являются акустические течения – стационарные вихревые потоки, возникающие в результате затухания акустической волны в вязкой текучей среде, в том числе вблизи границ или препятствий [8–10]. Эффекты акустических течений и акустической радиационной силы действуют на частицы в ультразвуковом поле одновременно, и преобладающий механизм перемещения зависит от их размера: у большинства биологических объектов (клеток и конгломератов клеток) перемещение происходит за счет акустической радиационной силы, тогда как биочастицы размера меньше 1 микрона перемещаются в основном за счет акустических течений [11–13]. Устройства, действующие на основе феноменов акустической радиационной силы и акустических течений, способны манипулировать даже единичными частицами и часто используются в задачах сортировки клеток [14–16].

Отдельной задачей является расчет акустической радиационной силы, которая возникает в результате рассеяния и поглощения при передаче импульса от бегущей волны к помещенной в поле частице и может быть рассчитана как интеграл от усредненного по времени тензора напряжений для полного звукового поля по замкнутой поверхности, окружающей частицу [17, 18]. Такая формулировка позволяет рассчитать радиационную силу, действующую со стороны произвольного акустического поля на объект любой формы в невязкой жидкости. На практике, поглощение среды часто играет важную роль на величину

силы и даже крутящего момента [19–21], однако им можно пренебречь в случае, если толщина вязкого пограничного слоя мала и акустические течения слабые [22].

Основная сложность в оценке акустической радиационной силы – это расчет рассеянного поля, особенно если объект, помещенный в акустическое поле, многократно превышает длину волны и имеет сложную форму. Поэтому на практике часто используют различные приближения и допущения. Например, для расчета акустической радиационной силы в симметричных полях, действующей на сферические и цилиндрические частицы, используют метод мультипольного разложения [23–25]. Этот метод также подходит для случаев, когда в поле размещено несколько частиц: в таком случае результирующее поле, оказывающее воздействие на частицу, является суммой падающего поля и рассеянного от остальных частиц [26]. Если падающее на твердотельные сферические частицы поле не является симметричным, то эффективным способом расчета является метод углового спектра, основанный на голограмме акустического поля [27, 28]. Голограмма звукового поля может быть рассчитана теоретически для любого источника, или измерена экспериментально [29, 30], что позволяет с высокой точностью рассчитать величину и направление действующей на сферический рассеиватель радиационной силы.

В биомедицинских приложениях размер частиц, как правило, гораздо меньше длины волны. В таком случае для оценки акустической радиационной силы удобно использовать приближение Горькова, когда рассеянное поле описывается только монопольной и дипольной составляющей, а также становится возможным записать потенциал, пространственный градиент которого равен вектору радиационной силы [31]. Приближение Горькова также можно использовать для определения удерживающей силы в случаях, когда размер частиц сравним с длиной волны, если физические свойства рассеивателя – плотность и скорость звука – не сильно отличаются от параметров иммерсионной среды, что зачастую выполняется для биологических клеток и тканей в питательных растворах [32].

Иногда упомянутыми приближениями обойтись нельзя – например, если рассеиватель имеет большой волновой размер и сложную форму, находится в

закрытой полости или на частицы воздействует комбинация из разных полей. В таком случае эффективным способом расчета акустической радиационной силы является численное моделирование. В основном используются метод конечных разностей [33], метод граничных элементов [34] и метод конечных элементов, последний реализован в повсеместно используемом коммерческом пакете моделирования Comsol Multiphysics [35]. Несмотря на высокие требования к вычислительным мощностям и значительное время расчета, численные методы позволяют с хорошей точностью оценить поле акустической радиационной силы и даже отследить динамику частиц в акустическом поле.

В биомедицинских приложениях для манипулирования биочастицами в качестве излучателя, как правило, применяют пьезоэлектрические преобразователи в виду их доступности, высокой эффективности и разнообразия форм и размеров [36, 37]. Пьезоэлектрические преобразователи характеризуются собственной резонансной частотой, поэтому их нужно выбирать в соответствии с параметрами эксперимента: размером манипулируемых частиц и размером структур, в которые частицы группируются. Для создания объемной стоячей волны в качестве источника акустической волны удобно использовать плоские пластины из пьезокерамики с металлическими обкладками, поляризованные вдоль своей толщины [38]. Переменный гармонический электрический сигнал, подаваемый на обкладки пьезоэлектрической пластины, за счет пьезоэффекта вызывает ее гармонические толщинные колебания, таким образом происходит излучение акустической волны в среду, окружающую пьезопластину [39]. Для эффективного излучения требуется сначала определить диапазон частот с максимальным КПД электроакустического преобразования, что можно сделать с помощью измерения акустической мощности или электрического импеданса [40], а структуру акустического поля можно оценить с помощью метода акустической голографии [30].

Часто для позиционирования клеток и других биологических объектов используются резонаторы, когда частицы собираются в узлах или пучностях (в зависимости от физических характеристик частиц и иммерсионной среды) стоячего

поля [41, 42]. В случае объемного акустического поля резонансная система представляет собой закрытую камеру с плоскопараллельными стенками и расположенными напротив друг друга источником ультразвукового поля и рефлектором, между которыми формируется зона, в которой собираются частицы [38]. В качестве излучателя можно использовать как единичный пьезоэлектрический, так и одномерную или двумерную решетку из излучателей [43]. Еще одним способом сборки частиц является использование голографической накладки на плоский излучатель, которая модулирует акустический сигнал на заданной плоскости и перемещает на ней частицы в структуру требуемой формы [44].

Другой способ позиционирования основан на плоских акустических волнах в резонаторе [45, 46]. В качестве источника поля используют пьезоэлектрические или встречно-штыревые преобразователи [47], а стоячая колебательная структура формируется на твердой поверхности за счет распространения поверхностных волн Рэлея или Лэмба, скорость которых гораздо меньше, чем скорость объемных волн в воде и твердом теле. Как правило, излучатели расположены друг напротив друга, формируя закрытую область на некоторой поверхности, в которой реализуется стоячее поле, в узлах или пучностях которого собираются частицы [48–50].

Еще один способ удержания и манипулирования частицами не подразумевает использование резонаторов, а базируется на формировании особой структуры поля в открытой области. С помощью решетки излучателей, модулирующей накладки или спирального встречно-штыревого преобразователя формируются закрученные пучки, способные к селективному захвату единичных частиц в фокальной плоскости [50–53].

Акустические методы позиционирования частиц в биомедицине нашли широкое применение. Привлекательность акустических технологий для захвата клеток оказалась предпочтительнее прочих методов (магнитных, электрических) благодаря бесконтактной природе воздействия и отсутствия необходимости в предварительной маркировке биочастиц, а также возможности манипулирования в течение длительного времени без влияния на их живучесть [54]. Одним из первых

применений акустических технологий была их интеграция с микрофлюидными устройствами для усиления контроля над клетками, например, для манипулирования клетками в микрофлюидной камере для установления определенных интервалов между клетками, от которых зависят процессы межклеточного контакта [49, 50, 55–57]. Использование ортогональных встречно-штыревых преобразователей в резонансной системе позволило разработать подходы по удерживанию клеток в двумерных массивах узлов стоячего поля, а использование режима излучения импульсных сигналов позволило динамически управлять положением захваченных частиц. С помощью устройств такой конфигурации выполняются исследования межклеточного контакта, так как возможно контролировать контакт двух отдельных клеток [55]. Использование высоких частот (100–230 МГц) открывает возможности двумерного паттернирования, когда в каждый узел стоячего поля попадает одна клетка, что было воспроизведено для индивидуальных эритроцитов и лимфоцитов и позволило провести высокоточный скрининг инфицированных клеток [58]. Путем фазовой подстройки преобразователей двумерная структура стоячего поля может вращаться, захватывая с собой удерживаемые в узлах частицы [56]. С помощью акустических технологий реализованы также методы удержания и перемещения единичных клеток для измерения их механических характеристик, требующие очень точного позиционирования [59]. Определены такие свойства, как поверхностное эпителиальное натяжение, эффективная вязкость и силы межклеточного сцепления [60].

Другим направлением, в котором успешно применяются акустические технологии, является сортировка клеток. Выделение биомаркеров из циркулирующей жидкости имеет важное значение для разработки высокочувствительных методов диагностики рака, нейродегенеративных заболеваний, болезней печени и желудочно-кишечного тракта [61, 62]. Суть метода сортировки состоит в том, что на частицы с разными физическими параметрами (размер, плотность, сжимаемость) будет действовать разная акустическая радиационная сила [63]. В одной из первых работ по сортировке биомаркеров с

помощью акустической радиационной силы была реализована сортировка раковых клеток простаты от лейкоцитов в жидкости, циркулирующей через область с объемной стоячей звуковой волной [64]. На более крупные раковые клетки действовала большая по величине акустическая радиационная сила, которая при прохождении через узел звукового поля давления выталкивала их из канала циркуляции, тогда как лейкоциты оставались в потоке.

Перспективным направлением исследований является область тканевой инженерии, в которой акустические технологии также находят применение [65]. Часто оказывается, что единичные клетки и клетки, сращенные в единую объемную ткань, по-разному реагируют на воздействие медицинских препаратов, поэтому для апробации новых лекарств было бы удобно иметь унифицированные трехмерные клеточные структуры [66]. Еще одним направлением тканевой инженерии является создание трехмерных функциональных органоидов, которые выращиваются из клеток пациента и могут быть трансплантированы вместо больного органа [67, 68]. Такой подход решил бы сразу две проблемы: недостатка донорских органов и отторжения чужеродных тканей. Недавние успешные эксперименты по выращиванию искусственной щитовидной железы мыши и ее трансплантации после разрушения собственной щитовидной железы показали, что такой подход работоспособен – органоид успешно функционировал после пересадки и вырабатывал гормоны [69].

С помощью акустических полей удается структурировать клетки и собирать из них органоиды для дальнейших биологических исследований. В частности, с использованием акустических резонаторов оказывается возможным формирование тканевых сфероидов – конгломератов клеток сферической формы. Они образуются в результате того, что взвешенные в питательном растворе исходно одиночные клетки под действием радиационной силы устремляются к узлу акустического давления и после длительного нахождения в контакте друг с другом срастаются в единую ткань [70]. Так созданные тканевые сфероиды раковых клеток можно использовать для тестирования новых химиотерапевтических препаратов, а клетки здоровой ткани использовать как строительные блоки для более крупных

органоидов в задачах биофабрикации. С помощью акустических резонаторов возможно также формирование одномерных тканевых волокон или двумерных структур, содержащих разные типы клеток. Так, например, было показано в экспериментах, что такие структуры оказывались жизнеспособными при пересадке в организм мыши и даже обрастали кровеносной системой [71, 72]. Для создания акустических полей, позволяющих добиться формирования двумерной плоской клеточной структуры, перспективным является использование акустических фазовых пластинок (голограмм) [73].

Основные успехи касались плоских структур, например, с помощью тканевой инженерии удается формировать участки искусственной кожи, которые используются, например, для лечения ожогов [74]. Однако создание многослойной тубулярной структуры для имитации сосудов и каналов до сих пор оставалось сложной задачей [75]. Множество систем органов человека содержат тубулярные структуры, особенно, кардиоваскулярная, респираторная, мочеполовая и пищеварительная системы. Первые подходы биофабрикации цилиндрических конгломератов были предприняты методом заполнения коллагеновой формы гладкомышечными клетками и фибробластами [76]. Другие методы использовали наложение плоских листов из клеток на сердечник, для формирования объемной цилиндрической структуры [77]. Эксперименты по формированию тубулярных клеточных структур таким методом были проведены с различными типами клеток, а также разными поддерживающими форму материалами (синтетическими и натуральными полимерами, бесклеточными матриксами, человеческими органами). Была показана эффективность такого метода [78, 79], а полученные тубулярные конгломераты даже были использованы для уретральной реконструкции в нескольких преклинических и клинических испытаниях [80, 81].

Для создания более сложных и протяженных форм были предложены методы послойной 3D-печати [82], когда с помощью 3D-принтера послойно выдавливался полимерный биоразлагаемый гель, содержащий в себе живые клетки. Преимуществом такого метода является контроль над архитектурой конструкции. В качестве наполнителя можно использовать не только клетки, но и тканевые

сфероиды, которые послойно печатаются совместно со стержнями из агарозы, используемыми в качестве формовочного шаблона [83, 84].

Новым шагом в тканевой инженерии стала сборка тканевых сфероидов посредством физических полей, без использования каркасов, подложек и гелей для удержания клеток или сфероидов [85, 86]. В данной диссертационной работе проведены пионерские исследования в этом направлении, а именно разработаны методы трехмерной биофабрикации с помощью акустической радиационной силы. Предложены новые методы по удержанию и сборке тканевых сфероидов и керамических гранул в акустическом поле.

Актуальность работы

В последнее время значительное распространение получило направление биофабрикации – технологии, когда из клеток и тканевых сфероидов, а также других материалов собирают более крупные функциональные органоиды. Одной из наиболее актуальных задач этой биотехнологии является развитие трехмерной биофабрикации тканевых конгломератов, которые выполняли бы те же функции, что и живые ткани человека. Существующие подходы еще не достигли в этом направлении полного успеха ввиду сложности создания трехмерного объекта. Пока наиболее удачно удается печатать лишь двумерные конструкции, например, лоскуты кожи.

Создание трехмерных тканевых конгломератов позволит, с одной стороны, более эффективно тестировать новые лекарства, так как плоские и объемные конгломераты клеток реагируют на лекарственное воздействие по-разному. С другой стороны, акустическая биофабрикация откроет новые горизонты в создании органоидов, способных выполнять функции реальных органов человека. Нехватка донорских органов является важной проблемой в современной медицине, а трехмерная сборка органоидов в акустическом поле может стать перспективным решением.

В большинстве существующих методов биофабрикации используются каркасы, изготовленные из биоматериалов или наноматериалов. Использование каркасов имеет ряд существенных недостатков, в том числе отрицательную

реакцию со стороны клеток на указанные материалы, что не позволяет создавать требуемые пространственные структуры. Поэтому актуальными являются разработанные в настоящей диссертации принципиально новые методы биофабрикации, в которых трехмерные тканевые конгломераты бесконтактно собираются из множества тканевых сфероидов в объемном поле сил различной природы. Собранные вместе в силовой ловушке, тканевые сфероиды контактируют друг с другом и, таким образом, сливаются, образуя трехмерный тканевый конгломерат, по физическим характеристикам близкий к реальным человеческим тканям.

Одна из самых простых и часто встречающихся форм в тканях и органах – это кольцо или трубка, так как именно трубчатую форму имеют кровеносные сосуды и капилляры. Проблема васкуляризации остро стоит перед биоинженерией, так как для поддержания жизнеспособности ткани необходимо не только собрать структуру из клеток, но и питать ее. Множество существующих методов биофабрикации позволяют изготавливать структуры лишь простой формы, тогда как реальные органы содержат полые кровеносные сосуды. В этой связи актуальной является разработанная в данной диссертации методика, позволяющая создавать тканевые структуры в форме трубок, которые могли бы выполнять функции кровеносных сосудов. Для решения этой проблемы использован метод биофабрикации с помощью совместного использования акустического и магнитного полей.

Целью диссертационной работы является разработка экспериментальных подходов и инструментов для манипулирования объектами с помощью акустической радиационной силы для целей биофабрикации. В качестве объектов воздействия рассматриваются сферические конгломераты живых клеток – тканевые сфероиды, а также имитаторы тканевых сфероидов – гранулы фосфата кальция и полистироловые шарики, а для эффективного манипулирования выбираются оптимальные параметры ультразвукового и магнитного полей. Для достижения обозначенной цели решались следующие **задачи**:

1) Провести теоретический анализ условий, необходимых для левитации и удержания частиц в плоской и цилиндрической стоячих акустических волнах.

2) Найти резонансные частоты полого цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя для формирования стоячей цилиндрической волны; осуществить экспериментальное удержание частиц в узловых областях стоячего поля.

3) Выполнить анализ точности метода по расчету акустической радиационной силы, действующей на упругий сферический рассеиватель произвольного волнового размера, и реализацию на основе указанного метода программного обеспечения с графическим интерфейсом.

4) Определить значимые параметры для эффективной магнитной левитации сфероидов и гранул фосфата кальция; оценить время сборки в поле постоянного магнита в зависимости от вязкости жидкой среды и концентрации парамагнетика в ней.

5) Создать экспериментальную установку для сборки и слияния тканевых сфероидов в сильном магнитном поле электромагнита Биттера; разработать экспериментальную методику по формированию трубчатой конструкции из тканевых сфероидов в акустическом поле.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования в диссертационной работе являются источники ультразвукового поля и манипулируемые частицы (тканевые сфероиды, полистироловые шарики, гранулы фосфата кальция) размером порядка сотен микрон. Предметом исследования являются пространственно-временная структура акустических полей и новые методы манипулирования частицами с помощью акустической радиационной силы.

Методология исследования

Для осуществления манипулирования частицами в акустическом поле использовались аналитические модели для расчёта акустической радиационной силы, основанные на приближении Горькова в случае малого размера частиц и метода решения полной задачи рассеяния на сфере для каждой угловой

компоненты падающего поля для случая произвольного волнового размер частиц. Акустические и магнитные поля, а также динамика движения и сборки частиц в этих полях были теоретически исследованы методом конечных элементов с помощью пакета численного моделирования COMSOL. Расчет акустической радиационной силы, действующий на рассеиватель произвольного размера, производился с использованием программного пакета, созданного автором на языке программирования Python 3.

В экспериментах по манипулированию частицами в качестве источника ультразвукового поля использовался цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь, позволявший создавать стоячую цилиндрическую волну, и комбинация плоского пьезоэлектрического диска с расположенным на некотором расстоянии от него рефлектором, позволявшая возбуждать плоскую стоячую волну. Преобразователи работали в мегагерцовом диапазоне частот и управлялись с использованием генератора сигналов Agilent 33250 A, который подавал электрический сигнал в гармоническом режиме, а контроль за излучаемыми сигналами осуществлялся с помощью осциллографа Tektronix TDS5034B. В некоторых экспериментах использовался усилитель мощности ENI RF Power Amplifier. В качестве источников магнитного поля были использованы постоянные кольцевые неодимовые магниты и электромагнит Биттера в лаборатории сильных магнитных полей Университета Неймегена, Нидерланды.

Научная новизна работы заключается в разработке следующих новых методов в рамках подготовки диссертации.

1. Разработана методика биофабрикации тканевых конгломератов тубулярной структуры в стоячем цилиндрическом акустическом поле с использованием подложки из агарозы.
2. Разработан метод левитационной биофабрикации тканевых конгломератов в форме кольца в комбинированном магнито-акустическом поле, когда источником магнитного поля являются постоянные магниты кольцевой формы.

3. Разработан метод левитационной сборки тканевых конгломератов тубулярной формы в комбинированном магнито-акустическом поле, когда источником магнитного поля является электромагнит Биттера.

4. Реализован программный комплекс с графическим интерфейсом для расчета акустической радиационной силы, действующей на упругий сферический рассеиватель произвольного размера со стороны акустического пучка с произвольной структурой.

Практическая значимость работы

1. Разработанные подходы по биофабрикации тканевых конгломератов тубулярной формы могут применяться для создания органоидов для тестирования новых лекарственных препаратов.

2. Предложенные методы биофабрикации тубулярных тканевых конгломератов могут быть использованы для создания искусственных кровеносных сосудов или использоваться для замещения других тубулярных структур в теле человека, например, для уретропластики.

3. Созданный программный комплекс с графическим интерфейсом может быть использован для расчёта акустической радиационной силы в различных приложениях, связанных с акустической левитацией и манипуляцией твердотельными частицами в жидкостях и газах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Акустическая радиационная сила, возникающая в жидкости в стоячем плоском или цилиндрическом ультразвуковом поле мегагерцового диапазона частот, способна перемещать в пространстве биологические частицы размером порядка сотен микрон и собирать их в узлах акустического давления в единую структуру.

2. Акустические ловушки, основанные использовании эффекта радиационной силы для манипуляции упругими рассеивателями большого волнового размера в жидкости, могут быть сконструированы и оптимизированы на основе теоретического расчёта с использованием углового спектра акустического поля, излучаемого многоэлементными излучателями.

3. Комбинация акустического и магнитного полей позволяет осуществлять левитацию тканевых сфероидов субмиллимерового размера и тем самым создавать из них органоиды тубулярной формы, обладающие жизнеспособностью и функциональностью.

Достоверность и обоснованность представленных в диссертационной работе результатов подтверждается проверочными численными и физическими экспериментами, а также соответствием результатов экспериментов априорной информации, теоретическим расчетам и результатам, полученным в работах других авторов.

Апробация работы

Вошедшие в диссертацию материалы докладывались и обсуждались на следующих профильных Всероссийских и международных конференциях: на XVI, XXII Всероссийских школах-семинарах «Волновые явления в неоднородных средах» имени А.П. Сухорукова (г. Можайск, 27 мая – 1 июня 2018 г., 6 –11 июня 2021 г.), на 2-ой и 3-ей Всероссийских акустических конференциях (г. Нижний Новгород, 6-9 июня 2017 г., Санкт-Петербург, 21-25 сентября 2020 г.), на XXXII и XXXIV сессиях Российского акустического общества (г. Москва, 14–18 октября 2019 г., 14-24 февраля 2022 г.), на Международном конгрессе по тканевой инженерии и регенеративной медицине TERMIS-EU 2019 (г. Родос, Греция, 27-31 мая 2019 г.), на Международной конференции HFML - FELIX User Meeting 2019 (г. Неймеген, Нидерланды, 8-10 июля 2019 г.), на Международном конгрессе по ультразвуку ICU 2019 (г. Брюгге, Бельгия, 3–6 сентября 2019 г.), на Международной конференции по биофабрикации 2019 (г. Коламбус, США, 20–22 октября 2019 г.), на 4-ом Международном симпозиуме «Физика, инженерия и технологии биомедицины (г. Москва, 26–30 октября 2019 г.), а также на Всероссийском Фестивале Науки (г. Москва, 9–11 октября 2020 г.), на Зимней школе по терапевтическому ультразвуку (Лезуш, Франция, 3–8 марта 2019 г.) и обсуждалась на научных семинарах кафедры акустики физического факультета МГУ.

Работа, представленная автором в рамках настоящей диссертации, была поддержана РФФИ в рамках научного проекта № 20-32-90093 «Конкурс на лучшие проекты фундаментальных научных исследований, выполняемые молодыми учеными, обучающимися в аспирантуре», стипендией Президента по приоритетным направлениям, стипендией Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова для молодых сотрудников, аспирантов и студентов, добившихся значительных результатов в педагогической и научно-исследовательской деятельности, стипендией фонда развития теоретической физики и математики «Базис» и стипендией Американского акустического общества (ASA International Student Grant).

Публикации

Основные результаты диссертации изложены в 20 печатных работах, в том числе 6 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, 2 публикациях в других рецензируемых научных изданиях и 12 публикациях в сборниках трудов и тезисов конференций. Список работ автора приведен в конце диссертации перед списком литературы.

Личный вклад автора

Все представленные в диссертационной работе результаты получены автором лично или при его определяющем участии. Постановка задач и обсуждение результатов проводились совместно с научным руководителем. Автором самостоятельно проводились эксперименты по акустическому и магнитному манипулированию частицами, создавались экспериментальные установки, на которых были получены представленные в работе тканевые конгломераты в форме трубки. Лично автором проведены все этапы компьютерного моделирования для планирования экспериментов по сборке частиц и для иллюстрации динамики их движения. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами. Автором была проведена значительная работа над текстом статей, а также представление их в редакции

журналов и переписка с редакторами и рецензентами. Вклад автора в научных трудах [А6] составлял от 1/2 до 1/3; в научных трудах [А4, А5] от 1/4 до 1/5.

Оригинальные результаты, изложенные в научных трудах [А1-А3, А7-А8], получены автором лично либо при его определяющей роли, а также при непосредственном участии автора в теоретических и прикладных исследованиях, которые проводились совместно с соавторами публикаций, изданных по теме диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из общего вводного раздела, 4 глав и Заключения. Каждая глава включает в себя краткое введение в рамках поставленной задачи, оригинальную часть и выводы. Работа содержит 121 страницу, включает 36 рисунков, 1 таблицу и 122 библиографические ссылки.

Содержание диссертации

Во Введении обоснована актуальность исследуемой проблемы, приведен краткий обзор литературы, сформулированы цели работы и описано ее краткое содержание по главам.

В главе 1 рассматриваются вопросы биофабрикации в акустическом поле. Описаны теоретические основы манипулирования частицами малого волнового размера в плоском и цилиндрическом стоячем ультразвуковом поле и определены важные параметры, влияющие на величину и направление акустической радиационной силы, а для оценки структуры ультразвукового поля реального излучателя конечных размеров предложен способ численного моделирования методом конечных элементов. Для демонстрации возможности биофабрикации частиц с помощью акустической радиационной силы были проведены эксперименты по манипулированию частицами в ультразвуковом поле. Была осуществлена левитации гранул фосфата кальция в плосковолновом стоячем поле, созданном с помощью плоского пьезоэлектрического преобразователя и рефлектора. Оказалось, что левитирующие на одном узловом уровне частицы способны собираться в единые конгломераты за счет неоднородности стоячего поля, проявляющейся из-за возникновения в пьезоэлектрической пластине волн

Лэмба. Также был предложен метод сборки трубки из тканевых сфероидов в стоячем цилиндрическом поле с помощью специальной формы из агарозы, ограничивающей область сборки и выступающей в качестве подложки для основания трубки. Эффективность и безопасность сборки для клеток была подтверждена наблюдением слияния тканевых сфероидов в сплошную ткань.

Для оценки воздействия акустической радиационной силы на крупные частицы и конгломераты сфероидов уже не применимо приближение Горькова. В главе 2 настоящей диссертации рассмотрена возможность использования метода углового спектра [27] для решения задачи рассеяния и расчета акустической радиационной силы, действующей на упругий рассеиватель большого волнового размера, проведена оценка точности и скорости расчета такого подхода. Для упрощения процедуры расчета реализован сервис с графическим интерфейсом с открытым кодом, позволяющий оценить акустическую радиационную силу исходя из акустической голограммы звукового пучка, которая может быть рассчитана теоретически или измерена экспериментально. Работоспособность метода проверена экспериментально: с помощью многоэлементного кольцевого преобразователя, излучающего на частоте 2 МГц, фазировкой элементов была собрана конфигурация звукового поля, способная удерживать в горизонтальной плоскости крупный рассеиватель диаметра 3 мм, что было рассчитано в созданном программном обеспечении и подтверждено на практике.

Как было показано, акустическое поле позволяет формировать цилиндрические структуры из частиц, однако использование только цилиндрического преобразователя в этих целях не позволяет левитировать весь конгломерат целиком для эффективного питания каждого тканевого сфероида. В главе 3 рассматривается метод магнитной левитации, когда за счет разницы парамагнитных проницаемостей частиц и окружающей их жидкой среды возникает магнитофоретическая сила, способная компенсировать силы гравитации и собирать биочастицы в единый конгломерат. В данной главе был исследован процесс сборки гранул фосфата кальция в поле постоянных магнитов, а также сборки тканевых сфероидов в условиях невесомости, определены важные

параметры, влияющие на скорость движения частиц, и предложены способы оценки времени сборки.

В главе 4 диссертации предложен метод биофабрикации тканевых конгломератов в виде кольца и трубки с помощью комбинации акустического и магнитного полей. Если в магнитное поле постоянного магнита поместить вертикально ориентированный полый пьезоэлектрический преобразователь, то внутри него образуется область, в которой возможна и левитация частиц за счет магнитофоретической силы, и формирование из них цилиндрической структуры за счет акустической радиационной силы, перемещающей сфероиды в узлы давления стоячего ультразвукового поля. За счет сильной неоднородности магнитного поля постоянных магнитов удалось получить только кольцевые конгломераты из хрящевых и гладкомышечных клеток. Использование более однородного в радиальном направлении и более сильного магнитного поля, создаваемого электромагнитом Биттера, позволило собрать более протяженные, состоящие из нескольких слоев сфероидов конгломераты, а также существенно снизить концентрацию парамагнитных солей, которые добавляют в питательный раствор для усиления эффекта магнитной левитации. Комбинация сильного магнитного поля от Биттерсовского электромагнита и стоячего цилиндрического акустического поля от пьезоэлектрического преобразователя позволило собрать тубулярный конгломерат из гладкомышечных клеток человека, анализ которого показал жизнеспособность тканей, а также сохранение их функциональности – сжатия в ответ на раздражитель. Таким образом, разработанная методика сборки позволяет собирать крупные и функциональные органоиды, которые могут имитировать искусственные сосуды для дальнейших биомедицинских приложений и исследований.

В Заключении сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы.

Глава 1
БИОФАБРИКАЦИЯ В АКУСТИЧЕСКОМ ПОЛЕ

Биофабрикация в широком смысле – это технология, направленная на создание функционального трехмерного органа из клеток самого пациента. Биофабрикация продолжает направление «инжиниринга органов», и её важной отличительной чертой является отсутствие каркасов – не используются никакие дополнительные материалы, в которые врастают клетки, формируя будущий орган. Такой подход гарантирует отсутствие реакции иммунного отторжения организмом.

Сама технология биофабрикации основана на явлении самосборки – направленной самоорганизации клеточных структур. Процессы самосборки встречаются в химии и материаловедении при образовании молекулярных кристаллов, коллоидов, среди биологических структур самосборными являются полипептидные цепи и нуклеиновые кислоты в белках. Для эффективного осуществления биофабрикации в качестве строительных блоков будущего органа используются тканевые сфероиды – сферические конгломераты размером порядка сотен микрон, состоящие из живых клеток. В процессе биофабрикации из сфероидов создают желаемую трехмерную структуру, и в результате нахождения в течение длительного времени в благоприятной питательной среде происходит слияние сфероидов в единую жизнеспособную ткань.

Максимальный диаметр сфероидов ограничен 200–300 микронами, так как это предельный размер для проникновения питательных веществ вглубь сфероида посредством диффузии [68]. Для поддержания жизнеспособности клеток сфероиды должны находится в питательном растворе при температуре 37° С, причем объем питательного раствора должен быть достаточным для питания клеток в течение как минимум суток – именно столько времени требуется для слияния сфероидов в единую ткань.

Часто в экспериментах для имитации тканевых сфероидов используют полистироловые шарики – унифицированные сферические частицы фиксированного диаметра, обычно 175 микрон. По своим физическим свойствам

полистироловые шарики близки к сфероидам, поэтому удобны для отработки на них экспериментальных методик.

Еще одним объектом биофабрикации могут выступать гранулы фосфата кальция (CaF) – они используются для инженерии костной ткани [87]. Человеческая костная ткань состоит преимущественно из CaF, и также содержит белки и воду. Существует ряд преимуществ использования CaF в качестве материалов для костных трансплантатов: такие материалы биосовместимы, а также могут участвовать в разрушении и образовании новой костной ткани, что является неотъемлемой частью функционирования кости. Большинство синтетических материалов, используемых в клинической практике, основаны на трикальцийфосфатной (ТКФ) керамике. Трикальцийфосфат является полным химическим аналогом минерального вещества костной ткани, но с другой кристаллической структурой. Поэтому при заполнении костного дефекта материалом из ТКФ возможно его замуровывание [88]. В связи с этим возможен подход по использованию фазы октакальцийфосфата (ОКФ) в качестве возможного предшественника CaF в естественной костной ткани [89, 90]. Наиболее часто используемым методом является смешивание керамических частиц с полимерами с последующим их трехмерным скреплением и дальнейшей высокотемпературной обработкой [91, 91]. Стоит отметить, что производство достаточного количества ОКФ является очень сложной задачей и обычно занимает несколько недель. Соответственно, важной задачей является разработка метода по быстрому изготовлению каркасов из ОКФ, предназначенных для костной пластики. Одним из вариантов решения является магнитная биофабрикация, когда из гранул ТКФ методом самосборки в условиях магнитной левитации конструируется трехмерный каркас с последующей перекристаллизацией в фазу ОКФ с помощью химических реагентов [91]. Такой подход позволяет создать наиболее биосовместимый керамический имплантат нужной формы для заполнения костного дефекта.

В данной главе будут рассмотрены методы биофабрикации, основанные на манипулировании частицами с помощью акустической радиационной силы, используются материалы, опубликованные в статьях [A1-A2].

§1.1 Манипулирование малыми частицами в акустическом поле

Одним из методов левитирования частиц является воздействие на них акустической радиационной силы, которая компенсировала бы силу тяжести. При помещении частиц в объем жидкости, подвергающийся воздействию ультразвукового поля, возникает акустическая радиационная сила, являющаяся результатом передачи количества движения от акустической волны поглощающим или рассеивающим объектам. Амплитуда и направление радиационной силы зависят от мощности ультразвукового источника и конкретной структуры поля. Используя зависимость структуры акустического поля от формы и размеров источника ультразвука, его рабочей частоты и граничных условий, можно создавать сложные трехмерные акустические ловушки.

Наиболее простая конфигурация поля, в которой возможно осуществить левитацию – это акустическое поле в форме плоской стоячей волны. Если радиус помещенных в это поле частиц много меньше длины волны, то, в зависимости от соотношения физических характеристик среды и частиц, они будут перемещаться радиационной силой в узел или пучность поля [31, 32]. Поэтому важной задачей является рассмотрение возможности и условий для акустической левитации сфероидов и керамических гранул для дальнейшего развития методов биофабрикации с использованием акустических полей.

Привлекательность использования акустической радиационной силы для сборки частиц является возможность варьировать конфигурацию ультразвукового поля для достижения самых разнообразных геометрий сборки. Одной из самых востребованных форм в биофабрикации является полая трубка как прототип кровеносного сосуда. Проблема васкуляризации (обеспечения искусственной ткани кровоснабжением) стоит довольно остро, поэтому создание тканевой трубки позволяет решить проблему питания прилежащих клеток и использовать трубку как часть более крупного участка ткани. Чтобы осуществить сборку тканевых сфероидов в форме трубки, в качестве источника акустического поля можно

использовать цилиндрическую стоячую волну, генерируемую внутри полого цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя.

