

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**РАЗРАБОТКА МИКРОНАСАДКИ ДЛЯ ЭКСТРУДЕРА 3Д ПРИНТЕРА,
ПЕЧАТАЮЩЕГО КЛЕТОЧНЫМИ СФЕРОИДАМИ**

Магистерская диссертация
обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001641
Афанасьева Андрея Юрьевича

Научный руководитель
к.б.н., доцент
Надеждин С. В.

Рецензент
Директор ООО «Клеточные
технологии – НИУ БелГУ»
Назаренко М.Е.

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы	5
1.1. 3D-принтеры и применение их в медицине.....	5
1.2. Процесс печати на 3D-принтере.....	10
1.3. Приготовление сфероидов.....	18
1.4. Системы для инкапсуляции клеток.....	30
1.5. Микроинструменты для микрохирургии и микроманипуляций с клетками.....	33
1.6. Материалы и оборудование для изготовления микроинструментов.....	54
Глава 2. Материал и методы исследования.....	63
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	72
Выводы	82
Список использованных источников.....	83
Приложения.....	94

Введение

3D-принтер – это новое устройство для печати трехмерных моделей. 3D-принтер позволяет выводить трехмерную информацию, т.е. создавать определенные физические объекты. В основе печати на 3D-принтере лежит принцип послойного наращивания вещества в различных состояниях.

Экспериментальное развитие печати органов началось около десяти лет тому назад. На первом этапе это больше всего походило на создание деталей для конструктора «Лего», когда исследователи могли получать лишь отдельные фрагменты той или иной ткани. Затем появилась возможность создавать сегменты внутреннего органа, уже снабженные сосудистой сетью, что стало определяющим этапом развития новой технологии.

Технология биопринтинга базируется на известном явлении самосборки (направленной самоорганизации) клеточных структур. Этот процесс, управляемый силами поверхностного натяжения и межбелковыми взаимодействиями, повсеместно встречается в живом мире, начиная от формирования клеточных мембран и заканчивая образованием органов у эмбриона.

Современные 3D технологии применяются во многих сферах жизни общества. Стремительное совершенствование этих технологий позволяет использовать 3D принтеры в самых различных областях науки и техники. Сегодня уникальные методы современной печати активно применяются в медицине и дальнейшие перспективы их применения безграничны.

Данная тема актуальна, так как в настоящее время стали интенсивно использовать 3D-принтеры для печати органов и тканей, а разработка насадки для экструдера позволяют улучшить условия печати клеточными сфероидами, так как это позволяет задавать и регулировать параметры выходного биоматериала из экструдера.

Цель работы – разработать микронасадку для экструдера 3D биопринтера печатающего клеточными сфероидами.

Для достижения поставленной цели были определены задачи:

1. Определить материал для изготовления стеклянной части микронасадки;
2. Разработать технологию изготовления суживающейся части микронасадки;
3. Разработать опытный образец микронасадки для экструдера 3D биопринтера;
4. Провести испытания микронасадки с использованием клеточных сфероидов.

Объект исследования: объектом исследования является микронасадка 3D-принтера для экструдера и параметры при которых она изготавливается.

Предмет научного исследования: разработка технологии изготовления микронасадки для экструдера 3D-принтера и возможность ее применения при печати клеточными сфероидными.

Научная новизна: в ходе проделанной работы были созданы микронасадка для экструдера 3D-принтера, которая способна печатать клеточными сфероидными. Данный микроинструмент был изготовлен на новом оборудовании различных компаний США и Японии. В России мало организаций, которые занимаются разработками данного типа.

Практическая значимость: разработанная микронасадка может быть использована в технологии 3D биопринтинга, которое нуждается в интенсивном развитии.

Структура работы: магистерская диссертация изложена на 89 страницах. Она состоит из оглавления, введения, трех основных разделов, выводов. Список использованных источников включает 110 наименований. В работе используется 43 рисунка и приложения.

Глава 1. Обзор литературы по теме исследования

1.1. 3Д-принтеры и применение их в медицине

Биопечать – это относительно новое направление в, которое появилось благодаря стремительному развитию аддитивных технологий. В настоящее время ученые всего мира усиленно работают над созданием многофункциональных принтеров, способных печатать работоспособные органы, такие как сердце, почки и печень [<http://make-3d.ru>].

Биопри́нтер – это биологическая вариация технологии RepRap, устройство, способная укладывать клетки в том порядке в котором необходимо, и придавать определенный вид ткани или органа, нанося клетки слой за слоем. В настоящее время все биопринтеры являются экспериментальными [<http://ifuture.livejournal.com>].

Несколько экспериментальных биопри́нтеров уже было создано в 2002 году японским ученым профессором Макото Накамура. Накамура долго изучал искусственные сердца в лабораторных условиях, но пришел к выводу, что они не могут быть альтернативой донорскому сердцу. Он заметил, что капли чернил в стандартном струйном принтере имеют сходный размер, как клетки человека. В 2002 году Накамура приобрел стандартный принтер Epson и попытался «укомплектовать» его клетками, но они закупоривали сопла. Когда ученый объяснил, что он хотел бы печатать клетками, компания Epson поддержала его идею. В 2003 г. Накамура сообщил, что клетки успешно переживают процесс печатания. Японский ученый одним из первых, создал трехмерную структуру из реальных живых клеток при помощи принтера. Чтобы клетки не высыхали и сохраняли трехмерную форму, они хранятся в специальном растворе альгината натрия и печатаются в хлориде кальция. В 2008 году он создал рабочую модель биопри́нтера, которая осуществляет печать биотрубочек, похожих на кровеносные сосуды [<http://2000.net.ua>].

Другим представителем в области биопечати является компания Organovo, которая была создана исследовательской группой под руководством профессора Габора Форгача из университета Миссури. С марта 2008 года Organovo задалась целью создать технологии биопечати функционирующих кровеносных сосудов и сердечной ткани с помощью клеток, полученных из тканей цыпленка. Эта работа опирается на прототип биопринтера с тремя печатающими головками. Первые две головки выводят кардио- и эндотелиальные клетки, в то время как третья выделяет коллагеновую основу – так называемую «био-бумагу» – для поддержки клеток во время печати. С 2008 года Organovo работала с компанией Invetech для создания коммерческих биопринтеров под названием NovoGen MMX. В этот биопринтер загружаются биочернильные сфероиды, наполненные десятками тысяч клеток. При печати NovoGen создает первый слой на биобумаге, изготовленной из коллагена, желатина или других гидрогелей. Затем в него вводятся (впрыскиваются) биочернильные сфероиды.

Слой добавляется за слоем до создания конечного объекта. Биочернильные сфероиды медленно сливаются. После этого биобумага растворяется или удаляется другим способом, и в результате получается ткань, напечатанная с помощью биопринтера. В декабре 2010 года компания Organovo создала при помощи биопринтера первые кровеносные сосуды с использованием клеток, полученных от одного донора. Компания так же успешно имплантировала нервы, созданные при помощи биопринтера, крысам, а эксперименты по пересадке созданных таким методом тканей человеку запланированы на 2015 год [<http://www.organovo.com>].

В настоящее время команда исследователей биопечати под руководством Энтони Атала из Института регенеративной медицины Уэйк Фореста создали гибридный 3D биопринтер, сочетающий в себе функции обычного струйного принтера и электропрядильной машины. В результате, с его помощью ученым удалось «напечатать» гибкую и прочную хрящевую ткань. Ученые протестировали механические свойства полученной ткани и ее

биосовместимость. Имплантированные мышам образцы через 8 недель сохранили все свойства, и даже начали производить коллаген и глюкозаминогликаны, как настоящая хрящевая ткань. В будущем ученые надеются создавать образцы ткани, строго подходящие по форме и структуре к дефектным частям человеческого тела, например, при повреждении суставов, и заменять поврежденную ткань искусственным аналогом [<http://pitbit.ru>].

Примечательно, что уже сегодня опытные образцы биопринтеров способны напечатать костные и хрящевые импланты, а также создать сложные биологические продукты питания, в состав которых входят жиры, белки, углеводы и витамины. Проблема недостатка донорских органов для пересадки вынуждает находить биомедицинские решения. Технологии регенеративной медицины в наше время считаются более многообещающими. К ним относят генную и клеточную терапию и инжиниринг тканей. В последнее время быстрое формирование получило еще одно направление регенеративной медицины 3D-биопринтинг. Сущность способа заключается в производстве тканей и органов из конгломератов клеток. Осуществляют эту производство, либо биопечать, на специально созданных 3D-биопринтерах, сходственно тому как печатают на 3D-принтерах разные подробности послойно, сообразно числовой (компьютерной) трёхмерной модели. Картриджи принтеров при данном заправляют сфероидными конгломератами клеток, которые «капают» на особую подложку необыкновенную биобумагу. Напечатав первый слой из клеточных сфероидов, поверх наносят второй «срастается» с главным. Этак равномерно получают большой активный предмет ткань либо орган. Вотан из пионеров в области биопечати органов и биофабрикации тканей Владимир Александрович Миронов, доктор института Вирджинии (Virginia Commonwealth University, USA) и академический управляющий фирмы «3D Bioprinting Solutions» (Российская Федерация). В количестве его исследований установка для изготовления тканевых сфероидов и гидрогель

для получения больших тканевых конструкторов. Конкретно таковой гидрогель исполняет роль «биобумаги» для биопечати [Миронов, 2013].

К 2010 году стала известной компания Organovo, которая одна из первых запустила процесс биопечати. В настоящее время компания занимается печатью образцов человеческой печени. Однако эти органы еще не полнофункциональны, их нельзя, к примеру, использовать для трансплантации. Но они нашли себе применение в фармакологии для проверки воздействия на печень различных лекарств. Следующей целью компании является создание полнофункциональной печени. Несмотря на огромную работу, проделанную в исследовании биопечати, Organovo пока не готова к выпуску подобных образцов [<http://yvek.ru>].

Сегодня под общим названием «биопринтинг» скрываются сразу несколько косвенно связанных технологий биопечати. Для создания органов на 3D принтере могут использоваться фоточувствительный гидрогель, порошковый наполнитель или специальная жидкость.

В зависимости от используемой машины, рабочий материал подается из диспенсера под видом постоянной струи или дозированными капельками. Такой подход используется для создания мягких тканей с низкой плотностью клеток – штучной кожи и хрящей. Костные импланты печатаются методом послойного наплавления из полимеров натурального происхождения.

3D принтеры позволяют хирургам быстро производить недорогие 3D модели для получения информации, что сокращает время операции, улучшает коммуникацию между пациентом и врачом и ускоряет выздоровление больного. Созданные при помощи 3D-принтера ткани покрываются полимерной пленкой, которая после полного заживления самостоятельно растворяется. При помощи 3D-принтеров разработали бионическое ухо, которое содержит живые клетки, а также антенну, чувствительную к радиоволнам. Научились создавать небольшие искусственные фрагменты печени, используя для этого 3D принтер. Разрабатывают методику восстановления поврежденных межпозвоночных

дисков с помощью 3D принтера. С помощью 3D принтеров печатают многие протезы, причем с учетом индивидуальных особенностей человека [Козыренко, 2011].

Самый современный метод пересадки органов человеку – трёхмерная печать органов. Данный метод имеет целый ряд преимуществ: во-первых – не нужны неорганические каркасы (клетки сами себя прекрасно держат), во-вторых – не нужен донор, следовательно, этот метод является самым гуманным и доступным.

Пациент дает немного своего биологического материала, например, жировую тканью, из неё методом последовательной обработки клеток выделяют необходимые элементы для формирования органа. После этого на компьютере разрабатывается 3D модель органа, которая затем отправляется на 3D принтер для дальнейшей печати органа. Данные 3D-принтеры способны «печатать» человеческими клетками и понимает, в какую точку трехмерного пространства ему нужно «уложить» конкретный тип клетки. Принтер печатает слоями по 250 микрон: это баланс между оптимальным размером блока и риском гипоксии в сфероиде. За полчаса можно напечатать тканево-инженерную конструкцию 10x10 сантиметров – но это ещё не орган, а тканево-инженерная конструкция. Чтобы конструкция стала органом, она должна жить, иметь чёткую форму, нести функции. Для того чтобы напечатанный орган мог функционировать в процессе фабрикации, необходима микроциркуляция. Данная проблему можно решить при помощи сразу напечатанных настоящих сосудов (капилляров) и тончайших перфузионных отверстий, проделываемых неорганическими инструментами (грубо говоря, конструкционные блоки поступают на полимерном «шампуре», который потом вынимается). После печати орган помещается в биореактор. Это сосуд с контролируемой средой, в котором на входы и выходы органа подаются нужные вещества, плюс обеспечивается ускоренное созревание за счёт воздействия факторами роста [Телепнева, 2015].

Непрерывное развитие цифровых информационных технологий и оборудования привели к идее послойного создания (выращивания) материальных объектов на основе цифровой 3D-модели и разработке периферийного устройства – 3D-принтера, позволяющего послойно создавать физические объекты по цифровой 3D-модели. В зарубежных источниках данный тип устройств называют фабберами, а процесс трехмерной печати – быстрым прототипированием (Rapid Prototyping). Таким образом, 3D-печать – это метод прототипирования (создания прототипа, модели предмета), позволяющий из математической модели, разработанной в специальной CAD-системе, при помощи 3D-принтера получить послойно созданный физический объект. Технологии 3D-печати находят широкое применение.

1.2. Процесс печати на 3D-принтере

Печатающая часть 3D-принтера состоит из трех экструдеров: две форсунки с гелем и устройство, выдающее тканевые сфероиды (рис. 1). В первой форсунке с гелем – тромбин, во второй – фибриноген. Данные два геля обладают относительной стабильностью, до тех пор, пока не взаимодействуют. Но когда белок фибриноген расщепляется тромбином, образуется фибрин-мономер. Именно им как бетоном скрепляются тканевые сфероиды.



Рис. 1. Уплотнение ткани

В зависимости от глубины слоя, который соответствует диаметру сфероида, можно поочередно наносить материал ряд за рядом, следующий слой можно укладывать только после того как предыдущий был закреплен. Затем фибрин легко деградирует в среде и вымывается при перфузии, и остаётся только нужная ткань (рис. 2).

Используемым материалом является – тканевые сфероиды, которыми будет печатать принтер. В качестве основы используется гидрогель, выполняющий функции соединительной структуры. Затем 3D-принтер печатает орган из этих вот тканевых сфероидов.

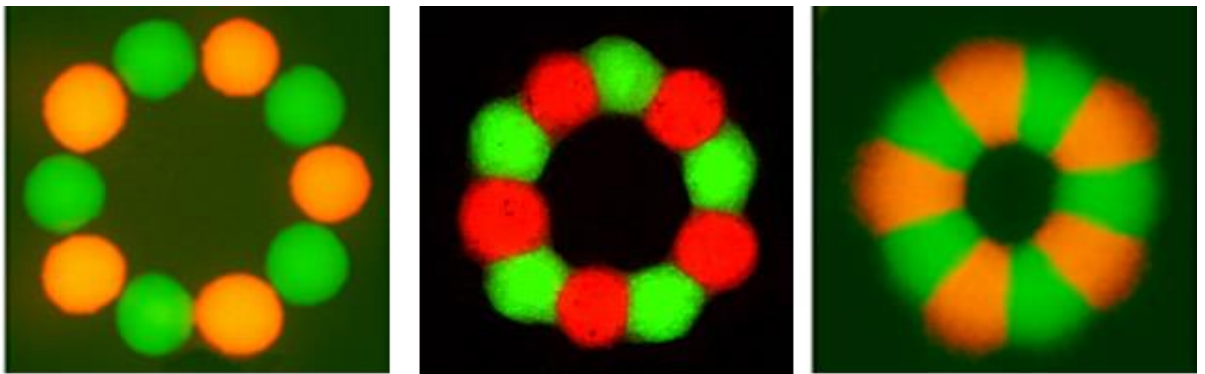


Рис. 2. Тканевое объединение нескольких типов клеток без смешения

Лучшим материалом для биопечати являются человеческие эмбриональные стволовые, они являются универсальными клетками, из них можно сделать клетки для любой ткани последовательной дифференцировкой. Эти клетки можно брать путем iPS – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Их можно сделать из костного мозга, пульпы зуба или обычной жировой ткани пациента – и их производят различные компании по всему миру.

Схема такая: человек обращается в клинику, делает липосакцию, жировая ткань замораживается и кладётся в репозиторий. При необходимости – достаётся, из неё делаются нужные клетки (ATDSC, один такой комплекс есть в России) и затем дифференцируются по назначению. Например, из фибробластов можно сделать iPS, из них – почечный эпителий,

а дальше – функциональный эпителий. Машины для автоматического получения таких клеток производятся General Electric (рис. 3).

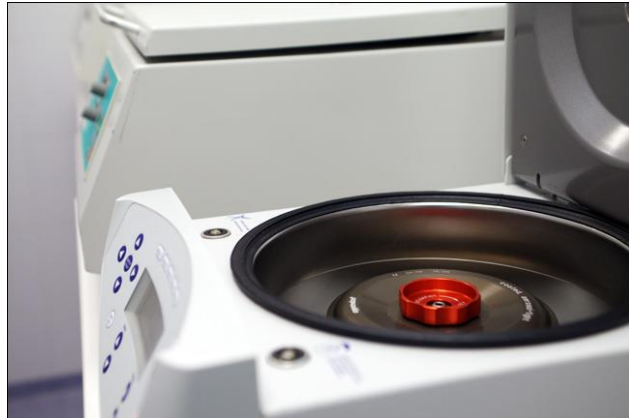


Рис. 3. Центрифуга. Первый этап отделения материала из жировой ткани

Из этих клеток формируются шарики в специальных микроуглублениях на твёрдом материале. В углубление на молде помещается клеточная суспензия, затем клетки срачиваются, и образуется шарик. Точнее – не очень ровный сфероид.

Принтер печатает слоями по 250 микрон: это баланс между оптимальным размером блока и риском гипоксии в сфероиде. За полчаса можно напечатать тканево-инженерную конструкцию 10x10 сантиметров – но это ещё не орган, а тканево-инженерная конструкция, «сопля» на жаргоне. Чтобы конструкция стала органом, она должна жить, иметь чёткую форму, нести функции. Главный вопрос – это то, что клеткам, вообще-то, не плохо бы иметь доступ к кислороду и питательным веществам. Иначе они начинают, грубо говоря, гнить. Когда орган тонкий, проблем нет, но уже с пары миллиметров это важно. Правда, у слона, например, есть хрящи до 5 миллиметров – но они вмонтированы там, где создаётся большое давление из-за массы остального слона. Так вот, чтобы напечатанный орган не испортился в процессе фабрикации, нужна микроциркуляция. Это делается печатью настоящих сосудов и капилляров, плюс с помощью тончайших перфузионных отверстий, прodelьваемых неорганическими инструментами.

Будущий орган помещается в биореактор. Это, сильно упрощая, банка с контролируемой средой, в которой на входы и выходы органа подаются нужные вещества, плюс обеспечивается ускоренное созревание за счёт воздействия факторами роста.

Архитектура органа обычно похожа на привычный по ООП инкапсулированный объект – артерия входа, вена выхода – и куча функций внутри. Предполагается, что биореактор позволит обеспечивать нужный вход и выход. Но это пока теория, собрать ещё не удалось ни одного. Но проект отработан до стадии «можно собирать прототип».

Процессу биопечати предшествует создание трёхмерной модели ткани или органа.

Эволюция кольца из 10 сфероидов (рис. 4) в коллагеновом геле. На микрофотографии видно, как отдельные клеточные сфероиды полностью сливаются за 168 часов (7 суток). Сращивание клеточных сфероидов – фундаментальная основа технологии. Американский морской биолог Петер фон Вильсон обнаружил свойство сращивания тканей. В 1907 году он проводил эксперименты на морских губках и наблюдал, как отдельные измельчённые кусочки морского животного срачивались в единый организм.

хема получения 3D-объекта из клеточных сфероидов: 1 – отдельные сфероиды «капают» на специальный биогель, постепенно формируя «сфероидный» монослой; 2–3 – послойная сборка объекта в форме цилиндра.