1.1.1. Теоретическое описание радиационной силы, действующей на частицы малого волнового размера. Случай стоячей волны

Рассмотрим частицу, находящуюся в жидкости в поле акустической волны. Наряду с знакопеременной силой, сопровождающей действие акустического давления, на эту частицу действует также постоянная (средняя) сила, возникающая в результате нелинейных эффектов второго порядка. Эта сила называется акустической радиационной силой. В общем случае её расчёт сложен. Однако имеются практически важные ситуации, когда выражение для силы упрощается и может быть записано в компактном аналитическом виде. Одна из таких ситуаций, проанализированная в работе Л.П. Горькова, – это случай частиц малого размера [31]. Предполагается, что диаметр частицы намного меньше длины волны, она имеет сферическую форму, а окружающая среда является идеальной жидкостью, в которой отсутствуют вязкость и теплопроводность.

Выражение для радиационной силы зависит от структуры акустического поля и радиуса частицы. Если волна является бегущей плоской волной, то она действует вдоль направления распространения волны, а её величина для сферической частицы выражается так:

$$F_{rad} = \frac{4\pi I}{9c} r^2 (kr)^4 \left[f_1^2 + f_1 f_2 + \frac{3}{4} f_2^2 \right], \tag{1.1}$$

где I – интенсивность падающей волны, r – радиус частицы, c – скорость звука в жидкости, $k = 2\pi f / c$ – соответствующее волновое число, f – частота звуковой волны, а 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:

$$f_1 = 1 - \frac{\rho c^2}{\rho_{sc} c_l^2} \frac{1}{1 - \frac{4c_t^2}{3c_l^2}}, \tag{1.2}$$

$$f_2 = 2\frac{\rho_{sc} - \rho}{2\rho_{sc} + \rho}. \quad (1.3)$$

Как видно из выражения для акустической радиационной силы, в случае плоской бегущей волны она пропорциональная 6-й степени радиуса частицы частицы, $F_{rad} \sim r^6$, т.е. для малых частиц является очень малой.

Если акустическое поле не является бегущей плоской волной, то главный вклад в радиационную силу дают градиенты плотности кинетической и потенциальной энергий (в плоской бегущей волне указанные градиенты равны нулю). При этом сила оказывается потенциальной и представляется в следующем виде:

$$\mathbf{F}_{rad} = -\nabla U, \quad (1.4)$$

где «потенциал Горькова» U выражается через плотности кинетической и потенциальной энергий W_{kin} и W_{pot}:

$$U = \frac{4\pi r^3}{3}\left(f_1 W_{pot} - \frac{3}{2} f_2 W_{kin}\right) \quad (1.5)$$

Как видно, в отличие от плоской бегущей волны, радиационная сила пропорциональна r^3 (а не r^6), т.е. при той же амплитуде волны эффект силового радиационного воздействия для малых частиц гораздо является гораздо более существенным.

В частном случае нахождения частицы в плоской стоячей волне, изменения величин поля в которой происходят в направлении вдоль оси x, плотности потенциальной и кинетической энергий имеют следующие зависимости от координаты: $W_{pot} = E\cos^2 kx$, $W_{kin} = E\sin^2 kx$, где $E = W_{pot} + W_{kin}$ – средняя плотность звуковой энергии. В этом случае акустическая радиационная сила направлена вдоль оси x: $\mathbf{F}_{rad} = (F_{rad}, 0, 0)$, где $F_{rad} = -dU/dx$, причём зависимость потенциала от расстояния можно представить в следующей форме:

$$U(x) = \frac{4\pi r^3}{3}\left(f_1 + \frac{3}{2} f_2\right) W_{pot}(x) + const. \quad (1.6)$$

Здесь учтено, что плотность полной энергии акустического поля $E = W_{pot} + W_{kin}$ в стоячей волне не зависит от координаты. Отсюда видно, что при $f_1 + \frac{3}{2} f_2 > 0$

точки устойчивого равновесия – акустические ловушки – находятся в точках минимума потенциальной энергии, т.е. в узлах акустического давления (пучностях колебательной скорости). При $f_1 + \frac{3}{2} f_2 < 0$ ловушки образуются, наоборот, в точках максимума потенциальной энергии, т.е. в пучностях акустического давления (узлах колебательной скорости). Выражение для силы можно выписать и в явном виде:

$$F_{rad}(x) = \frac{4\pi r^2 E}{3} \cdot kr \cdot \left(f_1 + \frac{3}{2} f_2\right) \cdot \sin(2kx) \qquad (1.7)$$

Рассмотрим интересующий нас случай тканевых сфероидов и гранул ТКФ. Их параметры приведены в Таблице 1.1. Как видно, для обоих типов частиц при $f_1 + \frac{3}{2} f_2 > 0$, т.е. радиационная сила в стоячей волне действует в направлении узлов акустического давления.

Тип частиц	ρ_{sc} , кг/м^3	c_l , м/с	c_t , м/с	f_1	f_2	$f_1 + \frac{3}{2} f_2$
Полистироловые шарики [93]	1040	2350	1120	0.438	0.026	0.477
Тканевые сфероиды [94]	1050	1600	3	0.163	0.032	0.211
Гранулы ТКФ [95]	2860	2709	1564	0.807	0.554	1.63

Таблица 1.1 Параметры материала частиц. Величины f_1 и f_2 рассчитаны для случая нахождении частиц в воде (ρ=1000 кг/м^3, c=1500 м/с)

При проведении экспериментов в условиях гравитации необходимо учитывать совместное воздействие на частицу радиационной силы и силы тяжести. Рассмотрим ситуацию, когда ось x направлена вдоль вертикали вверх. Сила тяжести и сила Архимеда, действующие на частицу, в сумме дают $F_{grav} + F_{boy} = (4\pi/3)(\rho_{sc} - \rho) r^3 g$, где g = 9.81 м/с^2 – ускорение силы тяжести. При помещении

частицы в поле стоячей акустической волны полная сила равна $F = F_{rad} + F_{grav} + F_{boy} = \frac{4\pi r^2 E}{3} \cdot kr \cdot \left(f_1 + \frac{3}{2} f_2\right) \cdot \sin(2kx) + (4\pi/3)(\rho_{sc} - \rho) r^3 g$. Левитация частиц возможна, если имеются точки, в которых $F = 0$. Из приведённого выражения для силы видно, что соответствующее условие на плотность акустической энергии является следующим:

$$E > \left| \frac{\rho_{sc} - \rho}{f_1 + \frac{3}{2} f_2} \right| \frac{g}{k} \tag{1.8}$$

Как видно, условие левитации не зависит от размера частиц (при условии, что диаметр частиц много меньше длины волны) и достигается при превышении амплитудой волны некоторого критического значения. Для нахождения порогового значения для амплитуды волны учтём, что зависимость акустического давления в стоячей волне может быть записана в виде

$$p(x, t) = p_0 \cos \omega t \cos kx,$$

где p_0 – значение акустического давления в пучности волны, $\omega = 2\pi f$ – циклическая частота. Из этого выражения следует формула для плотности потенциальной энергии: $W_{pot} = \langle p^2 \rangle / (2\rho c^2) = p_0^2 / (4\rho c^2) \cos^2 kx$, где скобками $\langle \dots \rangle$ помечено усреднение во времени по периоду волны. Отсюда видно, что плотность полной энергии равна $E = p_0^2 / (4\rho c^2)$. С учётом этой связи приходим к следующему выражению для пороговой амплитуды акустического давления:

$$p_0 > \sqrt{\frac{4\rho c^2 g}{k} \left| \frac{\rho_{sc} - \rho}{f_1 + \frac{3}{2} f_2} \right|} \tag{1.9}$$

При работе с тканевыми сфероидами важно следить, чтобы амплитуда акустического давления была ниже порога разрушений клеток. Главным образом, нужно следить за тем, чтобы не достигался порог кавитации. Это условие, как правило, удаётся обеспечить с большим запасом.

Отметим, что в условиях силы тяжести условие равновесия достигается уже не в пучностях акустического давления, а на некотором расстоянии от них, поскольку в самих пучностях радиационная сила равна нулю.

1.1.2. Аналитическое описание акустического поля и радиационной силы внутри цилиндрического пьезопреобразователя

Рассмотрим структуру поля внутри колеблющегося цилиндра и определим условия для возникновения в нем стоячей волны. Рассмотрим сначала случай бесконечного цилиндра, когда отсутствует зависимость от осевой координаты. Комплексная амплитуда гармонического акустического давления $P(R,\varphi)$ внутри круга радиуса a находится как решение задачи Гельмгольца [96]:

$$\begin{cases} \Delta P(R,\varphi) + k^2 P(R,\varphi) = 0, \;\; 0 \le \varphi < 2\pi, \;\; 0 < R < a, \\ P(a,\varphi) = F(\varphi), \;\; 0 \le \varphi \le 2\pi, \end{cases} \tag{1.10}$$

где Δ – оператор Лапласа, R, φ – радиальная и угловая координаты, $F(\varphi)$ – амплитуда давления на цилиндрической колеблющейся границе области, k – волновое число. Общее решение задачи записывается следующим образом:

$$P(R,\varphi) = \sum_{n=0}^{\infty} [A_n \cos(n\varphi) + B_n \sin(n\varphi)]\, J_n(kR), \tag{1.11}$$

где коэффициенты A_n и B_n определяются граничным условием:

$$A_0 = \frac{1}{2\pi J_0(ka)} \int_0^{2\pi} F(\varphi) d\varphi, \tag{1.12}$$

$$\begin{pmatrix} A_n \\ B_n \end{pmatrix} = \frac{1}{\pi J_n(ka)} \int_0^{2\pi} F(\varphi) \begin{pmatrix} \cos(n\varphi) \\ \sin(n\varphi) \end{pmatrix} d\varphi, \;\; n = 1, 2, \ldots \tag{1.13}$$

Будем считать, что колебания пьезоэлектрического цилиндра не зависят от полярного угла, т.е. являются радиально симметричными: $F(\varphi) = P_0 = const$. Тогда амплитуда волны также не зависит от полярного угла: $P(R,\varphi) = P(R)$. В таком случае все коэффициенты A_n и B_n для $n \ge 1$ обратятся в ноль, а единственный ненулевой коэффициент A_0 будет равен:

$$A_0 = \frac{P_0}{J_0(ka)}, \tag{1.14}$$

Следовательно, распределение комплексной амплитуды акустического давления внутри колеблющегося с частотой f цилиндра радиуса a описывается так [96]:

$$P(R) = \frac{P_0}{J_0(ka)} J_0(kR), \tag{1.15}$$

где R – радиальная координата, $k = 2\pi f/c$, c – скорость звука в жидкости, $J_0(ka)$ – функция Бесселя 0-го порядка. Из выражения видно, что максимальная амплитуда акустического давления достигается при $R = 0$, т.е. на оси цилиндра. При этом $P(0) = P_0/J_0(ka)$, т.е. при выполнении условия

$$J_0(ka) = 0 \tag{1.16}$$

амплитуда волны становится бесконечной. В реальности всегда присутствуют потери, которые ограничивают амплитуду. Тем не менее, при выписанном условии амплитуда будет достигать большой величины. Таким образом, указанное условие является условием резонанса и позволяет рассчитать те частоты, на которых амплитуда звукового давления будет наиболее высока. Также стоит отметить, что при этом волна имеет вид стоячей цилиндрической волны, радиальное распределение амплитуды давления в которой описывается функцией Бесселя. Таким образом, легко рассчитать радиусы цилидрических поверхностей, соответствующих узлам и пучностям акустического поля. Как уже отмечалось, на оси всегда образуется пучность волны. При увеличении частоты от нуля первый резонанс достигается при $ka \approx 2.404$, когда функция $J_0(ka)$ в первый раз обращается в ноль. При этом внутри цилинлического излучателя амплитуда волны нигде не зануляется, т.е. узловые поверхности отсутствуют. При дальнейшем росте частоты следующий ноль функции Беселя соответствует условию $ka \approx 5.520$. При этом на расстоянии $kR \approx 2.404$ амплитуда обращается в ноль. Следовательно, радиус первого от центра узла определяется соотношением:

$$R_1 \approx \frac{2.404}{k}. \tag{1.17}$$

Таким образом, варьируя частоту, подаваемую с генератора на преобразователь, можно изменять радиус узловой области поля. Более высокие резонансные частоты соответствуют последующим значениям нулей функции Бесселя: $ka \approx 8.654, 11.792,\ 14.493$ и т.д. При этом возникают новые узлы, но радиус первого узла всегда задается выписанным выше выражением, причём указанная узловая поверхность является самой подходящей для левитации – в том смысле, что по

сравнению с другими (более удалёнными от оси) узловыми поверхностями она окружена наиболее «сильными» зонами пучности.

Если в области распространения ультразвуковой волны находятся объекты с импедансом, отличающимся от импеданса иммерсионной среды, то будет возникать эффект рассеяния волны, а на сам объект радиуса *r* начнет действовать акустическая радиационная сила, которая была обсуждена выше в пункте 1.1.1. Ненулевой является лишь радиальная компонента силы $F_R = -dU/dR,$ где потенциал Горькова равен $U = \frac{4\pi r^3}{3}\left(f_1 W_{pot} - \frac{3}{2} f_2 W_{kin}\right)$, т.е. выражается через амплитуды акустического давления $|P|$ и колебательной скорости $|v|$ в точке нахождения частицы:

$$U = \frac{\pi r^3}{3}\left\{f_1 \frac{|P|^2}{\rho c^2} - \frac{3}{2} f_2 \rho |v|^2\right\}, \tag{1.18}$$

Ранее отмечалось, что в случае плоской стоячей волны для исследованного типа частиц радиационная сила действуют в направлении от пучности к узлу акустического давления. Указанный вывод основывался на том обстоятельстве, что плотность полной энергии не зависела от расстояния. В цилиндрической волне это не так, и условие минимума потенциальной функции является несколько иным. Напомним, что $P(R) = P_0 J_0(kR)/J_0(ka)$. Согласно уравнению движения, $v = -i/(\rho c)\, dP/d(kR) = iP_0/(\rho c)\, J_1(kR)/J_0(ka)$, т.е.

$$U(R) = \frac{\pi r^3 P_0^2}{3\rho c^2 J_0^2(ka)}\left\{f_1 J_0^2(kR) - \frac{3}{2} f_2 J_1^2(kR)\right\} \tag{1.19}$$

Отсюда видно, что минимум потенциала достигается не в пучностях акустического давления (когда первое слагаемое в фигурных скобках обращается в нуль), а при несколько иных радиальных координатах, зависящих от параметров f_1 и f_2. Радиационная сила $F_R = -dU/dR$ обращается в ноль при обращении в ноль функции $J_0(x) + \frac{3f_2}{2f_1}[\, J_1(x)/x - J_2(x)\,]$, где $x = kR$. При выводе этого условия учтены выражения для производных фукций Бесселя: $d\,J_0(x)/dx = -J_1(x)$, $dJ_1(x)/dx = J_1(x)/x - J_2(x)$. Отметим, что согласно Таблице 1.1 для рассматриваемых нами частиц $f_1 >> f_2$, т.е. вклад кинетической энергии в

потенциал Горькова незначителен по сравнению с вкладом потенциальной энергии. Численный анализ показывает, что вместо выписанной ранее координаты узла $R_1 \approx 2.404/k$ для точки минимума потенциала Горькова для полистироловых шариков получается координата $\hat{R}_1 \approx 2.369/k$, а для тканевых сфероидов $\hat{R}_1 \approx 2.304/k$, т.е. относительная разница $\left|\hat{R}_1 - R_1\right|/R_1$ не превышает 5%. Поэтому на практике можно считать, что минимум потенциала достигается в узлах акустического давления.

1.1.3. Численное моделирование акустического поля и радиационной силы внутри цилиндрического пьезопреобразователя методом конечных элементов

На практике источник стоячей цилиндрической волны имеет конечный размер. В этом случае проведённое выше упрощённое описание не позволяет учесть неоднородность структуры поля вдоль оси цилиндра. Чтобы учесть эти важные для практики детали, был использован пакет численного моделирования методом конечных элементов COMSOL Multiphysics [97]. Конечно-элементная численная модель, учитывающая пьезоэлектрические и упругие свойства керамики, позволяет точно описать акустическое поле внутри преобразователя и оптимизировать параметры эксперимента для наиболее эффективной сборки частиц в узлах стоячего поля.

Для описания ультразвукового поля внутри пьезоэлектрического цилиндра использовались модели линейного акустического поля, упругого твердого тела с учетом пьезоэффекта и электростатического поля в пространстве собственных частот, что соответствовало программным модулям Pressure Acoustics, Solid Mechanics и Electrostatics. Опишем кратко основные характеристики модулей, используемые для описания акустического, упругого и электростатического поля, создаваемого пьезоэлектрическим преобразователем.

Физический интерфейс Pressure Acoustics можно использовать для линейной акустики, описываемой скалярной переменной давления. Акустическое поле

давления, возникающее в результате излучения пьезоэлектрическим преобразователем в однородную среду, можно описать как решение уравнение Гельмгольца в частотной области для заданных частот:

$$\nabla\left(\frac{1}{\rho}(\nabla p)\right)+\frac{k^2 p}{\rho}=0 \tag{1.20}$$

где p и ρ – акустическое давление и плотность среды, k – волновое число. Гармоническое изменение всех полей и источников здесь дается с использованием соглашения $+i\omega$ (в отличие от других мест в диссертации, где используется соглашение $-i\omega$), т.е. в предположении, что параметры гармонических во времени процессов меняются по закону $e^{+i\omega t}$. В рамках модели задаются граничные условия, соответствующие параметрам эксперимента. Так как рассматривается акустическое поле внутри полого цилиндра, целесообразно решать задачу с учетом радиальной симметрии поля

Модуль Solid Mechanics позволяет рассчитать упругие деформации излучателя с учетом его пьезоэлектрических свойств. Определяющие уравнения для пьезоэлектрика выглядят так [97]:

$$\begin{cases} \mathbf{T}=[\mathbf{c^E}]\mathbf{S}-[\mathbf{e^t}]\mathbf{E} \\ \mathbf{D}=[\mathbf{e}]\mathbf{S}+[\boldsymbol{\varepsilon}^{\boldsymbol{S}}]\mathbf{E} \end{cases} \tag{1.21}$$

где $\mathbf{T}$ – вектор механического напряжения, $\mathbf{c}$ — матрица упругости, $\mathbf{S}$ — вектор деформации, $\mathbf{e}$ — пьезоэлектрическая матрица, $\mathbf{E}$ – вектор электрического поля, $\mathbf{D}$ – вектор электрического смещения, $\boldsymbol{\varepsilon}$ – матрица диэлектрической проницаемости. Верхние индексы указывают на ноль или константу соответствующее поле. Уравнения учитывают пьезоэлектрические свойства, а также механическую и электрическую анизотропию материала.

Физический интерфейс Electrostatics используется для расчета электрического поля, поля электрического смещения и распределения потенциала в условиях, когда распределение электрического заряда задано явно. В модуле решается закон Гаусса для электрического поля, а скалярный электрический потенциал используется в качестве зависимой переменной.

Геометрия модели задавалась в режиме аксиальной симметрии с помощью встроенного интерфейса. На рис. 1.1 а изображена схема задачи: область преобразователя (выделено синим цветом) и жидкости, вертикальная ось является также осью симметрии, горизонтальная ось соответствует радиальному направлению. Геометрия задачи на рис. 1.1 соответствует используемому в экспериментах пьезоэлектрическому преобразователю с внешним диаметром 33 мм и внутренним радиусом 28 мм. В области жидкости действует физический интерфейс Pressure Acoustics и решается волновое уравнение, а в области пьезоэлектрика заданы модули Solid Mechanics и Electrostatics. Взаимодействие между модулями и областями происходит следующим образом: на заданной частоте в модуле Electrostatics задается разность потенциалов на обкладках пьезоэлектрика. Рассчитывается электростатическое поле, которое подается на вход в физический интерфейс Solid Mechanics, и с учетом пьезоэффекта рассчитывается поле механических смещений. Затем механические колебания на границе пьезоэлектрика с жидкостью внутри рассматриваются как источник акустических волн, и с помощью модуля Pressure Acoustics производится расчет поля давления в жидкости.

Прямоугольная расчетная сетка, заданная в модели, имела размер ячеек 0.15 мм – в 10 раз меньше, чем длина акустической волны в жидкости на частоте 1 МГц. Граничные условия задаются в соответствии с условиями эксперимента. Например, если емкость с жидкостью находится только внутри пьезоэлектрика, а снаружи – воздух, то граничные условия, позволяющие точно описать акустическое поле в области расчета, будут следующими: сверху и снизу области жидкости задаются импедансные граничные условия, а внешние поверхности излучателя заданы как акустически свободные. Характеристики области жидкости соответствуют воде, а пьезоэлектрика – материалу PZT-4, причем параметры материалов взяты из стандартной библиотеки COMSOL. В случае, если материал в базе отсутствует, то для более точного расчета все акустические и упругие параметры можно задать вручную.

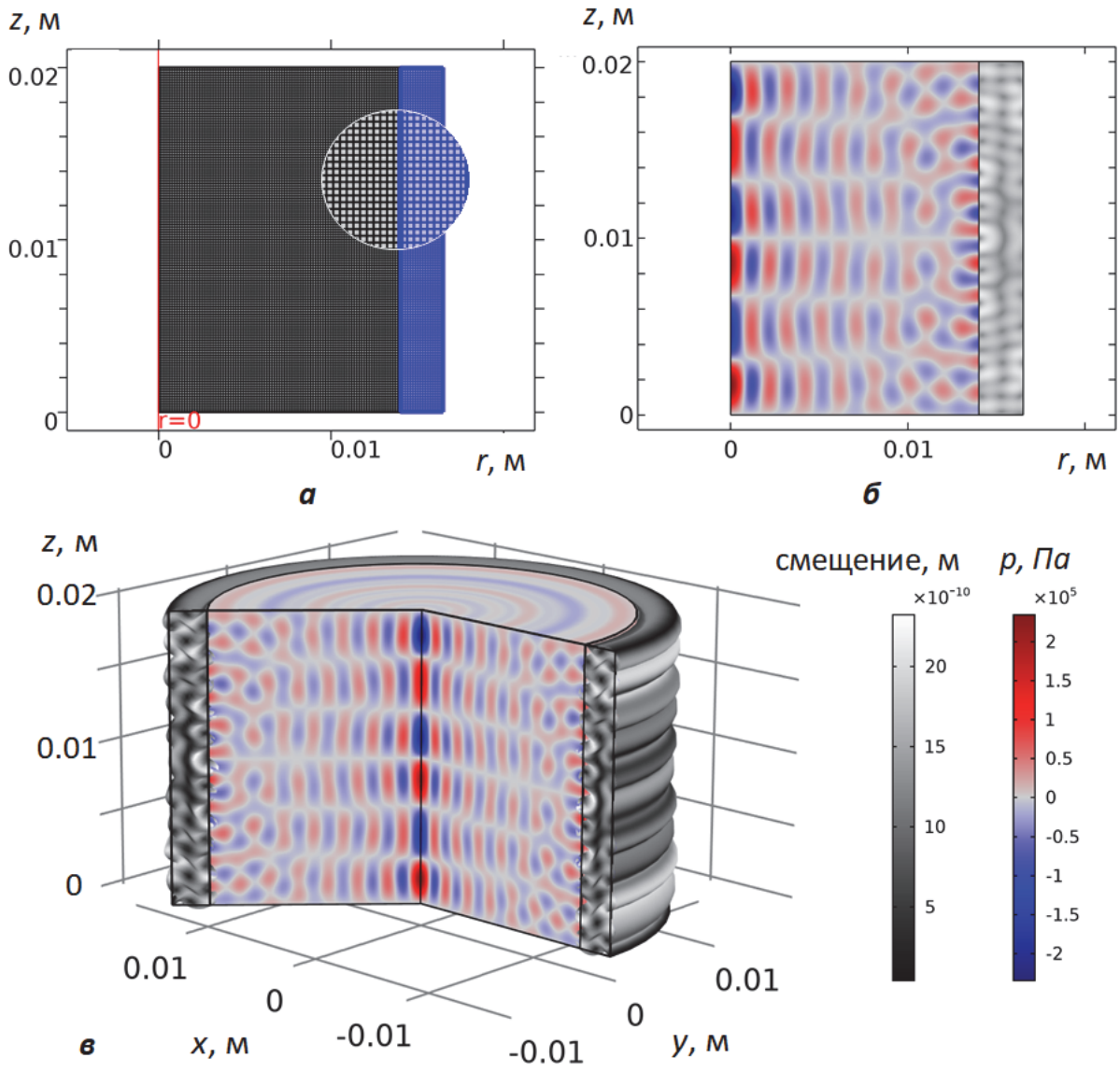


Рис. 1.1 Численная модель излучения пьезоэлектрического преобразователя, (а) расчетная сетка, (б) рассчитанное акустическое поле в жидкости и поле смещений в пьезоэлектрике, (в) объемное распределение поля на частоте 800 кГц.

Расчет акустического поля, поля смещений и электростатического поля происходит методом конечных элементов. В результате в области жидкости рассчитывается комплексное поле акустического давления, а в области излучателя – механические смещения и напряжения, а также поле электрического потенциала. На рис. 1.1 б показаны результаты расчета в аксиально-симметричной постановке задачи, а на рис. 1.1 в – акустическое поле и поле модуля смещения в трехмерной модели на резонансной частоте, соответствующей частоте геометрического резонанса 809 кГц (фактическая резонансная частота немного отличается от

рассчитанной в соответствии с формулой (1.17) 803 кГц, так как колеблющийся цилиндр не является бесконечным, что было допущено при выводе формулы).

Из распределения акустического давления можно определить, что первый узел стоячей волны расположен на расстоянии 0.8 мм, то есть на данной частоте при помещении тканевых сфероидов или полистироловых шариков вблизи оси, под воздействием акустической радиационной силы они будут образовывать трубку с диаметром около 1.6 мм.

1.1.4. Выводы к первому параграфу

Показана возможность сборки частиц маленького волнового размера – полистироловых шариков, тканевых сфероидов и гранул ТКФ в стоячем плоском и цилиндрическом акустическом поле. Найдены условия сборки и определены области пространства, в которые перемещаются частицы под воздействием акустической радиационной силы. Показан способ моделирования акустического поля в области излучения полого цилиндрического преобразователя методом конечных элементов для более точного определения условий сборки, а также для иллюстрации структуры ультразвукового поля.

§1.2 Эксперимент по левитации частиц акустическом поле в форме плоской стоячей волны

Так как теоретически возможна левитация частицы в вертикально направленном стоячем плоском поле в жидкости, и экспериментально такой феномен также наблюдается как в воде, так и в воздухе [98], то можно попробовать удерживать в левитирующем состоянии сразу множество сфероидов и проверить, возможно ли осуществить их сборку в единый конгломерат. С этой целью предлагалось использовать резонатор, состоящий из плоского пьезоэлектрического преобразователя и плоского отражателя, между которыми реализовывалось стоячее поле с волновым фронтом, близким к плоскому. Рассмотрены условия

реализации стоячей волны, а также возможность левитации и сборки гранул ТКФ в единый конгломерат.

1.2.1. Экспериментальное изучение левитации гранул ТКФ в поле стоячей волны

Для проверки возможности левитации частиц в поле стоячей волны была собрана экспериментальная установка, проиллюстрированная на рис. 1.2. В акустическую ванну с дегазированной водой помещалась жесткая металлическая рама, в которой крепились элементы акустического резонатора, позволяющего создать стоячую волну. Одной из частей резонатора был пьезоэлектрический преобразователь, который располагался сверху и генерировал квазиплоскую волну, распространяющуюся вниз. Изучающим элементом была ориентированная горизонтально плоская круглая пьезоэлектрическая пластина из материала PZT-4 с воздушной тыльной нагрузкой. Пьезопластина имела диаметр 50 мм и толщину 2 мм. На преобразователь подавался электрический гармонический сигнал с генератора частот Agilent 33250A после пропускания через усилитель мощности ENI RF Power Amplifier. Для создания стоячей волны на расстоянии 100 мм от излучающей поверхности был расположен рефлектор, представляющий собой круглую стеклянную пластину диаметром 150 мм и толщиной 5 мм, на тыльной стороне которой создавался слой, заполненный воздухом, что обеспечивало полное отражение ультразвука. Рефлектор был закреплен в поворотном устройстве, позволяющем производить тонкую регулировку наклона для достижения параллельности рефлектора и излучающей пьезопластины. В описанной конструкции пьезопластина выполняла роль не только источника, но и второго рефлектора акустического резонатора.

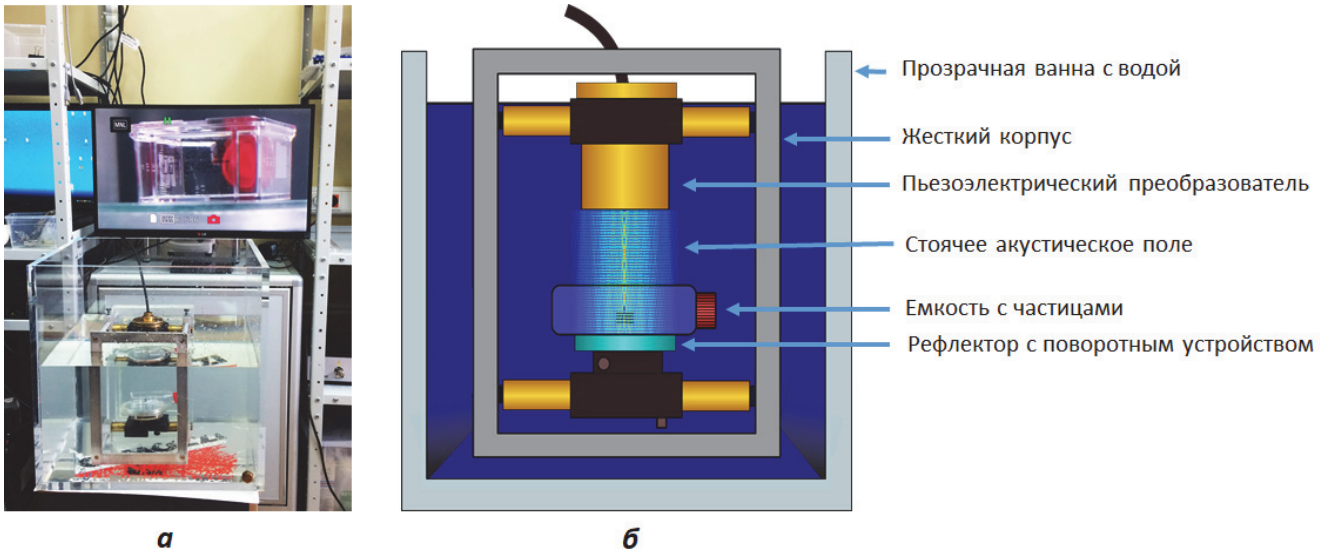


Рис. 1.2 (а) Фото экспериментальной установки; (б) схема установки.

Внутрь резонатора помещался контейнер, в котором находились гранулы фосфата кальция в жидкой среде. Диаметр гранул составлял около 100 мкм, их средняя плотность составляла около 2000 кг/м^3. В качестве иммерсионной жидкой среды использовалась как дегазированная вода (рис. 1.3 а), так и более плотный раствор сахарозы, имитирующий буфер для перекристаллизации гранул ТКФ (рис. 1.3 б). В качестве контейнера использовался культуральный флакон (Greiner culture flask [99]) с плоскопараллельными стенками из оргстекла. Поперечный размер широкой стенки флакона превышал 80 мм, что исключало влияние боковых стенок на волну в резонаторе. Расстояние между параллельными стенками узкой части флакона составляла 30 мм. Толщина пластиковых стенок не превышала 1 мм, что позволяло считать стенки звукопрозрачными. Флакон укладывался одной из своих широких сторон на рефлектор (рис. 1.2). Таким образом, внутри резонатора имелось два плоскопараллельных слоя – слой воды (толщиной около 70 мм) и слой иммерсионной жидкостью с исследуемыми частицами (толщиной около 30 мм). Для наблюдения поведения частиц в поле стоячей волны рядом со стенкой акустической ванны была установлена камера GoPro с макро-линзой. Изображение выводилось на монитор компьютера.

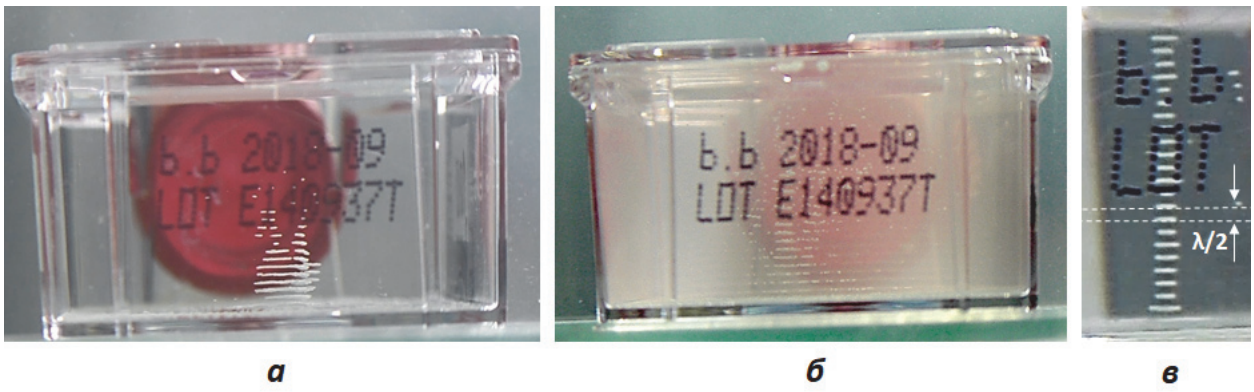


Рис. 1.3 Левитация гранул ТКФ в (а) воде, (б) растворе сахарозы. (в) Совпадение расстояния между левитирующими слоями с полуволновым расстоянием между узлами стоячей волны.

При отсутствии рефлектора (т.е. при излучении в свободное пространство) ультразвуковой преобразователь достигал максимума излучаемой мощности на частоте толщинного резонанса пьезопластины 1.09 МГц, при этом ширина полосы по уровню половинной мощности составляла около 60 кГц. При наличии рефлектора из-за возникновения стоячей волны электрический импеданс преобразователя изменялся, что приводило к характерной для волновых резонаторов зависимости потребляемой преобразователем электрической мощности от частоты в виде последовательности резонансных пиков, следующих друг за другом с периодом $\Delta f = c/(2L) \approx 7.5$ кГц, где $L \approx 100$ мм – длина резонатора, c – скорость звука в жидкости. Таким образом, в пределах полосы пьезопреобразователя имелось 8 – 10 резонансных пиков. Резонансные частоты соответствовали условию наиболее эффективного преобразования электрической энергии в акустическую, что происходило при возникновении в резонаторе стоячей волны. Тонкой настройкой частоты на генераторе сигналов была определена частота, ближайшая к частоте толщинного резонанса пьезопластины, которая и была выбрана в качестве рабочей частоты. Она составила 1.085 МГц в эксперименте с флаконом с водой и 1.088 МГц с флаконом раствора сахарозы.

Контейнер, содержащий взвешенные в воде гранулы ТКФ, встряхивался и затем помещался в резонатор. Под воздействием акустической радиационной силы гранулы перемещались в узловые плоскости акустического давления. Удержание гранул происходило (рис. 1.3), если плотность акустической энергии в резонаторе,

которая пропорциональна подводимой к излучателю электрической мощности, была достаточной для того, чтобы компенсировать разность силы тяжести и силы Архимеда (см. предыдущий пункт).

Для гранул в воде необходимая для удержания электрическая мощность излучателя составила около 1.78 Вт (так как размер гранул немного варьировался, при данной мощности левитировала большая часть частиц), а для гранул в растворе сахарозы – около 2 Вт (несколько большая мощность потребовалась из-за сильного затухания акустической волны в вязкой жидкости). Расстояние между слоями гранул в воде составило 0.69 мм (рис. 1.3 в), что в точности соответствовало половине длины волны, как и должно быть в стоячей волне. В каждой узловой области могло собираться по несколько слоев гранул ввиду малости их размера и большой амплитуды акустического поля. Так как радиальная структура акустического поля была достаточно неоднородной из-за волн Лэмба в пластине пьезопреобразователя, частицы, находящиеся на одном узловом уровне, передвигались к оси излучателя и собирались там в единые кластеры в виде плоских «блинов» (рис. 1.4).

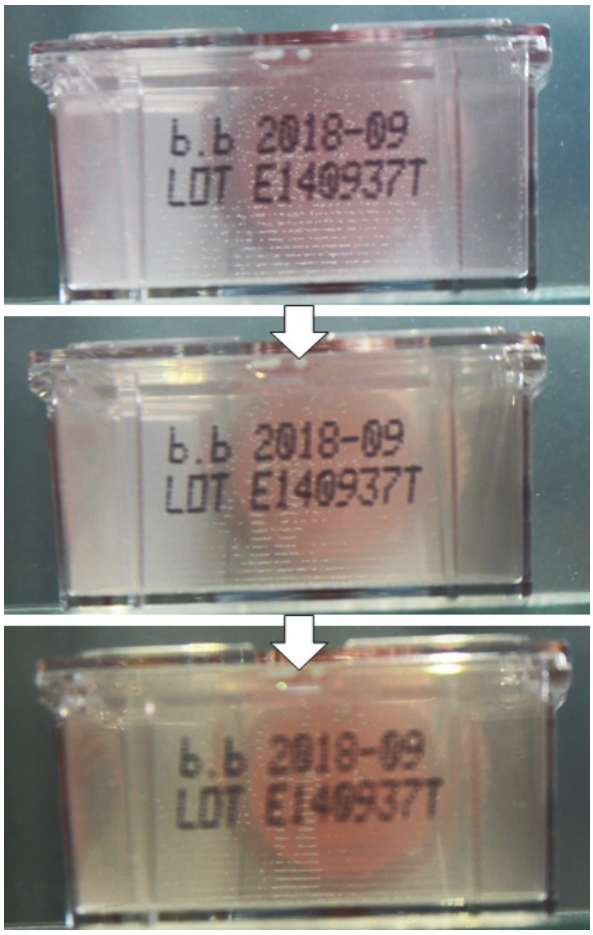


Рис. 1.4 Сборка гранул ТКФ в горизонтальных плоскостях в виде плоских кластеров, образующихся из-за неоднородной радиальной структуры поля стоячей волны.

1.2.2. Выводы ко второму параграфу

Экспериментально была продемонстрирована возможность левитации частиц малого волнового размера в вертикальном стоячем ультразвуковом поле,

созданном с помощью плоского пьезоэлектрического преобразователя и рефлектора. Была определена излучаемая электрическая мощность, необходимая для левитации гранул ТКФ в воде и водном растворе сахарозы. Было показано, что гранулы собираются в узловых областях поля и расстояние между слоями соответствует половине длины волны. Неоднородность акустического поля в радиальном направлении, обусловленная волнами Лэмба в пьезоэлектрической пластине, способствует сборке частиц на горизонтальных уровнях.

§1.3 Эксперимент по биофабрикации в акустическом поле в форме цилиндрической стоячей волны

Так как эксперимент с плоским стоячим полем показал, что частицы действительно собираются в узловых областях акустического поля давления, возникло желание проверить возможность сборки частиц в форме трубки, если поместить их в стоячее цилиндрическое поле. Для этого предлагалось использовать пьезоэлектрический преобразователь в виде полого цилиндра, внутри которого в случае резонанса будет формироваться стоячее поле, близкое к цилиндрическому. В эксперименте планировалось использовать тканевые сфероиды, так как трубка из клеток ткани могла бы стать аналогом кровеносного сосуда. Чтобы трубка имела равномерную толщину, цилиндрическое поле должно быть ориентировано вертикально, и должна быть предусмотрена подложка, на которую будет опираться нижний слой сфероидов.

1.3.1. *Экспериментальная установка*

Акустическая радиационная сила, создаваемая цилиндрическим пьезопреобразователем, воздействует на сфероиды только в горизонтальном направлении, тогда как в вертикальном направлении сфероиды оседают в питательном растворе под действием силы тяжести. Также был необходим контакт такого конгломерата с некоторой подложкой в нижней части зоны действия радиационной силы, причем такая подложка не должна препятствовать

прохождению питательных веществ к сфероидам. Более того, для построения одиночной тканевой трубки следовало ограничить область пространства, в которой могут находиться сфероиды, чтобы они попадали только в первый узел стоячей волны и не распределялись по периферийным узловым областям. Нужно было подобрать такие условия эксперимента, чтобы сфероиды после впрыскивания в рабочую область успели выстроиться в форме вертикально стоящей трубки до того, как достигнут нижней части преобразователя. Для этих целей был предварительно изготовлен контейнер специальной формы из агарозы.

Агарозная форма была выполнена в виде цилиндра с конусообразным отверстием и для герметичности закрывалась сверху крышкой, сделанной также из агарозы, а затем помещалась внутрь пьезоэлектрического преобразователя. Радиус отверстия не превышал радиуса второй узловой зоны стоячей волны, его дно заканчивалось на расстоянии 7 мм от нижнего края контейнера, а внешний диаметр и высота агарозного контейнера соответствовали внутреннему диаметру и высоте пьезоэлектрического преобразователя (рис. 1.5 а, серая область). Внутренняя полость агарозной формы заполнялась раствором с парамагнетиком в концентрации 50 мМ; там же были расположены полистироловые шарики диаметром 175 мкм, которые выполняли роль фантомов тканевых сфероидов, или сами тканевые сфероиды. Использование агарозной формы вместо стандартной пластиковой кюветы было обусловлено несколькими причинами. Во-первых, наличие твердых стенок у пластиковой кюветы вызывает дополнительное отражение и поглощение ультразвуковой волны, а в случае неидеального совпадения оси кюветы с осью цилиндрического пьезопреобразователя нарушаются условия резонанса, и радиационная сила уменьшается. В то же время, агарозные формы очень близки по физическим свойствам к воде и не вызывают сильных отражений и поглощения ультразвуковой волны [100]. Акустическая прозрачность агарозы избавляет от необходимости центрировать форму с преобразователем, а оптическая прозрачность позволяет наблюдать за ходом эксперимента с помощью видеокамеры. Во-вторых, пластиковое дно кюветы адгезивно для тканевых сфероидов и полистироловых шариков, тогда как к агарозе

они не прилипают. Пористая структура агарозы позволяет сфероидам получать питательные вещества, даже контактируя с таким контейнером.

В качестве источника ультразвука использовалось пьезокерамический цилиндр из материала ЦТБС-3 с внешним диаметром 33 мм, внутренним диаметром 28 мм и высотой 20 мм.

Эксперименты по сборки проводились как с полистироловыми шариками диаметра 175 мкм, так и со тканевыми сфероидами из человеческих хондроцитов диаметром около 200 мкм.

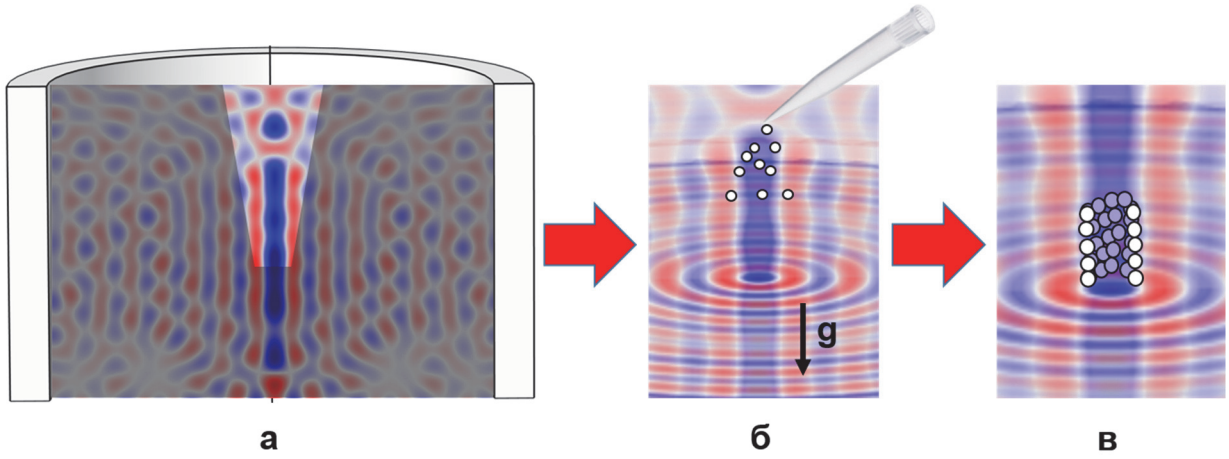


Рис. 1.5 Схема эксперимента по формированию трубчатого конгломерата из тканевых сфероидов в акустическом поле, (а) – стоячее поле, созданное кольцевым пьезопреобразователем, и положение контейнера из агарозы внутри цилиндра (затемненная область); (б) – впрыскивание сфероидов в питательный раствор в области ультразвукового поля; (в) – формирование трубчатого конгломерата в результате оседания сфероидов на агарозную форму в поле действия силы тяжести и акустической радиационной силы.

Пьезопреобразователь с расположенным внутри агарозным контейнером помещался в стеклянную емкость, которая также была заполнена питательным раствором. Затем установка устанавливалась в термостат, поддерживающий температуру 37 °C и необходимую для клеток концентрацию CO_2 в воздухе. Наличие дополнительного объема питательного раствора в емкости с преобразователем гарантировало более стабильный температурный режим внутри преобразователя во время излучения ультразвука и защищало сфероиды от перегрева.

В ходе эксперимента с помощью микропипетки тканевые сфероиды из хондроцитов – клеток хрящевой ткани – аккуратно впрыскивались внутрь отверстия в агарозной форме в верхней его части (рис. 1.5 б) при излучающем на резонансной частоте пьезоэлектрическом преобразователе. Ввиду того, что в качестве источника ультразвука использовался цилиндрический преобразователь, узловая область в пространстве представляла собой цилиндр. Так как величина акустической радиационной силы была достаточно большой, сфероиды практически мгновенно выстраивались в форме трубки, радиус которой соответствовал радиусу первого узла стоячего цилиндрического ультразвукового поля, и под действием силы тяжести оседали на дно, формируя таким образом тубулярный конгломерат (рис. 1.5 в).

1.3.2. Результаты эксперимента

Фотографии эксперимента и формирование конгломерата из сфероидов показаны на рис. 1.6. Оптическая прозрачность контейнера из агарозы и увеличенный радиус пьезоэлектрического цилиндра позволили рассмотреть трубку не только сверху (рис. 1.6 б) но и под углом (рис. рис. 1.6 в) на протяжении всего процесса сборки и слияния.

Если количество впрыскиваемых сфероидов было достаточно велико, то формировался плотный цилиндр с фиксированным радиусом, определяемым длиной акустической волны. Удержание сфероидов в форме трубки в термостате в течение 24 часов позволило сфероидам слиться в сплошной тканевый конгломерат. Процесс слияния сфероидов подтвердил их жизнеспособность. Ультразвуковая волна с частотой 800 кГц позволила создать цилиндр диаметром 1.3 мм, толщиной 0.45 мм и высотой 1.5 мм, что составляло порядка $7-9$ слоев сфероидов в вертикальном направлении (рис. 1.7). Диаметр тканевого цилиндра немного меньше, чем расчетный диаметр узловой области на частоте 800 кГц (1.44 мм в соответствии с формулой (1.17)), так как в процессе слияния сфероиды начинают контактировать плотнее друг с другом и трубка немного сжимается, однако с

учетом небольшой вариации температуры теоретическая зависимость хорошо описывает экспериментальные наблюдения. Высоту конгломерата можно существенно увеличить, если использовать большее количество сфероидов и передвинуть дно контейнера ближе к середине излучателя по высоте: в таком случае сфероиды окажутся в зоне, где структура волна наиболее близка к цилиндрической. В экспериментах без слияния сфероидов удавалось достигнуть высоты конгломерата порядка 5 – 6 мм, поэтому есть основания полагать, что аналогичный размер слившегося конгломерата может быть достигнут в рамках указанного метода.

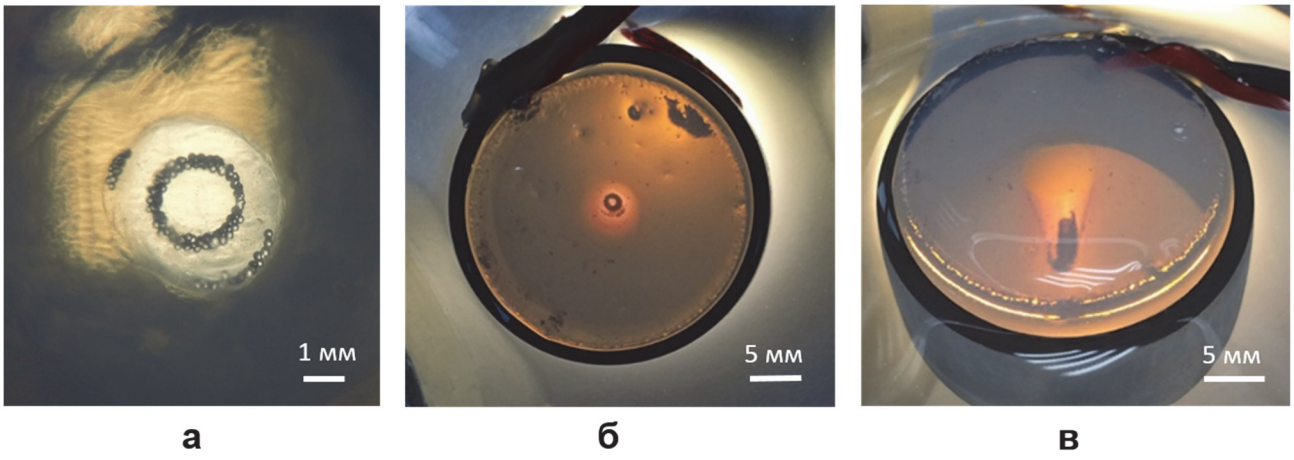


Рис. 1.6 Фотографии эксперимента: (а) – вид сверху, трубка из полистироловых шариков, имитирующих тканевые сфероиды, (б), (в) – виды сверху и под углом на трубку из хондросфер в агарозном контейнере внутри пьезоцилиндра; установка помещена в питательный раствор.

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

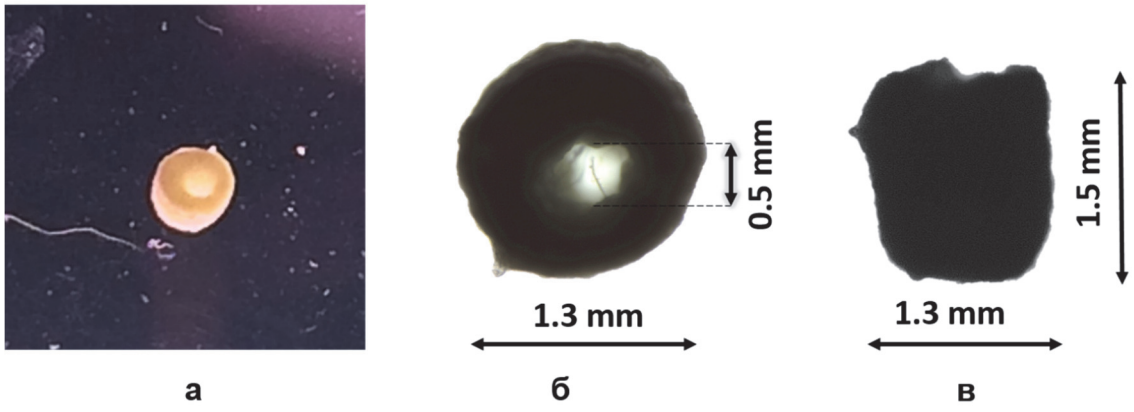


Рис. 1.7 Слившийся тканеинженерный конгломерат из хондроцитов в форме трубки: (а) – общий вид конгломерата, (б), (в) – вид сверху и сбоку под микроскопом.

1.3.3. Выводы к третьему параграфу

Была продемонстрирована возможность биофабрикации тканеинженерного объекта в форме трубки в стоячем цилиндрическом поле заданного радиуса. Предложенный метод подразумевает использование только акустического поля низкой интенсивности, что является безопасным даже при длительном воздействии на сфероиды. Разработан подход по сборке сфероидов внутри полого цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя с использованием специальной агарозной формы, которая является безопасной подложкой, пропускающей питательные вещества и не искажающей акустическое поле. Длина тканевой трубки, полученная методом акустической биофабрикации, составила порядка 7 – 9 слоев сфероидов в высоту, а радиус порядка 1.3 мм. Анализ слившейся тканевой трубки показал, что клетки сохраняют свою жизнеспособность.

Глава 2
АКУСТИЧЕСКАЯ РАДИАЦИОННАЯ СИЛА, ДЕЙСТВУЮЩАЯ НА СФЕРИЧЕСКИЙ РАССЕИВАТЕЛЬ ПРОИЗВОЛЬНОГО ВОЛНОВОГО РАЗМЕРА

При рассмотрении воздействия ультразвукового поля на некрупные тканевые сфероиды и гранулы фосфата кальция для оценки акустической радиационной силы удобным оказывается приближение Горькова [31]. Но если понадобится увеличить размер манипулируемых частиц или частоту ультразвука, то размер частиц может сравниться с длиной волны; в этом случае приближение Горькова окажется неприменимым. Вообще говоря, после сборки частиц в единый конгломерат получившийся объект обычно превышает по размеру длину волны (даже если исходные компоненты были много меньше длины волны) и может рассеивать звуковую волну как большая частица. При этом важно, чтобы на время слияния конгломерат оставался неподвижным в своем первоначальном положении и не контактировал со стенками контейнера, иначе в процессе слияния форма конгломерата может сильно измениться.

Расчет акустической радиационной силы, действующей на твердотельный рассеиватель большого волнового размера, является непростой вычислительной задачей, требующей решения задачи рассеяния акустической волны. В работе [27] был предложен подход по расчету радиационной силы, действующей со стороны произвольного акустического пучка на упругую сферу в жидкости. Падающий на рассеиватель пучок представляется в виде суммы плоских волн разных направлений (метод углового спектра). Для каждой такой волны применяется классическое решение для рассеяния на упругой сфере и затем результирующее рассеянное поле представляется в виде суперпозиции рассеянных волн от всех компонент углового спектра падающего пучка. Сумма падающей и рассеянной волн позволяет рассчитать компоненты тензора радиационных напряжений на

замкнутой поверхности, окружающей рассеиватель, и в итоге вычислить акустическую радиационную силу.

В данной главе используются материалы, опубликованные в статье [А3].

§2.1 Инструмент для расчета акустической радиационной силы для сферического рассеивателя произвольного волнового размера

Хотя предложенный в [27] метод позволяет с хорошей точностью рассчитать радиационную силу для произвольного акустического поля и для любого материала и размера сферического рассеивателя, то есть применим в большом диапазоне практических задач, численная реализация этого метода может вызвать трудности ввиду громоздкости формул и необходимости одновременного учёта большого количества параметров. Чтобы облегчить вычислительную процедуру и анализ результатов, в рамках настоящей диссертационной работы был реализован сервис с графическим интерфейсом на языке Python, позволяющий проводить расчет акустической радиационной силы, задавая посредством дружественного интерфейса параметры акустического поля и рассеивателя. Разработанный сервис прост в установке и использовании и имеет открытый код, то есть алгоритм доступен широкому кругу пользователей. Репозиторий проекта доступен по ссылке [101].

2.1.1. Метод расчета акустической радиационной силы

Для расчета акустической радиационной силы необходимо знать акустическое поле, в которое помещен рассеиватель. Рассмотрим акустический источник, излучающий волновой пучок вдоль оси z. Предполагается, что источник является гармоническим по времени. Акустическое поле может быть охарактеризовано голограммой – двумерным распределением давления на некоторой плоскости xy перед источником. Это распределение может быть рассчитано на основе модели вибрации поверхности источника с использованием

интеграла Рэлея или может быть измерено экспериментально. Выберем в качестве начала декартовой системы координат пересечение плоскости голограммы с осью z. Таким образом, нам известно распределение комплексной амплитуды давления падающей волны в плоскости xy при $z = 0$: $p_i(x, y, z = 0)$, и, следовательно, угловой спектр в этой же плоскости $S(k_x, k_y)$, где k_x, k_y – компоненты волнового вектора $k = \{k_x, k_y, k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}\}$. Угловой спектр связан с падающим полем давления $p_i(x, y, 0)$ двумерным пространственным преобразованием Фурье по координатам x, y. Комплексная амплитуда акустического давления в произвольной точке пространства находится из углового спектра следующим образом [29, 102]:

$$p_i(x, y, z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{k_x^2 + k_y^2 < k^2} dk_x dk_y S(k_x, k_y) e^{ik_x x + ik_y y + i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}\, z}. \quad (3.1)$$

В работе [27] показано, что если акустический пучок падает на упругий сферический рассеиватель, то суммарное падающее и рассеянное поле комплексной амплитуды давления в случае, если рассеиватель находится в точке $\mathbf{r} = \{x, y, z\}$, можно представить в виде следующего разложения:

$$p = \frac{1}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} i^n \left\{ j_n(k\mathbf{r}) + c_n h_n^{(1)}(k\mathbf{r}) \right\} \sum_{m=-n}^{n} H_{nm} Y_{nm}(\theta, \varphi) \quad (3.2)$$

где j_n, h_n – сферические функции Бесселя и Ханкеля, Y_{nm} – сферическая функция, c_n – множители, зависящие от параметров рассеивателя, H_{nm} – матричные коэффициенты, характеризующие падающее поле, $r = |\mathbf{r}|$. Коэффициенты H_{nm} можно найти на основе углового спектра падающей волны $S(k_x, k_y)$ и комплексно-сопряженных сферических гармоник Y_{nm}:

$$H_{nm} = \int_{k_x^2 + k_y^2 \le k^2} dk_x dk_y S(k_x, k_y) Y_{nm}^*(\theta_k, \varphi_k) \quad (3.3)$$

Заметим, что H_{nm} рассчитывается для такого углового спектра, которому соответствует положение рассеивателя в координатах $\mathbf{r} = \{0,0,0\}$. Если рассеиватель помещен в другую точку пространства $\mathbf{r} = \{x, y, z\}$, то

соответствующий такому положению угловой спектр находится умножением исходного углового спектра на соответствующий пропагатор:

$$\tilde{S}(k_x, k_y) = S(k_x, k_y) e^{ik_x x + ik_y y + i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}\, z} \tag{3.4}$$

После нахождения коэффициентов H_{nm} они используются для того, чтобы рассчитать декартовы компоненты вектора акустической радиационной силы, действующей на рассеиватель в данной точке пространства:

$$F_x = \frac{1}{8\pi^2 \rho c^2 k^2} \mathrm{Re}\left\{ \sum_{n=0}^{\infty} \psi_n \sum_{m=-n}^{n} A_{nm} \left(H_{nm} H_{n+1,m+1}^* - H_{n,-m} H_{n+1,-m-1}^* \right) \right\}, \tag{3.5}$$

$$F_y = \frac{1}{8\pi^2 \rho c^2 k^2} \mathrm{Im}\left\{ \sum_{n=0}^{\infty} \psi_n \sum_{m=-n}^{n} A_{nm} \left(H_{nm} H_{n+1,m+1}^* + H_{n,-m} H_{n+1,-m-1}^* \right) \right\}, \tag{3.6}$$

$$F_z = -\frac{1}{4\pi^2 \rho c^2 k^2} \mathrm{Re}\left\{ \sum_{n=0}^{\infty} \psi_n \sum_{m=-n}^{n} B_{nm} \left(H_{nm} H_{n+1,m}^* \right) \right\}, \tag{3.7}$$

где A_{nm}, B_{nm} и ψ_n представляются следующим образом:

$$\psi_n = (1 + 2c_n)(1 + 2c_{n+1}^*) - 1,$$

$$A_{nm} = \sqrt{\frac{(n+m+1)(n+m+2)}{(2n+1)(2n+3)}},$$

$$B_{nm} = \sqrt{\frac{(n+m+1)(n-m+1)}{(2n+1)(2n+3)}}.$$

Как видно из приведенных соотношений (3.2, 3.4–3.7), везде фигурирует суммирование по n от нуля до бесконечности. В действительности величина n-ых компонент радиационной силы довольно быстро убывает, и степень убывания зависит в том числе от множителя ψ_n, который зависит от соотношения ka – волнового размера рассеивателя, где a – радиус рассеивателя. Чем больше величина ka, тем больше членов суммирования нужно учесть для точного расчета акустической радиационной силы: если $ka < 1$, то требуется всего два члена ряда, и выражения сводятся к приближению Горькова для рассеивателей малого волнового размера.

2.1.2. Оценка точности и времени расчета

Время расчета квадратично зависит от количества итерационных членов и линейно зависит от количества пространственных точек, поэтому для оптимального времени работы алгоритма нужно определить минимальное количество удерживаемых членов ряда, которое обеспечит приемлемую точность расчета. В реализованном алгоритме количество членов ряда было ограниченно величиной $N_{max} = ka + 5$, где k – волновое число в среде, a – радиус рассеивателя. Было показано, что в таком случае численная ошибка расчета не превышает 10^{-5}.

Можно представить F_z из выражения (3.7) как функцию от величины верхнего индекса суммирования N следующим образом:

$$F_z(N) = \sum_{n=0}^{N} f_n,$$

где f_n – n-ые компоненты из выражения (7). Тогда будем считать количество членов N ряда достаточным, если $F_z(N)$ достигает асимптоты, а величина $|F_z(N-1) - F_z(N)|/F_z(N)$ не превышает 10^{-5}.

Для иллюстрации были рассчитаны величины z-компоненты радиационной силы, действующей на помещенный в фокус сферический рассеиватель разных волновых размеров. В качестве источника поля моделировался вогнутый фокусирующий излучатель в виде сферической чаши диаметром 10 см и радиусом кривизны 7 см, который излучал ультразвуковой пучок в воду на частоте 1 МГц. Параметры рассеивателя были заданы следующими: плотность ρ_{sc} = 2040 кг/м^3, скорости продольных и поперечных волн c_l = 4540 м/с и c_t = 2130 м/с, соответственно, радиус рассеивателя от 1 до 6 мм, что соответствовало волновому размеру ka от 5 до 26 (то есть рассеиватели имели большой волновой размер).

На рис. 2.1 а показана зависимость $F_z(N)$ для каждого размера рассеивателя. Как видно из графика, чем меньше волновой размер рассеивателя, тем быстрее величина F_z выходит на асимптоту. Для того, чтобы оценить необходимое количество удерживаемых членов ряда N для достижения необходимой точности

расчета g, были построены зависимости вида $g(N) = 1 - \left|\frac{F_z(N-1)}{F_z(N)}\right|$ (рис. 2.1 б). Видно, что для всех размеров рассеивателя при достижении $N_{max} = ka + 5$ (отмечено точкой на каждом графике) точность счета достигает значения 10^{-5}.

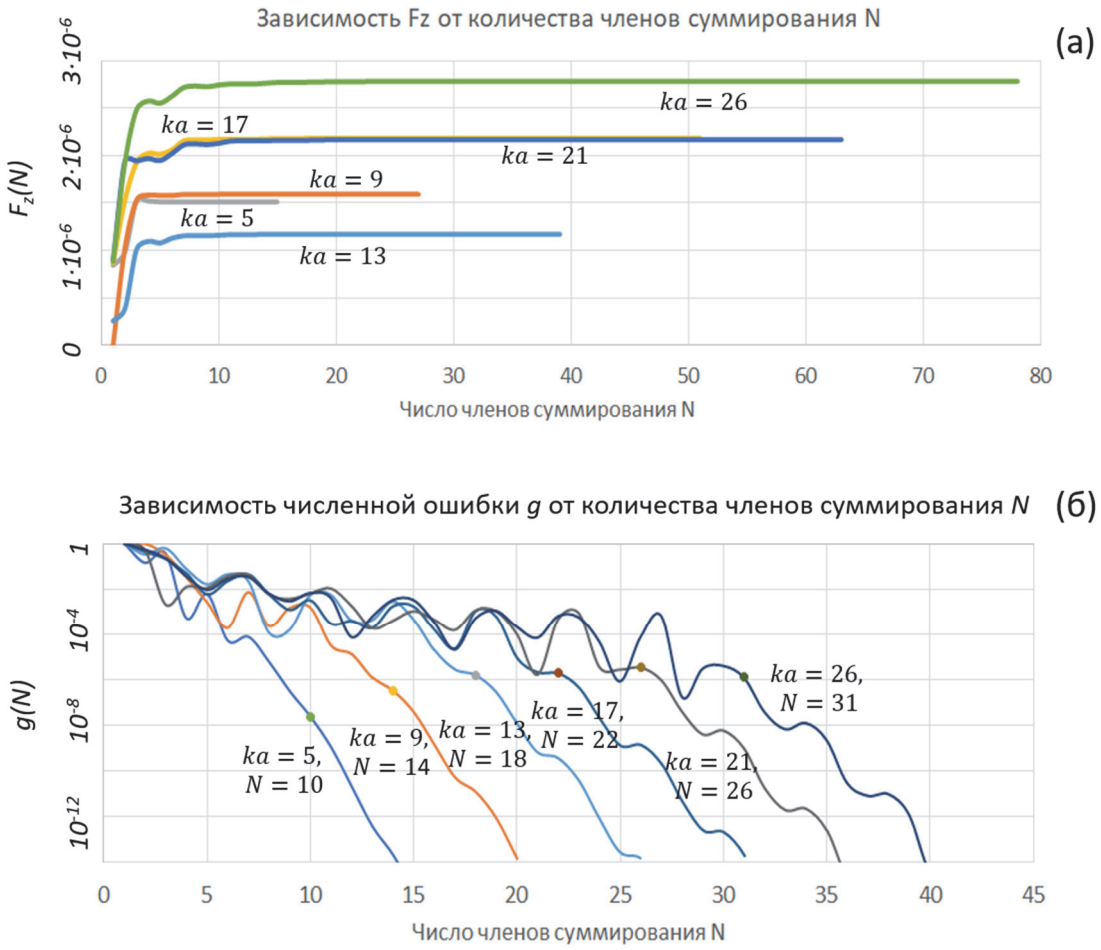


Рис. 2.1 Зависимость $\boldsymbol{F_z(N)}$ (а) и $\boldsymbol{g(N)}$ для каждого размера рассеивателя. Рисунки демонстрируют, что для рассеивателей разных размеров количества удерживаемых членов ряда $\boldsymbol{N_{max} = ka + 5}$ достаточно для высокой точности численных расчетов акустической радиационной силы.

Если говорить о времени счета, то наибольшее вычислительное время тратится на расчет матричных коэффициентов H_{nm}, которые включают в себя сферические гармоники Y_{nm}. Количество полиномиальных членов, входящих в состав Y_{nm}, квадратично зависит от n, поэтому время расчета коэффициентов H_{nm} также квадратично зависит от N_{max}. Таким образом, в целом наблюдается квадратичная зависимость времени расчета акустической радиационной силы от

размера рассеивателя. При этом время расчета линейно зависит от количества пространственных точек, в которых требуется рассчитать радиационную силу, так как алгоритм параллельно совершает вычисления для всех пространственных координат.