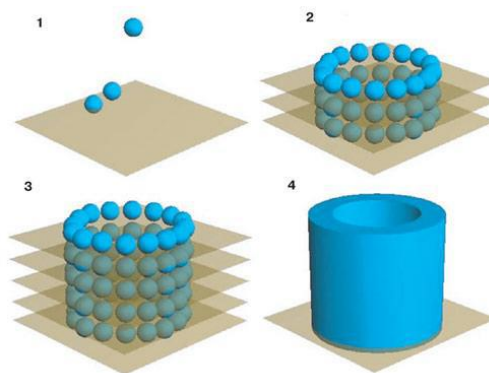


Рис.4. Расположение сфероидов при печати: 1 – кладка сфероидов первого слоя; 2 – обавление коллагена и следующих слоев; 3 – Послойная сборка элемента; 4 – олностью напечатанный элемент

Кровеносный сосуд, полученный методом биопринтинга. На микрофотографиях показаны этапы формирования сосуда из клеточных сфероидов. При сращивании сфероидов объём ткани уменьшается, это важно учитывать при создании копии человеческого органа.

В современной медицине происходит стремительное развитие и внедрение аддитивных технологий [Hull, 1986; Tumbleston, 2015] в таких отраслях как сосудистая хирургия [Goiato, 2011; Rozen, 2012], оториноларингология, пластическая хирургия [Gerstle, Chae, 2014], нейрохирургия [Klein, 2013], травматология, челюстно-лицевая хирургия [Cohen, 2010]. Данные компьютерной (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) в формате DICOM могут быть преобразованы в точную модель органа пациента [Herlin, 2013]. 3D-печать позволяет быстро создавать недорогие модели для определения оперативной тактики, предварительной разработки и максимально точного моделирования имплантатов и сложных металлоконструкций, а также оценки нагрузки на них [Ной, 2013]. Предварительное моделирование даёт возможность определиться с выбором инструментария для операции, изготовить индивидуальный имплантат для пациента и наглядно объяснить ему суть и ход операции, помогает обучению студентов [Srinivasan, 2012].

Получение данных КТ, преобразование данных КТ в 3D – модель, доработка и оптимизация модели, построение модели имплантата (рис. 4), проектирование матрицы (рис.6), изготовление матрицы (печать на 3D – принтере), изготовление имплантата из биосовместимого материала (Протакрил – М), установка имплантата.

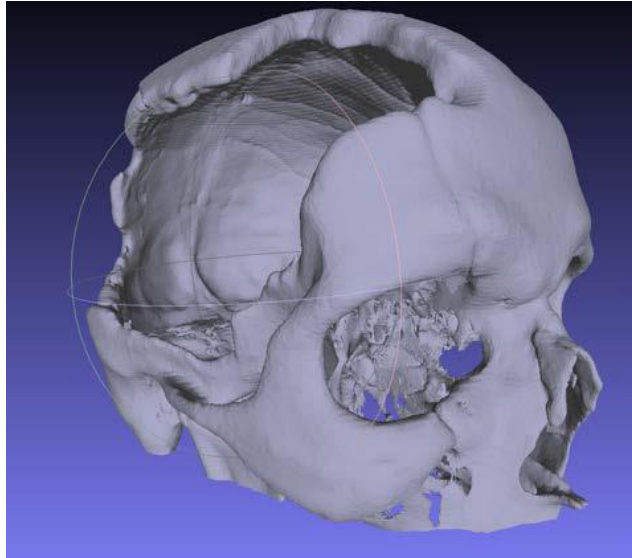


Рис. 5. 3D снимок черепа

Протакрил – М – акриловая самоотвердевающая пластмасса, представляет собой розовый порошок, смесь мелкодисперсного полиметилметакрилата 96,5%, перекиси бензоила 1,5% и дисульфанамина 2% (активатора), для получения пластмассы, разводится жидким метилметакрилатом, в него добавлен диметилпаратолуидин как активатор в количестве 0,1–0,2%. Полимеризация проходит за 15–20 минут, при этом материал разогревается до 40–45 градусов по Цельсию.

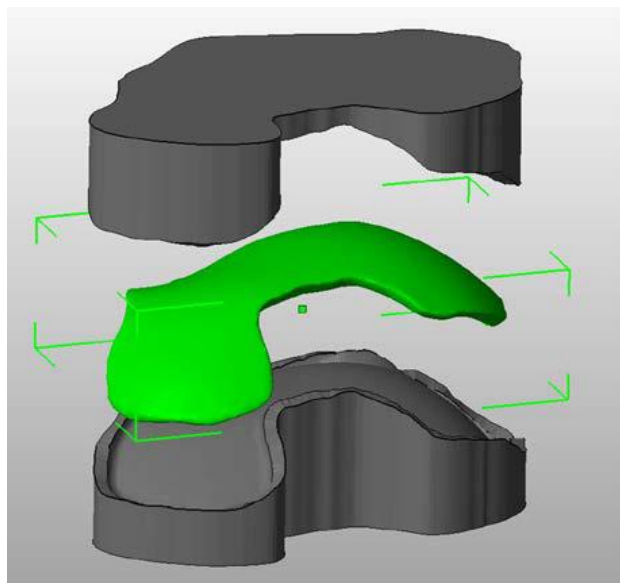


Рис. 6. Проектирование импланта

Имплантат был изготовлен до операции прессованием при помощи напечатанной матрицы не полимеризованного протакрила-м (рис. 7). После полимеризации имплантат был стерилизован методом паростерелизации при температуре 120 градусов по Цельсию в течение 3-х часов. Для установки имплантата выполнена.



Рис. 7. Готовый имплант

Нейрохирургическая операция: пластика посттравматического дефекта черепа протакрилом-м (рис. 8).



Рис. 8. Замена поврежденных частей имплантом

Таким образом, спроектированная форма имплантата учитывала анатомические особенности черепа пациента, что в данном случае имеет

определяющее значение для восстановления пациента после тяжёлой травмы головного мозга, и определяет дальнейшее качество его жизни. Исключена возможность термического воздействия на вещество головного мозга при полимеризации протакрила - м. Значительно сократились время нахождения пациента под наркозом, время подготовки и проведения операции (до 1 часа вместо 2–3 часов), что имеет существенный экономический эффект.

Точность восстановления такой поверхности имеет большое значение, совершенный имплантат не должен оказывать никакого воздействия на глазное яблоко, т.к. даже минимальное воздействие изменяет внутриглазное давление с формированием закрытоугольной глаукомы и сужением поля зрения. Операционный доступ сложен и ограничен в пространстве стенками глазницы, манипуляции в операционной ране сводятся к минимуму, во избежание дополнительной травматизации мягких тканей. Воссоздание анатомически правильной поверхности дна глазницы в данном случае выполнялось при помощи титановой сетки, распечатанные модели использовались для моделирования этой сетки. Подготовленный таким образом имплантат обеспечивал совершенное соответствие подлежащей поверхности. Порядок решения: получение данных КТ, преобразование данных КТ в 3D-модель, доработка и оптимизация модели, печать модели.

В результате 3D модели позволяли смоделировать имплантат до начала операций с пациентом, значительно снизилось операционное время, исключалась процедуры «переделки» в операционной ране с ограниченным операционным полем, сводился к минимуму размер разрезов. Следует отметить, что такой показатель, как конгруэнтность имплантата окружающим тканям, во многом определяет его биосовместимые свойства. Таким образом, 3D визуализация, моделирование и печать могут стать новым медицинским инструментом, который позволяет не только заглянуть внутрь, но и открывает широкие возможности для индивидуализации и повышения качества медицинской услуги.

В качестве одного из дальнейших направлений использования 3D печати в медицине является применение биосовместимых материалов, обладающих свойствами костной ткани. А также исследование и разработка материалов и технологий изготовления органических структур на матрицах, получаемых с помощью трехмерной печати.

Каркасы являются важным материалом тканевой инженерии, они вместо внеклеточного матрикса предоставляют начальную механическую прочность и жесткость, на которой клетки могут расти. Каркасы, как правило, состоят из материала с сообщающимися порами между собой, что делает возможным клеточные крепления, миграции, пролиферации и дифференцировки. Они также обеспечивают приток питательных веществ и отток отходов метаболизма. Гидрогели имеют преимущество над другими каркасными материалами в том, что они гидратированы аналогичным образом с биологическими тканями. Тем не менее, только они, вероятно, не смогут обеспечить достаточную механическую прочность для создания больших площадей тканей или органов. Несколько исследовательских групп работают над разными каркасными материалами и смесями гидрогелей и полимеров, чтобы компенсировать механические недостатки гидрогелей [Bose, 2013; Chia, 2015; Tasoglu, 2013].

Сообщения о создании искусственных трахей уже не редкость. В феврале 2015 года команда ученых и инженеров из Филиппинского центра легких и Технологического университета Филиппин под руководством исполнительного директора Центра легких, доктора Джоза Дангуалина (Jose Luis Danguilan), сообщила о создании биоинженерной трахеи из фибробластов пациента [<http://www.3ders.org>].

1.3. Приготовление сфероидов

Для получения альгинатных микросфер могут быть использованы различные методы с применением электростатических, механических или

пневматических воздействий для отрыва капли от стенок капилляра [Prusse, et al 2008]. В настоящей работе был применен пневматический принцип, который достаточно просто реализуется в условиях стерильного бокса и не требует специального оборудования. Для получения альгинатных микросфер использовали специальное устройство (рис. 9), на вход которого подавали углекислый газ из баллона высокого давления, предварительно прошедший стерилизующую фильтрацию через миллиметровый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Изменяя силу потока с помощью редуктора, получали микросферы диаметром от 500 до 1 000 мкм, обеспечивая при этом достаточно высокую производительность для экспериментальных масштабов – до $5 \cdot 10^6$ клеток/мин, что является важным условием для достижения однородности полимеризации капель по времени.

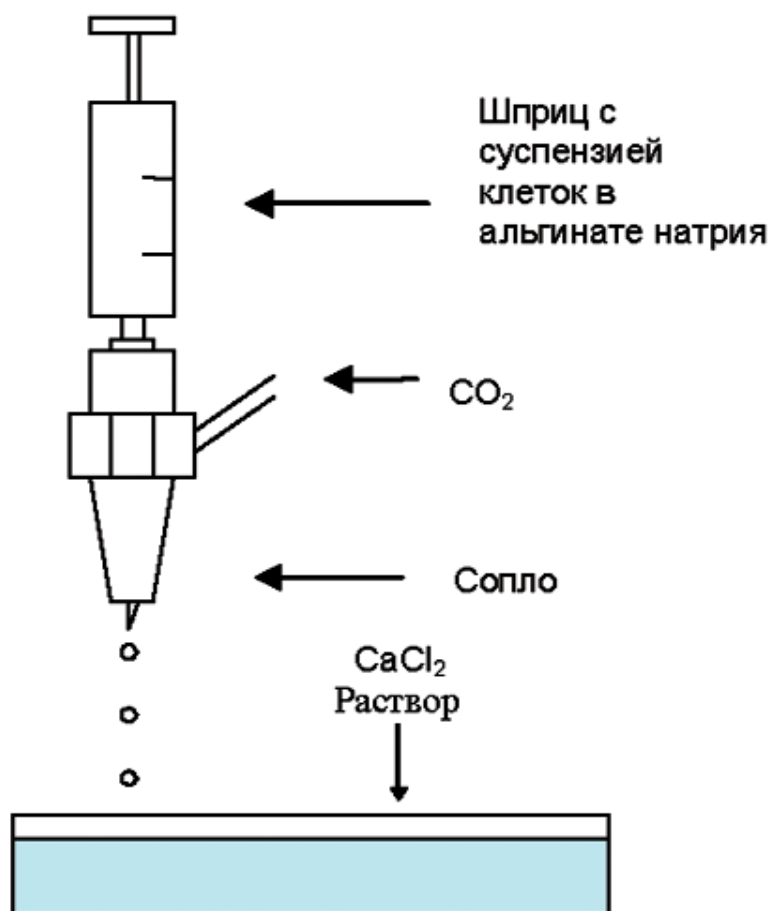


Рис. 9. Схема устройства для получения альгинатных микросфер.

Важным параметром получаемых альгинатных микрокапсул является форма, при этом сферическая геометрия капсул предпочтительнее, поскольку обеспечивает одинаковые условия обмена питательными веществами и сигналами между инкапсулированными клетками и окружающей средой. Было установлено, что форма капсул мало зависит от силы потока CO_2 и в основном определяется концентрацией взаимодействующих растворов альгината натрия и хлорида кальция. Как видно из табл. 1, сферические микросферы были получены при полимеризации капель 2%-го раствора АН в растворах с содержанием CaCl_2 выше 1,4% и полимеризации 1%-го АН в 2%-м растворе CaCl_2 . В остальных вариантах капли АН при контакте с растворами CaCl_2 разной концентрации образовывали дисковидные или полусферические структуры. Наиболее стабильные микросферы сферической формы получали при использовании 1%-го или 2%-го АН в сочетании с 2%м Ca^{2+} . Для инкапсуляции МСК применяли сочетание 2%-го АН и 2%-го Ca^{2+} . Полученные таким образом микросферы сохраняли сферическую форму в течение всего периода культивирования (6 нед). Вместе с тем, при длительном культивировании (более 2 нед) отмечалось некоторое набухание микросфер, что, очевидно, связано с заменой части ионов кальция на ионы натрия [Orive et al, 2009].

Внедрение клеток в микросферы из природных и синтетических гидрогелей называется инкапсурирование [Miguera et al, 2008]. Данный метод в последнее время стали использовать в различных направлениях биотехнологии, тканевой инженерии, трансплантологии, а также при решении ряда теоретических задач клеточной биологии [Zimmermann et al, 2007].

Для того что бы производить инкапсулирование клеток, материалы должны обладать низкой токсичностью, способностью к формированию определенных физико-химических структур, обеспечивающей иммобилизацию клеток, транспорт к ним питательных веществ и выведение продуктов распада, а также поддержание жизнеспособности и

функциональной активности клеток при культивировании [Mano, 2007; Kim, 2000].

Одним из веществ, которое подходит для инкапсулирования является альгинат – линейный полисахарид, состоящий из 1–4-связанных остатков бета-D-маннуроновой и альфа-L-гулууроновой кислот, который получают из бурых водорослей. В присутствии двухвалентных ионов растворы альгината образуют пористый гидрогель, обладающий определенной механической прочностью, биосовместимостью и способностью деградировать в организме без образования токсических продуктов. Альгинатные гидрогели позволяют диффундировать кислороду, питательным веществам, сигнальным молекулам, но препятствуют диффузии молекул с молекулярной массой свыше 100 кДа, например, иммуноглобулинов, что обеспечивает иммуноизоляцию и выживание биообъектов, заключенных в эти гидрогели, при имплантации. Такие свойства альгинатных гидрогелей позволили успешно использовать их для инкапсуляции островков поджелудочной железы [Vos et al, 2006], хондроцитов [Almqvist et al, 2001], гепатоцитов [Hirai et al, 1993], сперматозоидов [Weber et al, 2006], ооцитов [Xu et al, 2006], генетически модифицированных фибробластов [Tobias et al, 2001], эмбриональных стволовых клеток [Maguire et al, 2006] и др. Однако до настоящего времени не разработаны единые стандартизированные протоколы заключения клеток в альгинатные микросферы. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) характеризуются уникальной способностью к самообновлению и мультилинейной дифференцировке в клетки костной, хрящевой, мышечной, жировой и соединительной ткани *in vivo* и *in vitro* под действием определенных сигнальных веществ [Abdallah et al, 2008]. В настоящее время дискутируется способность МСК дифференцироваться в клетки не мезодермального происхождения, такие как гепатоциты [Luk et al, 2005] и нервные клетки [Dezawa et al, 2004]. МСК не экспрессируют гемопоэтические маркеры и являются позитивными по CD 105, CD10, CD13, CD 90, STRO1. МСК могут быть изолированы из различных источников,

таких как костный мозг, жировая и мышечная ткань, кожа, надкостница. Эти клетки отличаются высоким пролиферативным потенциалом, хорошо адгезируют на культуральный пластик, демонстрируют фибробластоподобную морфологию при культивировании в монослое. Благодаря своим свойствам МСК являются перспективным объектом для тканевой и клеточной инженерии, а также регенеративной медицины и трансплантологии [Tuan et al, 2003]. Однако особенности инкапсуляции МСК и их свойства при культивировании в микросферах остаются малоизученными.

Органическая печать может быть определена как послойная аддитивная роботизированная биообработка трехмерных функциональных живых макротип и органных конструкций с использованием тканевых сфероидов в качестве строительных блоков. Микротипы и тканевые сфероиды представляют собой живые материалы с определенным измеримым, эволюционирующим и потенциально контролируемым составом, материальными и биологическими свойствами. Тесно расположенные тканевые сфероиды подвергаются тканевому слиянию – процессу, который представляет собой фундаментальный биологический и биофизический принцип самоорганизации, направленной на развитие биологии. Возможно создание небольших сегментов внутриордально-разветвленного сосудистого дерева с использованием твердых и просветленных сосудистых тканевых сфероидов. Органическая печать может значительно улучшить и трансформировать область тканевой инженерии, позволив крупномасштабной промышленной роботизированной биообработке живых человеческих органных конструкций с «встроенным» перфузируемым внутриорганным разветвленным сосудистым деревом. Таким образом, органный печать - новая новая парадигма технологии, которая представляет собой биологию развития, альтернативную классическим биodeградируемым основам на основе строительных лесов в тканевой инженерии.

Недавно опубликованный обзорный документ с характеристическим названием «Клетка как материал» [Kasza et al, 2007] логически подразумевает, что минитиссы и тканевые сфероиды, также могут рассматриваться как материал или, более правильно, «живой материал» с определенными измеримыми, развивающимися и потенциально контролируруемыми свойствами материала. Наиболее популярным прямым методом измерения свойств материала округлых микротипов является тензиометрия или контролируемое сжатие клеточных агрегатов между двумя параллельными пластинами [Forgacs et al, 1998]. Однако требование идеальной сферической формы является ограничением такого подхода. Недавно был разработан новый метод аспирации тканей, успешно испытанный на эксплантатах ткани подушки, который показал желаемый уровень чувствительности [Butcher et al, 2007]. Флуоресцентные микрошарики были встроены в конструкции, спроектированные в тканях, для изучения свойств материала, основанных на подвижности, вызванной микрошарием [Leung et al, 2007]. Материальные свойства тканевых конструкций, образованных слиянием тканевых сфероидов, размещенных на очень эластичных и тонких полипропиленовых полиуретановых каркасах, также могут быть измерены классическим испытанием на растяжение. Биофабрикация тканевых сфероидов, включающих магнитные или флуоресцентные микрошарики, является одним из наиболее интригующих подходов к разработке новых анализов для изучения материальных свойств тканевых сфероидов до и после их слияния в конструкциях с большими тканями, разрушающего биомониторинга созревания тканей в этих конструкциях. Полуколичественная оценка свойств материала тканевых сфероидов также может быть основана на обволакивании двух соседних тканевых сфероидов во время процесса тканевого слияния. Теоретически, более сплоченный тканевый сфероид будет окутан сфероидом с более низкой когезионной тканью или низкими свойствами материала. Флуоресцентное восстановление после метода фотообработки (FRAP) основано на

предположении, что существует определенная корреляция между флуоресцентной диффузией зонда и плотностью молекул внеклеточного матрикса, таких как коллаген [Braeckmans et al, 2009]. Оценка электропроводности и электрического импеданса – это еще один косвенный неинвазивный подход с высокой пропускной способностью, основанный на аналогичных корреляция. Разработка широкого арсенала высокочувствительных, прямых и косвенных количественных и полуколичественных методов оценки материальных свойств тканевых сфероидов и микротипов является важной задачей при разработке прогностических подходов к тканевой инженерии на основе микропланшетов. Это особенно актуально в контексте контроля процесса слияния тканей, достижения желаемого уровня созревания тканей и для высокопроизводительного скрининга.