2.1.3. Архитекура сервиса

Данный метод расчета акустической радиационной силы был реализован на языке программирования Python 3, преимуществом которого является открытая лицензия, позволяющая использовать его без ограничений в любых приложениях, и широкий выбор библиотек. Графический интерфейс программы был реализован с помощью фреймворка веб-разработки Flask и может быть доступен в любом браузере [103]. В качестве базы данных, в которой хранятся результаты расчетов и загруженные модели акустического пучка, используется PostgreSQL [104]. Кроме того, имеется Docker образ данного сервиса, который может быть запущен на любой операционной системе, а также на облачном сервере [105].

2.1.4. Задание параметров для расчета

Для того чтобы рассчитать акустическую радиационную силу, действующую со стороны произвольного пучка на сферический упругий рассеиватель, на вход программы нужно подать информацию об акустическом поле и параметрах рассеивателя.

1) Расчет голограммы фокусирующего излучателя с заданными параметрами

Для задания информации об акустическом поле предусмотрено два способа: расчёт голограммы поля фокусирующего излучателя с заданными параметрами (соответствующий интерфейс для ввода параметров показан на рис. 2.2) или использование предварительно рассчитанной или экспериментально измеренной

голограммы акустического поля. Если в качестве источника используется одноэлементный фокусирующий излучатель с равномерным распределением нормальной компоненты колебательной скорости на его поверхности (поршневой излучатель), то можно задать его параметры, и в программе будет произведен расчет распределения комплексной амплитуды давления на плоскости, параллельной поверхности излучателя. Помимо фокусного расстояния, необходимо задать диаметр преобразователя D и диаметр центрального отверстия d, если оно присутствует, фокусное расстояние R, частоту звуковой волны и пространственный шаг dh, с которым будет рассчитана голограмма. Подразумевается, что пространственные шаги вдоль осей x, y одинаковы, как и общее количество точек вдоль этих осей. Также вводятся параметры жидкости, в которой распространяется звуковой пучок: скорость звука и плотность, и задается имя для модели поля.

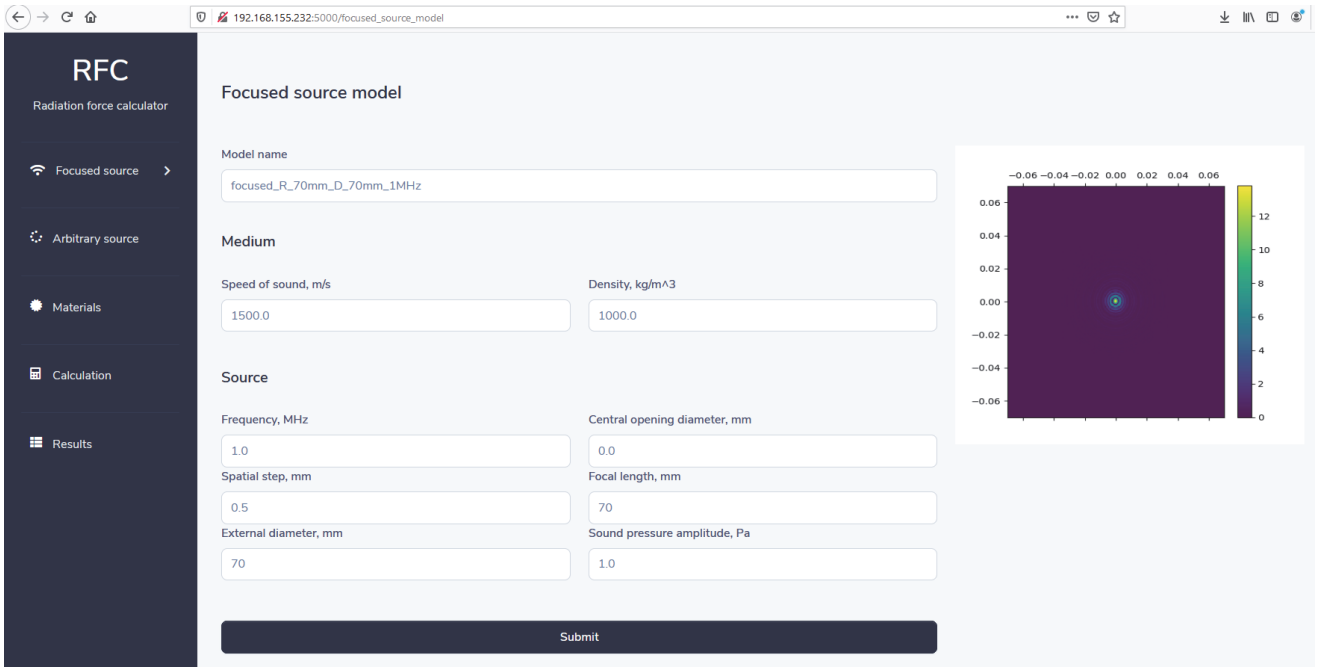


Рис. 2.2 Интерфейс программы на вкладке с вводом параметров фокусирующего излучателя. Справа показана рассчитанная голограмма для выбранных параметров.

Затем с помощью интеграла Рэлея по поверхности преобразователя производится расчет поля комплексной амплитуды давления в плоскости, параллельной поверхности излучателя, на расстоянии $0.9R$ с пространственным

шагом dh в диапазоне по осям x, y от $-D/2$ до $D/2$. Затем производится нулевое заполнение по краям области расчета: полученная таблица значений размера $N/2 \times N/2$ элементов, где $N=2D/dh$, дополняется нулями от $-D$ до $-D/2$ и от $D/2$ до D по осям x, y. Такая процедура дополнения нулями (zero padding) позволяет обеспечить достаточно мелкий шаг по пространственным частотам при расчете углового спектра. Итоговая схема со взаимным расположением излучателя и плоскости голограммы показана на рис. 2.3. После расчета голограммы появляется модель с заданным именем, которой присвоен файл в формате .mat, содержащий распределение комплексной амплитуды давления в виде таблицы размером $N \times N$ элементов.

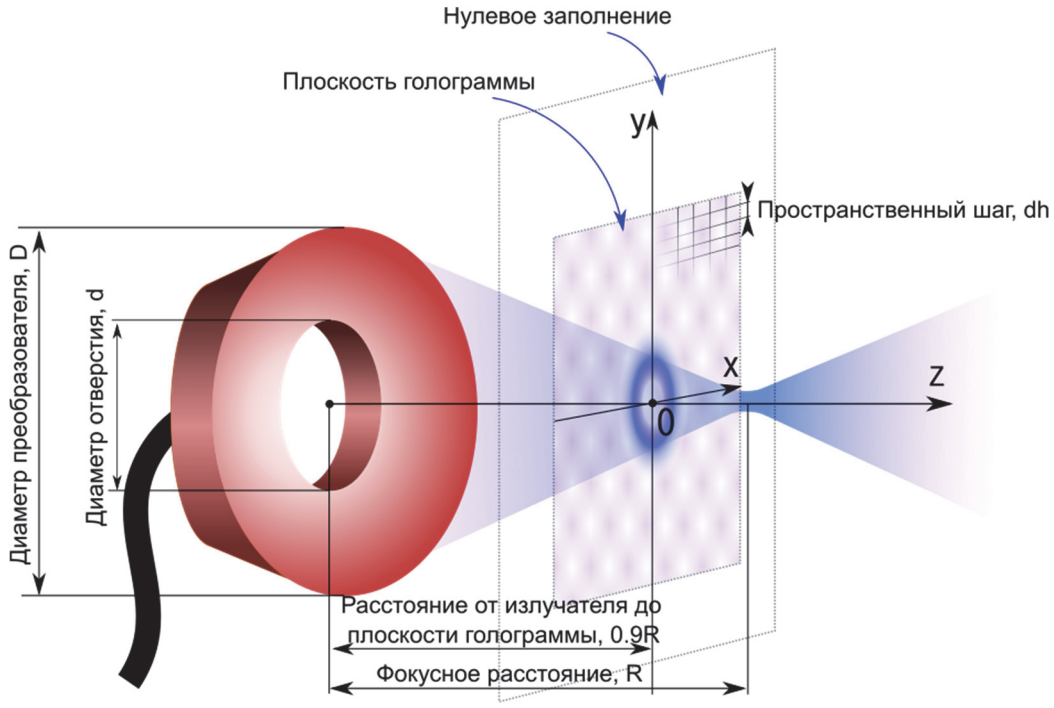


Рис. 2.3 Схематическое изображение плоскости расчета голограммы фокусирующего излучателя.

2) Загрузка голограммы произвольного акустического поля

Если в качестве источника поля необходимо использовать экспериментально измеренную голограмму [29, 30], то в программу напрямую загружается файл в формате .mat, который содержит таблицу из $N \times N$ элементов, представляющую распределение комплексной амплитуды давления в плоскости, перпендикулярной направлению распространения пучка. Плоскость голограммы (плоскость

сканирования) в идеальном случае неограниченного поперечного размера можно располагать на любом расстоянии от излучателя. Однако поскольку на практике поперечный размер голограммы ограничен размером области сканирования, для повышения точности описания трёхмерной структуры поля рекомендуется размещать плоскость голограммы между излучателем и фокусом, желательно ближе к тому месту, где предполагается вычислять радиационную силу (например, к фокусу). В отдельные окна добавляется информация о пространственном шаге в распределении комплексной амплитуды давления, плотности и скорости звука в среде, частоте звуковой волны. Каждой модели присваивается уникальное имя, и она загружается в базу данных. К ней будут привязываться все дальнейшие расчеты радиационной силы без необходимости подгружать модель заново при изменении параметров рассеивателей.

3) Задание параметров рассеивателя и расчет радиационной силы

Наряду с параметрами падающего акустического поля необходимо задать параметры рассеивателя. На отдельной вкладке программы предусмотрена таблица стандартных материалов с заданными плотностью, скоростями продольных и поперечных волн. Также есть возможность добавить в таблицу материал с любыми другими параметрами и задать ему свое уникальное имя.

Теперь, когда задана информация о поле и о материале рассеивателя, можно проводить расчет акустической радиационной силы. На вкладке с расчетами вводится имя модели поля, имя материала, задается радиус рассеивателя и задаются пространственные координаты, в которых необходимо выполнить расчет радиационной силы. В качестве точки отсчета по оси z задается пересечение с плоскостью голограммы, точки отсчета по x, y – центр этой голограммы.

Радиационную силу можно рассчитать вдоль одной из осей (одномерный случай) в некоторой плоскости (двумерный случай, рис. 2.4) или сразу в некоторой области пространства (трехмерный случай) в зависимости от того, какие координаты для позиции рассеивателя x, y и z будут заданы. Следует учитывать,

что в случае рассеивателя большого волнового размеры расчеты двумерного и, тем более, трёхмерного случаев могут потребовать больших компьютерных ресурсов.

2.1.5. Результаты расчета

После расчета акустической радиационной силы результаты выводятся в виде интерактивных графиков (рис. 2.4) и сохраняются на вкладке с моделями и результатами расчета. Также сохраняются все параметры поля и рассеивателя, а полученные значения компонент радиационной силы, нормированные на мощность звукового поля W и скорость звука в среде c, можно скачать в формате .txt. Нормировка радиационной силы необходима для тех случаев, когда доподлинно неизвестна амплитуда давления на поверхности излучателя, но было проведено измерение мощности источника, например, методом акустического взвешивания и известна его мощность. Нормирование производится по следующей формуле: $F_{norm} = Fc/W$. В работе [106] проведено сравнение результатов расчета предложенным методом с экспериментальными измерениями, показано хорошее соответствие.

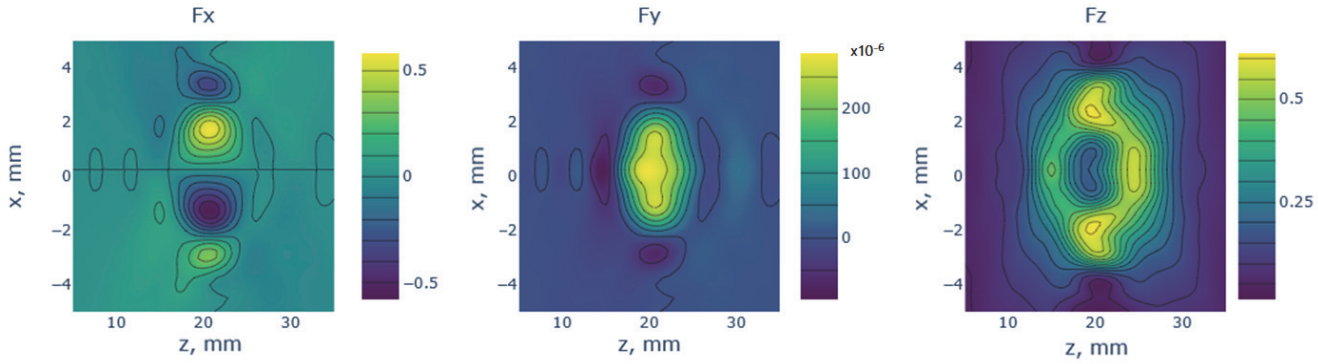


Рис. 2.4 Радиационная сила на плоскости *xz* в фокусе фокусирующего излучателя, действующая на нейлоновый сферический рассеиватель радиуса 3 мм. Отметим, что в силу симметрии задачи F_y должна быть равна нулю. Расчет показал, что F_y<0.0005, т.е. на 3 порядка меньше характерных значений F_x и F_z.

2.1.6. Выводы к первому параграфу

Разработан вычислительный алгоритм и создан соответствующий интерфейс сервиса для нахождения акустической радиационной силы, действующей со стороны произвольного акустического пучка на упругий сферический рассеиватель, в том числе большого волнового размера [101]. Преимуществами реализованного сервиса являются высокая точность расчёта силы благодаря использованию точного аналитического решения рассматриваемой задачи, а также удобный интерфейс, позволяющий делать расчеты для пользовательской голограммы акустического пучка. Данный сервис может найти широкое практическое применение, например, использоваться для моделирования акустических ловушек для объектов, размер которых существенно превышает длину волны.

§2.2 Моделирование и эксперимент по удерживанию рассеивателя большого волнового размера в акустическом поле многоэлементного излучателя

Интерес к созданию акустических ловушек обусловлен особенностями ультразвукового поля эффективно проникать на существенную глубину в жидкой среде, что зачастую недоступно для оптических и электромагнитных полей. Оказывается, что с помощью ультразвука можно манипулировать довольно крупными объектами: рассеиватель не обязательно должен быть меньше длины звуковой волны для удержания с помощью ультразвукового поля. Более того, для направленного воздействия на рассеиватель может быть использовано не только стоячее поле, но и ультразвуковой пучок, распространяющийся в открытое пространство [107]. Для удержания объектов с помощью бегущего пучка в основном используются многоэлементные преобразователи, в которых с помощью фазирования между элементами создается особая структура ультразвукового поля.

Во многих работах для удержания крупных рассеивателей используются закрученные пучки, когда фазовая задержка на излучающих элементах линейно

увеличивается вдоль окружности, создавая тем самым в фокальной плоскости кольцевое поле давления, которое может окружить и удержать в этой плоскости объект [108]. Другой способ удержания объектов возможен при конфигурации ультразвукового пучка в виде «бутылки» [109], когда элементы фокусирующего преобразователя на противоположных расстояниях от оси симметрии излучают со сдвигом фазы π. В экспериментах был продемонстрирован трехмерный захват полистироловых шариков в воде и воздухе, однако для рассеивателей большого волнового размера требуется иная структура поля, которая смогла бы эффективно компенсировать силу тяжести.

Для того, чтобы удерживать в некоторой области пространства довольно крупный рассеиватель, предлагается создать структуру звукового поля в виде «чаши», в центре которой амплитуда акустического давления имеет минимум, а по краям – максимум. Характерная частота ультразвукового пучка предполагается равной 2 МГц, тогда как характерные размеры рассеивателя могут достигать нескольких миллиметров в радиусе, поэтому зона акустической ловушки должна быть достаточно широкой [110, 111]. В такой постановке задачи возникла идея сформировать стены «чаши» акустической ловушки с помощью каустики, подобрав правильную фазу сигнала для каждого элемента излучателя. В работе [112] было показано, что такая сферическая каустика возникает при излучении одноэлементного сферического фокусирующего преобразователя: в пьезоэлектрической пластине возникают бегущие волны Лэмба, которые создают фазовую модуляцию от центра пластины к краю. Аналогичного эффекта можно добиться в случае многоэлементного сферического излучателя, задав на элементах фазу, линейно зависящую от полярного угла. В таком случае акустические лучи будут отходить от поверхности излучателя под некоторым постоянным углом, образуя тем самым каустику в виде участка сферической чаши. Такая форма каустики удобна тем, что в перспективе ее можно использовать для устойчивого удержания большого рассеивателя в пространстве, так как сила тяжести может быть скомпенсирована акустической радиационной силой, а форма каустики не

позволит рассеивателю отклониться от положения равновесия. Такая форма акустической ловушки была исследована численно и экспериментально.

2.2.1. Расчет акустической ловушки для рассеивателя большого волнового размера

Для проверки возможности создания «чашеобразной» каустики было проведено моделирование методом конечных элементов в пакете COMSOL. Была задана аксиальная симметрия пространства, моделировалась каустика радиуса 1 см при частоте акустической волны 2 МГц в воде; края расчетной области были ограничены поглощающим слоем PML, чтобы избежать отражений от границ вычислительной среды (рис. 2.5 а).

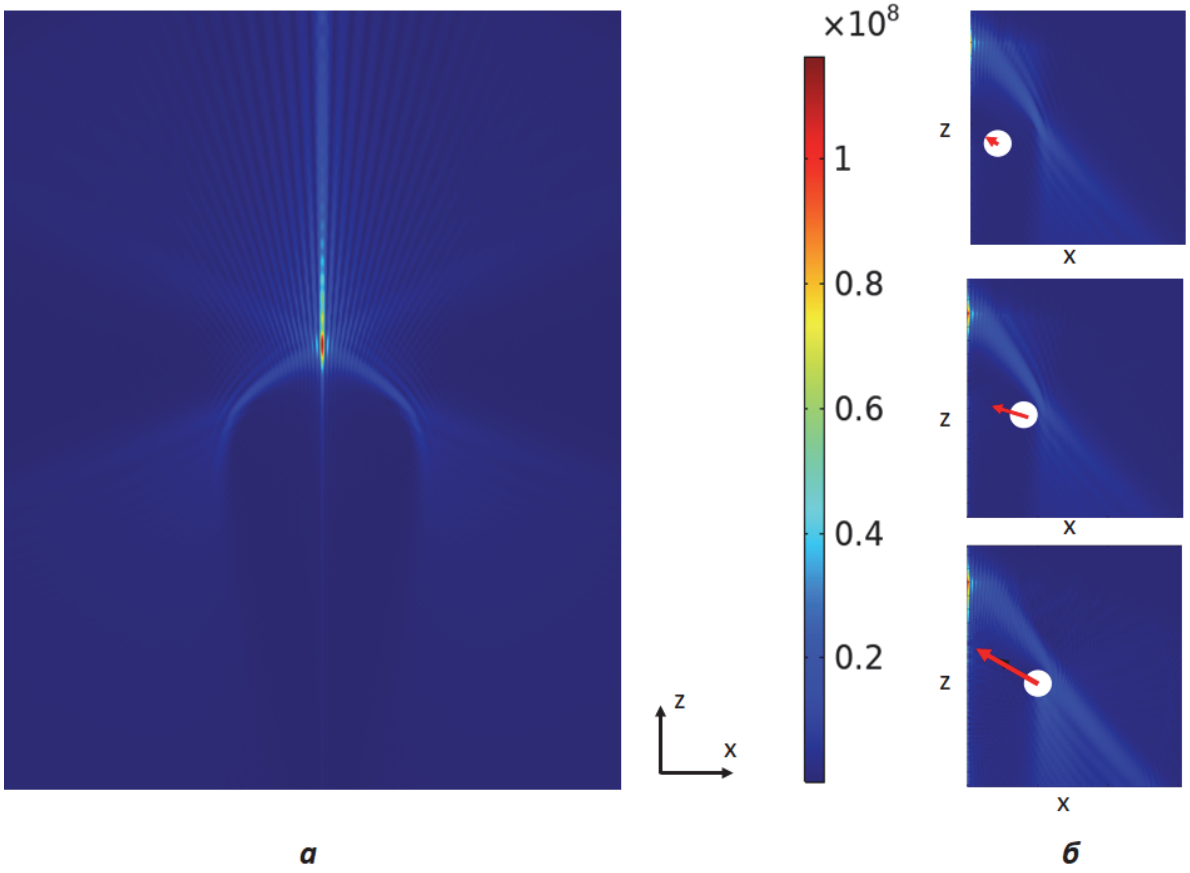


Рис. 2.5 (а) Поле акустического давления в случае, если излучающая поверхность излучает с линейным сдвигом по фазе в зависимости от полярного угла; (б) рассеиватель на разном расстоянии от оси, стрелкой показано направление акустической радиационной силы, длина стрелки пропорциональна амплитуде силы.

Также был сделан расчет акустической радиационной силы, величина которой оценивалась как средний поток импульса через замкнутую поверхность, окружающую сферический рассеиватель. Параметры рассеивателя были заданы следующими: плотность ρ_{sc} = 2040 кг/м^3, скорости продольных и поперечных волн c_l = 4540 м/с и c_t = 2130 м/с, что соответствует параметрам стекла, диаметр рассеивателя 3 мм. Расчеты показали, что, во-первых, линейная зависимость фазы излучения от полярного угла действительно создает каустику в форме чаши заданного радиуса, во-вторых, действие акустической радиационной силы направлено к оси излучателя, а амплитуда возрастает при приближении к каустике (рис. 2.5 б).

2.2.2. Расчет акустической радиационной силы

С помощью многоэлементного излучателя можно создать такую конфигурацию поля, которая будет удерживать рассеиватели в горизонтальной плоскости. Для того, чтобы создать в эксперименте требуемый фазовый фронт, был использован метод фазировки многоэлементного излучателя. Для задания акустической ловушки шириной 1 см был произведен расчет фазы для элементов существующего кольцевого многоэлементного излучателя, состоящего из 12 колец с минимальным радиусом 2 см и максимальным радиусом 5 см. Кольца являются участками сферической поверхности с радиусом кривизны 7 см. На рис. 2.6 а показано распределение фазы излучаемого сигнала на каждом элементе преобразователя, а на рис. 2.6б – структура результирующего поля, рассчитанная с помощью интеграла Рэлея для излучения ультразвукового пучка частоты 2 МГц в воду. Был сделан расчет комплексной амплитуды акустического давления в плоскости, перпендикулярной направлению распространения пучка (рис. 2.6в), затем с помощью полученного распределения давления была рассчитана акустическая радиационная сила, действующая на рассеиватель, находящийся в плоскости голограммы на расстоянии 5.5 см от поверхности излучателя, и смещающийся вдоль оси *x* на расстояния от -1 до 1 см.

Параметры рассеивателя были заданы такими же, как в пункте *2.2.1*: диаметр 3 мм, физические характеристики соответствовали материалу стека.

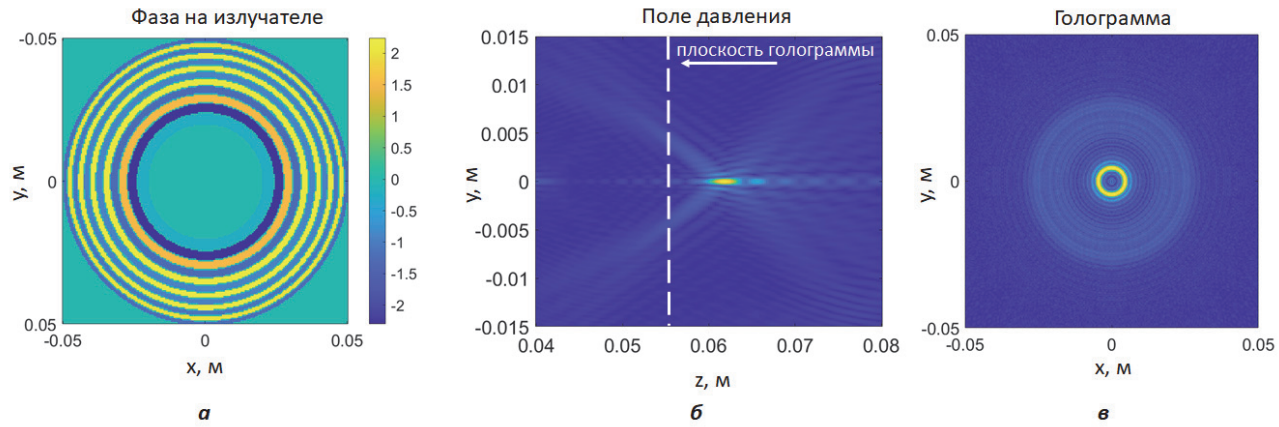


Рис. 2.6 (а) Фаза в радианах на элементах излучателя; (б) результирующая амплитуда акустического давления, линия обозначает плоскость, на которой производился расчет голограммы, (в) голограмма – амплитуда давления в плоскости, перпендикулярной направлению распространения пучка

Чтобы убедиться, что заданное поле является акустической ловушкой, нужно рассчитать акустическую радиационную силу, действующую на помещенный в область этой ловушки рассеиватель. Для этого использовался реализованный сервис с графическим интерфейсом, позволяющий рассчитывать акустическую радиационную силу предложенным выше методом исходя из голограммы звукового пучка и параметров рассеивателя. Все нормированные на скорость звука c и акустическую мощность W компоненты радиационной силы выводятся на экран в виде интерактивных графиков. Как видно из результатов расчета (рис. 2.7 а), x-компонента акустической радиационной силы отрицательна при смещении рассеивателя в положительном направлении оси x, и наоборот, при смещении в отрицательном направлении оси x-компоненты силы оказывается положительной. Это говорит о том, что рассеиватель будет удерживаться у оси симметрии пучка. Таким образом, с помощью созданного программного обеспечения показано, что данная конфигурация акустического поля позволяет удерживать рассеиватель большого волнового размера в горизонтальном направлении.

2.2.3. Экспериментальная проверка результатов расчета

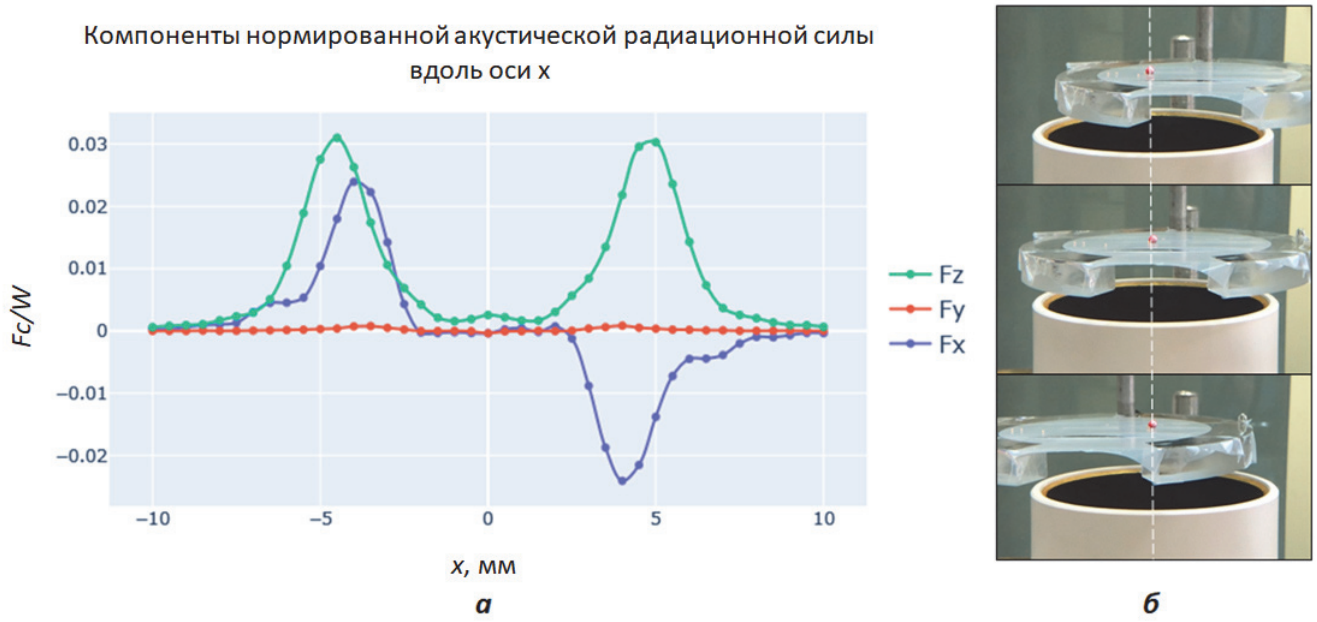


Рис. 2.7 (а) Результаты расчета компонент радиационной силы в созданном сервисе с графическим интерфейсом вдоль оси x на расстоянии 5.5 см от поверхности излучателя, (б) экспериментальная демонстрация удержания шарика в горизонтальной плоскости с помощью описанной выше конфигурации акустического поля.

Для проверки возможности манипулирования объектом большого волнового размера с помощью данной конфигурации ультразвукового поля был проведен эксперимент. В качестве объекта манипулирования была выбрана стеклянный шарик диаметра 3 мм, а многоэлементный кольцевой излучатель фазировался в соответствии с расчетом (рис. 2.6 а). В бассейн с дегазированой водой вертикально помещался излучатель, над ним крепилась рамка с натянутой тонкой акустически прозрачной пленкой. На пленке помещался свободно лежащий шарик. При излучении ультразвуковой волны на частоте 2 МГц шарик начинал удерживаться пучком: при перемещении рамки в горизонтальном направлении он оставался на месте (рис. 2.7 б).

§2.3 Выводы ко второй главе

Разработан сервис с графическим интерфейсом, позволяющий рассчитывать акустическую радиационную силу, действующую на упругий сферический

рассеиватель произвольного размера со стороны произвольного акустического пучка [101]. Была проведена оценка точности используемого метода расчета, найдено оптимальное количество итерационных членов для точной и быстрой работы алгоритма. Показано, что при определенной конфигурации ультразвукового поля, например, когда фазовый сдвиг элементов сферического излучателя линейно зависит от полярного угла, объект большого волнового размера может удерживаться в горизонтальном направлении. Экспериментально показано, что данной конфигурацией поля, созданной с помощью многоэлементного фокусирующего излучателя, действительно можно удерживать и перемещать рассеиватели, размер которых намного превышает длину волны.

Глава 3
БИОФАБРИКАЦИЯ В ПОЛЕ ПОСТОЯННОГО МАГНИТА

Феномен магнитной левитации – удержания без опоры или подвеса объектов с помощью только лишь магнитного поля – активно используется для изучения и манипулирования биологическими объектами. Было показано, что постоянное магнитное поле способно удерживать на весу как достаточно крупные объекты, например, насекомых или лягушек [113], так и единичные клетки [114]. Механизм действия магнитофоретической силы, компенсирующей силы гравитации, основан на разности диамагнитных восприимчивостей левитируемого объекта и среды, в которой он находится, и наличии градиента магнитного поля. В случае, если в некоторой области пространства наблюдается минимум потенциала магнитофоретической силы, можно говорить о магнитной ловушке, в которой будут устойчиво удерживаться частицы.

Недавно был разработан новый подход к биофабрикации органных конгломератов с использованием магнитной ловушки, когда тканевые сфероиды левитируют и притягиваются друг к другу, образуя единый тканевый конгломерат [85, 86]. Использование левитационной сборки в поле постоянного магнита является хорошим способом биофабрикации, так как обеспечивает постоянный доступ питательных веществ к сфероидам, возможность контроля температуры и концентрации CO_2, а также отсутствие контакта с карскасами. Работы по левитационной сборке в магнитном поле сфероидов из клеток хондроцитов овцы показали, что в результате слияния получается жизнеспособный органный конгломерат [86].

Одним из ограничений метода магнитной левитационной биофабрикации является необходимость использования раствора парамагнетика гадолиния (Gd^{3+}) для создания разности магнитных проницаемостей сфероидов или керамических гранул и окружающей среды. Увеличение концентрации гадолиния в среде ускоряет сборку частиц и эффективнее компенсирует силу тяжести, но оказывает более токсическое воздействие на живые клетки [86]. Поэтому интересной кажется

возможность биофабрикации в условиях невесомости, например, на Международной космической станции (МКС), где возможно существенно уменьшить концентрацию парамагнетика.

Ниже будет рассмотрен подход по магнитной биофабрикации в поле постоянных магнитов на примере тканевых сфероидов и гранул ТКФ. В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A4, A5].

§3.1 **Биофабрикация в магнитном поле постоянного магнита**

Магнитофорез – это индуцированное движение немагнитных частиц, взвешенных в среде с отличающейся магнитной восприимчивостью, которое возникает под действием градиента магнитного поля. На сферический объект, который находится в некоторой среде в магнитном поле, помимо гравитационной силы начинает действовать магнитофоретическая сила $\mathbf{F}_\mathrm{m}$, которая зависит от градиента плотности энергии магнитного поля $\nabla(\mathbf{H}^2)$, радиуса левитируемого объекта r и соотношения между магнитными проницаемостями объекта μ_p и окружающей этой объект среды μ_f [115]:

$$\mathbf{F}_\mathrm{m} = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \, \nabla(\mathbf{H}^2), \tag{3.1}$$

где $K = \frac{\mu_p - \mu_f}{\mu_p + 2\mu_f}$, $\mu_0 \approx 1.2566$ Гн/м в системе СИ – магнитная постоянная. Из этой формулы видно, какие факторы важны для увеличения магнитной силы, чтобы она могла компенсировать силу тяжести. С одной стороны, необходима существенная разность магнитных проницаемостей объекта и окружающей его среды. Этого можно достичь, добавив в жидкую среду соли парамагнетика Gd^{3+}. Также необходим большой градиент плотности энергии магнитного поля.

3.1.1. Экспериментальная установка

Для того, чтобы собрать вместе ансамбль частиц, необходим градиент квадрата напряжённости магнитного поля сразу в трех направлениях, причем вертикальный градиент компенсируется силой тяжести, что позволяет частицам

находиться в состоянии левитации, а в горизонтальной плоскости магнитное поле должно иметь минимум потенциала, чтобы частицы могли притягиваться друг к другу. Такой структуры магнитного поля можно достичь, соединив вместе южными полюсами два мощных кольцевых неодимовых магнита (рис. 3.1 а). Подобного вида магнитная установка была предложена в работе [116], когда с помощью двух кольцевых электромагнитов с максимальной индукцией 2.1 Тл, расположенных напротив друг друга навстречу одинаковыми полюсами, левитировали различные виды полимерных частиц.

В нашем эксперименте были использованы кольцевые неодимовые (NdFeB) магниты марки N38 с максимальной индукцией магнитного поля 1.21 Тл. Магниты были соединенные вместе южными полюсами, ориентация магнитов показана на рис. 3.1 а. Диаметр магнитов составлял 8.5 см, диаметр внутреннего отверстия – 2 см, а длина каждого кольцевого магнита – 2.4 см. Сбоку было сделано цилиндрическое отверстие для наблюдения за процессом сборки, а кювета со сфероидами помещалась вдоль оси магнитов. Вблизи плоскости соприкосновения магнитов будет достигаться максимум градиента магнитного поля, и в области отверстия будет находиться магнитная ловушка (рис. 3.1 б).

Для левитации и сборки гранул кальций фосфата в буфере (жидкости, в который помещались гранулы), было растворено необходимое для левитации количество Gd^{3+}. Экспериментально была определена необходимая для левитации тканевых сфероидов концентрация парамагнетика в питательном растворе. Раствор получался следующим образом: 3 мл 1-молярного раствора препарата Гадовист были высушены и добавлены в 1 мл буфера. Таким образом был получен 3-молярный (3 М = 3 моль/л) раствор Gd^{3+}, что соответствовало магнитной проницаемости $\mu_f = 1.0035$ (СИ) [117, 118]. Вязкость раствора была оценена экспериментально методом Стокса и составила 0.01 Па·с, плотность составила 1550 кг/м^3.

Гранулы фосфата кальция, использованные в эксперименте, имели преимущественно сферическую форму и составляли в диаметре 250−500 микрон. Хотя сплошной материал фосфата кальция имеет плотность 2800 кг/м^3,

фактическая плотность гранул могла оказаться несколько ниже, т.к. они имеют поры, заполненные воздухом.

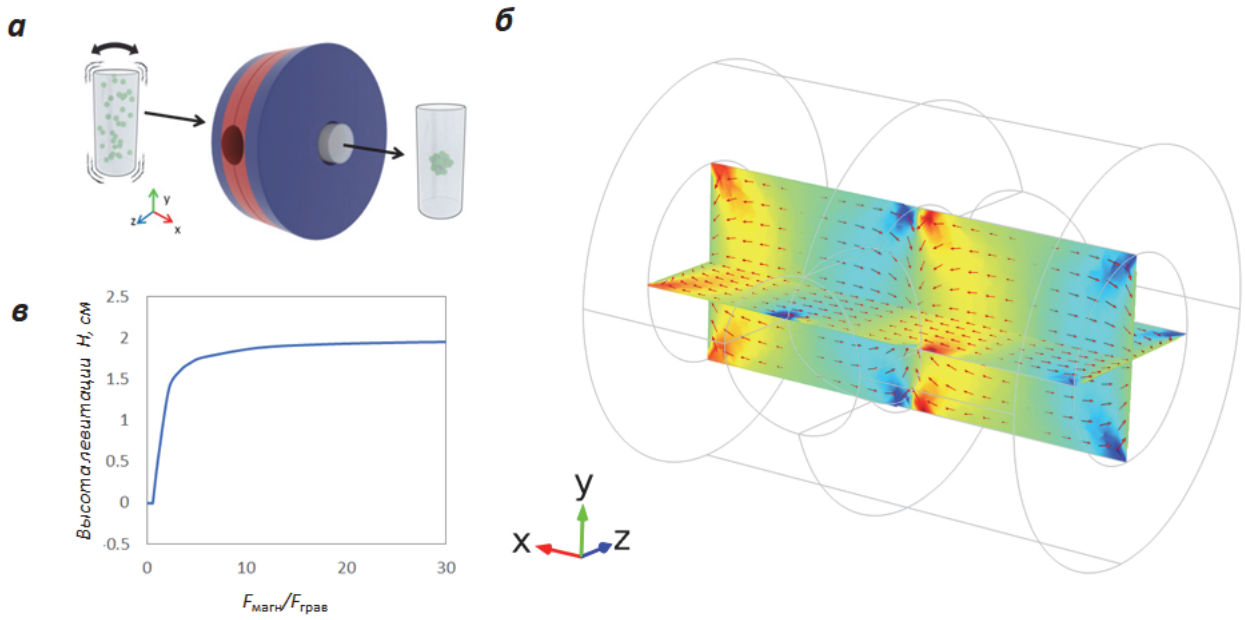


Рис. 3.1 (а) Схема магнитной установки с боковым отверстием для наблюдения; (б) магнитофоретическая сила, действующая на гранулы ТКФ, стрелками показано направление силы; (в) зависимость высоты левитации частиц от соотношения между магнитофоретической и гравитационной силами относительно нижнего края рабочей зоны, асимптота графика соответствует оси симметрии магнитных колец.

3.1.2. Численное моделирование

Для проведения экспериментов по биофабрикации конгломератов из керамических гранул ТКФ необходимо оценить концентрацию парамагнетика для возможности левитации, а также время, которое будет затрачено на сборку. Для этого с помощью метода конечных элементов в вычислительном пакете COMSOL в модуле «AC/DC – Magnetic Fields» было рассчитано магнитное поле от двух постоянных магнитов [97]. Была построена 3D модель магнитов, в рабочей зоне внутри была рассчитано магнитное поле, а также поле магнитофоретической силы, действующей на гранулы ТКФ, помещенные в раствор Gd^{3+} (рис. 3.1 б). Магнитная установка обеспечивает левитацию частиц на разную высоту в зависимости от соотношения силы магнитофореза и силы тяжести, которое регулируется концентрацией парамагнитной соли в среде (рис. 3.1 в). Максимальная величина

вертикальной компоненты магнитофоретической силы достигается в центре установки, однако из-за тяжести гранул для эффективной левитации требуется многократное превышение над силой гравитации.

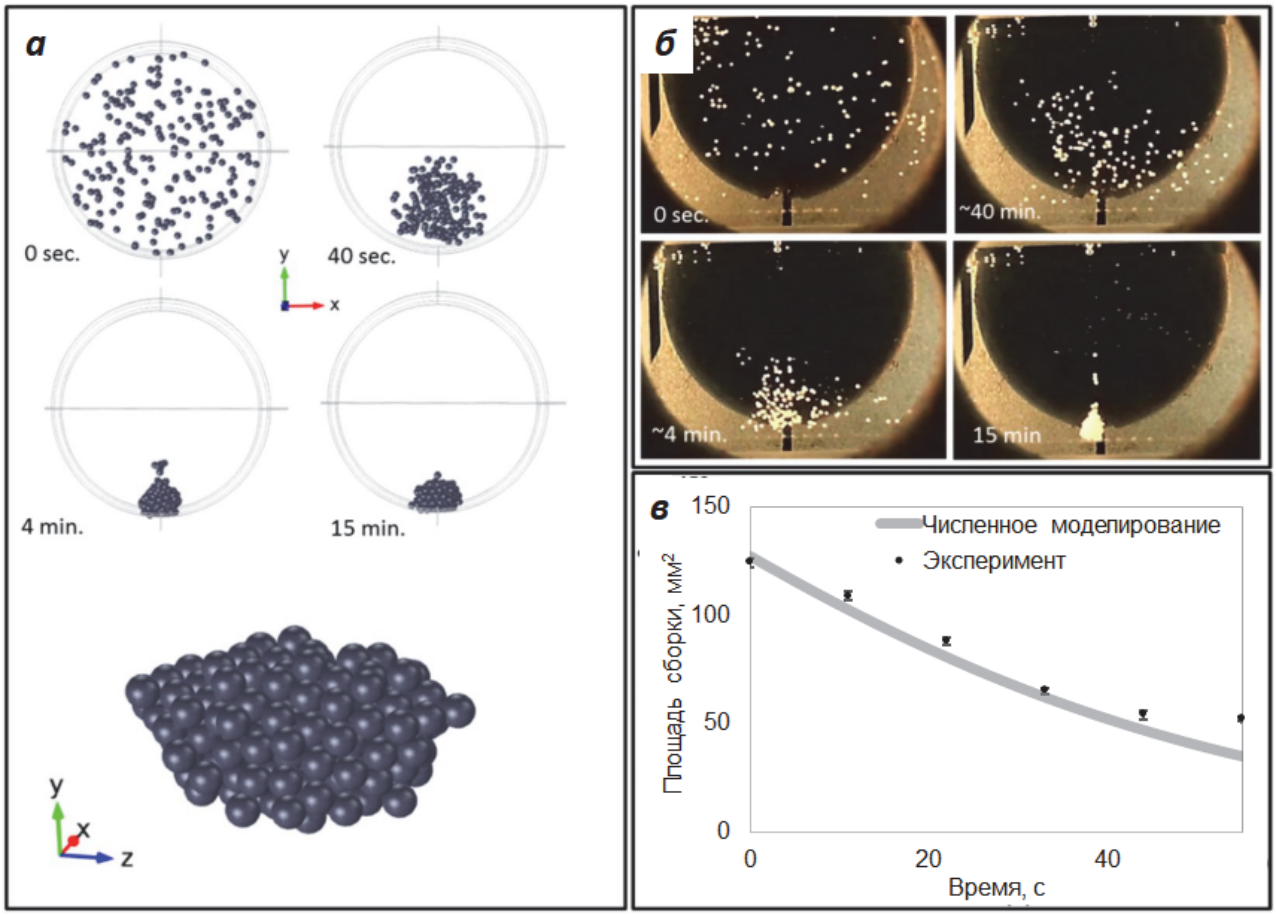


Рис. 3.2. (а) Численный расчет и (б) эксперимент по сборке гранул фосфата кальция в магнитном поле; (в) зависимость площади сборки от времени – сравнение результатов компьютерного моделирования и экспериментальных данных.

Для оценки времени сборки гранул ТКФ в магнитном поле был использован модуль «Particle Tracing Module» вычислительного пакета COMSOL. В рассчитанном магнитном поле были размещены в различных начальных позициях 400 сферических частиц диаметром 500 микрон; свойства частиц и окружающей среды были заданы в соответствии с параметрами гранул ТКФ и буфера. Так как измерить магнитную проницаемость гранул экспериментально не представлялось возможным, для моделирования она была выбрана в соответствии с параметрами кости, равной $\mu_p = 0.999962$ (СИ) [119]. Рассчитывались траектории частиц под действием магнитофоретической силы, силы тяжести, силы Архимеда и силы

вязкого сопротивления в соответствии с законом Стокса (который хорошо выполняется ввиду медленности движения частиц).

Результаты расчета показали, что динамика сборки гранул ТКФ хорошо описывается компьютерной моделью: верно оценивается положение и форма сборки для заданных параметров расчета – левитация происходит вблизи нижнего края рабочей зоны внутри отверстия в магнитах (рис. 3.2 а, б). Численная модель позволяет также оценить и зависимость площади сечения ансамбля частиц в зависимости от времени (рис. 3.2 в).

§3.2 **Биофабрикация в условиях невесомости**

Сила тяжести оказывает существенное влияние на процесс сборки – из-за реального разброса размеров и физических свойств керамических гранул или сфероидов сборка происходит с неоднородной в пространстве скоростью, поэтому форма результирующего конгломерата может оказаться вытянутой и сильно несимметричной; также наличие силы тяжести подразумевает высокие концентрации парамагнетика Gd^{3+}, которые при длительном контакте со сфероидами оказывают токсическое воздействие на живые клетки. Для проверки возможности осуществления биофабрикации в условиях невесомости, был подготовлен эксперимент по сборке тканевых сфероидов в магнитном поле на Международной космической станции (МКС).

Эксперимент по сборке тканевых сфероидов на Российском сегменте Международной космической станции был проведен лабораторией 3Д Биопринтинг Солюшенс совместно с госкорпорацией «Роскосмос». Для осуществления эксперимента был сконструирован магнитный биопринтер Орган.Авт, который был доставлен на борт космической станции 3 декабря 2018 г. Спустя сутки, 4 декабря 2018 г. космонавт Олег Дмитриевич Кононенко провел эксперимент по биофабрикации органных формирований хряща и щитовидной железы. Вклад автора диссертации в данную работу состоял в численном расчете

динамики сборки частиц в условиях эксперимента и оценке влияния значимых параметров на скорость сборки.

3.2.1. Схема эксперимента по биофабрикации на МКС

Эксперимент состоял из нескольких последовательных действий. В лаборатории в нормальных условиях 180 тканевых сфероидов диаметром порядка 300 микрон, состоящих из человеческих хондроцитов, были помещены в герметичную кювету с термочувствительным гидрогелем Мебиол.

Выгодная особенность указанного гидрогеля состоит в том, что его вязкость увеличивается с ростом температуры, поэтому без специального охлаждения случайным образом распределенные в кювете сфероиды не могли сливаться друг с другом. Затем кюветы со сфероидами и магнитная установка были доставлены на Российский сегмент МКС на космическом корабле «Союз-МС-11».

В качестве источника магнитного поля использовалась конфигурация из кольцевых магнитов, описанная в параграфе 3.1 (рис. 3.3 а). В магнитную установку помещалась кювета со сфероидами, затем в кювету впрыскивался раствор с парамагнетиком гадобутролом, и вся установка помещалась в температурную камеру с температурой 17°C на 90 минут. Для оценки возможности биофабрикации при разных концентрациях были проведены эксперименты с растворами гадолиния 50, 10 и 0.8 мМ (мМ=ммоль/л). Термочувствительный гидрогель разжижался и перемешивался с парамагнетиком, в результате чего на сфероиды начинала действовать магнитофоретическая сила, собирающая их вместе. После предполагаемой сборки частиц вместе установка помещалась в термостат с температурой 37°C на двое суток для полного слияния сфероидов друг с другом, при этом гидрогель уже достаточно вязкий и не позволяет им распасться. По истечении этого времени в кювету впрыскивался 4% раствор формалина для фиксации тканевого конгломерата, кюветы хранились в течение двух недель при комнатной температуре и затем были доставлены обратно на Землю в лабораторные условия.

3.2.2. Компьютерное моделирование сборки сфероидов в условиях невесомости

Для анализа процесса сборки сфероидов в магнитном поле в условиях невесомости было проведено численное моделирование. Сначала методом конечных элементов было рассчитано магнитное поле в рабочей зоне (рис. 3.3 б). Затем, в соответствии с параметрами эксперимента, были заданы физические характеристики сфероидов и окружающей их среды: магнитная проницаемость сфероидов была принята равной магнитной проницаемости воды $\mu_f = 0.999991$ (в системе СИ), плотность сфероидов хрящевой ткани 1050 кг/м^3, диаметр 200 мкм [94]. Вязкость среды рассматривалась при трех температурных режимах: 8°, 17° и 37° С, что соответствовало значениям динамической вязкости 0.0155, 0.0474, и 2.49 Па·с, соответственно. Вязкость геля при разных температурах измерялась экспериментально с помощью лабораторного вискозиметра. Концентрациям Gd^{3+} в среде 50, 10 и 0.8 мМ соответствовала магнитная проницаемость 1.000050, 1.0000027 и 0.999992 (СИ), соответственно, рассчитанная в соответствии с методом, указанным в работе [117]. В начальный момент в области воздействия задавалось 200 случайно распределённых в пространстве сфероидов. Методом градиентного спуска были рассчитаны траектории их движения и восстановлена динамика сборки сфероидов под воздействием силы вязкого трения и магнитофоретической силы, (рис. 3.3 в). Как видно из результатов моделирования, сфероиды собираются вместе ровно в центре магнитной установки, напротив отверстия для наблюдения.

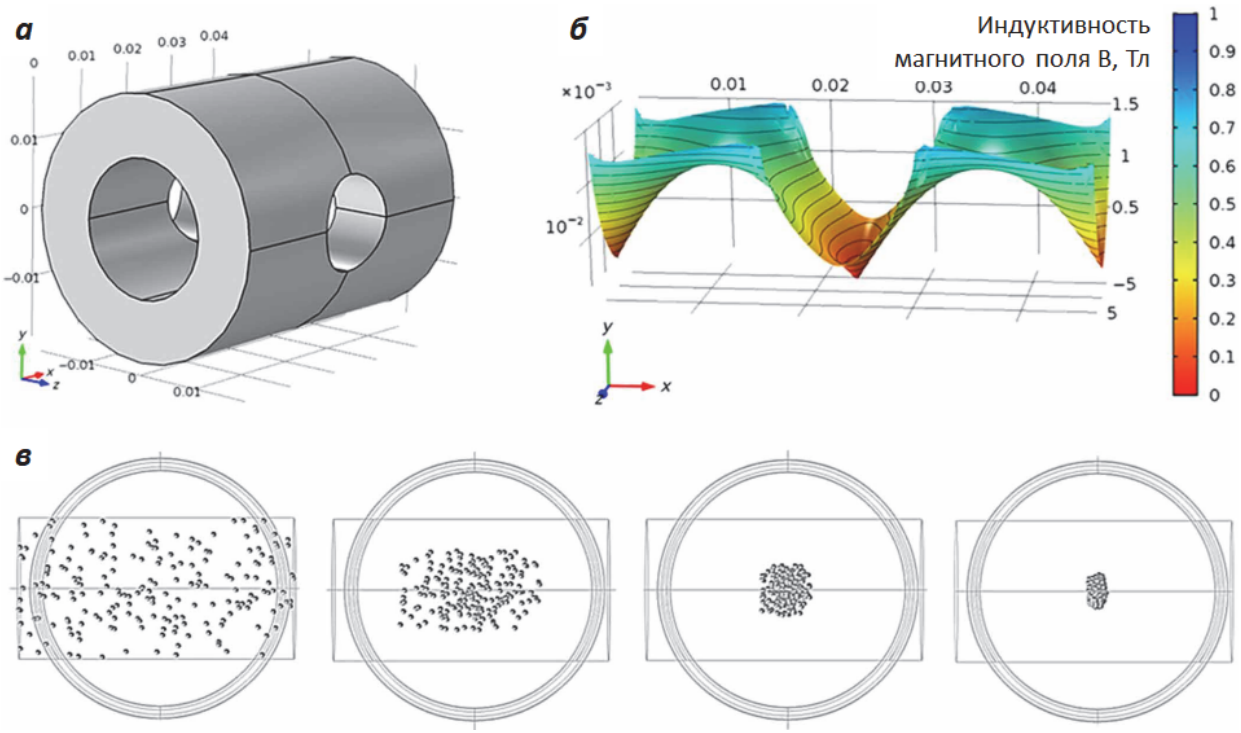


Рис. 3.3. (а) Схема магнитной установки, состоящей из двух кольцевых магнитов, ориентированных одинаковыми полюсами друг к другу, с отверстием для наблюдения; (б) рассчитанное методом конечных элементов поле внутри магнитов на плоскости xz, цветом и координатой вдоль оси y показала амплитуда индукции магнитного поля, минимум наблюдается в центре поля; (в) моделирование динамики сборки сфероидов внутри магнитной установки, вид через отверстие для наблюдения.

3.2.3. Влияние вязкости среды и концентрации парамагнетика на скорость сборки

Условия эксперимента подразумевали жесткие ограничения по времени: на процесс сборки сфероидов отводилось всего 90 минут, при этом желательно было проверить возможность биофабрикации при разных концентрациях парамагнетика. Скорость сборки сфероидов напрямую зависит как от разности магнитных проницаемостей среды и сфероидов, так и от вязкости среды, определяющейся температурным режимом. Поэтому, зная распределение магнитного поля в рабочей зоне, можно было аналитически оценить время сборки и установить его зависимость от значимых параметров.

Рассматриваемая конструкция магнитов состояло из двух соединенных одноименными полюсами постоянных кольцевых магнитов ширины $L = 25$ мм. В

центре конструкции перпендикулярно оси колец имелось цилиндрическое отверстие для наблюдения за экспериментом. Расположение магнитов относительно осей координат показано на рис. 3.3 а. Внутрь конструкции вдоль оси x помещалась кювета с парамагнитной средой и диамагнитными тканевыми сфероидами. В отсутствие сил тяжести на них действовала магнитофоретическая сила, собирающая частицы в центре конструкции, и сопровождающая движение сила вязкого трения.

Для того, чтобы магнитная сила действовала на частицы в направлении к центру ловушки, необходима соответствующая структура магнитного поля. Так как направление магнитной силы зависит от градиента квадрата напряжённости магнитного поля, в центре конструкции во всех трех направлениях должен реализовываться его минимум, в частности, может наблюдаться минимум всех трех пространственных компонент напряженности H_x, H_y и H_z. В данном случае это условие выполняется: проекции магнитного поля $\boldsymbol{H}$ на соответствующую ось показаны на рис. 3.4 а. В силу симметрии конструкции остальные проекции на центральные оси равны нулю. Напряженность магнитного поля определяется только параметрами магнитов.

Как отмечалось выше, изначально частицы в кювете были расположены хаотично. Требуется понять, какие параметры влияют на скорость сближения частиц и определить порядок времени, за которое произойдет сборка конгломерата.

На движущиеся в жидкости частицы действует сила вязкого трения. Ввиду малости скоростей движения и соответствующих чисел Рейнольдса, вязкое сопротивление среды при движении сферической частицы может быть описано законом Стокса:

$$\boldsymbol{F}_{st} = -6\pi r\eta\boldsymbol{v}, \tag{3.2}$$

где r – радиус частицы, $\boldsymbol{v}$ – ее скорость, η – динамическая вязкость жидкости. Также на частицы действует магнитофоретическая сила в соответствии с выражением (3.1).

Для упрощения задачи рассмотрим движение частицы вдоль оси x на оси симметрии кольцевых магнитов. На частицу в силу симметрии конструкции будет

действовать только x- компонента магнитофоретической силы $F_{mx} = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \frac{\partial(H_x^2+H_y^2+H_z^2)}{\partial x} = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K \frac{\partial H_x^2}{\partial x}$ (на оси симметрии H_y и H_z равны нулю), и сила Стокса $F_{st} = 6\pi r\eta \frac{dx}{dt}$. Зная все силы, действующие на частицу, можно попытаться оценить ее динамику, скорость и время движения к области магнитной ловушки.

Так как распределение x- компоненты магнитного поля H_x от координаты хорошо описывается гармонической функцией $H_x = H_{max} \sin\frac{\pi x}{L}$, то магнитную силу можно представить в таком виде: $F_{mx} = f_m \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right)$, где $f_m = 2\pi r^3 \mu_0 \mu_f K H_{max}^2$. Запишем уравнение баланса сил:

$$(m + m_{ad})\ddot{x} + 6\pi r\eta\dot{x} + f_m \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right) = 0, \tag{3.3}$$

где m_{ad} – добавочная (присоединённая) масса, увлекаемая сферической частицей массы m в жидкости. Так как движение частиц очень медленное, то членом $(m + m_{ad})\ddot{x}$ по сравнению с остальными членами можно пренебречь. Тогда уравнение сводится к виду:

$$6\pi r\eta\dot{x} = -f_m \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right). \tag{3.4}$$

Разделяя переменные и интегрируя, получаем следующее соотношение:

$$\frac{1}{2}\ln\left|\frac{1-\cos\left(\frac{2\pi x}{L}\right)}{1+\cos\left(\frac{2\pi x}{L}\right)}\right| = -\frac{2f_m}{3\eta rL}t + const, \tag{3.5}$$

где t это время. Отсюда следует:

$$\frac{1-\cos\left(\frac{2\pi x}{L}\right)}{1+\cos\left(\frac{2\pi x}{L}\right)} = E \cdot \exp\left(-\frac{2f_m}{3\eta rL}t\right), \qquad E = const, \tag{3.6}$$

$$x(t) = \frac{L}{2\pi}\arccos\left(\frac{1-Ee^{-\delta t}}{1+Ee^{-\delta t}}\right), \tag{3.7}$$

где $\delta = 2f_m/3\eta rL$ – параметр, определяющий время сборки. Полученное уравнение (3.7) описывает движение частицы в заданном поле. Константа E, возникающая при интегрировании, определяется начальными условиями частицы:

$$x|_{t=0} \equiv x_0 \to E = \frac{1-\cos\left(\frac{2\pi x_0}{L}\right)}{1+\cos\left(\frac{2\pi x_0}{L}\right)}. \quad (3.8)$$

Скорость частицы v можно определить, продифференцировав найденную зависимость координаты от времени (6):

$$v(t) = -\frac{L\delta\sqrt{E}\,e^{-\delta t}}{1+Ee^{-\delta t}}. \quad (3.9)$$

Как видно из полученного соотношения, начальная скорость частицы оказалась ненулевой:

$$v_0 = v|_{t=0} = -\frac{L\delta}{4\pi}\sin\left(\frac{2\pi x_0}{L}\right). \quad (3.10)$$

Этот на первый взгляд парадоксальный результат объясняется тем, что в рассматриваемом приближении в уравнении движения (3.3) был отброшен инерционный член $(m+m_{ad})\ddot{x}$. В реальности скорость устанавливается не мгновенно, а за конечное (малое) время, после чего движение замедляется и следует формулам (3.7) и (3.9).

Для верификации аналитических формул (3.9, 3.10) было проведено компьютерное моделирование динамики сборки частиц в вязкой жидкости под действием магнитного поля. Различия в магнитной восприимчивости частиц и жидкости варьировались, в то время как другие параметры системы оставались постоянными. В качестве начального положения частиц было выбрано $x_0 = L/4$, что соответствует $E = 1$. В этом случае выражение для зависимости координаты от времени упрощается:

$$x(t) = \frac{L}{2\pi}\arccos\left(\tanh\frac{\delta t}{2}\right), \quad (3.11)$$

$$v(t) = -\frac{L\delta e^{-\delta t}}{1+e^{-\delta t}}, \quad (3.12)$$

$$v_0 = -\frac{L\delta}{4\pi}. \quad (3.13)$$

Было проведено сравнение результатов аналитического и компьютерного расчетов начальной скорости частицы v_0 в зависимости от разности магнитных проницаемостей среды и частицы. На рис. 3.4 б показано сравнение расчетной

(точки) и теоретической (линия) начальной скорости. В целом имеется хорошее согласие между теорией и моделированием, а различие скоростей и при наиболее существенном различии магнитных проницаемостей объясняется тем, что при увеличении скорости движения член $(m + m_{ad})\ddot{x}$ из уравнения (3.3) перестает быть пренебрежимо малым, и динамика движения частиц выходит за рамки принятого приближения.

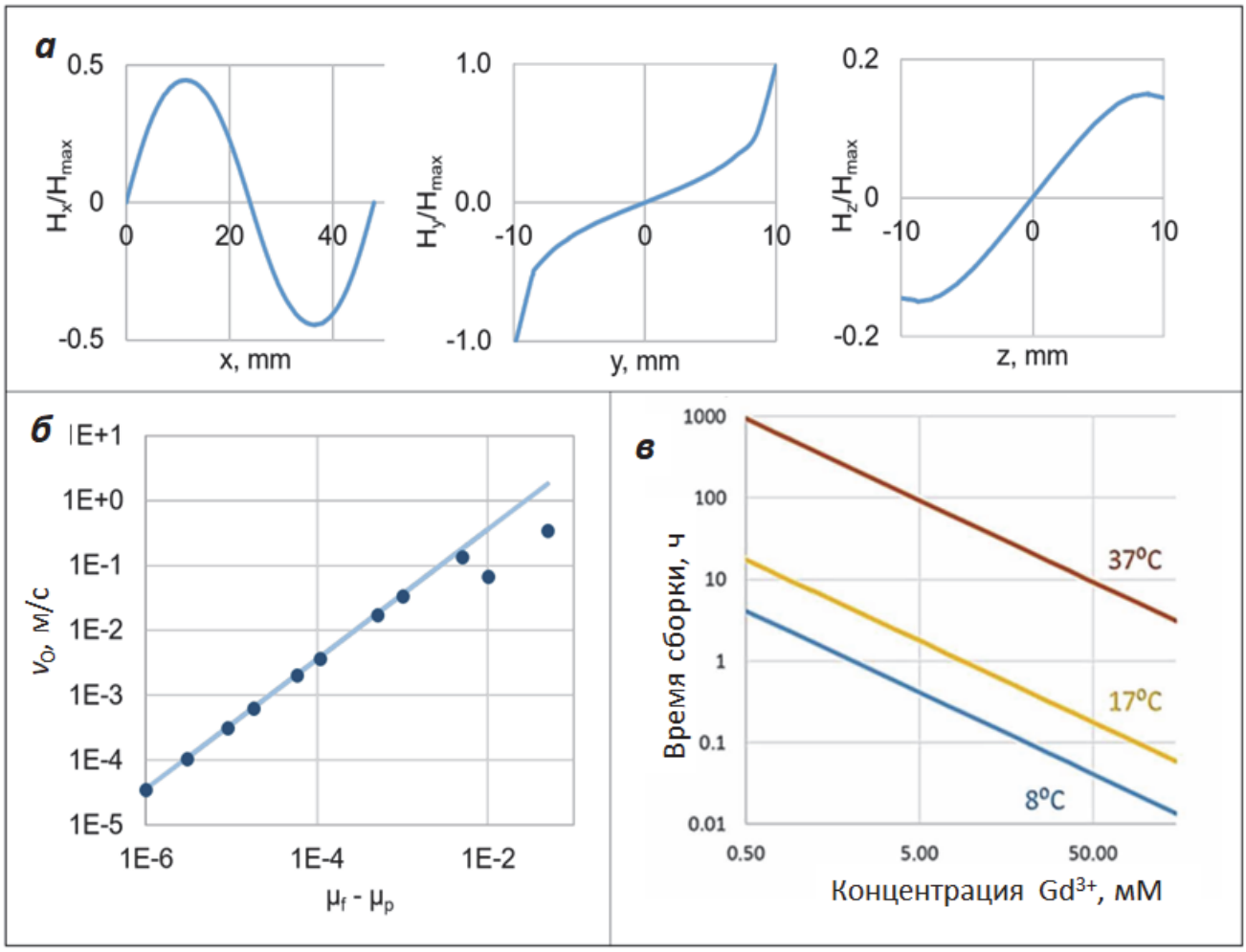


Рис. 3.4 (а) Распределение компонент напряженности магнитного поля по осям симметрии внутри магнита; (б) сравнение результатов компьютерного моделирования и аналитического выражения (3.13) для начальной скорости движения сфероидов; (в) зависимость времени сборки конгломератов от концентрации парамагнетика при различных температурах гидрогеля.

Как видно из выражения (3.13), начальная и максимальная скорости частицы оказываются прямо пропорциональными величине δ, которая, как видно из (3.12), по сути определяет время сборки:

$$T_{ass} \sim \frac{1}{\delta} = \frac{3\eta L(\mu_p + 2\mu_f)}{4r^2\mu_0\mu_f H_{max}^2(\mu_p - \mu_f)} \quad (3.14)$$

Таким образом, время сборки прямо пропорционально вязкости жидкой среды η и обратно пропорционально разности магнитных проницаемостей сфероидов и среды $\mu_p - \mu_f$. Этот результат полезен тем, что, измерив время сборки при одной концентрации Gd^{3+} в среде, при неизменных других параметрах эксперимента можно довольно точно оценить время сборки при другой концентрации парамагнетика. Точно так же, измерив время сборки при одной температуре среды, можно оценить время сборки при другой, более высокой или низкой температуре и, соответственно, вязкости среды.

3.2.4. Результаты эксперимента по биофабрикации в космосе

В эксперименте на МКС использовались концентрации парамагнетика гадолиния 0.8, 10 и 50 мМ. При этом эффективная сборка была осуществлена только при концентрациях 10 и 50 мМ. Результаты съемки процесса сборки показали, что процесс длился около 40 минут при концентрации 10 мМ (рис. 3.5 а) и около 15 минут при концентрации 50 мМ, при концентрации 0.8 мМ сфероиды не успели собраться за 90 минут эксперимента. Как показал расчет времени сборки (рис. 3.4 в) для различных температур, и, соответственно, вязкостей, термочувствительного гидрогеля, в котором содержались сфероиды, при температуре гидрогеля 17° С, сборка заняла бы порядка 10 часов. Сборка конгломерата при такой концентрации успела бы произойти, если бы температура гидрогеля соответствовала заявленной в плане эксперимента температуре 8° С, однако технические неполадки на космической станции не позволили охладить установку до таких значений.

Наиболее быстрая и эффективная сборка сфероидов в конгломерат происходит при максимальной концентрации гадолиния. Однако исследования показали, что раствор Gd^{3+} 50 мМ, воздействующий на тканевый сфероид в течение 24 ч, уменьшает жизнеспособность (долю живых клеток от первоначального

количества) до 84%, а концентрация гадолиния меньше 12.5 мМ на жизнеспособность клеток не влияет [А5]. Таким образом, наиболее предпочтительной оказывается сборка конгломерата из тканевых сфероидов в концентрации парамагнетика 10 мМ.