Тканевые сфероиды использовались в качестве трехмерной модели *in vitro* в биомедицинских и опухолевых исследованиях в течение нескольких десятилетий [Friedrich et al, 2007]. Неудивительно, что в конечном итоге был разработан впечатляющий арсенал методов биофабрикации тканевых сфероидов [Kloss et al, 2008; Kunz-Schughart et al, 2013]. Эта тема была систематически и всесторонне рассмотрена в замечательной обзорной статье [Lin et al, 2008]. Чтобы оценить, какой метод сферической биообработки наиболее подходит для крупномасштабной промышленной тканевой инженерии и для органной печати, важно сформулировать соответствующие критерии или четко определенные спецификации. Во-первых, самое главное, это должна быть масштабируемая технология. Например, для того, чтобы построить человеческую почку, нам нужно создать миллион клубочков и нефронов. Во-вторых, эти сфероиды должны быть максимально стандартизированы по своему размеру, чтобы сделать их обрабатываемыми или подлежащими дозированию через сопло для биопринтера или другими способами без проблем с засорением и их разрушением. Таким образом, стандартизация размера сфероида ткани является желательной для

непрерывного дозирования. В-третьих, метод биофабрикации сферической ткани не должен вызывать значительного повреждения клеток и / или повреждения ДНК. В-четвертых, метод биофабрикации сфероидов тканей не должен нарушать способность тканевых сфероидов для последовательного слияния тканей. Наконец, метод биообработки должен быть достаточно гибким, чтобы обеспечить создание разнообразных тканевых сфероидов сложной композитной структуры. Таким образом, сталкиваясь с тем фактом, что большинство существующих методов не являются масштабируемыми, можно с уверенностью предсказать, что разработка методов масштабируемого биообработки тканевых сфероидов вскоре станет быстро растущей областью в нетрадиционной тканевой инженерии.

Слияние иногда определяется как «плавление вместе», что логически подразумевает жидкую природу процесса слияния. Слияние слизистой оболочки является вездесущим процессом во время эмбрионального развития и может быть повторено *in vitro*. Было показано, что кинетика тканевого слияния двух закругленных эмбриональных эксплантатов ткани мягкой ткани сердца, помещенных в вислячую каплю, идеально подходит для кинетики слияния, описанной для двух капель жидкостей [Jakab et al, 2008]. Кроме того, на основе прямого измерения поверхностного натяжения и расчета вязкости тканевые сфериды действительно являются жидкими структурами. Таким образом, слияние тканей является, по сути, феноменом механики жидкости, вызванной силами поверхностного натяжения, и может быть адекватно объяснено физическими законами и «дифференциальной гипотезой прилипания» Малькольма Штайнберга. С другой точки, подвижные живые клетки, цитоскелет и число, а также перераспределение и активация рецепторов клеточной адгезии также необходимы для процесса слияния тканей. Накопление ЕСМ и связанное с ним ограничение подвижности клеток и усиление сцепления тканей в тканевых сфероидах могут изменить кинетику или затруднить процесс слияния тканей сфероидов.

Таким образом, необходимо выяснить точный эффект накопления внеклеточного матрикса и конкретных молекул ЕСМ, а также ремоделирование ЕСМ на свойства материала микротипов и тканевых сфероидов и связанную с ними модуляцию процесса слияния тканей.

Органическая печать как самостоятельная сборка ткани. Термин «направленная тканевая самосборка» выглядит как странная комбинация слов, потому что это в основном противоречие терминов. Можно логически утверждать, что это может быть либо «направленная сборка», либо «самосборка», но не обе вместе. Однако мы нашли еще более противоречивую комбинацию слов в названии недавно опубликованной статьи Природы: «Самонаправленная самосборка смесей наночастиц / сополимеров» [Lin et al, 2008]. Интересно, что авторы этой статьи используют аналогичные аргументы в описании своего нового подхода в нанотехнологии, который отличается от подхода на основе лесов: «Преыдущие усилия были сосредоточены на использовании таких каркасов для пространственного расположения наноскопических элементов в качестве стратегии. Недавние теоретические соображения предположили, что синергетические взаимодействия между самоорганизующимися частицами и самоорганизующимся матричным материалом могут привести к иерархически упорядоченным структурам». Экстраполяция последнего предложения в этой цитате дает мощное понимание аналогичных принципов самосборки, основанной на незащищенных тканях. Похоже, что термины «направленная самосборка» и даже «самонастраиваемая самоорганизация» приемлемы, по крайней мере, в области нанотехнологий. Взаимодействие тесно расположенных тканевых сфероидов путем процесса тканевого слияния в конструкции макротипов является подтвержденной документально подтвержденной реальностью, подтвержденной различными группами по всему миру. Прямой контакт соседних тканевых сфероидов в разрешающей среде является существенным предварительным условием для самосборки макротипной конструкции, связанной с тканевым слиянием. Таким образом,

автоматическая печатная или роботизированная добавка биоманипуляции с использованием точного поэтапного размещения («направления») самосборных тканевых сфероидов («биоиндикация») в распыляемых тканевых разрешающих гидрогелях («биопапер») является, по сути, примером технологической реализации концепции «направленной тканевой самосборки». Масштабируемость и пригодность для автоматизации с использованием специальных роботизированных биопринтеров (рис. 10), вероятно, являются наиболее привлекательными аспектами технологий самосборки направленной ткани. Органопечатная технология с использованием самосборных тканевых сфероидов в некоторых аспектах также концептуально очень близка к недавно изобретенной концепции цифровой печати [Hiller et al, 2007]. Обычное изготовление произвольной формы уже адаптировано для печати множества сложных 3D-тканевых строительных лесов из синтетических биodeградируемых полимеров с последовательной клеточностью на основе биореактора (двухступенчатый процесс биообработки), что делает их особенно подходящими для изготовления твердых тканей. Недавно была применена технология непрерывного быстрого прототипирования, основанная на одновременной роботизированной дозировке или фотополимеризации стимулирующих чувствительных биоматериалов, содержащих живые клетки (одностадийный процесс биообработки) для биотрансляции мягких тканей. Однако непрерывная (аналоговая) технология быстрого прототипирования обычно ограничивается одним однородным материалом, таким как гидрогели или гидрогелевая смесь с определенными реологическими и чувствительными к стимулам свойствами, обеспечивающими неразрушающую биообработку живых клеток в трехмерную живую ткань. Цифровая печать обеспечивает гораздо большую гибкость в выборе материалов для биопреобразования. Цифровые (дискретные) материалы принципиально отличаются от аналоговых (непрерывных) материалов. Цифровые материалы могут быть разбиты на два основных класса. Первый класс включает точное размещение

капель материала, которые затвердевают, как капли, струившиеся из струйной системы. Второй класс цифровых материалов предполагает сбор сборных вокселей. В этом контексте воксель определяется как «физический бит в цифровой материи». Согласно концепции цифровой печати, «физический воксел» должен пассивно самосогласоваться со своими соседями, будучи способным к самосборке и легко сделать точно в больших количествах. Тканевые сфероиды можно рассматривать как «сферические физические воксели», которые относительно легко изготавливать при желательном стандартном размере в больших масштабах. Привлекательность использования тканевых сфероидов основана на их относительно легкой промышленной биообработке в больших масштабах и потенциальной пригодности для обоих новых вариантов технологии биопреобразования. При непрерывном (аналоговом) биопреобразовании тканевые сфероиды могут непрерывно распределяться с гидрогелем. В цифровой биопринтинге тканевые сфероиды могут быть использованы в качестве дискретных материалов («физические воксели») и быть «пробиты» в цифровой форме в последовательно распыленные слои гидрогеля или даже быть подвергнуты цифровой самоподготовке без использования каких-либо гидрогелей.

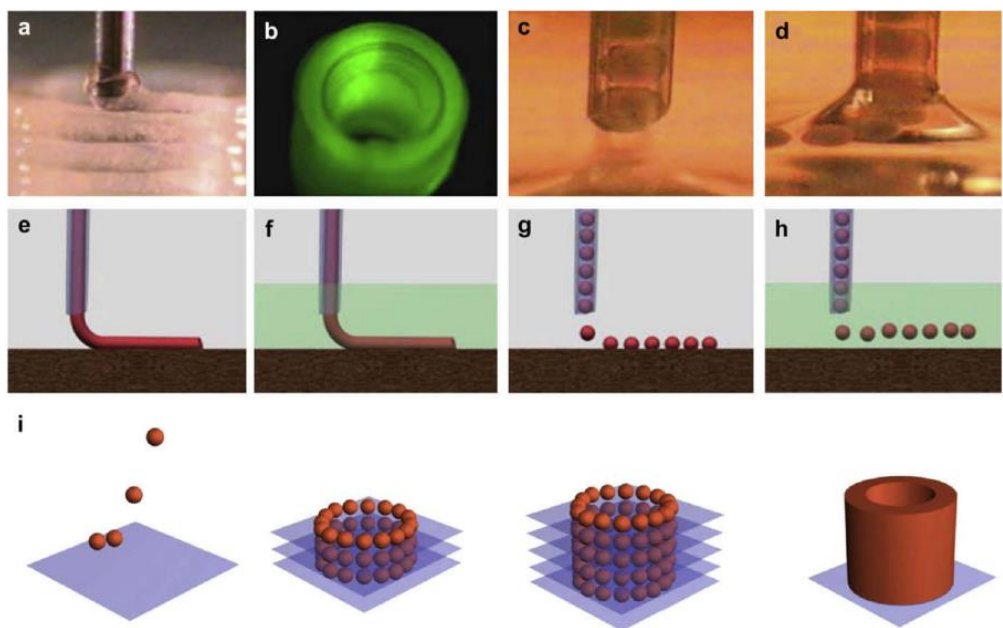


Рис. 10. Принципы технологии биопечати

Принципы технологии биопечати: а) биопринтер (общий вид); б) несколько сопел биопринтера; в) тканевые сфероиды перед выдачей; г) тканевые сфероиды во время дозирования; д) непрерывное дозирование в воздухе; е) непрерывное дозирование в жидкости; ж) цифровое дозирование в воздухе; з) цифровое дозирование в жидкости; и) схема биоассоциирования конструкции трубчатой ткани с использованием биопреобразования самосборных тканевых сфероидов, иллюстрирующих последовательные этапы поэтапного осаждения сфероидов в тканях и процесса слияния тканей.

Клеточная терапия имеет большой потенциал лечения широкого спектра заболеваний (печеночная недостаточность, болезнь Паркинсона и др.). Инкапсуляция живых клеток в полупроницаемые мембраны (например, альгинатные микрокапсулы) была предложена как средство избежания нежелательного иммунного ответа реципиента, достижения контролируемой доставки терапевтических веществ, произведенных инкапсулированными клетками, и долгосрочного выхода терапевтических веществ. Большой интерес в костно-тканевой инженерии также представляют быстро деградирующие микрокапсулы на основе альгината, содержащие стволовые клетки. Размер альгинатных микрокапсул, их проницаемость и скорость деградации должны соответствовать типу живых клеток и скорости их пролиферации, которые используются для инкапсуляции. В этой работе представлена возможность инкапсуляции живых клеток в альгинатные микрокапсулы с помощью электрораспыления. Раствор полимерного альгината находится внутри шприца и откачивается через наконечник с помощью электрического поля с высокой напряженностью в заземленную ванну со сшивающим раствором CaCl_2 . При попадании в сшивающий раствор альгинат сразу превращается в гель за счет быстрого физико-химического взаимодействия между сшиваемыми агентами. Для получения мелких микрокапсул с регулируемым распределением размеров были

оптимизированы такие параметры процесса, как: концентрация альгината, скорость потока, расстояние распыления, прилагаемое напряжение, концентрация сшивающего раствора. Фибробласты NIH 3T3 были инкапсулированы при различных концентрациях (10^6 , 5×10^6 , 10^7 кл/мл) в стерильных условиях. Распределение размеров микрокапсул, а также эффективность инкапсуляции клетки изучали с помощью микроскопа «Carl Zeiss Axiovert 200M» с 5- или 10-кратными увеличениями и программного обеспечения «AxioVision V 4.8.2.0». При электрораспылении размер микрокапсулы альгината можно регулировать путем корректировки одного или нескольких оптимизированных параметров. Было показано, что точное управление диаметром гранулы возможно только при распылении струйного потока (от 15–17 кВ). Существенного влияния скорости потока на гранулу не наблюдается (в пределах напряженности электрического поля 2 кВ/см). Было обнаружено, что напряжение и концентрация альгината являются наиболее значимыми параметрами, определяющими размеры микрокапсул, в то время как концентрация CaCl_2 в основном влияет на их морфологию и однородность. Эффективность клеточной инкапсуляции, а также диаметр гранулы можно контролировать с помощью концентрации клеток, скорости потока, прилагаемого напряжения, концентрации сшивающего раствора. Кроме того, было установлено, что увеличение начальной концентрации клеток приводит к уменьшению диаметра микрокапсул. Проведенные эксперименты по выживаемости клеток после инкапсуляции доказали эффективность технологии клеточной инкапсуляции в альгинатные полупроницаемые полимерные матрицы с использованием высокого электрического напряжения.

1.4. Системы для инкапсулирования клеток

Инкапсуляция клеток в геле. Инкапсуляция в каплях гидрогеля или сфероиды открывают новые возможности:

- 3D культуры в очень определенной (гель шарика) среде;
- Гель-инкапсулированные клетки могут быть использованы для пересадки, так как они могут быть защищены от иммунной системы хозяина;
- Гелевые гранулы, содержащие клетки могут быть отсортированы FACS;
- Создание сшитых желатиновых шариков.

Капельки для FACS-сортировки. Капли могут вести себя, как отсеки, которые соединяют генотип некоторых иных несвязанных фенотипов (например, деятельность секретируемых белков; флуорогенные анализы на ферменты из лизированных клеток; влияние на другую клетку). Кроме того, микрофлюидные капельки могут быть отсортированы по разновидности клеток с возбуждением флуоресценции. Приборы для сортировки (FACS), превращают их в капли двойной эмульсии (то есть капли воды в нефти «оболочки», в водной непрерывной фазе).

Зинченко и др. «Один на миллион: поток цитометрии сортировки отдельных клеточных лизат анализов в монодисперсных каплях пиколитра двойной эмульсии для направленной эволюции.»

Сотовая инкапсуляция в микрофлюидных каплях делает возможным выделение тысяч нативно-спаренных последовательных антител, кодирующих из образцов крови – например, выделения моноклональных антител или потенциальных терапевтических антител из образцов крови человека или профилирование гуморальный иммунный ответ от нескольких пациентов. Результирующие нативно-конденсированные переменной библиотеки фрагмент может быть непосредственно секвенированы (например, с помощью Illumina секвенирования).

Высокая пропускная способность микрожидкостных технологий позволяют генерировать тысячи одноцепочечных антител в один проход. Суспензию лимфоцитов пипетировали в систему Encapsulator. Лимфоциты захватываются в каплях при ограничивающем разведении, вместе с поли

бусин (дТ) и лизиса смеси, таким образом, что каждая гранула захватывает мРНК из одной клетки.

Шарики промывают, и добавляют к смеси с обратной транскрипцией, чтобы сделать первую цепь кДНК на шариках. Полученные гранулы кДНК повторно обнесены на предельное разведение в ПЦР-смеси, с использованием праймеров, предназначенных для усиления и плавления тяжелых и легких цепей фрагментов. Полученные в результате гибридные продукты изначально содержат тяжелые и легкие фрагменты переменной цепи от той же самой клетки.

Профильные Т-клеточные рецепторы осуществляются с помощью микрофлюидики, которая позволяет изолировать тысяч отдельных Т-клеток в каплях, надежно герметизирующего единичные лимфоциты с поли (дТ) мРНК захвата бусин.

Это позволяет исследователю профиль Т-клеточных типов клеток и функциональных классов из лимфоцитов Preps из образцов крови, или профиль реакции пациента на вакцины, инфекции, а также следить за восстановлением, или для иммунотерапии.

Single Cell-Seq РНК. Одно Секвенирование РНК клеток (scRNA Seq) обеспечивает простую и надежную доступ к Транскриптом тысяч отдельных клеток - предоставляя беспрецедентные понимание тканей на уровне отдельных клеток. Это в отличие от традиционных методов, которые либо позволил анализ нескольких генов в тысячах отдельных клеток (например, гибридизация), либо профиль экспрессии тысяч генов, но только на гомогената ткани.

Единичную ячейку секвенирование РНК позволяет использовать новые типы анализов, например:

- Понимание гетерогенность опухоли и клональной эволюции - в том числе изучение анализа родословной, раковых стволовых клеток, а также лекарственной устойчивостью и метастатических клонов.
- Понимание сложных тканей (например, нервной ткани).

- Высокое разрешение идентификации типов и маркеров клеток и понимание путей дифференциации в области развития и системной биологии.

Доломит Био разработал системы для выполнения на раскрывающуюся SEQ и другие, связанные с протоколами, что ведет к быстрому распространению по всему миру.

Высокая точность, инертными, стеклянные осколки соединены с насосами давления на основе, чтобы создать надежную систему под управлением компьютера, с реальным временем визуализации клеток капсулой и формирования капель, чтобы дать уверенность в производительности системы.

1.5. Микроинструменты для микрохирургии и микроманипуляций с клетками

В настоящее время механические и биологические явления на клеточном уровне не совсем понятны [Bao & Suresh, 2003], а также развитие болезней и их лечения также неясны. Клетки представляют собой сложные структуры с ядрами и органеллами, размеры которых требуют разработки микро – и нанотехнологий для эффективной манипуляции и мониторинга. Действительно, размеры ядер варьируют от 3 до 7 мкм для дифференцированных клеток. У эмбрионов ядра не окружены мембраной, хотя генетический материал в основном обособляется в области диаметром 9 мкм. Другие органеллы с определенными функциями в эукариотических клетках, таких как митохондрия, могут иметь очень маленькие размеры (1 мкм). Кроме того, гистологи знают, что важные параметры, такие как концентрация pH или Ca / Na / K, могут сильно варьироваться в цитоплазматической области. Недавно Weibel [Weibel et al, 2007] утверждал, что микробиология должна эволюционировать в количественной области. Эти слова предсказали развитие микросистемных инструментов,

позволяющих индивидуально манипулировать с клетками, рост и изучение субклеточной организации, в то время как будут раскрыты механизмы дифференциации и коммуникации между клетками. Действительно, текущие исследовательские усилия направлены на исследование генетических, биохимических и поведенческих различий между клетками. Постоянное развитие микроструктур для количественного изучения параметров в отдельных клетках приведет к глубокому пониманию субклеточной активности, включая патогенез с беспрецедентным уровнем детализации. Кроме того, эти усилия проложат путь к высокоэффективной, адаптированной доставке к клеткам лекарств. Конечно, проблемы состоят в том, как эффективно манипулировать клетками, как позиционировать датчик в определенных местах внутри ячейки и даже как проникать в различные органеллы.

Первый шаг в изучении клеток неизбежно начинается с разработки инструментов и протоколов для обработки клеток, поскольку манипуляция с самыми внешними мембранами в клетках, вероятно, приведет к возникновению возмущений в системе, которые могут в конечном итоге воздействовать на субклеточные или межклеточные процессы. Пипетки обычно вытягиваются и разделяются съемниками, вырезаются до соответствующего внутреннего диаметра с помощью технологий микроволокна и полировки. Ученые, изучающие фертильность человека, идентифицировали ранее [Huang et al, 1996] трудности, связанные с подготовкой инструмента, и важность надлежащей обработки клеток во время процедур экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Следуя этой линии мышления и принимая во внимание традиционный производственный подход, активно действующий в торговле, технологи задумались о том, что манипуляции с ячейками мешают рудиментарные манипуляторы [Campo et al, 2009 a и b].

Обычные пипетки состоят из боросиликатного стекла, которые затем растягиваются, вырезаются и полируются для достижения подходящей

геометрии наконечника с соответствующими размерами. Имеются коммерчески доступные стеклянные капилляры, разность в геометрии которых контролируется съемником с комбинацией осевого натяжения и термической обработки [Sutter Instruments, 2008]. В последние годы микроинъекции клеток стали важной процедурой в клеточной и репродуктивной биологии. Микроинъекция клеток обычно используется в различных биотехнологических и биомедицинских применениях, таких как клонирование животных путем ядерного переноса [Kishigami et al, 2006], производство трансгенных животных путем инъекции ДНК в эмбрионы [Ittner and Götz 2007] или *in vitro* оплодотворение ооциты интрацитоплазматической инъекцией спермы (ICSI) [Palermo et al, 1992; Yoshida and Perry, 2007]. Сообщалось, что более высокие показатели выживаемости клеток являются результатом минимального повреждения микроинъекции при использовании пипетки высокого качества. При использовании методов микроинъекции с обычной практикой 5-25% ооцитов мыши лизируют вовремя ИКСИ (Lacham-Kaplan & Trounson, 1995) и 20-30% эмбрионов мыши после пронуклеарного микроинъекции ДНК [Nagy et al, 2002]. При всех экспериментальных данных предполагается, что важнейшие обычные процедуры изготовления пипетки включают утомительные кустарные методы, которые подвержены разрушению [Yaul et al, 2008; Ostadi et al, 2009].