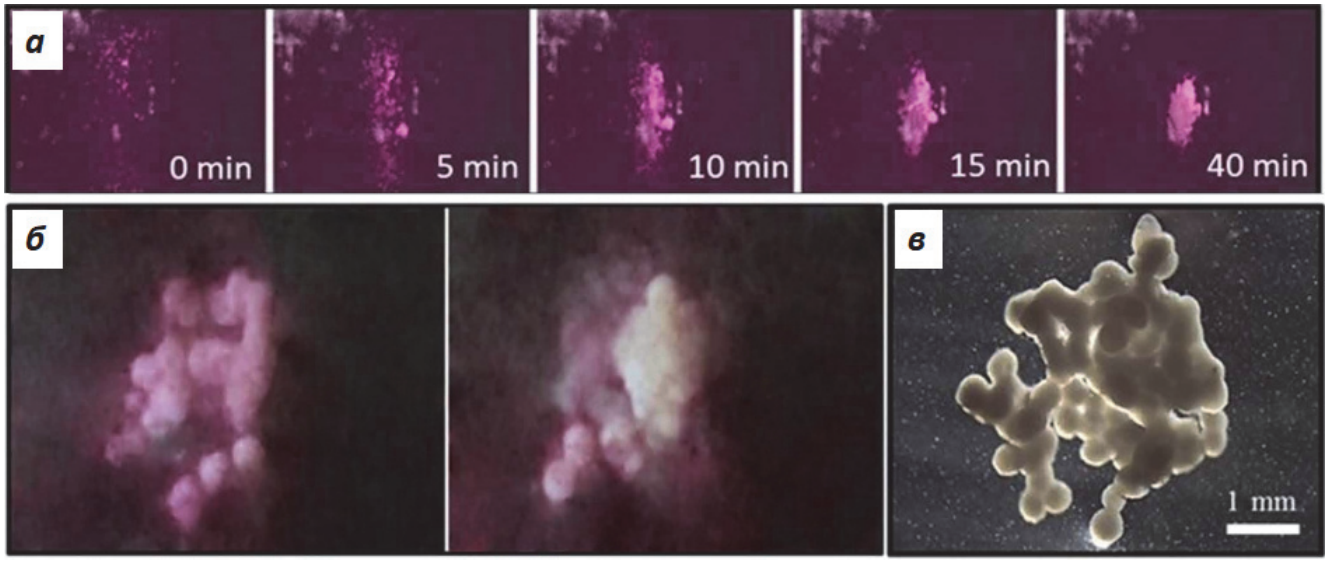


Рис. 3.5 (а) Фото сборки сфероидов в 10 мМ растворе парамагнетика; (б) фото конгломерата в начале и в конце процесса слияния; (в) макрофотография слившегося конгломерата после возвращения на Землю.

Последующий гистологический анализ тканевого конгломерата после слияния в течение 48 ч при температуре 37° С показал частичное сращение сфероидов (рис. 3.5 б). Принимая это во внимание, увеличение времени биофабрикации сделало бы возможным полное слияние хондросфер в единый трехмерный тканевый конгломерат (рис. 3.5 в). Специфическое иммуногистохимическое окрашивание не выявило признаков апоптоза внутри конгломерата, что означает, что подобранные и апробированные условия доставки и последующей сборки сфероидов в космосе позволили хондроцитам сохранить свою жизнеспособность и физиологическую активность, свойственную клеточному поведению в 3D-культурах.

3.2.5. Выводы ко второму параграфу

Показана возможность биофабрикации жизнеспособных тканевых конгломератов в состоянии невесомости в магнитном поле. Построена компьютерная модель магнитного поля, позволяющая моделировать процесс сборки тканевых сфероидов под действием магнитофоретической силы для разных параметров среды. Исследовано влияние вязкости жидкой среды, содержащей сфероиды, и концентрации парамагнетика гадолиния, на скорость сборки конгломерата. Продемонстрирована возможность биофабрикации при концентрациях парамагнетика в жидкой среде 50 и 10 мМ, причем более низкая концентрация позволила осуществить биофабрикацию без уменьшения жизнеспособности клеток.

§3.3 **Выводы к третьей главе**

В данной главе продемонстрированы способы левитационной биофабрикации конгломератов из гранул ТКФ и тканевых сфероидов в магнитном поле. Ключевой особенностью такого метода биофабрикации, осуществляемой без каркасов, подложек и других элементов, которые непосредственно контактируют с конгломератом, является необходимость левитации – это достигается либо компенсацией сил гравитации с помощью высокой концентрации парамагнетика Gd^{3+} в среде, либо помещением магнитной установки в условия микрогравитации, как на станции МКС. Оба подхода не являются оптимальными – высокие концентрации гадолиния снижают жизнеспособность клеток, а эксперименты в космосе слишком трудо- и ресурсозатратны.

Еще одним недостатком изложенного метода сборки является невозможность контроля формы конгломерата – она полностью обусловлена полем постоянных магнитов и не может варьироваться под конкретные нужды. При этом клетки в глубине конгломерата нуждаются в питании, которое не поступает внутрь посредством диффузии, и сборка достаточно крупного тканевого конгломерата не

может обойтись без васкуляризации ткани. Изложенные недостатки представляется возможным разрешить с помощью комбинации магнитного и акустического поля: акустическая радиационная сила, воздействующая на частицы, может их эффективно перемещать и удерживать, а разнообразие акустических источников в перспективе позволяет конструировать конгломераты различных форм и размеров.

Глава 4
БИОФАБРИКАЦИЯ ТРУБЧАТЫХ СТРУКТУР ПУТЁМ КОМБИНИРОВАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АКУСТИЧЕСКОГО И МАГНИТНОГО ПОЛЕЙ

§4.1 Эксперимент по магнито-акустической левитации в поле цилиндрической акустической стоячей волны и магнитного поля постоянного магнита

Для обеспечения акустического удержания частиц вдоль цилиндрической поверхности следует иметь в виду, что наряду с акустической радиационной силой на частицы действует и сила тяжести. Для сохранения радиальной симметрии силового потенциала необходимо ориентировать ось цилиндра вертикально. Тогда в горизонтальном направлении частицы будут перемещаться под действием радиационной силы в направлении узловой поверхности. Однако левитация при этом окажется возможной только при наличии подстилающей поверхности, препятствующей падению частиц под действием силы тяжести. Альтернативным способом является использование дополнительного источника силового воздействия, который будет компенсировать гравитацию. Как описано в главе 3, эта компенсация может быть обеспечена магнитной силой. Исходя из этого, нами было предложено сконструировать бестелесные ловушки для левитации частиц на основе комбинации акустических и магнитных полей. Как отмечено в главе 3, магнитное поле удобно для удержания сфероидов в большом объёме, но имеет ограниченные возможности при формировании тонкой пространственной структуры ловушки. Ультразвуковое поле, напротив, больше подходит для образования ловушек малых масштабов (сравнимых с длиной акустической волны). Поэтому сочетание магнитного и акустического полей может оказаться перспективным методом формирования сложных трехмерных структур из тканевых сфероидов в питательной среде. С целью исследования указанного подхода к задаче биофабрикации было проведено описанное ниже

экспериментальное исследование. В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A6-A8].

Описанный далее эксперимент по биофабрикации тканевого кольца похож на изложенный в главе 1 с тем отличием, что вместо подложки из агарозы, на которую опирался конгломерат из сфероидов, использовалось магнитное поле, удерживающее частицы на весу.

4.1.1. Методика эксперимента

Главной задачей данного исследования было создать методику, позволяющую осуществить быструю левитационную сборку конструкции из тканевых сфероидов, случайным образом распределенных в рабочем объеме питательной среды. В качестве основного инструмента сборки используется комбинация неоднородного магнитного и стоячего акустического полей, которые создают магнито-акустическую ловушку внутри пробирки, содержащей жидкость с тканевыми сфероидами. Сфероиды, плавающие в питательной среде, устремляются в область ловушки под действием гравитации, магнитного поля и акустической радиационной силы. Внутри ловушки гравитационные силы компенсируются действием магнитных сил в вертикальном направлении, а в горизонтальном направлении форму конгломерату придает акустическая радиационная сила. Таким образом, происходит сборка тканевого конгломерата, когда сфероиды сливаются друг с другом в питательной среде без контакта с подложкой.

Как отмечалось в главе 3, магнитная сила возникает вследствие пространственной неоднородности магнитного поля и разницы магнитных восприимчивостей сфероидов и питательной среды. Чем больше разница магнитных восприимчивостей, тем больше магнитная сила. Поэтому для усиления эффекта в среду добавляют раствор солей гадолиния. Таким образом, жидкая среда становится парамагнитной. Сфероиды, как вода, диамагнитны.

Акустическая радиационная сила определяет форму конгломерата. В результате возможно получить тканевые конгломераты сферической, эллиптической, кольцевой и другой формы – достаточно лишь подобрать подходящую конфигурацию звукового поля. Для того чтобы придать конструкции из сфероидов форму трубки, был использован цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь (см. главу 1). В полости внутри преобразователя создавалось стоячее поле, близкое к цилиндрическому, следовательно, узловые зоны поля тоже имели форму цилиндра. Сфероиды, попадающие в узлы такого поля, формировали конгломерат в форме трубки. Толщину стенки трубки определял размер сфероидов и амплитуда акустического поля, а длину – количество сфероидов. Радиус трубки зависел от длины волны, излучаемой преобразователем. Из-за небольших размеров конструкций манипулирование тканевыми сфероидами в питательной жидкости возможно в ультразвуковой области частот – от сотен килогерц до нескольких мегагерц.

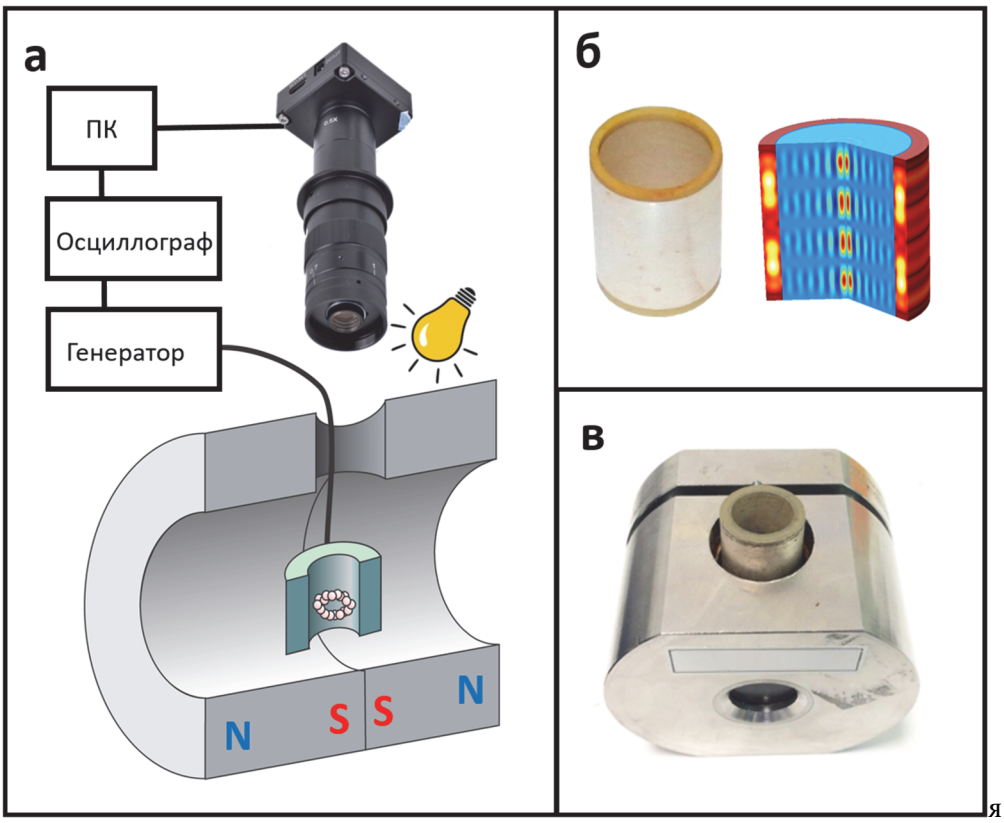
4.1.2. Экспериментальная установка

Экспериментальная установка состояла из комбинации магнитной установки и цилиндрического пьезоэлектрического преобразователя. Магниты были такими же, как описано в параграфе §3.1, единственным отличием было дополнительное отверстие диаметром 25 мм сверху для вертикальной установки внутрь кюветы со сфероидами и акустического преобразователя. Схема установки показана на рис. 4.8. Электрический гармонический сигнал подавался на преобразователь с генератора частот Agilent 33250A, а геометрический резонанс определялся по минимуму амплитуды сигнала на осциллографе. Для наблюдения за процессами сборки и слияния сфероидов была установлена камера с макро-объективом. Внутри пьезокерамического цилиндра находилась среда с тканевыми сфероидами.

В эксперименте использовался ультразвуковой преобразователь из пьезокерамики ЦТС-4 в виде отрезка цилиндра с внутренним диаметром 16 мм, внешним диаметром 20 мм и высотой 20 мм (рис. 4.8 б). Толщина стенки 2 мм

соответствовала частоте толщинного резонанса 770 кГц. Для создания внутри преобразователя стоячей волны следовало выбрать такую частоту излучения, которая соответствовала бы обсужденным в пункте 1.1.2 условиям акустического резонанса внутри цилиндра. В то же время для эффективного электроакустического преобразования частота излучения должны быть близка к частоте толщинного резонанса пьезокерамического цилиндра. В условиях эксперимента, чтобы получить трубку диаметром 1.5 мм, требовалось излучить ультразвуковую волну частотой 775 кГц.

Чтобы определить область пространства, в которой будут собираться сфероиды, с помощью численного моделирования методом конечных элементов было рассчитано поле акустического давления от преобразователя (см. пункт 1.1.3). Затем был найден потенциал Горькова – потенциал акустической радиационной силы в приближении малости рассеивателя по отношению к длине волны, что выполнялось в эксперименте: длина волны в воде на частоте 775 кГц составляет примерно 2 мм, а диаметр частиц – около 0.2–0.3 мм, т.е. почти на порядок меньше. Как отмечалось ранее, минимум потенциала соответствует области, в которую направлены силы радиационного давления и куда будут устремляться частицы. Градиент потенциала Горькова соответствует радиационной силе, действующей на сфероиды. Так как структура поля внутри преобразователя концентрическая, как и поле радиационной силы (рис. 4.8 б), то при сильном акустическом поле возможно образование не одной трубки из сфероидов, а нескольких вложенных друг в друга концентрических структур. Однако магнитная сила имела еще и горизонтальную составляющую, притягивающую сфероиды к центру магнитной установки. Поэтому амплитуда излучаемой ультразвуковой волны подбиралась опытным путем исходя из двух требований: она должны была быть больше магнитной силы в центре рабочей зоны, чтобы сформировать кольцо, то есть оттолкнуть сфероиды от центра, но меньше в области второго минимума потенциала радиационной силы, чтобы все сфероиды из рабочего объема были задействованы в формировании единого кольца.



я

Рис. 4.8 (а) Схема экспериментальной установки, (б) пьезоэлектрический преобразователь и результаты конечно-элементного расчёта распределения радиальной составляющей акустической радиационной силы внутри преобразователя; в стенках преобразователя показано распределение амплитуды смещений, (в) фотография экспериментальной магнитно-акустической установки.

Сфероиды помещались в питательный раствор, оптимальный для выбранного типа клеток. В эксперименте использовались гладкомышечные клетки и хондроциты. Экспериментальная установка была помещена в термостат, который поддерживал температуру 37°C. Для осуществления магнитной левитации в питательной среде были растворены соли парамагнетика гадолиния, концентрация которых была 50 мМ.

4.1.3. Сборка и слияние сфероидов в форме кольца

Как и предполагалось, сфероиды собрались в узлах цилиндрического стоячего звукового поля, левитируя в питательной среде под действием магнитной силы. Радиус получившейся конструкции соответствовал расчетному радиусу области первого от центра узла: его можно найти из соотношения (1.17). Для излучаемой частоты 775 кГц при температуре среды 37°C, соответствующей

скорости звука в жидкости 1530 м/с, расчетный радиус кольцевого конгломерата должен был составить 0.74 мм. Указанное значение соответствовало наблюдаемому в эксперименте при тех же условиях: диаметр конгломерата составил около 1.5 мм. Изменяя частоту излучаемой ультразвуковой волны, было возможно контролировать диаметр конгломерата сфероидов.

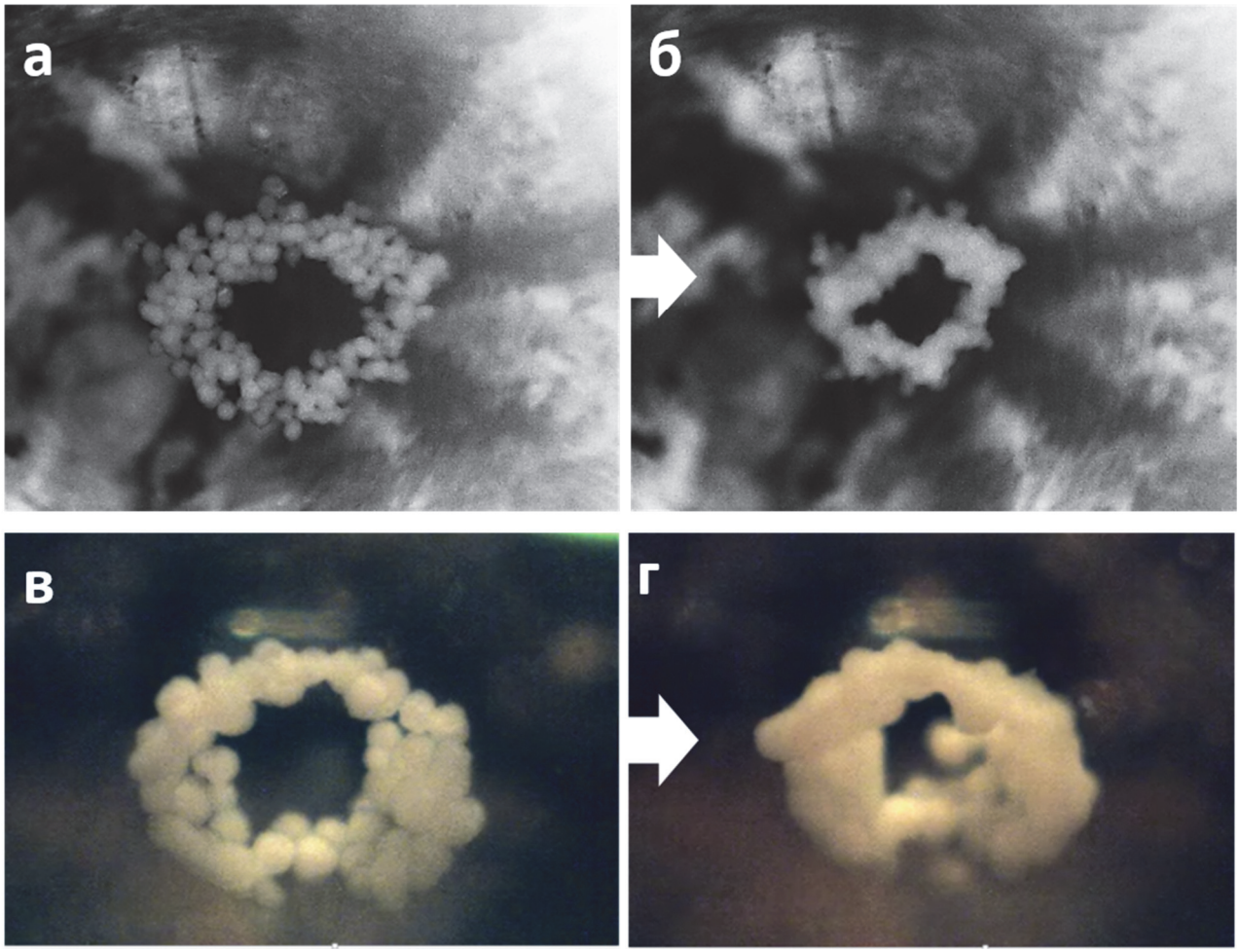


Рис. 4.9 Формирование кольца из сфероидов в начале эксперимента и после 20 часов слияния из (а, б) гладкомышечных клеток и (в, г) хондроцитов.

После сборки сфероидов в кольцеобразную структуру, их было необходимо удерживать в этом состоянии в течение суток для слияния и образования сплошного тканевого конгломерата. Важно отметить, что интенсивность ультразвуковой волны была достаточно малой, чтобы не повредить сфероидам даже при столь длительном воздействии. В эксперименте была проведена биофабрикация кольцеобразных структур из гладкомышечных клеток (рис. 4.9 а, б), которые являются клетками стенок сосудов, а также из хондроцитов

(рис. 4.9 в, г), которые образуют хрящ. В конечном счете для обоих типов клеток сфероиды сливались и образовывали сплошное тканевое кольцо примерно за 20 часов, что свидетельствовало о том, что клетки оставались живыми в течение всего процесса слияния.

4.1.4. Выводы к третьему параграфу

Тканевые сфероиды были собраны в сплошной тканевый конгломерат в форме кольца с использованием комбинации магнитного и акустического полей, в состоянии левитации непосредственно в питательной среде. Размер получившегося конгломерата согласовывался с расчетным, показана возможность манипулирования сфероидами с помощью ультразвуковой волны для придания итоговой структуре желаемого радиуса. Толщина конгломерата составила 1-2 слоя сфероидов.

§4.2 Эксперимент по магнито-акустической левитации в поле магнита Биттера

Закономерным следующим шагом по развитию методов биофабрикации является попытка сборки сфероидов в форме трубки, длина которой составляет несколько слоев сфероидов. Конструирование длинной трубки из тканевых сфероидов в предложенной ранее установке на основе постоянного магнита не представляется возможным из-за сильного вертикального градиента магнитного поля. Область пространства, в которой магнитофоретическая сила уравновешивает силы гравитации, оказывается слишком короткой. Указанный недостаток отсутствует в электромагните Биттера [113], работающем по принципу соленоида. В таком магните вдоль оси соленоида создаётся более плавный и протяженный в пространстве градиент напряженности магнитного поля, позволяющий скомпенсировать силу тяжести в протяженной области. Еще одним преимуществом электромагнита Биттера является способность создавать очень сильное постоянное магнитное поле величиной до 32 Тл, что позволяет обеспечить

левитацию тканевых сфероидов или имитирующих их полистироловых шариков при нетоксичной для клеток концентрации соли гадолиния. Сборку сфероидов в горизонтальном направлении можно произвести с помощью уже рассмотренного полого цилиндрического пьезопреобразователя.

Эксперимент по магнитной левитации был проведен на биттеровских магнитах в Лаборатории сильных магнитных полей университета Неймегена (г. Неймеген, Нидерланды) в рамках совместных проектов NSO04-218 и NMA11-119 университета Неймегена (Нидерланды) с компанией «3Д Биопринтинг Солюшенс» (Россия) при поддержке European Magnetic Field Laboratory. Руководителем проекта с российской стороны был к.м.н. В.А. Миронов, автор настоящей диссертации отвечал за акустическую часть работ по проекту.

Для того чтобы придать левитирующим частицам форму трубки постоянного сечения, использовался цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь, подобный использованному в экспериментах с постоянным магнитом. Он представлял собой пьезокерамический цилиндр с толщиной стенки 2 мм, внешним диаметром 20 мм и высотой 20 мм. К внешней и внутренней поверхностям пьезоцилиндра прикладывалась переменное электрическое напряжение с амплитудой около 10 В, и вследствие пьезоэффекта стенки цилиндра колебались в радиальном направлении на заданной частоте, излучая тем самым ультразвуковую волну внутрь цилиндра. Во внутренней области такого пьезопреобразователя на резонансных частотах формировалось стоячее ультразвуковое поле. Структура поля звукового давления была радиально симметричной: узлы и пучности формировали чередующиеся друг за другом цилиндрические области. В вертикальном направлении структура поля не являлась полностью однородной: на границе пьезоэлектрика с жидкостью неизбежно возникают поверхностные волны Лэмба [112], из-за которых возникают вариации амплитуды акустического давления.

4.2.1. Экспериментальная установка

Электромагнит Биттера (рис. 4.10 а) – это большой соленоид, состоящий из множества тонких перфорированных хорошо проводящих металлических дисков. Между слоями проложены диэлектрические прокладки, и диски формируют двойную спираль. Через отверстия постоянно прокачивается охлаждающая жидкость, так как на высоких мощностях магнит сильно греется. Рабочая область, в которой создается сильное магнитное поле внутри магнита-соленоида, имеет диаметр 50 мм. Длина магнита составляет 940 мм, а максимальной амплитуды магнитное поле достигает в центре магнита, на расстоянии 470 мм от краев. На рис. 4.10 б показана зависимость индукции магнитного поля на оси магнита от расстояния до верхнего края при заданной максимальной амплитуды 8 Тл.

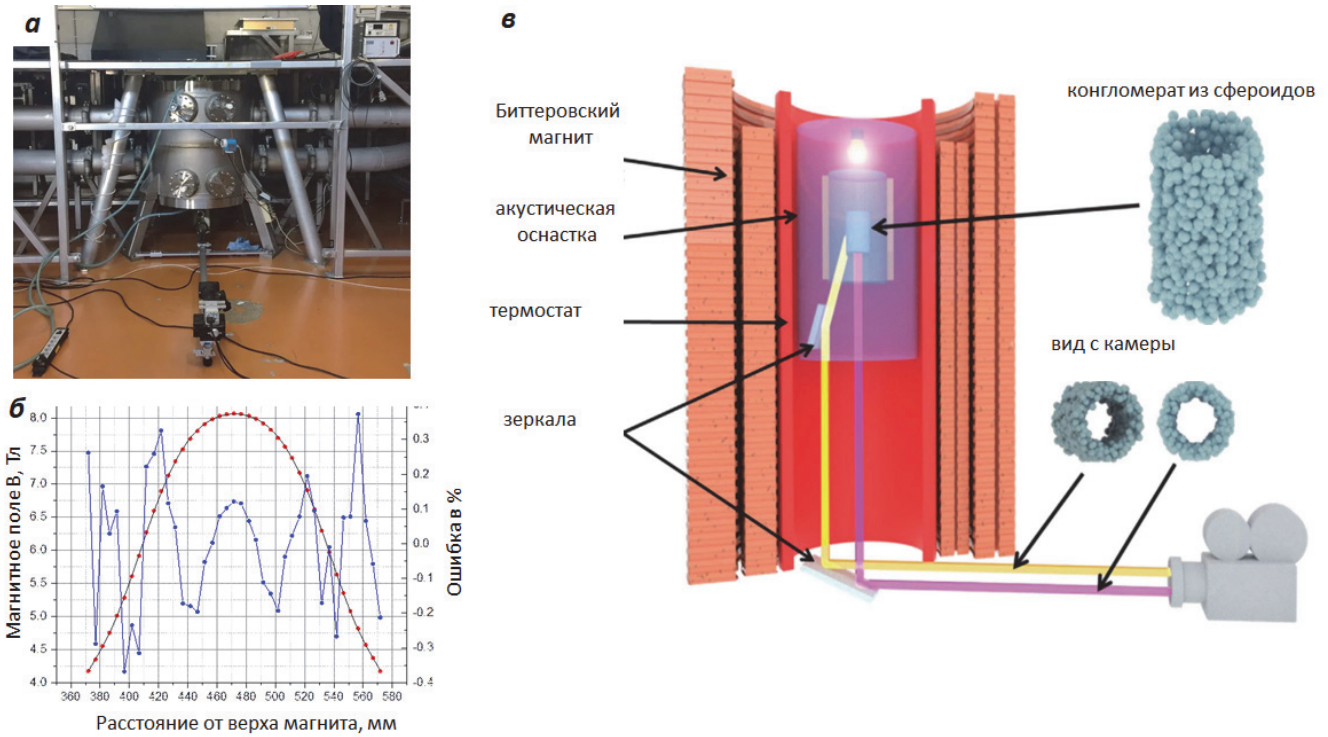


Рис. 4.10 (а) Фото электромагнита Биттера, на котором проводился эксперимент; (б) Зависимость амплитуды магнитного поля на оси магнита от расстояния до верхнего края магнита. Красные точки означают индукцию магнитного поля на оси электромагнита, синие – ошибка измерения в %; (в) Схема экспериментальной установки.

Для работы с живыми клетками по биофабрикации тканевых конгломератов в рабочую зону магнита был помещен термостат с циркулирующей в нем водой, поддерживающий температуру 37º С. В отверстие термостата диаметром 40 мм была вставлена специально созданная акустическая оснастка. Схема взаимного расположения магнита, термостата и акустической оснастки показана на рис. 4.10 в.

Акустическая установка (рис. 4.11 а, д) состояла из герметичного прозрачного цилиндрического контейнера из оргстекла с пластиковой крышкой из полимерного пластика ZEDEX ZX-100K [120]. Из этого же материала с помощью печати на 3Д-принтере были изготовлены и другие детали установки, такие как крепления для пьезопреобразователей и зеркал. Выбор данного материала был обусловлен его прочностью, низкой пористостью (так как наличие пузырей в области излучения ультразвука нежелательно – они могут вызывать как дополнительное затухание акустической волны, так и резонировать, а также мешать визуальному наблюдению за ходом эксперимента), антифрикционным свойствам, устойчивостью к кавитации и высоким магнитным полям, а также возможностью использовать данный материал для печати на 3D-принтере. К крышке на пластиковых стержнях крепилась платформа с вертикально расположенным цилиндрическим пьезоэлектрическим преобразователем (рис. 4.11 в). Провода, подведенные к преобразователю, проходили по центру контейнера, герметично крепились к крышке и выходили наружу для последующего подключения к генератору сигнала и осциллографу. Также к крышке крепились светодиоды, которые были подключены к источнику постоянного напряжения, и небольшой кольцевой пьезоэлектрический преобразователь с фокусирующей накладкой, который использовался для перемешивания левитирующих частиц в случае их преждевременного слипания.

Все пространство контейнера было заполнено дегазированной водой. Наличие воды, во-первых, обеспечивало отсутствие прослоек воздуха между стенкой преобразователя и емкостью с частицами внутри неё, что повышало эффективность ультразвукового воздействия. Во-вторых, наличие значительного

объема воды гарантировало более стабильный температурный режим внутри преобразователя во время излучения ультразвука и защищало частицы от перегрева (и от быстрого охлаждения при вынимании оснастки из термостата на некоторое время). Удаленность верхней и нижней границы оснастки от преобразователя позволила уменьшить их вклад в искажение результирующего ультразвукового поля.

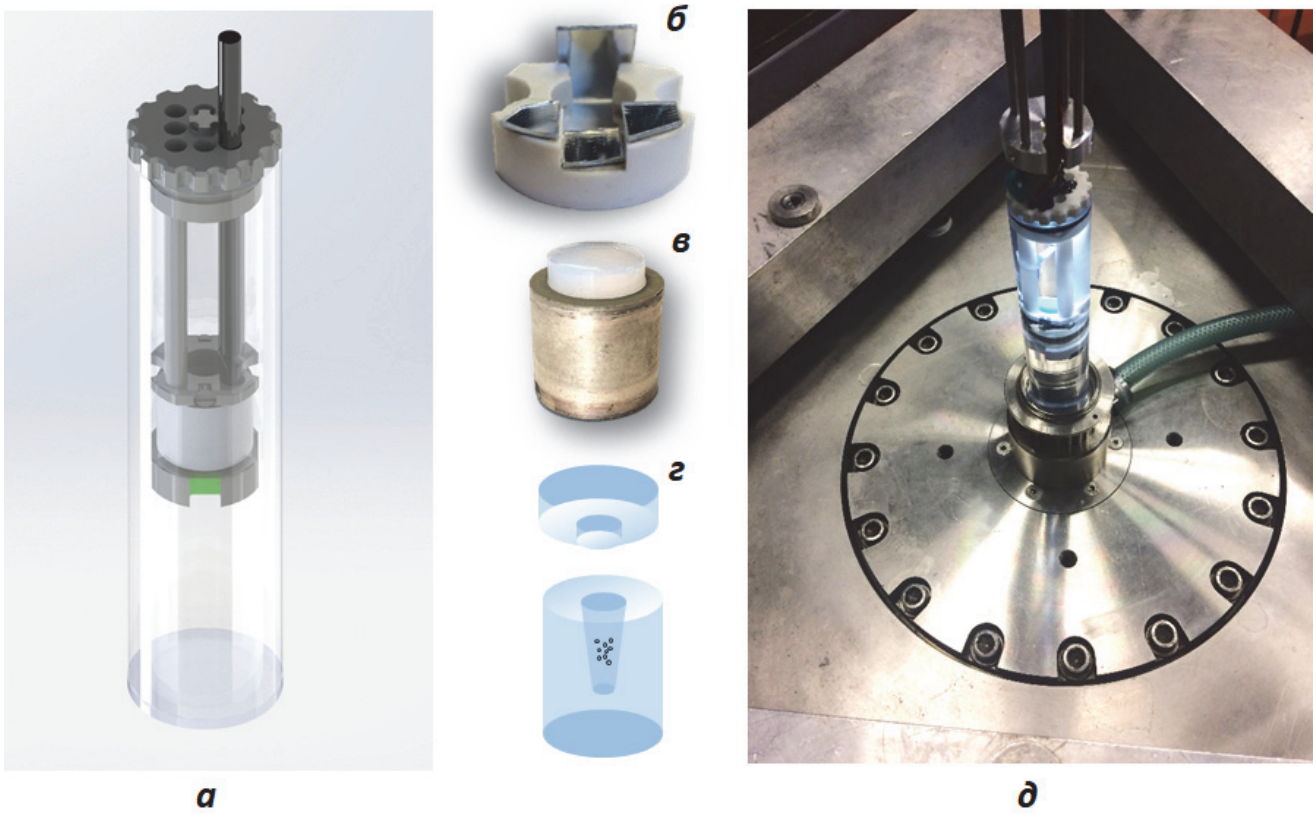


Рис. 4.11 (а) Схематичное изображение акустической установки; (б) оптическая система зеркал; (в) цилиндрический пьезоэлектрический преобразователь с агарозной формой внутри; (в) агарозная форма; (д) фото акустической оснастки, помещаемой в магнит. Зеленый шланг подводит циркулирующую воду к термостату.