Несмотря на отсутствие подробного биомеханистического объяснения взаимодействия пипетки с клетками, основанные на ошибках накопили множество спецификаций, применимых к инструментам и методам биопсии в разных сценариях. На рисунке 11 показаны изображения электронной микроскопии предварительно обработанных пипеток (сверху) и изображений оптической микроскопии условно обработанных пипеток с различными геометриями. В частности, для большинства применений, связанных с ооцитами и эмбрионами, пипетки для инъекций должны быть скошены и часто проколоты на кончике [Yaul et al, 2008; Nagy et al, 2002]. Скошенные

наконечники (рис. 11) способствуют проникновению через толстую эластичную плазматическую мембрану.



Рис 11. Изображения электронной и оптической микроскопии предварительно обработанных (верхних) и условно обработанных капилляров.

Различные геометрии, достигаемые методамиковки и полировки, имеют некоторую универсальность для размещения различных сценариев пирсинга. Протоколы микроинъекции для инъекций сперматозоидов, особенно те, которые используются для инъекций ооцитов мышей, иногда нуждаются в односторонних микропипетках до первого «ядра», а затем через оолему с использованием минутных вибраций пьезо-устройства. Пипетки, используемые с пьезо-сверлом, требуют чистого 90-градусного разрыва на наконечнике (поддающегося изготовлению микроформом), а скос или наконечник на наконечнике не нужны для облегчения перфорации. Внутренний диаметр этих пипеток должен быть тщательно контролирован, чтобы пипетка была наиболее эффективной. Вытянутую пипетку обычно разрезают на микроформу до соответствующего диаметра [Sutter Instruments, 2008]. Показаны SEM-изображения наконечников из стеклянных пипеток, показывающие шероховатые края предварительно обработанных пипеток и полированного края в традиционной пипетке в ICSI человека; где гладкие

края и скошенный наконечник с помощью шипового ассистента во время перфорации. Действительно, краевая отделка является важным фактором качества пипетки. Абразивность, кислотная и огневая полировка являются общепринятыми методами для устранения морфологических нарушений от краев пипеток. В недавнем исследовании Яуль и коллеги [Yaul et al, 2008] исследовали влияние различных газовых химикатов во время огневой полировки пипетки ЭКО. Как правило, в промышленности IVF стеклянные микроинструменты изготавливаются из полых стеклянных капилляров диаметром 1 мм [Yaul et al, 2008]. Эти разбавленные капилляры разрезают вручную до длины 100 мм из полых стеклянных стержней, что приводит к резким и сколоченным краям, аналогичным тем. Известно, что результирующие острые и неровные края легко собирают мусор, что делает их неэффективными для лечения ЭКО. Эксперименты Яуля включали анализ процесса огневой полировки www.intechopen.com Biomedical Engineering – от теории к применению 278 с использованием свечей, бутана, пропана, 2350 бутана пропана и оксиацетиленовых газовых пламен, чтобы найти подходящую химию газа, оптимальное расстояние капиллярного относительно к пламени и оптимальным временам нагрева и охлаждения, поскольку морфология наконечника модифицируется фазовым переходом стекла. Результаты показывают, что диапазон температур в 2350 бутан-пропановом газе (между 925–1015 ° C) является оптимальным для огневой полировки капилляров боросиликатного стекла, поскольку температура размягчения боросиликатного стекла составляет 820 ° C, а рабочая температура составляет от 1000 до 1252 ° C.

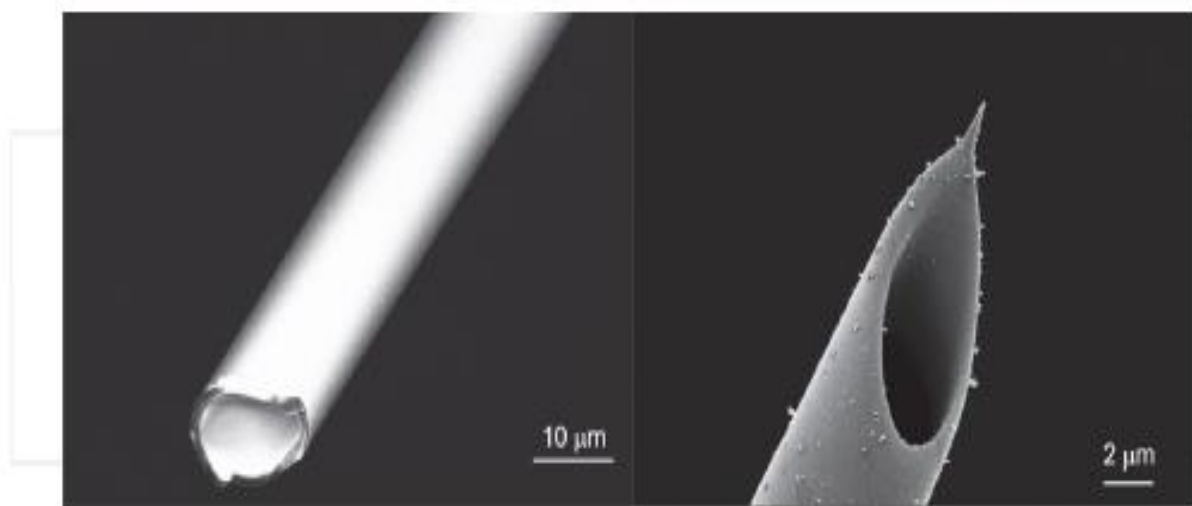


Рис 12. Электронно-микроскопические изображения неполированной пипетки из стеклянной пипетки (слева) и коммерчески полированной (Humagen, Virginia) пипетки (справа)

Неравномерный рисунок в тепловом излучении от неточечного источника нагрева также был предварительно рассмотрен путем воздействия капилляров на верхнюю, среднюю и нижнюю части пламени. Проверка шероховатости края проводилась с помощью оптической микроскопии и обсуждения был обеспечен только качественным образом.

Сообщается, что огнеопыляемые капилляры были протестированы в клиниках ЭКО в Великобритании, с большим одобрением по сравнению с пипетками с неокрашенными полированными краями. Хотя огневая полировка, по-видимому, влияет на производительность пипетки, по-прежнему отсутствует количественная оценка как тепловых параметров (для автоматизации), так и эффектов этой обработки на краевой шероховатости.

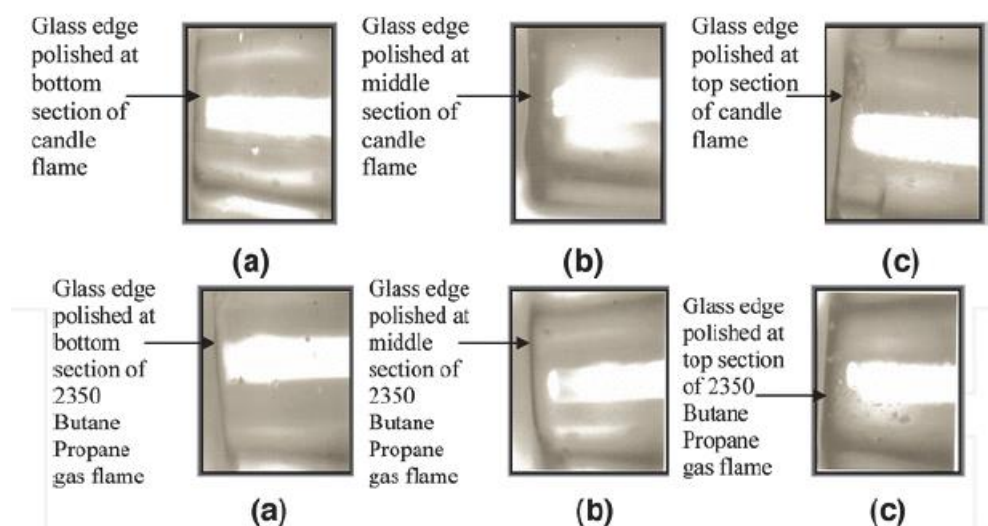


Рис 13. Изображения с оптической микроскопией, показывающие влияние воздействия пипетки на пламя свечи (выше) и 2350 бутан-пропан (ниже) на разных участках пламени свечи

В настоящее время неясно, какие уровни шероховатости приемлемы для адекватной обработки клеток. Возникает ряд вопросов, поскольку важность краевой поверхности должна быть атомарно плоской для обработки клеток или даже для перфорации органелл. Между прочим, Мальбуби и коллеги [Malboubi et al, 2009] однозначно коррелировали шероховатость поверхности пипетки (в порядке нанометров) с образованием гигантских уплотнений при патч-зажимах, предоставляя полуколичественные свидетельства улучшения шероховатости на основе разрешения, обеспечиваемого электронной микроскопией изображений. Обычно используемые методы характеристики для измерения шероховатости в микроэлектронике, такие как атомно-силовая микроскопия (АСМ), можно применять в контексте инструментов для биологических наук. Это, возможно, самый разумный шаг, ожидающий в этом процессе понимания шероховатости края и его последствий для клеточной манипуляции. С этой целью был предпринят ряд усилий по внедрению современных микротехнологий в контексте обработки пипетки и методов пирсинга [Ergenc & Olgas, 2007] появились в литературе. В частности, использование фоновых

ионных пучков и электронной микроскопии, возможно, открыло новый путь к созданию усовершенствованных или даже совершенно новых инструментов в биомедицинских науках. В следующих подразделах мы рассмотрим функции фокусных ионных пучков и начальные усилия по их применению к наукам о жизни.

Изготовление микронанопипеток с использованием технологий фокусированного ионного пучка. В последние несколько десятилетий технологические достижения в области вычислительной мощности, вакуумных насосов и дифференциальных колонн-гранулятов, в частности, оказали большое влияние на электронную и ионную микроскопию. Сканирующие электронные микроскопы (SEM) теперь могут работать в сухом вакууме или в мокром режиме, что позволяет визуализировать гидратированные образцы в их родной среде. Для множества разработок стоит подчеркнуть революционный вклад систем двойного фокусирования ионного пучка (FIBs), где обычная одноэлектронная пушка в SEM теперь дополняется ионной пушкой галлий. Дополнительный пушка держит совпадающую точку с электронной пушкой, и их пересекающийся угол зависит от производителя. Кроме того, системы обычно дополняются источниками газа *in situ*. Ионы галлия больше и тяжелее электронов. При ускорении они сталкиваются с поверхностью и их взаимодействие с самыми удаленными атомами на подложке приведет к атомной ионизации и разрушению химических связей. В результате внешние атомы в подложке распыляются. Доступность газовых инжекторов в камере FIB может фактически помочь процессу выброса атома путем первого адсорбции, а затем химического травления целевой поверхности (рис. 14). Использование газов может ускорить фрезерование в больших регионах и облегчить травление через глубокие траншеи. Кроме того, ионы галлия, вероятно, будут непреднамеренно имплантированы во время травления. Непреднамеренная имплантация ионов галлия может иметь пагубные последствия для применения биомедицинских инструментов, о чем будет сказано ниже.

Другим менее известным функционалом, обозначенным FIB, является газовое осаждение металлов и изоляторов. В этой схеме комбинированное действие ионов галлия (коричневых шариков) и молекул газа (синяя и зеленая сферы – комплексы), выходящие из системы www.intechopen.com. Биомедицинская инженерия. От теории к приложениям. Источники 280 situ приводят к адсорбции молекул газа на подложке, что приводит к диссоциации молекулы газа с тепловым движением. Наконец, напылены нежелательные диссоциированные виды. Подобно фрезерованию, имплантация ионов галлия и диссоциированных видов может произойти во время осаждения. Читатель направляется на монографию о фокусных ионных лучах Люсиль Джаннуцци и Фреда Стиви для тщательного и строгого описания техники.

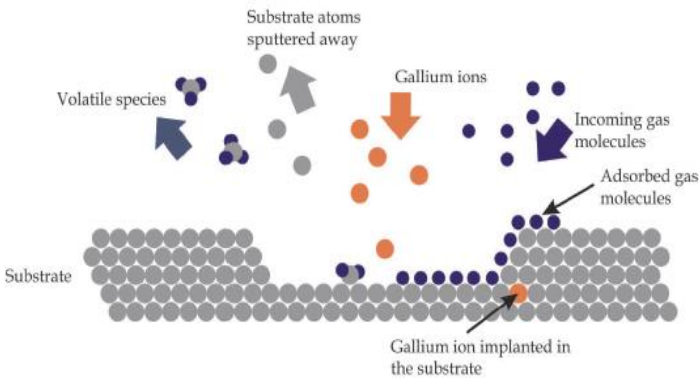


Рис. 14. Схема, описывающая атомные процессы при распылении, основанном на ионном пучке

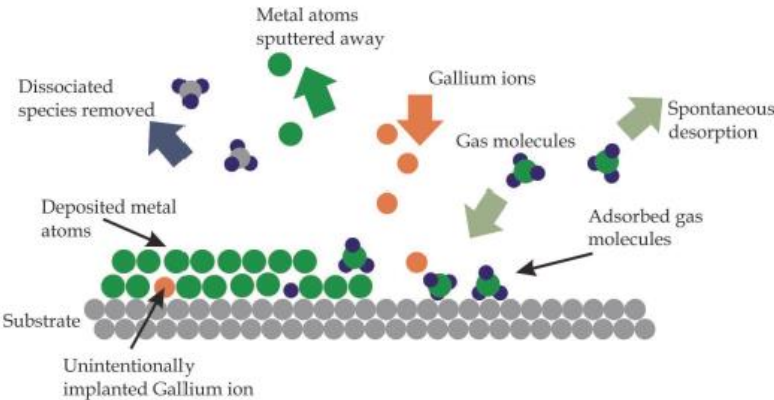


Рис. 15. Схематическое описание атомных струй при ионно-лучевом асимметричном осаждении

Изготовление микронаномов FIB для индивидуальной пипетки. Изготовление микроинъекционных пипеток и микроманипуляторов с точно контролируемыми углами прокалывания, нанометровой полировкой и универсальной геометрией наконечника является следующим шагом для повышения эффективности манипуляции с ячейками. Технологии на основе микросистем обеспечивают обещание массового производства таких высокофункциональных инструментов с высококонцентрированными советами. Эта высокая настройка, вероятно, будет влиять как на текущую, так и на будущую обработку ячеек и клеточное зондирование. В частности, микрообработка FIB в последнее время получает некоторое внимание в этом контексте приложения. Действительно, FIB быстро становится полезным в различных средах, обслуживая множество приложений. Некоторые из них сильно отличаются от первоначальных целей FIB по отношению к, например, идентификации анализа режима отказа в полупроводниковой промышленности или истончению ламелей для проверки электронной микроскопии в области материаловедения. Широкораспространенный характер возможностей FIB в сочетании с увеличением перекрестных помех между физическими и науками о жизни способствовал стремлению FIB к средствам настройки пипетки. Некоторые из первых доказательств этого усилия пришли от Кометани и сотрудников, которые модифицировали обычные стеклянные пипетки (стеклянные капилляры) путем создания наноструктурированных сопел. Этот процесс показан на (рис. 16), где обычная пипетка подвергается вытягиванию (для целей разбавления), покрытию золотом (чтобы минимизировать электрическую очистку при бомбардировке электронным и ионным пучками) и настройке FIB химическим осаждением из паровой фазы (CVD) и дальнейшее измельчение.

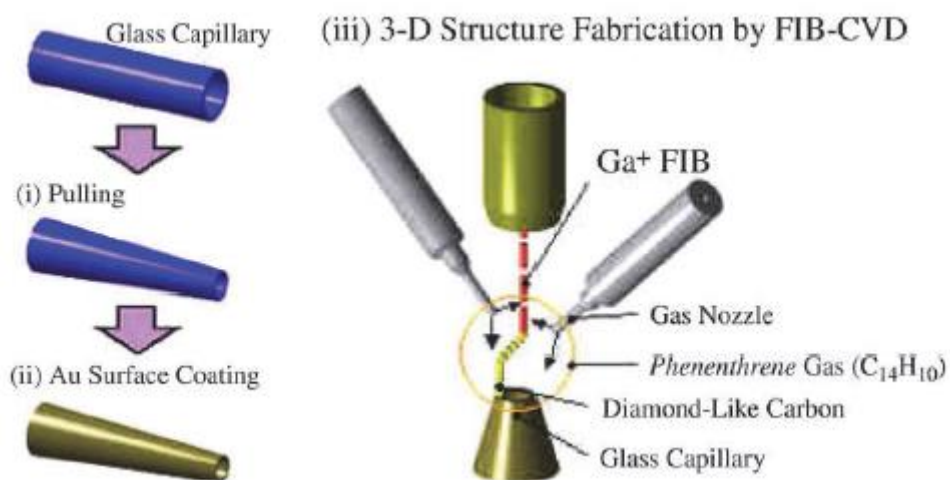


Рис. 16. Пипетка микрофабрикационной последовательности в FIB.

Отложение CVD относится к процессу осаждения газа, описанному в предыдущем разделе. Известно, что газообразный фенантен ($C_{14}H_{10}$) дает трехмерный алмазоподобный углерод (DLC) при использовании в качестве предшественника в сердечно-сосудистых заболеваниях, поддерживаемых FIB. Как сообщается, этот предшественник является хорошим выбором для заполнения заданных пустот или для выращивания заполняющей трубки непосредственно над заполняющим отверстием. Другие газы-предшественники легко доступны на обычных коммерческих FIB, таких как вольфрам (W) и оксид кремния (SiO_2), открывая пространство для материалов для приложений с проводимостью и структурными требованиями.

В этой схеме конструкции сопел были сначала изготовлены на кремниевых подложках. Облучение выбранных областей на поверхности при постоянном потоке фенантенового газа осуществляли после последовательности сканирования, продиктованной функциональным генератором. Этот генератор функции задавал путь пучка ионов, который определяет локальное осаждение DLC, как показано на рисунке 6, с нанометрическим назначением. Путь не только продиктован на плоскости x-y, перпендикулярной кончику, обычным боковым сканирующим действием лучей. Он также подвергается модификации на вертикальной оси z,

параллельной оси пипетки, по-видимому, путем изменения фокальной глубины ионного пучка. Свертка как бокового сканирования, так и вертикального изменения высоты создавала бы спиральный лоток, как показано на схеме, изображенной на, в которой суммируется синтез структур сопел путем осаждения DLC. За изготовлением форсунок следует точечное фрезерование внутреннего канала и настройка наконечника путем секционирования с определенными углами. На рисунке 17 (средний ряд) показана прогрессия конструкции сопла с конечными внутренними и внешними каналами 150 нм и 1580 нм на конце и основании соответственно.

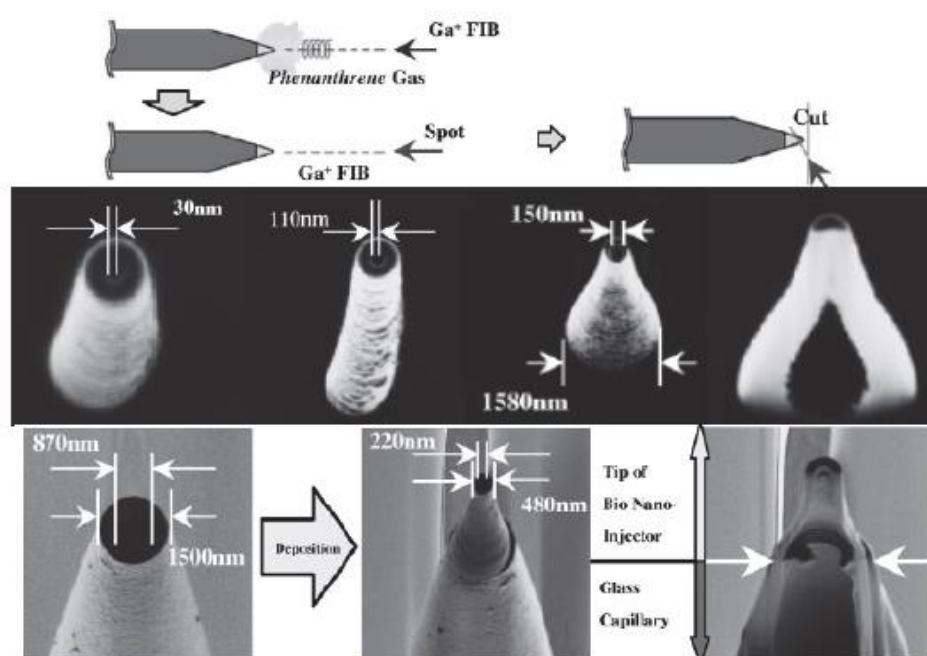


Рис. 17. Последовательность FIB для микропроцессора пипетки через депонированный с помощью паровой фазы DLC

Аналогично, конструкции сопел могут быть реализованы на поверхностях пипетки. Опять же, комбинируя возможности FIB травления и осаждения, окончательное сопло внутреннего диаметра наконечника 220 нм может быть плотно вылеплено на краях коммерческой стеклянной пипетки (нижний ряд). В этом процессе происходит первоначальная полировка краев, чтобы впоследствии облегчить плавное осаждение. Функциональный

генератор, предназначенный для пайки этого сопла, суживал конусообразную оболочку с наружным диаметром от 1500 нм до 480 нм и внутренними диаметрами от 870 до 220 нм. Поперечное сечение структуры показывает резкий интерфейс между стеклом и DLC. Хотя значения прочности интерфейса не сообщались вместе с методологией изготовления, этот подход может быть удобным для обработки сотовой связи. Ранее мы упоминали о том, насколько универсальность фрезерования и осаждения FIB связана не только с высокой позиционной способностью самого ионного пучка, но и с высокой программируемостью сканирующих линз (магнитных полей). В сочетании с программным обеспечением для проектирования сложные трехмерные шаблоны могут быть вылеплены на краях пипетки (рис. 18). Нанонец можно было бы скульптурировать по краям пипетки, предлагая особый подход к сбору 2 мкм полистирольных сфер, погруженных в водную среду.

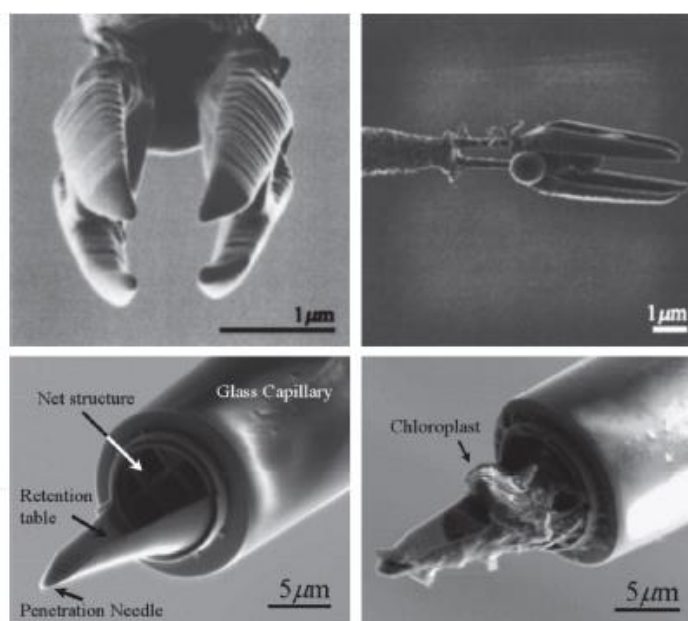


Рис. 18. SEM-изображения архитектур сопел.

Конструкция нанонет служит доказательством концепции, способствующей манипулированию и анализу субклеточных органелл. Возможности дизайна выходят за рамки пассивных компонентов, а также

демонстрируется электростатически активный манипулятор, с помощью 4-пальцевого наноманипулятора, сжимающих латексные микросферы диаметром 1 мкм. Сценарий выборочного захвата субклеточных органелл определенного размера в выбранной ячейке был исследован путем создания многокомпонентного инструмента. Многокомпонентный инструмент состоял из клеточной стеночной иглы и нано-сетки с заранее определенным размером ячейки. Хлоропласты в листе эгерийских плодов избирательно захватывались фильтрованием по размеру в нанонете. Фильтрация активировалась естественным капиллярным всасыванием на кончике пипетки. Действительно, фильтрующее средство было обработано для приближения к определенной ячейке, и игла была вставлена в клеточную стенку с помощью внешнего микроманипулятора. Фильтрация мелких органелл происходила, оставляя хлоропласты в компоненте резания клеток, также действуя как хирургический ковш. Сообщается, что этот процесс был завершён за 7 с, а отфильтрованные хлоропласты из интересующей ячейки показаны на рисунке 9 (внизу справа). Богатство примеров, представленных Кометани и его коллегами, проложило путь для радикального подхода к дизайну и производству пипетки, открыв совершенно новую перспективу в процедурах биологической обработки на клеточном и субклеточном уровне. Следуя начальным этапам доказательства концепции, возникает несколько вопросов относительно надежности; таких как механические свойства ансамбля. В качестве осажденного FIB DLC показан большой модуль Юнга, что дает жесткость, сравнимую с другими керамиками, такими как SiC и WC. Кроме того, *nanomanipulators* пережили испытания, связанные с манипуляцией микросфер и фильтрацией хлоропластов. Однако необходим более подробный анализ механической прочности этих структур в соответствующих контекстных приложениях. Хотя вопросы, касающиеся токсичности и биосовместимости, требуют неотложного внимания [Campo et al, 2011]. Следует подчеркнуть, что ионы галлия, вероятно, будут имплантированы вовремя как фрезерования, так и осаждения в FIB.

Дальнейшие исследования необходимы для устранения влияния ионных имплантированных инструментов на клеточную активность. В следующем разделе описывается работа Кампо и коллег, которые измельчали обычные стеклянные пипетки под особыми углами FIB, что дает чрезвычайно полированные края с высокой точностью. Испытания во время пирсинга эмбрионов мыши коррелировали с увеличением скорости проникновения с уменьшением угла пипетки. Кроме того, оптимальное развитие эмбрионов после манипуляций выявило небольшое влияние остаточных имплантированных ионов галлия, что свидетельствует о биосовместимости. Было также отмечено, что измельченные пипетки сохраняют структурную целостность после повторного пирсинга. Микроизготовка стеклянных пипеток FIB может поддаваться массовому производству, представляя перспективный путь для будущего, все более требовательного, обращения с ячейками.

Микрообработка FIB для обработки клеток. В предыдущих разделах описано, как изготовление пипетки для инъекций эмбрионов является деликатной задачей. Обычно проводимые вручную, пробные и ошибочные вытягивания и нагрева контролируют внутренний и внешний диаметры, а также длину конуса. В FIB области могут быть измельчены выборочно ионами галлия, как обсуждалось ранее. В этом разделе мы опишем, как тщательный выбор времени и тока в ионном пучке позволяет проводить высококачественную полировку, обеспечивая качественно гладкие регулярные сужения. Высокая пространственная селективность в FIB эффективно использовалась для разработки острых наконечников пипетки, создавая высококонцентрированные капилляры. В этом контексте настройка включала контролируемые скошенные углы, а также правильную обработку конуса. В попытке решить проблему удобства использования микробиологических микроконтроллеров для микроконтроллеров и микроконтроллеров 285 пипетки с использованием FIB, а также для частичного устранения биосовместимости ооцитов мышей и эмбрионов были

использованы в испытаниях на пробивание. Мышиные эмбрионы представляют собой идеальный испытательный стенд для первоначальной оценки биосовместимости, поскольку небольшие пертурбации на начальных этапах развития могут повлиять на эмбриональное развитие. В последнее время произошли важные технологические успехи в области микроинъекции ооцита и эмбриона. Микроинъекция яйцеклеток и эмбрионов может быть выполнена с помощью плоских пипетц, которые легче изготавливать, но часто требуется бурение с пьезоэлектрическим приводом для механического продвижения наконечника пипетки через зонный пеллюцид и плазматическую мембрану. Бурение с пьезоприводом является ключом к успеху экспериментальных процедур, связанных с микроинъекцией ооцитов мыши в таких процессах, как ИКСИ. Высокая эластичность плазматической мембраны ооцита мыши затрудняет ручную перфорацию без разрыва с использованием обычных скошенных и шипованных пипеток, систематически требующих пьезо-сверления. Хотя это и не является абсолютно необходимым, пьезо-бурение значительно упрощает пирсинг эмбриона мыши. В этой схеме небольшое количество ртути обычно загружается в микропипетку, чтобы минимизировать боковые вибрации, предотвращая повреждение клеток. Однако дополнительные затраты на пьезорезы и, что более важно, проблемы токсичности, возникающие в результате использования ртути, ограничили использование микроинъекции с пьезосодержащими свойствами лишь несколькими видами. Следуя этой линии исследований и учитывая растущую потребность в улучшении современного пирсинга клеток и качества пипетки заострили обычные стеклянные капилляры с помощью FIB и протестировали их у эмбрионов мыши. Впервые исследовано влияние пипетки субнаметров на прорезание *zona pellucida* и взаимодействия с плазматической мембраны. Кроме того, мониторинг *in vitro* инъецированных эмбрионов контролировался, обеспечивая раннюю оценку повреждений и токсичности от пипеток, обработанных FIB. В общей сложности три капилляра были заострены на 30,

20 и 15 ° (капилляры с номерами 1,2 и 3 соответственно), с профилями, показанными на рисунке 10. Полученные края были гладкими после последовательной полировки. Вставка на рис. 10а (ранее показанная на рис. 18 справа) показывает коммерческую стеклянную пипетку, используемую в человеческом ICSI (Humagen, Virginia) с резким всплеском, который, согласно коммерческим спецификациям, имеет угол между 25 и 30 °. Этот угол аналогичен таковому для пипеток номер 1 и 2.

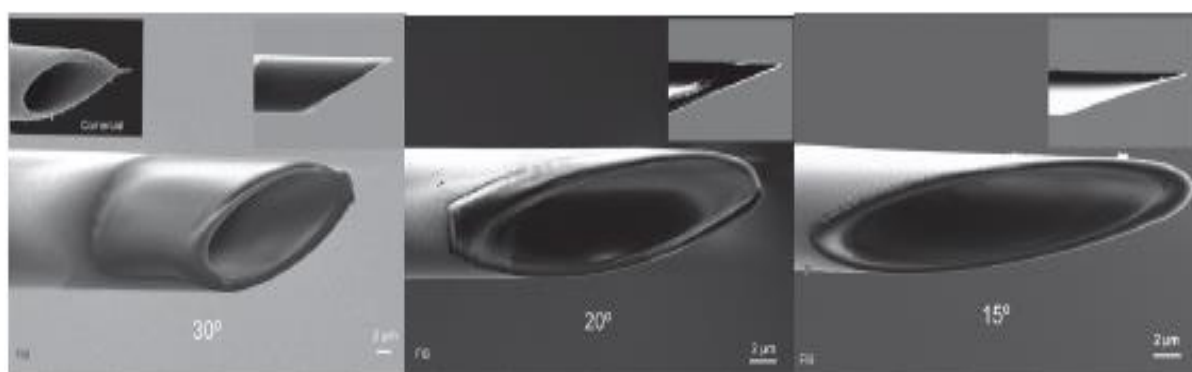


Рис. 19. СЭМ-изображения пипеток (слева) 1, (в центре) 2 и (справа) 3, заостренные под углом 30 °, 20 ° и 15 ° соответственно и показывающие скошенный разрез

В настоящее время интенсивная работа продолжается с целью улучшения технологии восстановления клеток, и после этого всего организма. На уровне отдельной клетки можно изменить свои биохимические процессы, его физиологии и морфологии, его генетический статус. Микрохирургия из одной клетки, заменив ее элементы, введение чужеродного генетического материала делает эту область медицины, сельского хозяйства, очень актуальной. Появление в руках микрохирурга одной клетки и новых микроинструментов, которые имеют возможность активного вмешательства в функционирование клетки, не вызывая значительного ущерба ему, изменили экспериментальную биологию. Клеточная инженерия решает широкий спектр задач, широко используя микрохирургические методы и подходы, которые включают микроинъекции

в клетку и ее органелл – для ядерной передачи и передачи отдельных хромосом, трансгеноза, разделив ранних предимплантационных эмбрионов для двойников и т.д. Микроинструментов для микрохирургии отдельных клеток, микроскопические вещи, сопоставимые по размерам с клеткой или ее органеллами; микроинструментов сделанных на микроузнице (рис. 19). На рисунке показана схема микропипетки, которая может служить в качестве заготовки (основы) для многих микроинструментов.

Инженерный анализ существующих в настоящее время ограничительных конструкций, методов отделки и зондирования стеклянных пипеток и микроманипуляторов позволяет предположить, что они страдают ограниченной функциональностью и часто повреждают клетки; в конечном итоге приводит к лизису. При всех физических параметрах, которые идентифицируют высококачественную пипетку для конкретного приложения, требуется более количественное описание. В частности, на концах пипетки, по-видимому, отсутствует количественная мера, которая может быть обеспечена общепринятыми методами характеристики в микросистемных технологиях, таких как атомно-силовая микроскопия. Похоже, что существует множество возможностей для продвижения современного уровня техники пипетки, изготовления и пирсинга. Большая гибкость, создаваемая микросистемными технологиями в контексте микрожидкостных устройств и микрообработки с ионными пучками, представляет уникальную возможность в биомедицинских науках. В этой схеме инструменты для обработки и мониторинга ячеек могут быть адаптированы к конкретным задачам с беспрецедентным уровнем детализации. Действительно, возможность использования доступных по заказу инструментов открывает двери для улучшения показателей производительности в обычных клеточных процедурах, таких как прокалывание клеток. Высококонтрастные инструменты также могут быть разработаны для выполнения субклеточных манипуляций, которые в противном случае были бы недостижимы с ограниченными функциями

обычных пипеток. Использование ионных пучков для отделки поверхности может, возможно, выработать некоторые утомительные работы, часто участвующие в отделении capillaries. Полировка ионного луча также может количественно способствовать характеристике шероховатости и чистоты. Фактически, фрезерование ионного пучка является полезным инструментом, позволяющим полностью модифицировать морфологию пипеток путем последовательной полировки и последующей реконструкции изображения. Эти томографические возможности могут оказаться полезными при оценке качества текущего и сопутствующего ячеистого инструмента. Предоставили множество примеров в высококонцентрированных микроманипуляторах, ожидающих применения в соответствующих сотовых и субклеточных сценариях. Аналогично, микрозагрязненные пипетки, зависшие от FIB, находятся в ожидании тестирования на вливание. Кроме того, производство микростойких пипеток позволяет исследовать материалы, отличные от оксида кремния, которые могут представлять интерес для дополнительных применений, таких как электрофизиология. Подобно стеклянным пипеткам, микрожидкостные пипетки могут быть снабжены дополнительными компонентами либо по принципу «снизу», либо сверху вниз. Результирующие структуры от добавления датчиков и исполнительных механизмов с различными функциональными возможностями необходимо тестировать в адекватных условиях и дополнительно оценивать биосовместимость. Мы подробно обсудили, как FIB с помощью ионов галлия и осаждения углерода выходит далеко за рамки концепции с точки зрения инновационного дизайна и микропроизводства. Будущие направления в приложениях микротехнологий к наукам о жизни, вероятно, будут основываться на возможностях FIB, а также исследовать приближающуюся ионно-белую микроскопию. С надеждой на будущее, опираясь на возможности FIB, можно было бы изучить в пространстве материалов, а также в пространстве функциональных возможностей инструментов с ионным лучом. Что касается материалов, то большинство изготовлений FIB

для клеточных инструментов используют структурную устойчивость DLC. Однако в коммерческом FIB имеется ряд химикатов со все более очищенными источниками [Botman et al, 2009]. Осаждение золота (Au), палладия (Pd) и платины (Pt) может быть особенно интересным для устройств, требующих электропроводности, таких как электрофизиология. Типично наноструктуры более высокой чистоты осаждаются ионным пучком, чем осаждением с помощью электронного пучка [Utke, 2008]. Тем не менее, дальнейшая работа должна будет оценить влияние чистоты источника на химию и механические характеристики структур, базирующихся на ионных пучках. Среди возникающих новых технологий микромашины и микропродуцирования, способных вносить вклад в сотовые инструменты, возможно, наиболее важна гелий-ионная микроскопия (НИМ). В семенных работах описывается эта новая микроскопия, которая служит как характеристика [Scipioni et al, 2009], так и производственный инструмент [Postek et al, 2007] в микронано-системах. С использованием ионов гелия (He) и, смежотворно, для FIB, очень настраиваемых возможностей фрезерования, НИМ может оказать положительное влияние на ожидаемую оценку биосовместимости. Для оценки ионной дозы имплантации на инструменты и устройства необходимы адекватные исследования по биосовместимости, а также эффекты на субклеточном и клеточном уровнях, а также *in vivo*. Это будут критические параметры, которые могут помешать внедрению ионно-лучевых технологий в науках о жизни. По всей вероятности, эти стратегии должны быть разработаны многопрофильными группами. Фактически, сборка высокопрофессиональных команд, охватывающих биомедицинских ученых и микротехнологий-технологов, безусловно, необходима для полного изучения возможностей эффективных инструментов, ориентированных на конкретные задачи, в контексте субклеточных манипуляций.

Также важно разработать механистическое понимание того, как методы проектирования, изготовления и пирсинга влияют на клеточные структуры. Действительно, влияние параметров пипетки на обработку неясно, поскольку

механизмы, ответственные за различные режимы отказа при обычном пирсинге с пьезоприемником, только недавно были предметом исследования. Механические исследования установили бы столь необходимую корреляцию между (измеряемыми) физическими параметрами пипеток и методами пирсинга с клеточным ответом в контексте теории упругости и биологии. Что касается подготовки операторов и количественной оценки проявленной силы, то появление гаптиков в контексте робототехники может обеспечить количественную оценку силы инъекции клеток, а также улучшить статистику успеха в прошивке и других оперативных процедурах. Уже есть достаточные данные, свидетельствующие о том, что сочетание тактильной и визуальной обратной связи улучшает обработку. Дальнейшая разработка этих технологий, скорее всего, сделает их доступными для биомедицинского сообщества в целом. В недавней литературе появились новые технологии пирсинга, такие как Ross-Drill, способствующие ротационному подходу к прокалыванию клеток, а не тангенциальные и требующие снижения усилий для обучения операторов. Возможность комбинирования Ross-Drill с FIP-полированными пипетками уже была заглажена [Campo et al, 2010a].

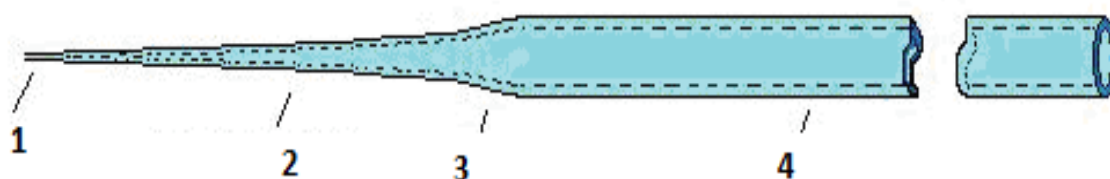


Рис. 20. Схема микропипетки – заготовка для изготовления многих микроинструментов (1 – наконечник, 2 – коническая часть, 3 – плечо, 4 – тело микрокапилляра.)

Главные свойства. 1. Конус – участок пипетки, начинающийся от ее кончика, на протяжении которого внутренний диаметр возрастает

постепенно (рис. 20) Чем плавнее возрастает внутренний диаметр пипетки, тем подвижнее ее кончик. Эмбриологи, которые набирают в микроинъекционную пипетку сходу несколько сперматозоидов, выбирают длинный конус для стабильной фиксации сперматозоида в конкретной позиции. Конус формируется в самом начале процесса изготовления пипетки.

1.5. Материалы и оборудование для изготовления микроинструментов

Для работы с микроскопическими объектами, какими считаются клетки, нужны тонкие, очень крепкие и химически стойкие микроинструменты. Размеры таких микроинструментов, как правило, должны быть маленькими, чтобы случайно не наносить клеточкам огромных повреждений. В особенности это относится к проникающим в клетку микроинструментам. Большая часть из них имеют внутреннее отверстие для проведения разных операций на клетке: микроинъекций, микроэкстракций и др. Следовательно, вначале микропипетки, из которых производят микроинструменты, разделяют на полые и сплошные. В качестве начальных форм таковых болванок имеют все шансы служить круглые палочки из стекла, плоские полосы стекла, а также разные пластмассы, к примеру куски полиэтилена разного диаметра [Никитин, 1986].