Для эксперимента была изготовлена емкость из агарозы, которая служила контейнером для частиц (рис. 4.11 г), подробно об агарозном контейнере упоминалось в пункте 1.3.1. Размеры агарозной формы соответствовали используемому преобразователю – ее внешний диаметр и высота составляли 20 мм, а конусообразное отверстие внутри – диаметры от 3 до 8 мм

Для визуального наблюдения за движением частиц во время эксперимента была использована оптическая схема, состоящая из зеркала, расположенного под углом 45 градусов к вертикали, фокусирующей линзы и видеокамеры (рис. 4.10 в).

Так как дно оснастки было прозрачным, такая схема позволяла проводить наблюдения за сборкой части в вертикальном направлении. Чтобы оценивать длину собираемого конгломерата из частиц по вертикали, использовалась дополнительная оптическая система, установленная внутри оснастки сразу под пьезоэлектрическим преобразователем (рис. 4.11 б). К пластиковому кольцу, плотно сидящему внутри цилиндрического контейнера, крепилось небольшое зеркало, расположенное под небольшим углом к вертикали таким образом, чтобы камера, на которую попадает изображение, захватывала и получаемое под углом изображение конгломерата на зеркальце. Там же, но горизонтально, крепились дополнительные зеркала, которые отражали на частицы падающий сверху свет, что позволяло добиться лучшего контраста получаемого изображения. Таким образом, в ходе эксперимента одновременно обеспечивался обзор конгломерата и снизу, и сбоку.

Контейнер с акустической системой был прикреплен к длинным штырям, которые позволяли опустить установку внутрь магнита до нужной высоты. Длина штырей была выбрана такой, чтобы ультразвуковой преобразователь находился на фиксированном небольшом расстоянии от центра магнита в области, где магнитофоретическая сила компенсировала силы гравитации.

4.2.2. Численное моделирование эксперимента

Для проверки возможности сборки сфероидов в магнито-акустическом поле предварительно было сделано численное моделирование магнитного и акустического полей в соответствии с характеристиками реальной установки методом конечных элементов, а также был проведен расчет динамики движения частиц методом градиентного спуска в пакете моделирования COMSOL.

Источником магнитного поля были заданы тонкие медные диски, разделенные диэлектрическими прокладками, к которым применялось переменное электрическое напряжение. Все размеры соответствовали реальному магниту Биттера, на котором проводились эксперименты, а разность потенциалов

соответствовала максимальной индукции магнитного поля 8 Тл. Результаты расчета магнитного поля показаны на рис. 4.12 а.

Источником акустического поля был задан радиально поляризованный пьезоэлектрический цилиндр с внутренним и внешним радиусами 8 и 10 мм и длиной и 20 мм. Было рассчитано акустическое поле внутри пьезоцилиндра и поле механических напряжений в стенке пьезоэлектрика (рис. 4.12 б). Как видно из результатов расчета, акустическое поле довольно неоднородно в вертикальном направлении – в стенке пьезоэлектрика неизбежно присутствуют волны Лэмба [112], из-за чего возникают вариации амплитуды акустического давления.

По результирующему полю акустического давления в приближении Горькова была найдена радиационная сила, действующая на сферическую частицу. Свойства моделируемых частиц выбраны в соответствии со свойствами тканевых сфероидов: продольная и поперечная скорость звука 1600 м/с и 3 м/с соответственно, плотность 1050 кг/м^3, диаметр 0.2 мм [94]. Магнитофоретическая сила рассчитывалась на основании найденного магнитного поля согласно формуле (3.1) при следующих параметрах эксперимента: относительная магнитная проницаемость сфероидов и среды составляла μ_p = 0,999992 и μ_f = 1.000014 соответственно (СИ) [118], что соответствовало концентрации парамагнетика гадолиния в среде 20 мМ, а напряженность магнитного поля составляла 8 Тл.

Траектории частиц рассчитывались в соответствии с методом, описанным в параграфе §3.1. В начале расчета было задано 400 случайным образом расположенных частиц, которые под воздействием упомянутых сил собрались в единый конгломерат в форме трубки (рис. 4.12 д), радиус которой соответствовал первому узлу стоячей цилиндрической волны внутри пьезоизлучателя (рис. 4.12 в, г), а длина трубки насчитывала несколько слоев из сферических частиц.

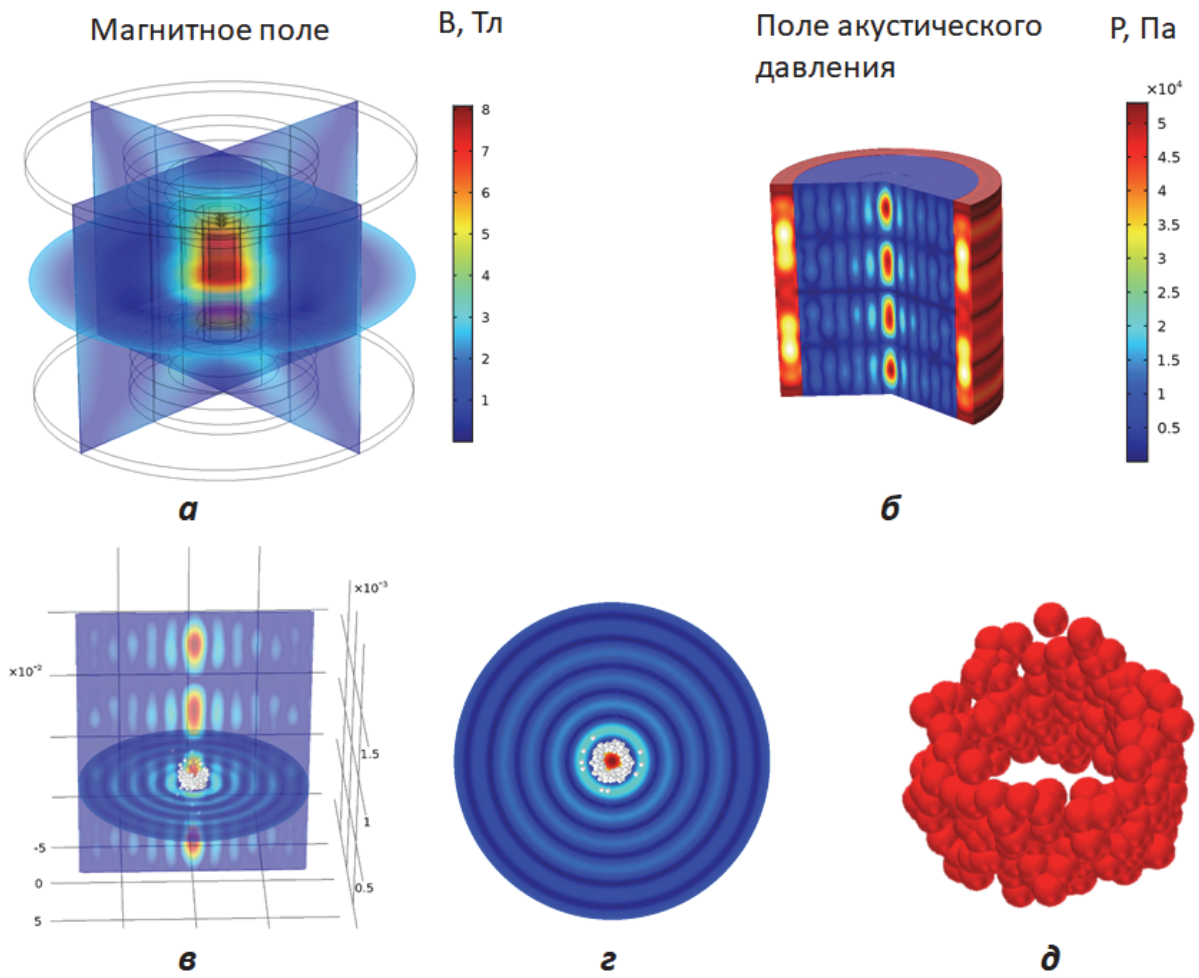


Рис. 4.12 Магнитное (а) и акустическое (б) поле, рассчитанные методом конечных элементов; результат моделирования сборки сфероидов в магнито-акустическом поле вид сбоку (в) и сверху (г); модель сформированного конгломерата в виде трубки (д).

4.2.3. Эксперимент

В качестве объектов сборки использовались полистироловые шарики и тканевые сфероиды из гладкомышечных клеток. Полистироловые шарики как имитаторы тканевых сфероидов использовались для настройки параметров эксперимента: подбора амплитуды магнитного поля и положения акустической оснастки внутри магнита, частоты ультразвуковой волны, оптимального количества частиц в среде и концентрации Gd^{3+} в питательном растворе. После апробации методики эксперимента проводилась сборка сфероидов из гладкомышечных клеток – именно эти клетки входят в состав оболочек кровеносных сосудов и обладают способностью к сжатию [121].

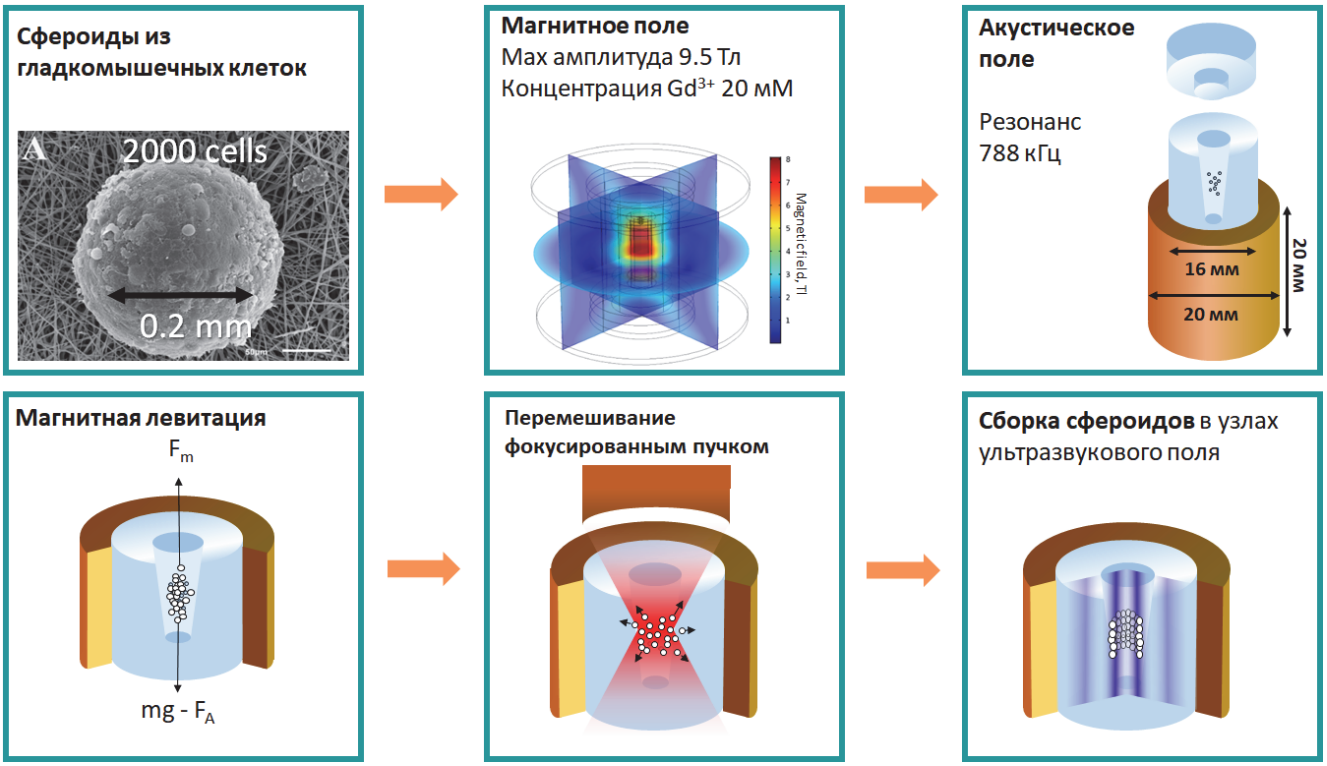


Рис. 4.13 Последовательность экспериментальных действий

В ходе эксперимента выполнялась следующая последовательность действий (рис. 4.13):

1) Сначала термостат прогревался до температуры 37° С. Было важно дождаться установления постоянной температуры, так как скорость звука в воде внутри акустической установки и в питательном растворе зависит от температуры, из-за чего условие резонанса и радиус узловой зоны изменяется с нагревом или охлаждением циркулирующей в термостате жидкости, что может привести к нарушению структуры стоячей волны.

2) В термостат помещалась установка с полистироловыми шариками или тканевыми сфероидами в парамагнитной среде. Концентрация парамагнетика в питательном растворе составила 20 мМ. Включалась подсветка светодиодами для наблюдения за движением частиц.

3) Затем было включено магнитное поле, которое достигало необходимой для левитации напряженности за 7 минут.

4) Если эксперимент проводился с тканевыми сфероидами, в процессе включения магнитного поля они могли частично слипнуться друг с другом из-за

высокой адгезивности. В таком случае включался небольшой ультразвуковой излучатель с фокусирующей накладкой, который эффективно создавал вихревые потоки (акустические течения) в контейнере из агарозы и таким образом перемешивал сфероиды.

5) При включённом постоянном магнитном поле, когда частицы свободно левитировали в агарозной форме, с помощью пьезоэлектрического цилиндра создавалось ультразвуковое поле. Возникающая стоячая волна создавала радиационную силу, сдвигающую частицы в узлы поля. Благодаря тому, что в качестве источника ультразвука использовался цилиндрический преобразователь, узловая область в пространстве представляла собой цилиндр. Если полистироловых частиц или сфероидов было достаточно много, они формировали плотный цилиндр с фиксированным радиусом, определяемым длиной акустической волны. Процесс сборки левитирующих полистироловых шариков в трубку показан на рис. 4.14.

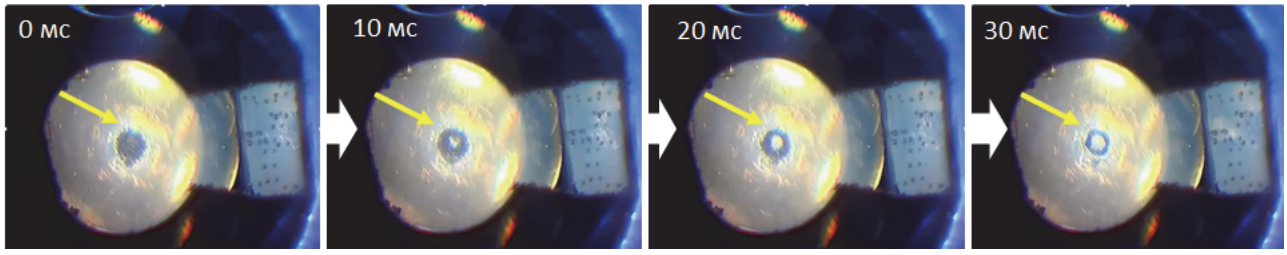


Рис. 4.14 Процесс сборки трубки из левитирующих полистироловых шариков под действием акустической радиационной силы. Хаотично левитирующие частицы (указаны стрелкой) под действием ультразвукового поля упорядочиваются в форме кольца.

4.2.4. Результаты эксперимента

Сначала были проведены эксперименты с полистироловыми шариками для определения оптимальных условий для биофабрикации тканевых сфероидов в форме трубки. Определялись амплитуда магнитного поля и частота ультразвуковой волны для сборки конгломерата оптимального размера. Оказалось, что для используемой концентрации парамагнетика в среде 20 мМ оптимальной для левитации является максимальная амплитуда магнитного поля 9.5 Тл.

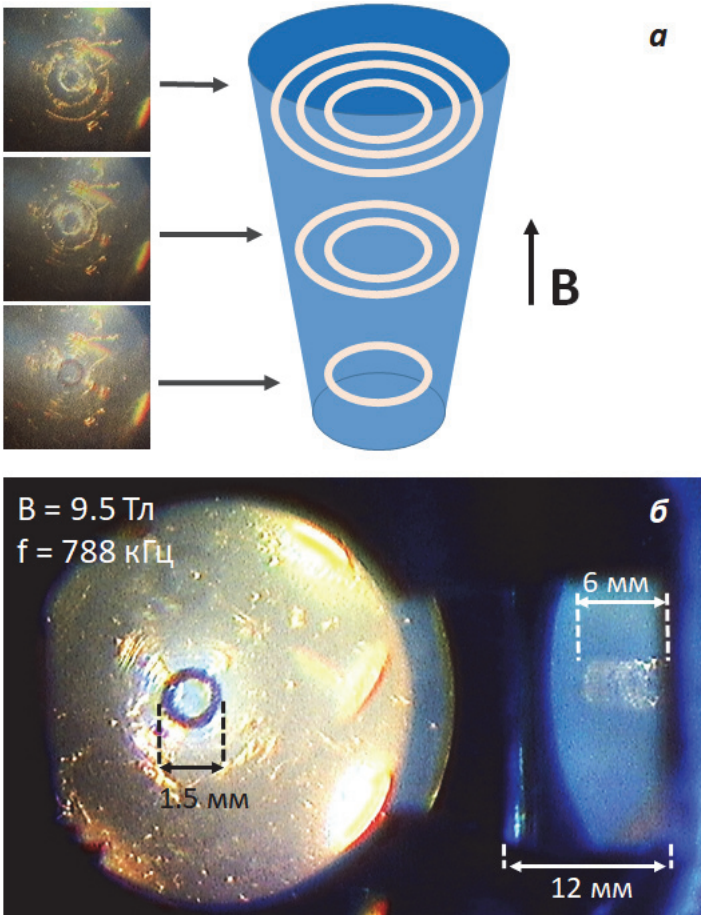


Рис. 4.15 (а) Формирование дополнительных колец при усилении магнитного поля; (б) вид снизу и сбоку на собранную трубку из полистироловых шариков.

Электрический гармонический сигнал подавался на пьезоэлектрический преобразователь с генератора сигналов, его амплитуда была 10 В, что соответствовало максимальной скорости сборки при довольно низкой амплитуде акустического поля, которая не вызывала ни эффектов кавитации, ни локального перегрева среды.

Одной из задач было использовать для сборки максимальное число частиц, левитирующих в агарозной форме. Изменяя амплитуду магнитного поля, можно было перемещать полистироловые шарики вверх и вниз. Так как отверстие в агарозной форме было выполнено в виде сужающегося книзу конуса, то при увеличении амплитуды магнитного поля левитирующие частицы поднимались и занимали большую площадь в емкости. Если диаметр области левитации не превышал полутора диаметров первого узла, то в области воздействия формировался один цилиндр из полистироловых шариков. Если же диаметр емкости в области левитирующих частиц превышал диаметр второго узла или последующих, то формировались дополнительные концентрические цилиндры (рис. 4.15 а). Ввиду ограниченного числа полистироловых шариков, внешние цилиндры были либо разреженными, либо имели форму, близкую к кольцевой. Распределение частиц по нескольким узловым диаметрам было нежелательно, так как уменьшало потенциальный размер конгломерата, формируемого на основном узле стоячей волны, на минимальном от оси радиусе. Оптимальным же размером

собираемой трубки был принят диаметр 1.5 мм, что соответствовало частоте ультразвука 788 кГц (рис. 4.15 б).

Для проверки формулы (1.17), описывающей связь частоты ультразвуковой волны с радиусом образованной трубки из полистироловых шариков, были сделаны фронтальные фотографии левитирующих частиц в области стоячей акустической волны на разных частотах – от 0.5 до 1 МГц (рис. 4.16 а). Из фотографий были оценены радиусы образованных конгломератов, которые далее были сопоставлены с теоретической зависимостью для радиуса первого узла в стоячей цилиндрической волне. С учетом небольшой вариации температуры теоретическая зависимость (1.17) хорошо описывает экспериментальные наблюдения (рис. 4.16 б).

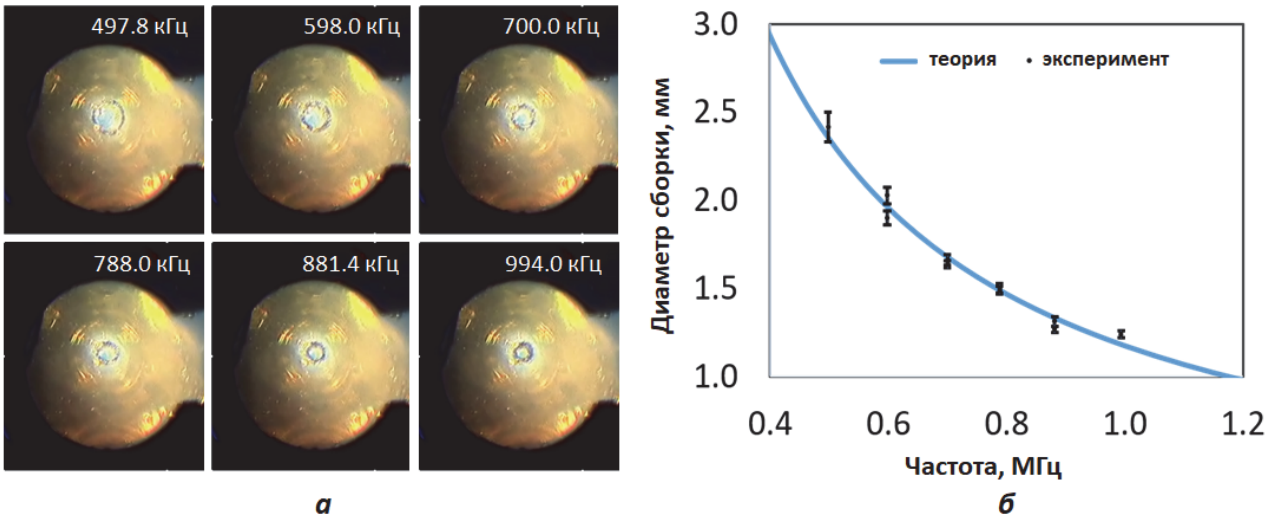


Рис. 4.16 (а) Изменение диаметра сборки полистироловых шариков в зависимости от частоты; (б) сравнение диаметра сборки с аналитической зависимостью от частоты.

После выбора оптимальных параметров для успешной сборки частиц в трубку, был проведен эксперимент со сфероидами из человеческих гладкомышечных клеток. Предварительно было оценено, что концентрация гадолиния в питательной среде 20 мМ существенно не снижает жизнеспособность клеток при воздействии в течение 48 ч.

В магнитном поле максимальной амплитуды 9.5 Тл, в питательном растворе, температура которого поддерживалась на уровне 37° С, на частоте 788 кГц был собран тубулярный конгломерат диаметром 1.5 мм из тканевых сфероидов

(рис. 4.17 а, б). В таких условиях конгломерат был оставлен на 8 часов для слияния сфероидов. Этого времени было недостаточно для полного слияния сфероидов в единый тканевый конгломерат, но достаточно для частичного слияния и фиксирования формы, а ограничение по времени было вызвано максимальной допустимой продолжительностью работы электромагнита Биттера. Следует отметить, что в течение 8 ч форма конгломерата претерпевала незначительные изменения (уменьшение толщины стенки трубки), связанные с процессом слияния сфероидов, но это не повлияло на стабильное удержание в акустическом поле.

Для оценки жизнеспособности клеток после проведения магнито-акустической части исследования был проведен гистологический анализ конгломерата (рис. 4.17 в) и Live/Dead анализ [122] (рис. 4.17 г). Гистология показала, что ткань состояла из жизнеспособных гладкомышечных клеток, плотно упакованных внутри тканевых сфероидов. Live/Dead анализ клеток в биоткани при помощи конфокального микроскопа проводился посредством подкрашивания клеток флуоресцентными маркерами: живые клетки маркировались зеленым цветом, мертвые – красным. Как видно из рис. 4.17 г, подавляющее большинство клеток участка конгломерата подкрашены зеленым, что говорит о жизнеспособности тканей. Анализ структуры конгломерата сканирующей электронной микроскопией подтвердил слияние тканевых сфероидов в трехмерное тканевое образование в форме трубки (рис. 4.17 д). Как показано на рис. 4.17 д, конгломерат состоял из трех слоев сфероидов. Следует отметить, что время инкубации в магнито-акустическом поле было недостаточным для полного слияния сфероидов; следовательно, контуры отдельных сфероидов были различимы. Однако тканевый конгломерат имел целостную и довольно прочную структуру для последующих манипуляций.

Также была проведена оценка функциональности тканевого конгломерата из гладкомышечных клеток – способности сжиматься в ответ на вазоконстриктор [121]. Вазоконстрикция (способность к сужению просвета кровеносных сосудов в ответ на стимуляцию) является важнейшим свойством сосудов, поэтому сохранность функции в искусственно сфабрикованной тканевой трубке

подтверждает возможность практического использования подобных конгломератов в качестве сосудов в живом организме.

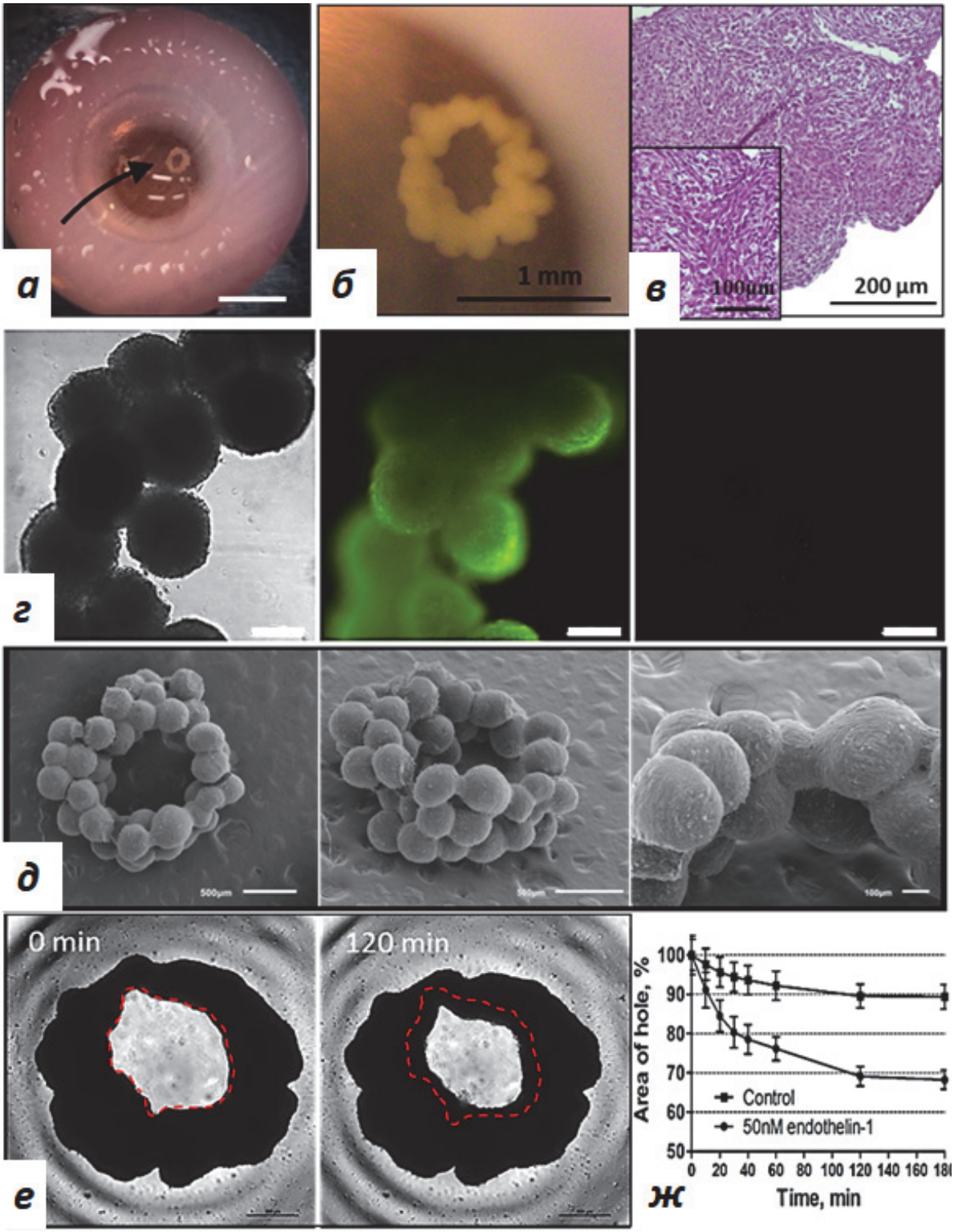


Рис. 4.17 (а, б) Фотография тканеинженерной трубки сразу после слияния в течение 8 ч в агарозном контейнере; (в) гистология участка ткани; (г) Live/Dead анализ: (слева направо) фазовый контраст, зеленый маркер, красный маркер; (д) сканирующая электронная микроскопия тканеинженерной трубки; (е) сжатие просвета в течение 120 мин воздействия эндотелина-1; (ж) доля от первоначальной площади отверстия в зависимости от времени под воздействием вазоконстриктора.

Чтобы оценить возможность сфабрикованной трубки сужаться в ответ на добавление физиологического вазокнстриктора, она была выдержана в растворе эндотелина-1 – сильнейшего сосудосуживающего агента. Как показано на рис. 4.17 е, агент вызывал зависящее от времени уменьшение площади внутреннего отверстия конгломерата, что указывает на возникновение сократительной реакции. Уменьшение площади просвета является показательным параметром для *in vitro* модели полого органа с мышечной стенкой. В эксперименте площадь просвета уменьшилась значительно — до 70 % от исходного значения (рис. 4.17 ж). Большая часть уменьшения площади происходила в течение первых 120 мин после добавления эндотелина-1. Воздействие в течение еще 60 мин к дальнейшему сокращению не привело. Таким образом, была продемонстрирована функциональная активность тканеинженерного конгломерата из гладкомышечных клеток в форме трубки.

4.2.5. Выводы к третьему параграфу

Предложен метод манипулирования микроскопическими объектами для формирования единого трубчатого конгломерата с помощью сильного постоянного магнитного поля и стоячего цилиндрического акустического поля. Экспериментально продемонстрировано, что использованный подход позволяет создавать трехмерную трубку из тканевых сфероидов заданного размера из живых клеток при безопасной концентрации парамагнетика. Показано, что конгломерат остается жизнеспособным и сохраняет функциональную способность к сжатию в ответ на воздействие вазоконстриктора.

Предложенный метод является довольно эффективным для биофабрикации тканевых конгломератов в форме трубки, однако существует несколько ограничений для его применения. В первую очередь, это уникальность магнитной установки, ограниченное время ее работы и высокая стоимость электроэнергии, затрачиваемой для создания магнитного поля такой высокой амплитуды. Это

открывает простор для развития чисто акустических методов биофабрикации конгломератов заданной формы.

§4.3 Выводы к четвертой главе

В текущей главе были предложены способы сборки конгломератов из гранул фосфата кальция и тканевых сфероидов с помощью акустической радиационной силы. Была экспериментально продемонстрирована возможность акустической левитации частиц и показано соответствие расстояние между левитирующими слоями половине длины волны в среде. Рассмотрены методы биофабрикации кольцевых и трубчатых конгломератов из тканевых сфероидов с помощью цилиндрического пьезоэлектрического излучателя в поле постоянного магнита и в поле электромагнита Биттера. Магнито-акустическая сборка в поле постоянного магнита позволяет собрать конгломерат в форме кольца и требует довольно высокой концентрации солей парамагнетика в питательный раствор сфероидов, что вызывает ощутимое (на 13 %) снижение жизнеспособности клеток. Левитация в сильном поле электромагнита Биттера позволяет собрать ровный цилиндрический конгломерат и позволяет более чем в два раза снизить концентрацию парамагнетика в среде.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Создан вычислительный комплекс с графическим интерфейсом, позволяющий рассчитать акустическую радиационную силу, действующую со стороны произвольного звукового поля на твердотельный сферический рассеиватель большого волнового размера. Оценена точность используемого метода. С помощью созданного комплекса было реализовано поперечное удержание крупного рассеивателя в поле многоэлементного излучателя.
2. Разработаны методы биофабрикации, основанные на действии акустической радиационной силы. Экспериментально продемонстрирована возможность сборки и слияния конгломератов в форме кольца в магнито-акустическом поле, когда источник магнитного поля – постоянный магнит, а источник стоячего ультразвукового поля – полый пьезоэлектрический преобразователь. Показана возможность биофабрикации тканевых конгломератов из сфероидов в акустическом стоячем поле с использованием специальной формы из агарозы.
3. Разработана методика левитационной сборки сфероидов в конгломерат тубулярной формы в поле электромагнита Биттера и стоячем цилиндрическом ультразвуковом поле внутри полого пьезоэлектрического преобразователя. Разработана оригинальная экспериментальная установка. Показана возможность биофабрикации жизнеспособного и функционального тканевого конгломерата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Написание данной диссертационной работы было бы невозможным без поддержки и участия большого количества окружающих меня людей. Хочется от всей души поблагодарить коллектив Лаборатории промышленного и медицинского ультразвука МГУ за невероятно душевное отношение, готовность в любой момент помочь советом или делом, подсказать и поправить. В особенности я выражаю благодарность Цысарю Сергею Алексеевичу и Николаеву Дмитрию Александровичу за внушительное количество часов, проведенных в совместных экспериментах, их обсуждениях и планированиях. Бесконечное спасибо Лапиной Анастасии Васильевне за ценные советы, участие и помощь как в научной деятельности, так и в житейских вопросах. Также хочется поблагодарить коллектив биотехнологической лаборатории «3Д Биопринтинг Солюшенс» и руководителя лаборатории Хесуани Юсефа Джоржевича за предоставленную возможность участия в таком новаторском направлении исследований, как биофабрикация. Спасибо Парфенову Владиславу Александровичу за интересную совместную работу над моделированием и экспериментами.

Отдельно хочется поблагодарить своих родителей за их поддержку и веру в результат на протяжении всего времени обучения в аспирантуре и написания диссертационной работы. Очень ценной оказалось участие моего мужа, который был рядом в самые непростые моменты научной деятельности и вдохновлял на дальнейшие исследования.