Боросиликатное стекло – тип стекла с кварцем и трехокиси бора как главные формирующие стакан элементы. Боросиликатные стекла известны тем, что они имели очень низко коэффициенты теплового расширения ($\sim 3 \times 10 / ^\circ\text{C}$ в $20 ^\circ\text{C}$), делая их стойкими к тепловому шоку, больше, чем какой-либо другой общий стакан [<http://ru.knowledgr.com>].

Боросиликатные стекла с высоким содержанием SiO_2 , низким – щелочного металла и значительным – оксида бора B_2O_3 называются боросиликатными (рис. 21).



Рис. 21. Трубки из боросиликатного стекла

Для работы с микропипетками необходимо разное оборудование, такое как пуллер, который специализирован для производства заготовок, микрокузница, и микрогриндер.

Пуллер предназначен для разрыва стеклянных микротрубочек из разного вида стекла. Инструменты для изготовления микропипеток (пуллеры) предусмотрены для производства в лабораторных условиях микропипеток из стеклянных капилляров способом вытягивания. В операционной системе пуллера имеются разные режимы по производству микротрубочек для микроинструментов. В некоторых пуллерах установлена функция по изменению характеристик при которых будет производится разрыв микротрубочек. Пуллер имеет нагревательную часть при помощи которого происходит, нагрев микротрубочки, а при поддержки создаваемого давления на концах держателей стеклянная заготовка станет плавиться и вытягиваться и в конце концов порвётся. Есть разные виды пуллеров, разных фирм.

Sutter Instrument, разработанный с многолетним опытом работы с съемщиками микропипетки Flaming / Brown и оснащен новыми технологиями, он дает съемник микропипетки Sutter P-1000. Более очевидной новой особенностью считается многоцветный сенсорный экран, который гарантирует интуитивно ясный и полнофункциональный интерфейс.

Новые функции Sutter Instrument P-1000 включают в себя: диагностическое тестирование всех компонентов съемника, встроенное

обнаружение ошибок потери давления воздуха или выгорание нити, легкий доступ к тесту на рампе, измерение температуры челюсти и доступ к предыдущим результатам выталкивания с помощью время нагрева для каждого цикла программы. Кроме того, разделы справки предварительно загружаются для помощи при устранении неполадок на месте, а встроенный глоссарий включает текст, изображения и диаграммы, объясняющие термины, используемые при изготовлении микропипетки. Вращающийся диск предлагается в качестве альтернативы клавиатуре для цифровой записи.

Пуллеры производства Narishige (Япония): Puller (рис. 22). Вертикальный пуллер с двумя режимами работы. Может производить длинные, тонкие микропипетки для инъекций и твёрдые микроэлектроды для патч-клампа. Предназначен для работы с капиллярами из боросиликатного стекла диаметром от 1 до 1,5 мм.



Рис. 22. Пуллер PC-10 компании Narishige

Пуллеры компании The Sutter Instrument: Пуллер P-2000 (рис. 23) компании Саттер для микропипеток представляет значительный шаг вперед в технологии изготовления микропипеток, исследований оптоволокон и подсказок нанобрызг. Инструмент P-2000 компании Саттер объединяет основанный на лазере источник тепла CO₂ с технологией, полученной из

нашего обширного опыта с обычным пуллером. Эта система предлагает возможности, непревзойденные другим пуллерами.



Рис. 23. Пуллер Р 2000 компании Sutter Instrument

Инструмент Р-97 (рис. 24) Саттер горящего типа / микропипетка типа Брауна. Пуллер идеален для изготовления микропипеток, пипеток участка и игл для микроинъекций. Сохраняя многие особенности более ранних моделей, Инструмент Р-97 предлагает улучшения механического, электронного и проектирования программного обеспечения.



Рис. 24. Пуллер Р - 97 компании Sutter Instrument

Принцип работы микрокузницы основан на манипулировании нитью накаливания под микроскопом вблизи оттянутого до небольших размеров кончика стеклянной заготовки. В качестве стеклянной заготовки в основном используют оттянутые стеклянные капилляры или стержни диаметром 1:2 мм. Поперечные размеры и длину ствола заготовки подбирают такими, чтобы ее можно было надежно закрепить в держателе микроманипулятора. Профиль стеклянной заготовки может иметь самую различную форму (круглую, квадратную, прямоугольную или треугольную) Собственно микроинструмент изготавливают, обычно на самом кончике оттянутой заготовки. Все операции при изготовлении микроинструментов на микрокузнице производят нитью накаливания, температуру которой регулируют электрическим током. Стеклянная заготовка при этом, как правило, остается неподвижной и должна постоянно находиться в поле зрения микроскопа.

Стекло заготовки в температурной зоне нагрева нити накаливания размягчают или плавят, в зависимости от температуры и расстояния между стеклянной заготовкой и нитью. Размягченное стекло при этом можно деформировать, формовать (ковать) нитью накаливания или любым вспомогательным инструментом (металлической иглой, скальпелем, проволочкой и др.). При сильном расплавлении стекла заготовки происходит оплавление капилляра или стержня, сужение внутреннего просвета капилляра и даже его запаивание под действием сил поверхностного натяжения.

Фонбрюн выделяет семь главных операций, которыми разрешено производить на микрокузнице: отрыв стеклянных нитей либо капилляров, плавление на расстоянии, оплавление контактное (при конкретном контакте нити накаливания со стеклом), микроковка, микровыдувание (образование

микрошариков), растягивание нити из стекла на расстоянии и контактное вытягивание нити [Фонбрюн, 1951].

В отличие от простых стеклодувных процессов нить накаливания на микрокузнице совершают сменный сообразно последующей причине. Линейные параметры нити накаливания изменяются в зависимости от силы тока. Если применять максимальное разрешение микроскопа, конец разогреваемой или охлаждающейся нити станет вылезать из поля зрения. Для того чтобы видеть процесс изготовления микроинструмента, пришлось бы смещать микроскоп, а стеклянную заготовку непрерывно удерживать на конкретном расстоянии от нити накаливания. Потому целенаправлено ставят стеклянную заготовку неподвижно, а манипулировать только нитью накаливания.

Нить накаливания перемещают по трем перпендикулярным направлениям в определенной последовательности от стеклянной заготовки. Перемещение в горизонтальном и вертикальном направлениях выполняют при помощи микрометрической подачи, а перемещение вдоль оптической оси микроскопа создают при помощи кремальерного приспособления. Микрометрическое смещение нити накаливания позволяет очень точно манипулировать ею вблизи стеклянной заготовки в процессе изготовления микроинструментов.

Микрокузница Фонбрюна проста в работе. Стеклянную заготовку перемещают относительно нити накаливания вручную в момент установки ее в тиски и затем механически при помощи поворотного круга, позволяющего вращать заготовку в плоскости, перпендикулярной оптической оси микроскопа. Ток накала регулируют при помощи реостата, помещенного в корпусе микрокузницы. Микроскоп имеет объектив с большим рабочим расстоянием (30 мм) и позволяет просматривать поле зрения диаметром около 3 мм. На микрокузнице предусмотрена регулируемая подача воздуха в зону нагрева нити накаливания при помощи воздушного нагнетательного

насоса. На рис. 25 представлен общий вид микрокузницы Фонбрюна, детальное описание которой можно найти в его работах [Фонбрюн, 1951].

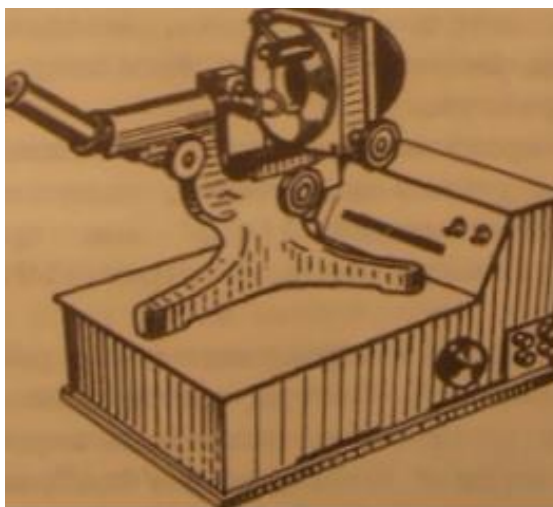


Рис. 25. Микрокузница Фонбрюна

Микроманипулятор скольжения типа ММ-1 позволяет выводить плоскость нити накаливания как в строго горизонтальное положение, так и под небольшим углом к оптической оси микроскопа. Кремальерный механизм продольного перемещения стеклянной заготовки позволяет быстро устанавливать ее кончик в зоне нагрева нити накаливания. На микрокузнице имеется специальное режущее приспособление для отрезания стеклянных нитей, управляемое фототросиком.

Микрогриндер предназначен для заточки стеклянных заготовок под разными углами. EG-401 Microgrinder обладает станком для работы с пипетками диаметром от 1–1,5 мм. Движение пипетки вверх/вниз в диапазоне 47 мм. Движение микроскопа X 7 мм, Y 30 мм, Z 8 мм. Имеет окуляры 10x увеличением, и объективы 3x. Скорость вращения алмазного шлифовального круга в диапазоне от 150-2 000 о./мин.

Другая же разновидность микрогриндера EG-45 Microgrinder (рис. 26) так же обладает станком для работы с пипетками диаметром от 1 по 1,5 мм. Вероятность движения пипетки вверх/вниз в диапазоне 47 мм. Скорость

вращения алмазного шлифовального круга в диапазоне от 150 по 2 000 о./мин.



Рис. 26. Микрогриндер EG-45 компании Narishige

Глава 2. Материалы и методы исследования

Для изготовления насадки для экструдера 3D-принтера нами были выбраны стеклянные заготовки в виде капилляров из боросиликатного стекла (Borosilateglass н.д. 1,0 мм, а в.д. 0,75 мм) (рис. 27) и (Borosilateglass н.д. 1.0 мм, а в.д. 0,50 мм), (Borosilicate glass н.д. 1,2 мм, а в.д. 0,70 мм). Стеклянные заготовки произведены в США компанией «Sutter Instrument».

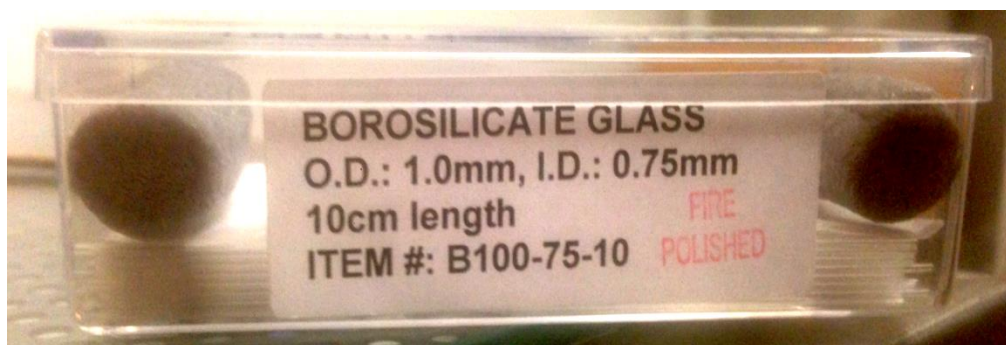


Рис. 27. Borosilateglass н.д. 1,0 мм, а в.д. 0,75 мм)

Изготовление и обработка микронасадки для экструдера производится на зарубежной аппаратуре:

- Micropipette Pullers P-1000 (компания Sutter Instrument, США);
- Narishige Micropipette Grinder EG-400 (компания Narishige, Япония);
- Микрокузница (компания Narishige, Япония).

1. Этап изготовления.

При помощи Пуллера (компании Sutter Instrument) были определены параметры для вытягивания суживающейся части заготовки: 1. Температура плавления стеклянного капилляра; 2. Усилие для растяжения; 3. Параметр вязкости стекла; 4. Время подачи охлаждающего воздуха; 5. Давление потока воздуха.



Рис. 28. Пуллер P-1000 компании Sutter Instrument

Для высококачественной изготовления стеклянных заготовок нужно верно настроить все составляющие, входящие в устройство пуллера. Основной частью в данном приборе считается нагревательный элемент, который установлен в центре устройства. Нагревательный элемент обязан быть правильно согнут (рис. 29) и находиться ровно над каналом для подачи воздуха. Это отверстие предназначено для быстрого охлаждения нагревательного элемента.



Рис. 29. Правильно установленный нагревательный элемент.

При установке заготовки в держатель пуллера она должна проходить ровно по центру нагревательного элемента (рис. 30), чтобы при изготовлении не возникло проблем, и дальнейшие заготовки имели одинаковые формы.

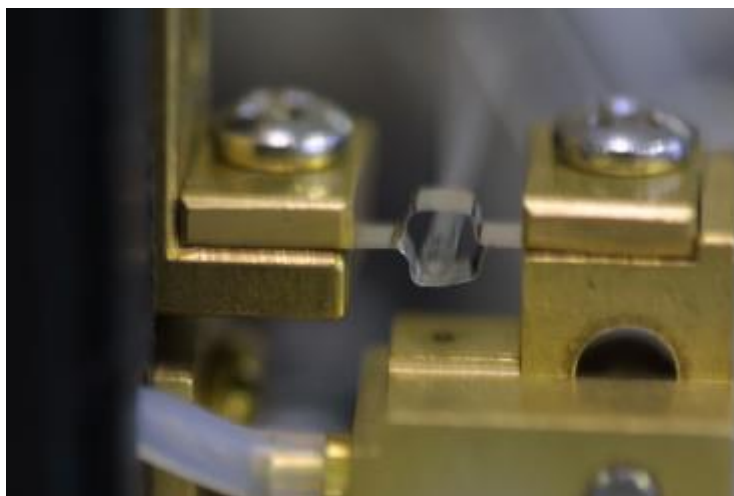


Рис. 30. Правильное расположение нагревательного элемента над каналом для охлаждения

2. Этап изготовления.

Обработка конической части заготовки при помощи микрокузницы компании Narishige (Япония) (рис. 31). Данное устройство имеет нагревательный элемент при помощи которого происходит отламывание стеклянного конца для получения необходимого диаметра суживающей рабочей части микрокапилляра.



Рис. 31. Микрокузницу МФ-900.

Отдельные механизмы вращения для вертикального и горизонтального перемещения позволяют пипетке подходить под любым углом, в то время как специальное устройство в секции нагревателя может сформировать его в любую требуемую форму. Так же, как и в обычных масштабах, транспортер для измерения углов предусмотрен на окуляр микроскопа.

3. Этап изготовления.

Финальная обработка – шлифовка заготовки суживающейся части микрокапилляра производилась при помощи микрогриндера компании Narishige EG-400 (Япония). В качестве гриндера использовался образец компании Narishige EG-400 (рис. 32), который является наилучшим блоком для снятия фаски иглы, что дает как более острый угол так и большее отверстие. Он также может быть использован практически любой тонкой операции полирования. Шлифовальный диск А «оселок» раскручивается стабилизированным с переменной скоростью двигателем для любого быстрого измельчения или сверхточной полировки. EG-400 микрошлифовальный станок включает в себя ось для микроманипулятора, а вода капает в устройстве для обеспечения непрерывной смазки, а интегральный микроскоп для наблюдения за процессом измельчения.



Рис 32. Гриндер Narishige EG-400

4. Этап изготовления.

Подготовка канюли для крепления стеклянной части микронасадки. При помощи бор машины в верхней части канюли просверливалось отверстие необходимого диаметра (1 мм) для установки микронасадки.

5. Этап изготовления.

Сборка опытного образца микронасадки для экструдера 3D биопринтера;



Рис. 33. Канюля для микронасадки

Испытания опытных образцов микронасадки для экструдера 3D биопринтера были проведены на базе частного учреждения Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс» Москва.

Испытания проведены с использованием клеточных сфероидов, примененных для биопечати щитовидной железы. Для проведения испытаний с клеточными сфероидами использовались следующие реагенты и материалы: сбалансированный солевой раствор Хэнка, вольфрамовая проволока, анти-E-cadherin (BD Biosciences, cat. No 610182, 1: 1000), анти-эзрин (Thermo Scientific, номер № MS-661-P1, 1: 400), анти-PECAM (BD

Biosciences, № 550274, 1: 100), анти - caspase-3a (Cell Signaling, № 9661), анти-pHH3 (Cell Signaling, № 9701), анти-TTF1 (Dako, номер № M3575), Hoechst 33258 (Sigma, №. B2883), Alexa Fluor 488 антитела против мышинового IgG1 (γ 1) козы (Thermo Scientific, № по каталогу A-21121), Alexa Fluor 647 козы антитела против IgG2a (γ 2a) (Thermo Scientific, № по каталогу A-21241)), Alexa Fluor 647 куриного анти-крысиного IgG (H + L) (Thermo Scientific, № по каталогу A-21472), гидроксид натрия (Merck, № 106498), бикарбонат натрия (Paneco, cat. No F022), забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS, Gibco, № 18912-014), оболочка из политетрафторэтилена (PTFE) Corning Transwell®-COL вставки (Corning, cat. нет. 3491, 0,4 мкм), желатин (Fluka, № 48723-500G-F), сахароза (Sigma, кат. № 2) Биологическая сборка 9 (2017) 034105 Е.А. Буланова и др. S0389), SU5416 (Cayman, cat. No 13342), 100-миллиметровое блюдо для культивирования пластиковых клеток (Corning, № 430167).

Полная среда для культивирования включала модифицированную Дульбекко среду Eagle (DMEM, Gibco, № 12491-015), содержащую 10% фетальную бычью сыворотку (FBS, Gibco, № 16000-044), дополненную антибиотиком / антимикотическим (Gibco, № 15240- 062) и 1 мл-глутамина (Paneco, № F032).

Выделение коллагена из хвостов крыс и подготовка коллагенового геля. Коллаген хвоста I крысы получали в соответствии со способом, описанным Rajan et al. Установленная концентрация коллагена в растворе составляла 3,12 мг / мл. Для приготовления коллагенового геля 890 мкл раствора коллагена смешивали с 60 мкл 1 М гидроксида натрия, 250 мкл 7,5% бикарбоната натрия и 300 мкл PBS.

Экспланты щитовидной железы были выделены из одной группы эмбрионов мыши [Delmarcelle et al, 2014]. Аллантаическую ткань выделяли из другой группы эмбрионов мыши [Drake et al, 2000]. Диссекция не проводилась в стерильной атмосфере, поэтому экспланты и аллантаиды несколько раз промывали в стерильной культурной среде. Индивидуальные

экспланты щитовидной железы и аллантаиды затем суспендировали в 20 мкл полной культурной среде и наносили на нижнюю часть крышки 100-миллиметровой пластиковой чашки Петри. Затем крышки переворачивали и помещали в блюда для создания висячих капель. SU5416 (ингибитор киназы VEGFR2) растворяли в диметилсульфоксиде (раствор ДМСО, раствор 20 ммоль) и добавляли при 5 мкМ для эксплантов щитовидной железы. Контрольные экспланты щитовидной железы подвергались воздействию той же концентрации средства, что и образцы для испытаний. Висячие капли среды помещали в увлажненную атмосферу и культивировали при 37 ° C, 5% CO₂ в течение 18-24 ч. Через 18-24 ч культивирования полученные сфероидные экспланты щитовидной железы и аллантаиды были использованы для биопечати структуры щитовидной железы мыши.

Слияния между соседними сфероидами измеряли [Susienka et al, 2016]. Углы слияния измерялись вручную и отображались как функция времени с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Чтобы напечатать мышиную щитовидную железу в гидрогеле, на прозрачной мембране из PTFE, сотрудники использовали многофункциональный биопринтер Fabion 3D с системой турникета (см. Рисунки 34 (A) - (C)). Это устройство состоит из следующих функциональных систем: шприцевого насоса; жидкий чип; поршень загрузки (d); захват поршня (e); (f) с канавкой для удаления жидкости (g) (рисунок 34 (B)). Шприц, нагруженный сфероидной подвеской, был установлен в шприцевой насос и, таким образом, подключен к печатающей головке. Как только суспензия сфероида попала в печатающую головку, система автоматизации включала насос шприца, а затем отключила его в тот момент, когда сфероиды вошли в контакт с поршнем. Поставляющий поршень (f) перемещается вверх, закрывая отверстие для удаления жидкости (g) и освобождая канал для прохождения сфероида; захватный поршень (e) скользит вниз, открывая проход для сфероидов. Затем загрузочный поршень

(d) сразу перемещал сфероиды вправо и под поршнем (f). Положительный поршень транспортировал сфероиды вниз до контакта с печатной поверхностью и затем возвращался в исходное положение, таким образом завершая один цикл биопреобразования. Поршень имеет канавку, немного выше основания (g), обеспечивающую канал для слива жидкости. Этот ресурс применяется для сведения к минимуму количества жидкости, осаждаемой тканевыми сфероидными. Этот отрезок с уменьшенным диаметром расположен между выходом и горизонтальным каналом. Вакуумный насос удаляет жидкость, в то время как тканевые сфероиды удерживаются на месте самим поршнем.