Самую большую благодарность и признательность я выражаю моему научному руководителю Сапожникову Олегу Анатольевичу, вклад которого в данную работу огромен и неоценим. Спасибо за предоставленную свободу выбора в направлениях исследований, за помощь и поддержку в самых разных вопросах, за мудрое научное руководство и веру в результат.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:

A1. **Крохмаль А.А.**, Сапожников О.А., Кудан Е.В., Грядунова А.А., Цысарь С.А., Петров С.В., Перейра Ф., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., Парфенов В.А. *Создание полых цилиндрических конструктов из тканевых сфероидов с помощью акустической радиационной силы* // Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2021. Т. 85. № 6. С. 883–888. **IF = 0.8 (Scopus)**

A2. **Крохмаль А.А.**, Николаев Д.А., Цысарь С.А., Сапожников О.А. *Создание эталонной плоской ультразвуковой волны в жидкости с помощью плоского пьезоэлектрического преобразователя большого волнового размера* // Акустический журнал. 2020. Т. 66. № 5. С. 475–488. **IF = 0.782 (WoS)**

A3. **Крохмаль А.А.**, Крохмаль Н.Е., Сапожников О.А. *Расчёт акустической ловушки для упругого сферического рассеивателя большого волнового размера* // Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2022. Т. 86. № 2. С. 257–262. **IF = 0.8 (Scopus)**

A4. Parfenov V.A., Mironov V.A., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Petrov S.V, **Krokhmal A.A.**, Aydemir T., Vakhrushev I.V., Zobkov Y.V., Smirnov I.V., Fedotov A.Y., Demirci U., Khesuani Y.D., Komlev V.S. *Fabrication of calcium phosphate 3D scaffolds for bone repair using magnetc levitational assembly* // Scientific reports. 2020. V. 10. N. 1. P. 4013. **IF = 3.998 (WoS)**

A5. Parfenov V.A., Khesuani Y.D, Petrov S.V., Karalkin P.A., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Pereira F.D.A.S., **Krokhmal A.A.**, Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Vakhrushev I.V., Babichenko I.I., Kasyanov V.A., 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. V. 6. N. 29. P. eaba4174. **IF = 13.116 (WoS)**

A6. Parfenov V.A., Koudan E.V., **Krokhmal A.A.**, Annenkova E.A., Petrov S.V., Pereira F.D.A.S., Karalkin P.A., Nezhurina E.K., Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Sapozhnikov O.A., Tsysar S.A., Liu K., Oosterwijk E., van Beuningen H., van der Kraan P., Granneman S., Engelkamp H., Christianen P., Kasyanov V., Khesuani Y.D., Mironov V.A. *Biofabrication of a functional tubular construct from tissue spheroids using magnetoacoustic levitational directed assembly* // Advanced healthcare materials. 2020. V. 9. N. 24. P. 2000721. **IF = 8.273 (Scopus)**

Публикации в других рецензируемых научных изданиях:

A7. **Krokhmal A.A.**, Sapozhnikov O.A., Koudan E.V., Tsysar S.A., Khesuani Y.D., Parfenov V.A. *Assembly of a ring-shaped construct from tissue spheroids in a magneto-acoustic field* // Proceedings of Meetings on Acoustics. 2019. V. 38. N. 1. P. 020006. **IF = 0.19 (Scopus)**

A8. **Крохмаль А.А.**, Сапожников О.А., Цысарь С.А., Кудан Е.В., Нежурина Е.К., Хесуани Ю.Д., Парфенов В.А. *Биофабрикация кольцеобразного конгломерата из тканевых сфероидов в магнитоакустическом поле* // Ученые записки физического факультета Московского Университета. 2020. № 1. С. 2010902. **IF = 0.065 (РИНЦ)**

Публикации в сборниках и тезисы докладов:

A9. **Дорофеева А. А.**, Сапожников О. А., Цысарь С. А., Николаев Д. А. Плоский пьезоэлектрический преобразователь как устройство по созданию эталонного поля // Труды школы-семинара Волны-2018, секция 7, Акустоэлектроника и акустооптика. Физический факультет МГУ, Можайск, 2018. С. 13–15.

A10. **Крохмаль А. А.**, Сапожников О. А., Кудан Е. В., Цысарь С. А., Петров С. В., Перейра Ф., Хесуани Ю. Д., Энгелькамп Х., Граннеман С., Миронов В. А., Парфенов В. А. Акустическое манипулирование левитирующими в магнитном поле сферическими частицами // Труды Всероссийской акустической конференции. — ПОЛИТЕХ-ПРЕСС Санкт-Петербург, 2020. С. 309–314.

A11. **Крохмаль А. А.**, Николаев Д. А., Крохмаль Н. Е., Сапожников О. А. Моделирование акустической ловушки с помощью сервиса с графическим интерфейсом по расчету радиационной силы // Сборник трудов XXXIV сессии Российского акустического общества. ГЕОС Москва, 2022. С. 57–64.

A12. **Крохмаль А. А.**, Крохмаль Н. Е., Сапожников О. А. Сервис с графическим интерфейсом для расчета акустической радиационной силы, действующий на упругий сферический рассеватель в жидкости // Сборник трудов XXXII Всероссийской школы-семинара Волновые явления: физика и применения имени А.П. Сухорукова (Волны-2021), Секция 12. Математическое моделирование в задачах волновой физики. 2021. С. 10–11.

A13. Котельникова Л. М., **Крохмаль А. А.**, Николаев Д. А., Цысарь С. А., Сапожников О. А. Управление коэффициентом отражения звука от плоской пьезопластины путем выбора ее электрической нагрузки // Сборник трудов XXXII Всероссийской школы-семинара Волновые явления: физика и применения имени А.П. Сухорукова (Волны-2021). Секция 5. Акустоэлектроника и акустооптика. 2021. С. 20–24.

A14. **Крохмаль А. А.**, Сапожников О. А., Кудан Е. В., Цысарь С. А., Петров С. В., Перейра Ф., Хесуани Ю. Д., Энгелькамп Х., Граннеман С., Миронов В. А., Парфенов В. А. Акустическое манипулирование левитирующими в магнитном поле сферическими частицами // Программа III Всероссийской акустической конференции. Издательско-полиграфический центр Санкт-Петербургского политехнического университета СПб, 2020. С. 99–100.

A15. **Krokhmal A. A.**, Mironov V. A., Petrov S. V., Pereira F. D. A. S., Khesuani Y. D., Parfenov V. A. Fabrication of the tubular construct from polystyrene beads by acoustic radiation force in high magnetic field // Abstract book HFML - FELIX User Meeting 2019, 2019. P. 19–19.

A16. Koudan E. V., Petrov S. V., Karalkin P. A., Pereira F. D. A. S., Khesuani Y. D., Nezhurina E. K.**, Krokhmal A. A.**, Zobkov Y. V., Fedotov A. Y., Komlev V. A., Parfenov V. A. Magnetic levitation of calcium phosphate particles as new approach for 3d scaffolds biofabrication // 4th International Symposium and International

School for Young Scientists on Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine: Book of Abstracts. Moscow MEPhI, 2019. P. 168–169.

A17. Parfenov V., Khesuani Y., Petrov S., Koudan E., Nezhurina E., Pereira F., **Krokhmal A.**, Gryadunova A., Bulanova E., Vasiliev M., Brakke K., Belousov S., Grigoriev T., Osidak E., Karalkin P., Petrov O., Mironov V. Magnetic levitational bioassembly in space // TERMIS EU Abstracts 2019, 2019. V. 3. P. 1383–1383.

A18. **Krokhmal A. A.**, Sapozhnikov O. A., Koudan E. V., Tsysar S. A., Khesani Y. D., Parfenov V. A. Ring-shaped assembly of tissue spheroids in a magneto-acoustic field // Abstract Book of 2019 International Congress on Ultrasonics. Bruges, Belgium, 2019. P. 112–112.

A19. **Крохмаль А. А.**, Сапожников О. А., Кудан Е. В., Цысарь С. А., Нежурина Е. К., Хесуани Ю. Д., Парфенов В. А. Сборка кольцеобразного конструкта из тканевых сфероидов в магнитоакустическом поле // Программа и аннотации докладов XXXII-ой сессии Российского акустического общества. М.: ГЕОС, 2019. С. 108–108.

A20. Котельникова Л. М., Николаев Д. А., **Крохмаль А. А.**, Сапожников О. А. Метод взвешивания твердотельного шара в жидкости для измерения действующей на него акустической радиационной силы // Сборник трудов XXXIV сессии Российского акустического общества, ГЕОС Москва, 2022. С. 1042–1049.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ozcelik A., Rufo J., Guo F., Gu Y., Li P., Lata J., Huang T. J. Acoustic tweezers for the life sciences // *Nature methods.* 2018. V. 15. N. 12. P. 1021-1028.
2. Zhang P., Bachman H., Ozcelik A., Huang T. J. Acoustic microfluidics //*Annual Review of Analytical Chemistry*. 2020. V. 13. P. 17-43.
3. Sapozhnikov O. A., Khokhlova V. A., Cleveland R. O., Blanc-Benon P., Hamilton M. F. Nonlinear acoustics today // *Acoustics Today.* 2019. V. 15. P. 55 – 64.
4. Rufo J., Cai F., Friend J., Wiklund M., Huang T. J. Acoustofluidics for biomedical applications // *Nature Reviews Methods Primers.* 2022. V. 2. N. 1. P. 1 – 21.
5. Harper J. D., Sorensen M. D., Cunitz B. W., Wang Y.-N., Simon J. C., Starr F., Paun M., Dunmire B., Liggitt H. D., Evan A. P., McAteer J. A., His R. S., Bailey M. R. Focused ultrasound to expel calculi from the kidney: safety and efficacy of a clinical prototype device // *The Journal of Urology*. 2013. V. 190. N. 3. P. 1090-1095.
6. Friend J., Yeo L. Y. Microscale acoustofluidics: Microfluidics driven via acoustics and ultrasonics // *Reviews of Modern Physics*. 2011. V. 83. N. 2. P. 647.
7. Shi J., Ahmed D., Mao X., Lin S. C. S., Lawit A., Huang T. J. Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW) // *Lab on a Chip.* 2009. V. 9. N. 20. P. 2890 – 2895.
8. Lighthill J. Acoustic streaming // *Journal of Sound and Vibration*. 1978. V. 61. N. 3. P. 391 – 418.
9. Eckart C. Vortices and streams caused by sound waves // *Physical Review*. 1948. V. 73. N. 1. P. 68.
10. Zhang N., Horesh A., Manor O., Friend J. Powerful acoustogeometric streaming from dynamic geometric nonlinearity // *Physical Review Letters*. 2021. V. 126. N. 16. – P. 164502.
11. Liu S., Yang Y., Ni Z., Guo X., Luo L., Tu J., Zhang D., Zhang J. Investigation into the effect of acoustic radiation force and acoustic streaming on particle patterning in acoustic standing wave fields // *Sensors.* 2017. V. 17. N. 7. P. 1664.

12. Barnkob R., Augustsson P., Laurell T., Bruus H. Acoustic radiation-and streaming-induced microparticle velocities determined by microparticle image velocimetry in an ultrasound symmetry plane // *Physical Review E.* 2020. V. 86. N. 5. P. 056307.
13. Muller P. B., Barnkob R., Jensen M. J. H., Bruus H. A numerical study of microparticle acoustophoresis driven by acoustic radiation forces and streaming-induced drag forces // *Lab on a Chip*. 2012. V. 12. N. 22. P. 4617-4627.
14. Ding X., Peng Z., Lin S. C. S., Geri M., Li S., Li P., Chen Y., Dao M., Suresh S., Huang T. J. Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014. V. 111. N. 36. P. 12992 – 12997.
15. Collins D. J., Alan T., Neild A. Particle separation using virtual deterministic lateral displacement (vDLD) // *Lab on a Chip*. 2014. V. 14. N. 9. P. 1595 – 1603.
16. Guo F., Mao Z., Chen Y., Xie Z., Lata J. P., Li, P., Dao M., Suresh S., Huang T. J. Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. V. 113. N. 6. P. 1522 – 1527.
17. Westervelt P. J. The theory of steady forces caused by sound waves // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1951. V. 23. N. 3. P. 312 – 315.
18. Zhang L. From acoustic radiation pressure to three-dimensional acoustic radiation forces // *The Journal of the Acoustical Society of America.* 2018. V. 144. N. 1. P. 443 – 447.
19. Marston P. L., Zhang L. Unphysical consequences of negative absorbed power in linear passive scattering: Implications for radiation force and torque // *The Journal of the Acoustical Society of America.* 2016. V. 139. N. 6. P. 3139 – 3144.
20. Zhang L., Marston P. L. Angular momentum flux of nonparaxial acoustic vortex beams and torques on axisymmetric objects // *Physical Review E*. 2011. V. 84. N. 6. P. 065601.
21. Silva G. T. Acoustic radiation force and torque on an absorbing compressible particle in an inviscid fluid // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2014. V. 136. N. 5. P. 2405 – 2413.

22. Karlsen J. T., Bruus H. Forces acting on a small particle in an acoustical field in a thermoviscous fluid // *Physical Review E*. 2015. V. 92. N. 4. P. 043010.
23. Mitri F. G. Acoustic radiation force acting on elastic and viscoelastic spherical shells placed in a plane standing wave field // *Ultrasonics*. 2005. V. 43. N. 8. P. 681 – 691.
24. Hasegawa T., Saka K., Inoue N., Matsuzawa K. Acoustic radiation force experienced by a solid cylinder in a plane progressive sound field // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1988. V. 83. N. 5. P. 1770 – 1775.
25. Silva G. T. An expression for the radiation force exerted by an acoustic beam with arbitrary wavefront (L) // *The Journal of the Acoustical Society of America.* 2011. V. 130. N. 6. P. 3541 – 3544.
26. Doinikov A. A. Acoustic radiation interparticle forces in a compressible fluid // *Journal of Fluid Mechanics*. 2001. V. 444. P. 1 – 21.
27. Sapozhnikov O.A., Bailey M.R. Radiation force of an arbitrary acoustic beam on an elastic sphere in a fluid // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2013. V. 133, №. 2. P. 661 – 676.
28. Gong Z., Baudoin M. Equivalence between angular spectrum-based and multipole expansion-based formulas of the acoustic radiation force and torque // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2021. V. 149. N. 5. P. 3469 – 3482.
29. Sapozhnikov O.A., Tsysar S.A., Khokhlova V.A., Kreider W. Acoustic holography as a metrological tool for characterizing medical ultrasound sources and fields // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2015. V. 138. №. 3. P. 1515 – 1532.
30. Цысарь С.А., Синельников Е.Д., Сапожников О.А. Применение метода акустической голографии для исследования ультразвуковых источников цилиндрической формы // *Акуст. журн*. 2011. Т. 57. №. 1. С. 104 – 116.
31. Горьков Л. П. О силах, действующих на малую частицу в акустическом поле в идеальной жидкости // *Доклады Академии наук. Российская академия наук.* 1961. Т. 140. №. 1. С. 88 – 91.
32. Jerome T. S., Ilinskii Y. A., Zabolotskaya E. A., Hamilton M. F. Born approximation of acoustic radiation force and torque on soft objects of arbitrary shape // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2019. V. 145. N. 1. P. 36-44.

33. Cai F., Meng L., Jiang C., Pan Y., Zheng H. Computation of the acoustic radiation force using the finite-difference time-domain method // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2010. V. 128. N. 4. P. 1617 – 1622.
34. Wijaya F. B., Lim K. M. Numerical calculation of acoustic radiation force and torque acting on rigid non-spherical particles // *Acta Acustica united with Acustica*. 2015. V. 101. N. 3. P. 531-542.
35. Baasch T., Pavlic A., Dual J. Acoustic radiation force acting on a heavy particle in a standing wave can be dominated by the acoustic microstreaming // *Physical Review E*. 2019. V. 100. N. 6. P. 061102.
36. Dual J., Hahn P., Leibacher I., Möller D., Schwarz T. Acoustofluidics 6: Experimental characterization of ultrasonic particle manipulation devices // *Lab on a Chip*. 2012. V. 12. N. 5. P. 852 – 862.
37. Zhou Q., Lam K. H., Zheng H., Qiu W., Shung K. K. Piezoelectric single crystal ultrasonic transducers for biomedical applications // *Progress in materials science.* 2014. V. 66. P. 87 – 111.
38. Özer M. B., Çetin B. An extended view for acoustofluidic particle manipulation: Scenarios for actuation modes and device resonance phenomenon for bulk-acoustic-wave devices // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2021. V. 149. N. 4. P. 2802 – 2812.
39. Харкевич А. А. Теория электроакустических преобразователей. Избранные труды в трех томах. Т. 1. М.: Наука, 1973.
40. Uchino K., Zheng J. H., Chen Y. H., Du X. H., Ryu J., Gao Y., Ural S., Hirose S. Loss mechanisms and high power piezoelectrics // *Journal of Materials Science.* 2006. V. 41. N. 1. P. 217 – 228.
41. Barmatz M., Collas P. Acoustic radiation potential on a sphere in plane, cylindrical, and spherical standing wave fields // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1985. V. 77. N. 3. P. 928 – 945.
42. Coakley W. T., Bardsley D. W., Grundy M. A., Zamani F., Clarke D. J. Cell manipulation in ultrasonic standing wave fields // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 1989. V. 44. N. 1. P. 43 – 62.

43. Saito M., Daian T., Hayashi K., Izumida S. Y. Fabrication of a polymer composite with periodic structure by the use of ultrasonic waves // *Journal of applied physics*. 1998. V. 83. N. 7. P. 3490 – 3494.
44. Melde K., Mark A. G., Qiu T., Fischer P. Holograms for acoustics // *Nature.* 2016. V. 537. N. 7621. P. 518 – 522.
45. Ding X., Li P., Lin S. C. S., Stratton Z. S., Nama N., Guo F., Slotcavage D., Mao X., Shi J., Constanzo F., Huang T. J. Surface acoustic wave microfluidics // *Lab on a Chip.* 2013. V. 13. N. 18. P. 3626 – 3649.
46. Destgeer G., Sung H. J. Recent advances in microfluidic actuation and micro-object manipulation via surface acoustic waves // *Lab on a Chip*. 2015. V. 15. N. 13. P. 2722 – 2738.
47. Fu Y. Q., Pang H. F., Torun H., Tao R., McHale G., Reboud J., Tao K., Zhou J., Gibson D., Luo J., Hu P. Engineering inclined orientations of piezoelectric films for integrated acoustofluidics and lab-on-a-chip operated in liquid environments // *Lab on a Chip*. 2021. V. 21. N. 2. P. 254 – 271.
48. Shilton R., Tan M. K., Yeo L. Y., Friend J. R. Particle concentration and mixing in microdrops driven by focused surface acoustic waves. // *Journal of Applied Physics.* 2008. V. 104. N. 1. P. 014910.
49. Ding X., Shi J., Lin S. C. S., Yazdi S., Kiraly B., Huang T. J. Tunable patterning of microparticles and cells using standing surface acoustic waves // *Lab on a Chip.* 2012. V. 12. N. 14. P. 2491 – 2497.
50. Shi J., Ahmed D., Mao X., Lin S. C. S., Lawit A., Huang T. J. Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW) // *Lab on a Chip.* 2009. V. 9. N. 20. P. 2890 – 2895.
51. Riaud A., Baudoin M., Matar O. B., Becerra L., Thomas, J. L. Selective manipulation of microscopic particles with precursor swirling Rayleigh waves // *Physical Review Applied*. 2017. V. 7. N. 2. P. 024007.
52. Tian Z., Yang S., Huang P. H., Wang Z., Zhang P., Gu, Y., Bachman H., Chen C., Wu M., Xie Y., Huang, T. J. Wave number–spiral acoustic tweezers for dynamic and

reconfigurable manipulation of particles and cells // *Science Advances*. 2019. V. 5. N. 5. P. eaau6062.

53. Zhang N., Mei J., Gopesh T., Friend J. Optimized, Omnidirectional Surface Acoustic Wave Source: 152° Y-Rotated Cut of Lithium Niobate for Acoustofluidics // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control.* 2020. V. 76. N. 10. P. 2176 – 2186.
54. Starritt H. C. Radiation force and its possible biological effects // *The Safe Use of Ultrasound in Medical Diagnosis.* 2012. V. 3. P. 81 – 90.
55. Ding X., Lin S. C. S., Kiraly B., Yue H., Li S., Chiang I. K., Shi J., Benkovic S.J., Huang T. J. On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. V. 109. N. 28. P. 11105 – 11109.
56. Guo F., Li P., French J. B., Mao Z., Zhao H., Li S., Nama N., Fick J. R., Benkovic S. J., Huang T. J. Controlling cell–cell interactions using surface acoustic waves // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. V. 112. N. 1. P. 43 – 48.
57. Guo F., Mao Z., Chen Y., Xie Z., Lata J. P., Li P., Ren L., Liu J., Yang J., Dao M., Suresh S., Huang T. J. Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. V. 113. N. 6. P. 1522 – 1527.
58. Collins D. J., Morahan B., Garcia-Bustos J., Doerig C., Plebanski M., Neild A. Two-dimensional single-cell patterning with one cell per well driven by surface acoustic waves // *Nature Communications*. 2015. V. 6. N. 1. P. 1 – 11.
59. Sitters G., Kamsma D., Thalhammer G., Ritsch-Marte M., Peterman E. J., Wuite G. J. Acoustic force spectroscopy // *Nature Methods.* 2015. V. 12. N. 1. P. 47 – 50.
60. Kamsma D., Bochet P., Oswald F., Alblas N., Goyard S., Wuite G. J., Peterman E. J. G., Rose T. Single-cell acoustic force spectroscopy: resolving kinetics and strength of T cell adhesion to fibronectin // *Cell Reports.* 2018. V. 24. N. 11. P. 3008 – 3016.

61. Pantel K., Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives // *Trends in Molecular Medicine*. 2010. V. 16. N. 9. P. 398 – 406.
62. Simpson R. J., Lim J. W., Moritz R. L., Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential // *Expert Review of Proteomics*. 2009. V. 6. N. 3. P. 267 – 283.
63. Lee K., Shao H., Weissleder R., Lee H. Acoustic purification of extracellular microvesicles // *ACS nano*. 2015. V. 9. N. 3. P. 2321 – 2327.
64. Augustsson P., Magnusson C., Nordin M., Lilja H., Laurell T. Microfluidic, label-free enrichment of prostate cancer cells in blood based on acoustophoresis // *Analytical Chemistry.* 2012. V. 84. N. 18. P. 7954 – 7962.
65. Olofsson K., Hammarström B., Wiklund M. Ultrasonic based tissue modelling and engineering // *Micromachines*. 2018. V. 9. N. 11. P. 594.
66. Achilli T. M., Meyer J., Morgan J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012. V. 12. N. 10. P. 1347 – 1360.
67. Chatzinikolaidou M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation // *Drug Discovery Today*. 2016. V. 21. N. 9. P. 1553 – 1560.
68. Mironov V., Visconti R. P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C. J., Markwald R. R. Organ printing: tissue spheroids as building blocks // *Biomaterials.* 2009. V. 30. N. 12. P. 2164 – 2174.
69. Bulanova E. A., Koudan E. V., Degosserie J., Heymans C., Pereira F. D., Parfenov V. A., Sun Y., Wang Q., Akhmedova S. A., Sviridova I. K., Sergeeva N. S., Frank G. A., Khesuani Y. D., Pierreux C. E., Mironov V. A. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct // *Biofabrication.* 2017. V. 9. N. 3. 034105.
70. Olofsson K., Carannante V., Ohlin M., Frisk T., Kushiro K., Takai M., Lundqvist A., Onfelt B., Wiklund M. Acoustic formation of multicellular tumor spheroids enabling on-chip functional and structural imaging // *Lab on a Chip*. 2018. V. 18. N. 16. P. 2466 – 2476.

71. Armstrong J. P., Puetzer J. L., Serio A., Guex A. G., Kapnisi M., Breant A. et al. Engineering anisotropic muscle tissue using acoustic cell patterning // *Advanced Materials*. 2018. V. 30. N. 43. P. 1802649.
72. Kang B., Shin J., Park H. J., Rhyou C., Kang D., Lee S. J. et al. High-resolution acoustophoretic 3D cell patterning to construct functional collateral cylindroids for ischemia therapy // *Nature Communications.* 2018. V. 9. N. 1. P. 1 – 13.
73. Ma Z., Holle A. W., Melde K., Qiu T., Poeppel K., Kadiri V. M., Fischer P. Acoustic holographic cell patterning in a biocompatible hydrogel // *Advanced Materials.* 2020. V. 32. N. 4. P. 1904181.
74. Priya S. G., Jungvid H., Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2008. V. 14. N. 1. P. 105 – 118.
75. Basu J., Ludlow J. W. Platform technologies for tubular organ regeneration // *Trends in biotechnology.* 2010. V. 28. N. 10. P. 526 – 533.
76. Weinberg C. B., Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells // *Science*. 1986. V. 231. N. 4736. P. 397 – 400.
77. L'heureux, N., Paquet, S., Labbé, R., Germain, L., Auger, F. A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel // *The FASEB Journal.* 1998. V. 12. N. 1. P. 47 – 56.
78. Seliktar D., Black R. A., Vito R. P., Nerem, R. M. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro // *Annals of Biomedical Engineering.* 2020. V. 28. N. 4. P. 351 – 362.
79. Kubo H., Shimizu T., Yamato M., Fujimoto T., Okano T. Creation of myocardial tubes using cardiomyocyte sheets and an in vitro cell sheet-wrapping device // *Biomaterials.* 2007. V. 28. N. 24. P. 3508 – 3516.
80. De Filippo R. E., Kornitzer B. S., Yoo J. J., Atala A. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2015. V. 9. N. 3. P. 257 – 264.
81. Raya-Rivera A., Esquiliano D. R., Yoo J. J., Lopez-Bayghen E., Soker S., Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study // *The Lancet.* 2011. V. 377. N. 9772. P. 1175 – 1182.

82. Zhang K., Fu Q., Yoo J., Chen X., Chandra P., Mo X. 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment // *Acta Biomaterialia.* 2017. V. 50. P. 154 – 164.
83. Itoh M., Nakayama K., Noguchi R., Kamohara K., Furukawa K., Uchihashi K. Scaffold-free tubular tissues created by a bio-3D printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in rat aortae // *PloS One.* 2015. V. 10. N. 9. P. e0136681.
84. Norotte C., Marga F. S., Niklason L. E., Forgacs G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting // *Biomaterials. 2009. V. 30. N. 30. P.* 5910 – 5917.
85. Tasoglu S., Yu C. H., Liaudanskaya V., Guven S., Migliaresi C., Demirci U. Biomaterials: Magnetic Levitational Assembly for Living Material Fabrication (Adv. Healthcare Mater. 10/2015) // *Advanced Healthcare Materials.* 2015. V. 4. N. 10. P. 1420 – 1420.
86. Parfenov V. A., Koudan E. V., Bulanova E. A., Karalkin P. A., Pereira F. D., Norkin N. E., Knyazeva A. D., Gryadunova A. A., Petrov O. F., Vasiliev M. M., Myasnikov M. I., Chernikov V. P., Kasyanov V. A., Marchenkov A. Yu., Brakke K., Khesuani Y. D., Demirci U., Mironov V. A. Scaffold-free, label-free and nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly // *Biofabrication.* 2018. V. 10. N. 3. P. 034104.
87. García-Gareta E., Coathup M. J., Blunn G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration // *Bone.* 2015. V. 81. P. 112 – 121.
88. Raksujarit A., Pengpat K., Rujijanagul G., Tunkasiri T. Processing and properties of nanoporous hydroxyapatite ceramics // *Materials & Design.* 2010. V. 31. N. 4. P. 1658 – 1660.
89. Elliott J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier, 2013.
90. Brown W. E., Smith J. P., Lehr J. R., Frazier, A. W. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite // *Nature.* 1962. V. 196. N. 4859. P. 1050 – 1055.

91. Баринов С. М., Комлев В. С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. 2005.
92. Komlev V. S., Popov V. K., Mironov A. V., Fedotov A. Y., Teterina A. Y., Smirnov I. V. 3D printing of octacalcium phosphate bone substitutes // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015. V. 3. P. 81.
93. Chen B., Liu J. Mechanical properties of polymer-modified concretes containing expanded polystyrene beads // *Construction and Building Materials*. 2007. V. 21. N. 1. P. 7 – 11.
94. Koudan E. V., Gryadunova A. A., Karalkin P. A., Korneva J. V., Meteleva N. Y., Babichenko I. I. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells // *Biotechnology Journal*. 2020. V. 15. N. 5. P. 1900217.
95. Bouslama N., Chevalier Y., Bouaziz J., Ayed F. B. Influence of the sintering temperature on Young's modulus and the shear modulus of tricalcium phosphate–fluorapatite composites evaluated by ultrasound techniques // *Materials Chemistry and Physics*. 2013. V. 141. N. 1. P. 289 – 297.
96. Тихонов А.Н., Самарский А.А. Уравнения математической физики. Наука. М., 1966.
97. COMSOL Multiphysics User's Guide© COPYRIGHT 1998–2010.
98. Yarin A. L., Pfaffenlehner M., Tropea C. On the acoustic levitation of droplets // *Journal of Fluid Mechanics*. 1998. V. 356. P. 65 – 91.
99. https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/c7231
100. Culjat M. O., Goldenberg D., Tewari P., Singh R. S. A review of tissue substitutes for ultrasound imaging // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2010. V. 36. N. 6. P. 861 – 873.
101. https://github.com/nkrokhmal/rfc_calculation
102. Schafer M. E., Lewin P. A. Transducer characterization using the angular spectrum method // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1989. V. 85. N. 5. P. 2202 – 2214.
103. Grinberg M. Flask web development: developing web applications with python. "O'Reilly Media, Inc.", 2018.

104. Momjian B. PostgreSQL: introduction and concepts. New York : Addison-Wesley, 2001. V. 192.
105. Bhat S., Bhat S., Karkal. Practical Docker with Python. Bangalore : Apress, 2018.
106. Николаева А. В., Карзова М. М., Цысарь С. А., Хохлова В. А., Сапожников О. А. Численное и экспериментальное исследование акустической радиационной силы, действующей в поле фокусированного излучателя на упругую сферу в воде // *Известия Российской Академии Наук. Серия физическая*. 2019. Т. 83. № 1. С. 91 – 95.
107. Baresch D., Thomas J. L., Marchiano R. Spherical vortex beams of high radial degree for enhanced single-beam tweezers // *Journal of Applied Physics*. 2013. V. 113. N. 18. P. 184901.
108. Baresch D., Thomas J. L., Marchiano R. Observation of a single-beam gradient force acoustical trap for elastic particles: acoustical tweezers // *Physical Review Letters*. 2016. V. 116. N. 2. P. 024301.
109. Marzo A., Seah S. A., Drinkwater B. W., Sahoo D. R., Long B., Subramanian S. Holographic acoustic elements for manipulation of levitated objects. // *Nature Communications*. 2015. V. 6. N. 1. P. 1 – 7.
110. Ghanem M.A., Maxwell A.D., Sapozhnikov O.A., KhokhlovaV.A., Bailey M.R. Quantification of acoustic radiation forces on solid objects in fluid // *Physical Review Applied*. 2019. V. 12. P. 044076 (1–13).
111. Ghanem M. A., Maxwell A. D., Wang Y. N., Cunitz B. W., Khokhlova V. A., Sapozhnikov O. A., Bailey M. R. Noninvasive acoustic manipulation of objects in a living body // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2020. V. 117. N. 29. P. 16848 – 16855.
112. Сапожников О.А., Смагин М.А. Нахождение дисперсионных зависимостей для волн лэмбовского типа в вогнутой пьезоэлектрической пластине посредством оптической визуализации излучаемого в жидкость ультразвукового поля // *Акустический журнал*. 2015. Т. 61. №2. С.199 – 206.
113. Berry M. V., Geim A. K. Of flying frogs and levitrons // *European Journal of Physics.* 1997. V. 18. N. 4. P. 307.

114. Winkleman A., Gudiksen K. L., Ryan D., Whitesides G. M., Greenfield D., Prentiss M. A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer // *Applied Physics Letters*. 2004. V. 85. N. 12. P. 2411 – 2413.
115. Alnaimat F., Dagher S., Mathew B., Hilal-Alnqbi A., Khashan, S. Microfluidics based magnetophoresis: A review // *The Chemical Record.* 2018. V. 18. N. 11. P. 1596 – 1612.
116. Kimura T., Mamada S., Yamato M. Separation of solid polymers by magneto-Archimedes levitation // *Chemistry Letters*. 2000. V. 29. N. 11. P. 1294 – 1295.
117. Weis J., Nilsson S., Ericsson A., Wikström M., Sperber G. O., Hemmingsson A. Measurement of magnetic susceptibility and MR contrast agent concentration // *Magnetic Resonance Imaging*. 1994. V. 12. N. 6. P. 859 – 864.
118. Josephson L., Bigler J., White D. The magnetic properties of some materials affecting MR images // *Magnetic Resonance in Medicine*. 1991. V. 22. N. 2. P. 204 – 208.
119. Hopkins J. A., Wehrli F. W. Magnetic susceptibility measurement of insoluble solids by NMR: magnetic susceptibility of bone // *Magnetic Resonance in Medicine.* 1997. V. 37. N. 4. P. 494 – 500.
120. Ibeh C. C. Thermoplastic materials: properties, manufacturing methods, and applications. CRC Press, 2011.
121. Roby T., Olsen S., Nagatomi J. Effect of sustained tension on bladder smooth muscle cells in three-dimensional culture // *Annals of Biomedical Engineering.* 2008. V. 36. N. 10. P. 1744 – 1751.
122. Stoddart M. J. Cell viability assays: introduction // *Mammalian Cell Viability*. 2011. P. 1 – 6.