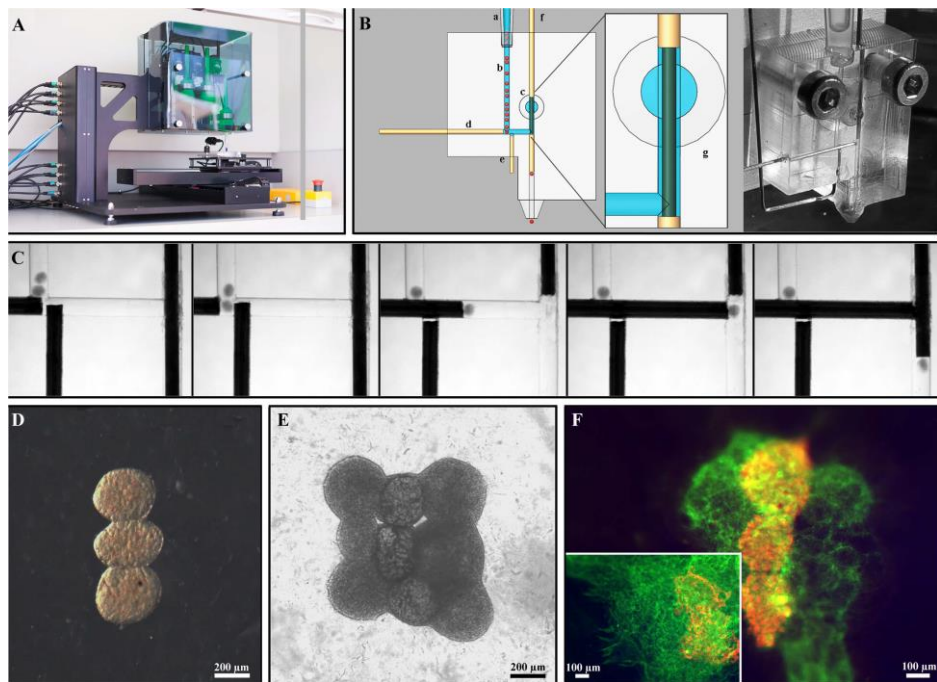


Рис. 34. Биопечать конструкции щитовидной железы мыши с использованием устройства турникета.

В биопринтере имеется три диспенсера для шприцев без воздуха, один из которых способен поддерживать температуру до 4°C , одну распылительную насадку и один пневматический раздатчик шприцов. Печатающая часть XY перемещается в диапазоне 5 мкм и имеет нагревательную базу с максимальной температурой 100°C .

Экспериментальная головка одного сфероидного принтера была разработана в доме и заняла место одного шприца для этого эксперимента. Структура была разработана для удобного включения в биопринтер и последующее техническое обслуживание. Модуль печатающей головки может быть стерилизован либо ультрафиолетовым облучением, либо водным раствором этилового спирта. Для обеспечения гидрогелевой обработки коллагена была разработана специальная система охлаждения / обогрева. Система состоит из регулируемого нагревательного алюминиевого основания (при температуре от комнатной температуры до 200°C с шагом $0,1^{\circ}\text{C}$) и системы охлаждения (при температуре от комнатной до -4°C с шагом $0,1^{\circ}\text{C}$) для охлаждения содержимого шприца. Температура шприца контролировалась системой охлаждения на основе модуля Пельтье. Этот модуль допускал охлаждение рециркулирующей жидкостью, которая передает тепло через свернутую бронзовую трубку вокруг шприца. Охлажденный шприц удерживал смесь коллагена при температуре 4°C . Базовая плита использует нагреватель картриджа для изменения его температуры до 100°C . При осаждении на нагретую пластину (28°C) коллагеновая смесь полимеризуется, позволяя контролировать трехмерную форму печати.

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

Изготовление микронасадки для экструдера 3D-принтера происходило по изложенной ранее схеме, состоящей из пяти этапов.

Разработка микронасадки для экструдера 3D-принтера производилась при помощи зарубежного оборудования. Такое оборудование как Пуллер Sutter P-1000, используется для изготовления заготовок для различных микроинструментов, в том числе и разработанного нами. Для изготовления микроинструментов используются различные виды стекла: боросиликатное, алюмосиликатное и др., в некоторых случаях используют пластиковые заготовки.



Рис. 35. Borosilicateglass н.д. 1,0 мм, а в.д. 0,50 мм.

В ходе испытаний стеклянных заготовок различного диаметра было установлено, что микронасадки с заданными геометрическими параметрами изготавливаются лучшего качества из заготовок боросиликатного стекла с внутренним диаметром 0.50 мм.



Рис. 36. Исходные размеры заготовки

Было установлено, что основные геометрические параметры микронасадки реализуются в ходе обработки заготовки при помощи Пуллера.

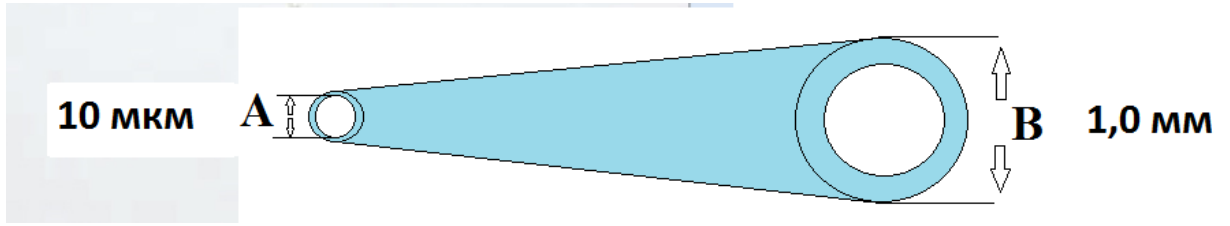


Рис. 37. Заготовка после обработки на Пуллере

Последующие этапы изготовления суживающейся части микронасадки являются вспомогательными, однако при помощи микрокузницы и гриндера осуществляется доработка микронасадки до необходимых геометрических параметров.

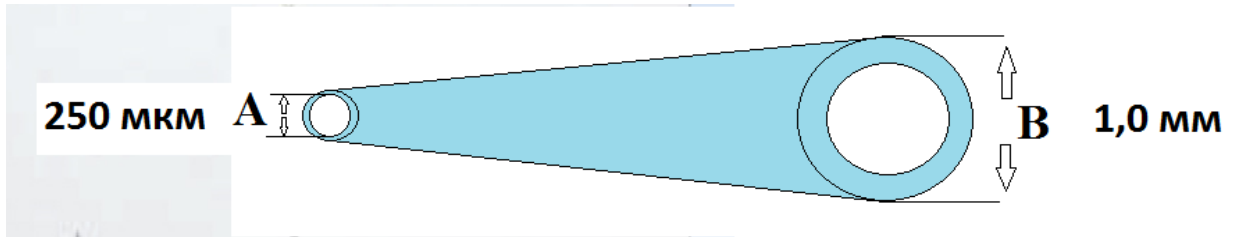


Рис. 38. Размеры готовой микронасадки

После изготовления стеклянной части микронасадка монтировалась при помощи эпоксидного клея в подготовленное отверстие канюли.

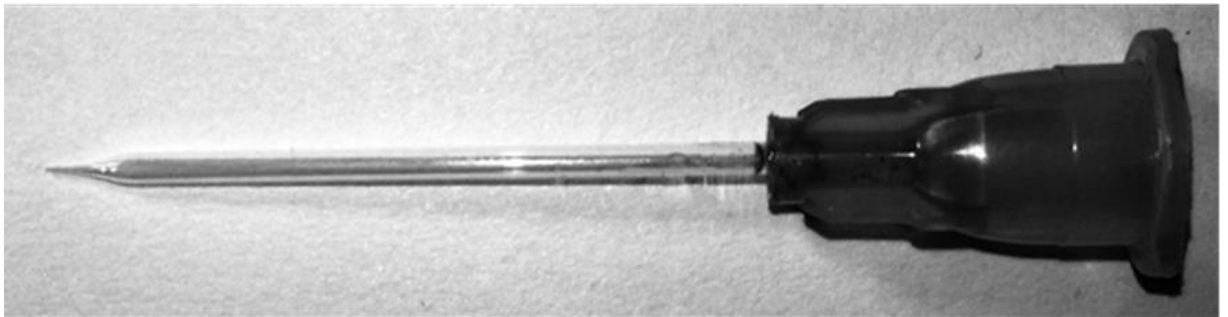


Рис. 39. Микронасадка для 3D-биопринтера

Испытания опытного образца микронасадки для экструдера 3D биопринтера печатающего клеточными сфероидами осуществляли сотрудники компании «3Д Биопринтинг Солюшенс» Москва.

В экструдер под давлением подавалась суспензия содержащая клеточные сфероиды диаметром около 200 мкм. Пройдя внутри канюли сфероиды легко попадали в суживающуюся часть микронасадки и далее выстреливались в гидрогель.

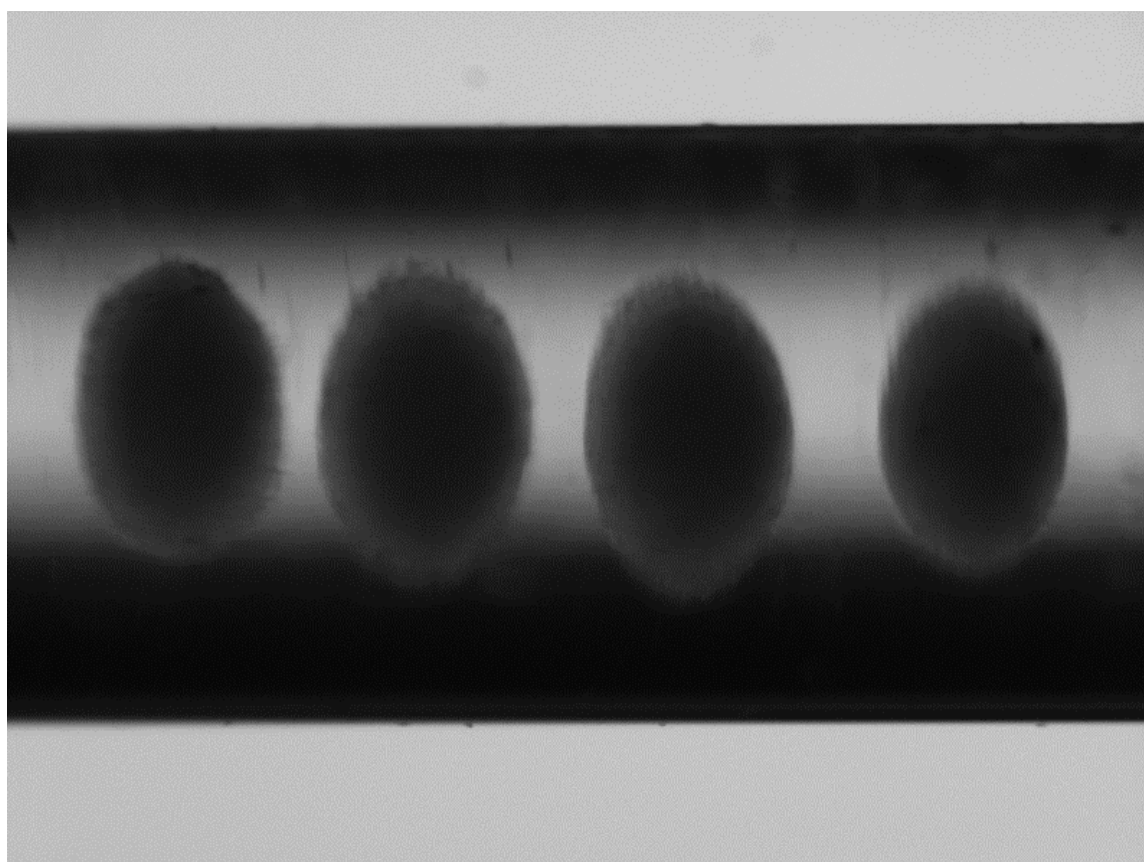


Рис. 40. Клеточные сфероиды в микронасадке

Было установлено, что сфероиды могут легко проходить по сужающейся части микронасадки выстраиваясь друг за другом, что позволяет обеспечить их одиночный выход из суживающейся части без нарушения их целостности.

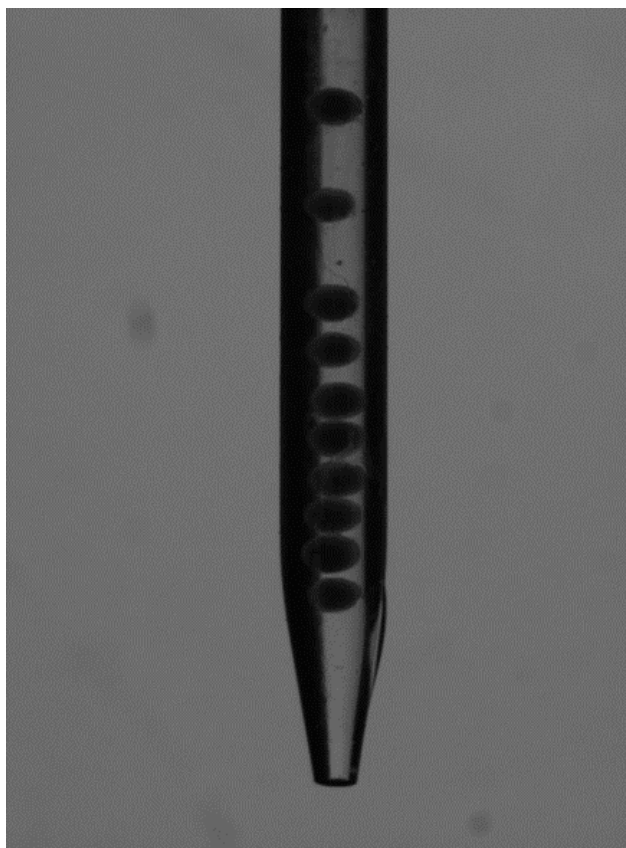


Рис. 41. Микронасадка с клеточными сфероидами

Таким образом было продемонстрировано, что структура органа (например, щитовидной железы) может быть напечатана с использованием разработанной микронасадки и двух типов округлых сфероидов эмбриональной ткани: тиреоидных сфероидов и аллантаидных сфероидов внутри коллагенового гидрогеля с использованием новой микронасадки способной точно размещать один сфероид за другим в один подход.

В дальнейшем в течение 4 дней тканевые сфероиды сливаются в единую структуру и интегральную конструкцию органа, в которой эндотелиальные клетки от аллантаидных сфероидов вторглись и васкуляризировали тиреоидные сфероиды, создавая плотную капиллярную сеть вокруг развивающихся фолликулов.

Возможность использования тканевых сфероидов в качестве строительных блоков в 3D-биопринте, в компании «3Д Биопринтинг Солюшенс» впервые начали с математического моделирования и

компьютерного моделирования. Здесь они впервые провели математическое моделирование и компьютерное моделирование для биообработки полного внутриорганного ветвящегося дерева, включая проксимальные и дистальные сосудистые сегменты. Теоретически смоделировано и смоделировано слияние сфероидов, состоящих из плотно упакованных эпителиальных клеток. Для исследования процесса слияния использовалась многоклеточная решетчатая модель, описывающая взаимодействия между ячейками на основе гипотезы дифференциальной адгезии (ДАИ). Эта гипотеза гласит, что: клеточная адгезия в многоклеточных системах зависит от различий в энергии между различными типами клеток, и клетки в агрегатах достаточно подвижны, чтобы достичь конфигурации, которая минимизирует межфазную энергию системы. В модели каждый слот трехмерной кубической решетки занимает либо ячейка, либо единица объема аналогичного размера гидрогелевой среды. Для моделирования многоклеточной системы был применен кинетический метод Монте-Карло (КМК). В методе КМК самоадаптация клеток в клеточной агрегатной системе описывается с точки зрения скоростей перехода, соответствующих возможным конформационным изменениям системы, а затем соответствующая временное развитие системы выражается в терминах этих скоростей. Динамика ячеек зависит от скоростей переходов клеточного обмена с соседними клетками разного типа и / или с гидрогелевыми частицами, которые даны соотношением Аррениуса. На каждом шаге вычисляются скорости перехода для всех возможных изменений из текущей конфигурации, а затем выбирается новая конфигурация с вероятностью, пропорциональной скорости соответствующего перехода. На рисунках 42 (А) – (D) изображены компьютерные симуляции процессов слияния между двумя или тремя тканевыми сфероидными из разных исходных параметров для биотрансляции конструкции щитовидной железы. Затем, чтобы исследовать параметры биопреобразования, мы смоделировали слияние трех TS, окруженных шестью сосудистыми сфероидными, которые образуют основную структуру

сконструированной конструкции щитовидной железы (рис. 40 (E)). Затем эта установка была испытана экспериментально (см. Ниже). Модель структуры щитовидной железы помещается в разведения разветвленного сосудистого дерева с использованием самосборки сфероидов сосудистой ткани (рис. 42 (F)). Такой подход необходим в случае ортотопической имплантации с использованием хирургических сосудистых анастомозов. В случае гетеротопической имплантации под высоковазуляризированной капсулой в почках, которая была реализована в нашем исследовании, предлагаемая биопреобразование полного разветвленного сосудистого дерева не требуется для достижения желаемого уровня васкуляризации в имплантированной конструкции щитовидной железы.

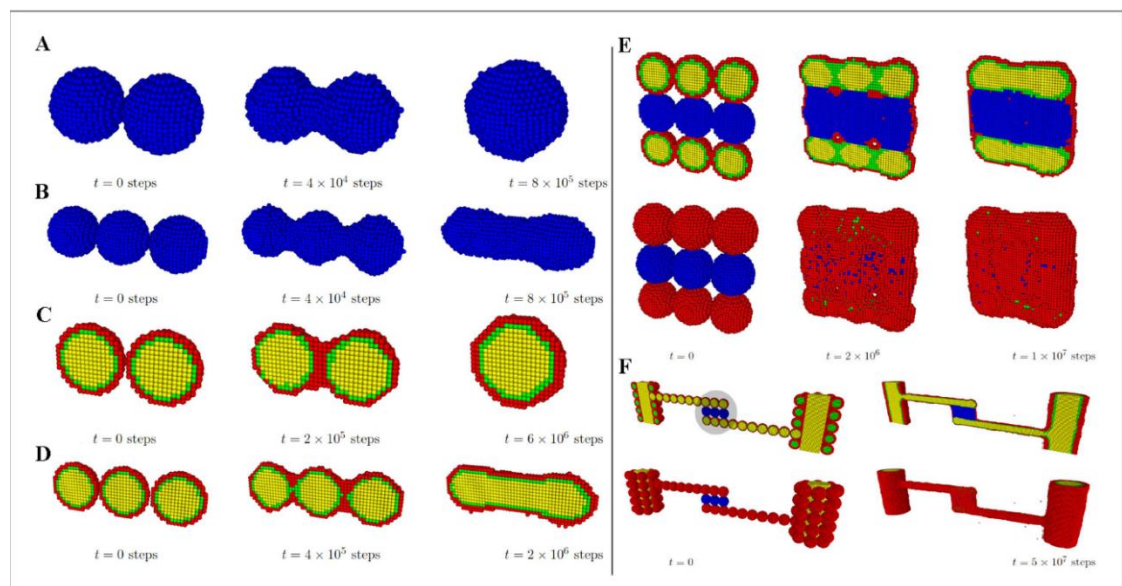


Рис. 42. Математическое моделирование и компьютерная стимуляция процессов слияния, начиная с разных начальных настроек для биоформирования структуры щитовидной железы мыши

(A) Временное слияние между двумя сфероидами щитовидной железы (TS) inKMCsimulations. Первоначально каждый сфероид содержит 2176 клеток. Три моментальных снимка берутся при $t = 0$, 4×10^4 и 2×10^6 шагов соответственно. (B) Временная эволюция трех плоских TS. Три

моментальных снимка берутся при $t = 0, 4 \times 10^4$ и 8×10^5 шагах соответственно. (C) Временная эволюция двух плавящихся сосудистых сфероидов. Первоначально каждый сфероид содержит 1336 клеток, которые включают 848 гладких мышечных клеток (SMCs в красном) во внешнем слое и 488 эндотелиальных клеток (ECs in green) во внутреннем слое, который поглощает 840 внутренних частиц гидрогелевой среды (желтым). Три моментальных снимка представленных в поперечном сечении берутся при $t = 0, 2 \times 10^5$ и 6×10^6 шагов соответственно. (D) Временная эволюция трех слизистых сосудистых сфероидов. Три моментальных снимка представленных в поперечном сечении берутся при $t = 0, 4 \times 10^5$ и 2×10^6 шагов соответственно. (E) Временная эволюция системы из шести сосудистых сфероидов с тремя TS в середине, которые составляют центральную часть белой щитовидной железы. Три моментальных снимка представленных в поперечном сечении (сверху) и внешних представленных (внизу) берутся при $t = 0, 2 \times 10^6$ и 1×10^7 шагов соответственно. (F) Временное развитие структуры сосудистой системы щитовидной железы с двумя сосудами большого диаметра, изготовленными из сфероидов сосудистой ткани. Два моментальных снимка поперечного сечения (сверху) и внешних представлений (внизу) берутся при $t = 0$ и 5×10^7 шагах соответственно.

Основываясь на принципе самосборки, сотрудники компании «3Д Биопринтинг Солюшенс» стремились напечатать конструкции щитовидной железы мыши, используя округлые мышечные эмбриональные экспланты щитовидной железы для фолликулярного отсека мышей Allantois в качестве сосудистого, то есть ЕС, источника. Экспланты щитовидной железы были микродиссифицированы из e14.5 эмбрионов мыши, как описано в, и культивировали всю ночь в висячей капле, чтобы получить округлые клетки ткани, подходящие для биопечати (рис. 43 (A)). Ранее было показано, что эмбриональный фолликулогенез щитовидной железы мыши начинается с e14.5 и сопровождается васкуляризацией эмбриональной ткани щитовидной

железы. Аллантаиды микродиссифицировали из e8.5 эмбрионов мыши, как описано, и культивировали 12 часов в висячей капле для получения округления клеток ткани (рис. 43 (B)). Рассеянные аллантаиды мыши e8.5 имеют удлиненную стержнеобразную форму и состоят из клеток с ангиобластным фенотипом. Ранее сообщалось, что выделение аллантаидов на этой стадии с последовательной инкубацией в висячей капле в присутствии VEGF индуцирует эндотелиальную дифференциацию и образование кластера EC с последующей генерацией микрососудов крови. Таким образом, аллантаиды использовались в качестве источника EC; экспланты щитовидной железы как источник фолликулярных клеток и VEGF. Когда экспланты щитовидной железы и аллантаиды культивировали в висячих каплях, они принимали сферическую форму в течение ночи со средними наружными диаметрами $388,2 \text{ мкм} \pm 45,3$ ($n = 168$) и $493,6 \text{ мкм} \pm 114,3$ ($n = 28$), соответственно. При оценке кругов AS и TS они были оценены близко к значению 1,0, $0,92 \pm 0,06$ ($n = 28$) и $0,90 \pm 0,05$ ($n = 168$) соответственно, что указывает на почти идеальный круг (рис. 43 (C)). Это исследование было выполнено с использованием программного обеспечения Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

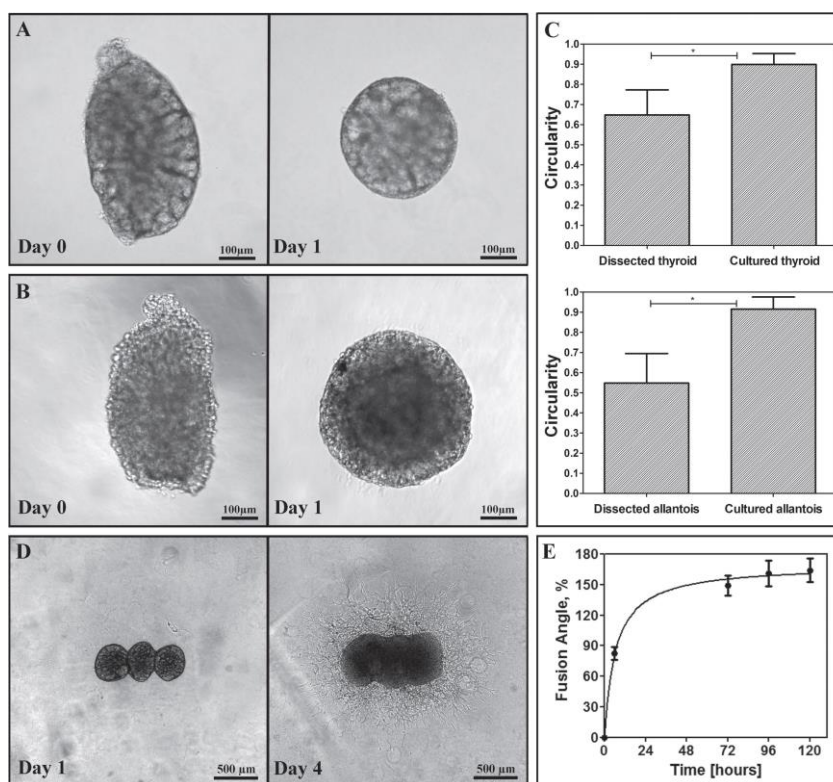


Рис. 43. Создание округлых строительных блоков для печати щитовидной железы мыши. Репрезентативные изображения расчлененной ткани и сфероидов щитовидной железы (A) и аллантаоидов (B) после культивирования капли. Вычислено округлость до и после висающей культуры капель (C). Круглость щитовидной доли и аллантаоидов увеличилась после висающей культуры капель. Для статистического анализа использовался непарный t-тест (* P < 0.001). (D) Слияние трех щитовидных сфероидов (TS) в коллагеновом геле через 4 дня. TS полностью слит и образовал сплошную плоскую конструкцию с тонкими ростками. Угол плавления между отдельными сфероидными увеличился до 162 ° С, показывая полный сфероидный синтез (E)

Таким образом, результаты, полученные сотрудниками компании "ЗД Биопринтинг Солюшенс» показали, что биопечать тканевых сфероидов, полученных из расчлененных тканей эмбриональных мышей, используемых в качестве строительных блоков, и способных к слиянию, может развиваться в васкуляризированной компетентной структуре щитовидной железы.

Полученные результаты представляют собой значительный прогресс в развитии технологии органной печати и важный шаг к возможному биопреобразованию васкуляризированной функциональной ткани человека.

Выводы

1. Для изготовления микронасадки оптимальными являются заготовки из боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.0 мм, а внутренним диаметром 0.50 мм.

2. Технология изготовления состоит 5 этапов: формовка на пуллере, подрезка на микрокузнице, шлифовка на гриндере, подготовка канюли, сборка микронасадки.

3. Разработан опытный образец, который состоит из стеклянной суживающейся части и пластиковой канюли.

4. Изготовленные микронасадки прошли испытания и могут использоваться для печати клеточными сфероидными.

Список использованных источников

1. Готье С. В., Хомяков С. М. Оценка потребности населения в трансплантации органов, донорского ресурса и планирование эффективной сети медицинских организаций (центров трансплантации) // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2013. Т. XV, № 3. С. 11–24.
2. Климушева Н. Ф. Трансплантация солидных органов: пути оптимизации и повышения эффективности: дис. докт. мед. наук. М., 2016. 248 с.
3. Козыренко О. Ю. 3D-принтер и медицина // Медицина третьего тысячелетия. 2011. № 14. С. 24–25.
4. Миронов В. А. 3D-биопечать: любые органы на заказ // Инициативы 21 века. 2013. № 2. С. 94–98.
5. Телепнева А. А., Вовк О.Ю. Трехмерная печать органов – будущее трансплантологии // Студенческий научный форум: VII Международная студенческая электронная научная конференция. Москва. 2015. С. 1–2.
6. Фонбрюн П. Методы микроманипуляций / под ред. С. Я. Залкинда. Москва: Издательство иностранной литературы. 1951. 89–96. с.
7. Abdallah B. M., Kassem M. Human me senchymal stem cells: from basic biology to clinical applications // Gene Ther. 2008. V. 15, № 2. P. 109–116.
8. Almqvist K., Wang L., Wang J. et al. Culture of chondral in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks // Ann. Rheum. Diseases. 2001. V. 60. P. 781–790.
9. Bao G., Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials // Nature materials, 2013. Vol. 2, № 11. P. 715–725.
10. Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing // Mater. Today. 2013. Vol.16, № 12. P.496–504.
11. Botman A., Mulders J. J. L., & Hagen C. W. Creating pure nanostructures from electron-beam-induced deposition using purification

techniques: a technology perspective // *Nanotechnology*, 2009. Vol. 20. P. 5–14.

12. Braeckmans K., Peeters L., Sanders N. N., et al. Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope // *Biophys J*. 2009. P. 40–52.

13. Bulanova E. A., Koudan E. V., Degosserie J., et al. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct // *Biofabrication*. 2017. № 9. P. 1–13.

14. Butcher J. T, McQuinn T. C., Sedmera D., et al. Transitions in early embryonic atrioventricular valvular function correspond with changes in cushion biomechanics that are predictable by tissue composition // *Circ Res*. Vol. 100 № 13. 2007. P. 3–11.

15. Campo E. M., Mamojka B., Wenn D., Ramos I., Esteve J., and Terentjev E. M., “Education and dissemination strategies in photoactuation,” in preparation // *SPIE NanoScience + Engineering*. 2011. № 11. P. 47–56.

16. Campo, E. M., Lopez-Martinez, M. J., Fernandez, E., et al. Image-guided 3D-printing and haptic modeling in plastic surgery // *CRC Taylor and Francis Press*. 2014. № 25. P. 30.

17. Chia H. N, Wu B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials // *J. Biol Eng*. 2015. Vol. 9. P. 4.

18. Chua C. K., Leong K. F., Lim C. S. *Rapid Prototyping: Principles and Applications* // *World Scientific*. 2010. № 8. P. 15.

19. Cohen A., Laviv A., Berman P., Nashef R., Abu-Tair J. Mandibular reconstruction using stereolithographic 3-dimensional printing modeling technology // *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009. № 12. P. 108.

20. Delmarcelle A. S., Villacorte M., Hick A. C. and Pierreux C. E. An ex vivo culture system to study thyroid development J // *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2014. № 14. P. 8–15.

21. Dezawa M., Kanno H., Hoshino M., et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous

transplantation // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 113, № 12. P. 1701–710.

22. Dougherty G. *Medical Image Processing: Techniques and Applications* // Springer. 2011. № 13. P. 33.

23. Drake C. J. and Fleming P. A. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo // *Blood*. 2000. Vol. 95. № 17. P. 85.

24. Duarte Campos D. F., Blaeser A., Weber M., et al. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid // *Biofabrication*. 2013. Vol. 5. № 2. P. 98.

25. El-Baz A. S., Acharya U. R., Mirmehdi M., Suri J. S. Multi Modality State-of-the-Art Medical Image Segmentation and Registration // *Methodologies. Biomed. Sci.* 2011. Vol. 696. № 15. P. 25.

26. Ergenc, A., Olgac, N. New technology for cellular piercing: rotationally oscillating μ -injector, description and validation tests // *Biomedical Microdevices*. 2013. Vol. 9. № 6. P. 885–891.

27. Forgacs G., Foty R. A., Shafrir Y., et al. Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study // *Biophys J.* 1998. № 5. P. 27–34.

28. Friedrich J., Ebner R., Kunz-Schughart L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids – old hat or new challenge // *Int J Radiat Biol.* 2007. P. 49–71.

29. Fullerton J., Frodsham G., Day R. 3D printing for the many, not the few // *Nat. Biotechnol.* 2014. Vol.3., № 11. P. 1086–1087.

30. Gerstle T. L, Ibrahim A. M, Kim P. S, Lee B. T, Lin S. J. A plastic surgery application in evolution: three-dimensional printing // *Plast Reconstr Surg.* 2014. № 33. P. 133.

31. Goiato M. C., Santos M. R., Pesqueira A. A., et al. Prototyping for surgical and prosthetic treatment // *J. Craniofac Surg.* 2011. № 7. P. 22.

32. Hannen E. J. Recreating the original contour in tumor deformed mandibles for plate adapting // *Int J. Oral Maxillofac Surg.* 2006. № 12. P. 35.

33. Herlin C., Koppe M., Beziat J. L., et al. Rapid prototyping in craniofacial surgery: using a positioning guide after zygomatic osteotomy – a case

report // *J. Craniomaxillofac Surg.* 2011. № 16. P. 39.

34. Hiller, J.; Lipson H. Methods of parallel voxel manipulation for 3D digital printing // *Proceedings of the 18th solid freeform fabrication symposium.* 2007. № 11. P. 200–211.

35. Hirai S., Kasai S., Mito M. Encapsulated Hepatocyte Transplantation for the Treatment of D galactosamine Induced Hepatic Failure in Rats // *Eur. Surg. Res.* 1993. V. 25. № 4. P. 193–202.

36. Horváth L., Umehara Y., Jud C., et al. Engineering an in vitro airblood barrier by 3D bioprinting // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. № 17. P.79–74

37. Hoy M. B. 3D printing: making things at the library // *Med Ref Serv Q.* 2013. № 4. P. 32.

38. Huang T., Kimura Y., & Yanagimachi R. The use of piezo micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection of human oocytes // *Journal of Assisted Reproduction and genetics*, 2013. Vol. 13. №. 4. P. 320–328

39. Hull C. W. Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography // *Science.* 1986. № 26. P. 13.

40. Hunt N. C., Shelton R. M., Grover L. M. An alginate hydrogel matrix for the localized delivery of a fibroblast/keratinocyte co culture // *Biotech. J.* 2009. V. 4. № 5. P. 730–737.

41. Hunt N. C., Shelton R. M., Grover L. M. Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 32. P. 6435–6443.

42. Iniewski K. *Medical Imaging: Principles // Detectors, and Electronics.* John Wiley & Sons. 2009. P. 32.

43. Ittner, L., & Götz, J. Pronuclear injection for the production of transgenic mice // *Nature protocols*, 2007. Vol. 2. №. 5. P. 1206–1215.

44. J., Plaza J. A. Sharpened transparent micronozzles fabrication for cell membrane piercing // *Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering.* 2009. № 21. P. 78–90.

45. Jakab K., Damon B., Marga F., et al. Relating cell and tissue

mechanics: implications and applications // *Dev Dyn.* 2008. № 15. P. 38–49.

46. Kasza K. E., Rowat A. C., Liu J., et al. The cell as a material // *Curr Opin Cell Biol.* 2007. № 9. P. 1-7.

47. Kim B. S., Baez C. E., Atala A. Biomaterials for tissue engineering // *World J.Urol.* 2000. V. 18, N 1. P. 2–9.

48. Kishigami S., Hikichi T., Van Thuan N., et al. Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer // *FEBS Letters.* 2006. Vol. 580/ №. 7. P. 1801–1806.

49. Klein G. T., Lu Y., Wang M. Y. 3D printing and neurosurgery – ready for prime time? // *World Neurosurg.* 2013. №18. P. 80.

50. Kloss D., Fischer M., Rothermel A., Simon J. C., Robitzki A. A. Drug testing on 3D in vitro tissues trapped on a microcavity chip // *Lab Chip.* 2008. №10. P. 79–84.

51. Kunz-Schughart L. A., Freyer J. P., Hofstaedter F., et al. The use of 3-D cultures for highthroughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* 2008. № 33. P. 73–85.

52. Lee D. A., Reisler T., Bader D. L. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques // *Acta Orth.* 2003. Vol. 74. № 1. P. 6–15.

53. Leung L. Y., Tian D., Brangwynne C. P., et al. A new microrheometric approach reveals individual and cooperative roles for TGF-beta1 and IL-1beta in fibroblastmediated stiffening of collagen gels // *FASEB J.* 2007. № 2. P. 64–73.

54. Lin R. Z., Chang H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // *Biotechnol J.* 2008. № 3. P. 72–84.

55. Luk J. M., Wang P. P., Lee C. K. et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co culture and intraportal transplantation models // *J. Immun. Meth.* 2005. Vol. 305. № 1. P. 39–47.

56. Maguire T., Novik E., Schloss R., Yarmush M. AlginatePLL

microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes // *Biotech. Bioengin.* 2006. Vol. 93. № 3. P. 581–591.

57. Malboubi M., Ostadi H., Wang, S., et al. The Effect of Pipette Tip Roughness on Giga-seal Formation // *Proceedings of the World Congress on Engineering* 2009. № 7. P. 113–120.

58. Mano J. F, Silva G. A, Azevedo H. S et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends // *J. Royal Soc. Interf.* 2007. Vol. 4, № 17. P. 999–1030.

59. Martin I., Simmons P.J., Williams D.F. Manufacturing Challenges in Regenerative Medicine // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6, № 232. P. 232.

60. Mironov V., Viscontia R. P, Kasyanovb V., et al. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks // *Biomaterials* 2017. № 6. P. 2–14.

61. Mohammad M. N., Mohammad R. Sadeghi and Mohammad Mehdi Akhondi. A Technique for Facile and Precise Transfer of Mouse Embryos // *Avicenna J Med Biotech.* 2013. № 5. P. 62–65.

62. Murphy S. V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs // *Nat. Biotechnol.* 2014. Vol. 32. №8. P.773–785.

63. Murua A., Portero A., Orive G, et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application // *J. Control. Rel.* 2008. Vol. 135. № 4. P. 76–83.

64. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., et al. Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory Manual, 3rd ed // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2002. № 8. P. 90.

65. Ono I., Gunji H., Suda K., Kaneko F. Method for preparing an exact-size model using helical volume scan computed tomography // *Plast Reconstr Surg.* 1994. № 7. P. 93.

66. Orive G., Hernandez R. M., Gascon A. R. Cell encapsulation: promise and progress // *Nat. Med.* 2003. Vol. 9. № 1. P. 104–107.

67. Ostad, H., Malboubi M., Prewett P. D., et al. Microelectronic //

Engineering. 3D reconstruction of a micro pipette tip. 2009. Vol. 86. № 4–6. P. 68–70.

68. Ozbolat I. T., Yu Y. Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2013. Vol.60, № 3. P.691–699.

69. Pati F., Jang J., Ha D., Won Kim S., et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink // Nat. Commun. 2014. №5. P.35–39.

70. Pianykh O. S. Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM): A Practical Introduction and Survival Guide // Springer. 2009. № 1. P. 23–25.

71. Postek, M., Vladár, A. E., Kramar J., et al. “The helium ion microscope: a new tool for nanomanufacturing” // Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering, Instrumentation Metrology and Standards for nanomanufacturing. 2017 Vol. 6648. № 3. P. 89–94.

72. Prusse U., Bilancetti L., Bucko M. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production // Chem. Papers. 2008. V. 62. № 4. P. 364–374.

73. Rajan N., Habermehl J., Coté M. F, et al. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications // Nat. Protoc. 2006. № 4. P. 1–8.

74. Rengier F., Mehndiratta A., von Tengg-Kobligk H., et al. 3D printing based on imaging data: review of medical applications. // Int J. Comput Assist Radiol Surg. 2010. № 5. P. 55.

75. Rozen W. M, Ting J. W, Baillieu C, Leong J. Stereolithographic modeling of the deep circumflex iliac artery and its vascular branching: a further advance in computed tomography-guided flap planning // Plast Reconstr Surg. 2012. №9. P. 130.

76. Scipioni, L., Sanford, C., Notte, J., Thompson, B, McVey, S. Understanding imaging modes in the helium ion microscope // Journal of Vacuum

Science and Technology B. 2017. Vol. 76. № 6. P. 250–255.

77. Song J. J., Guyette J. P., Gilpin S. E et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney // *Nat Med.* 2013. № 5. P 46–51

78. Srinivasan V, Bassan J. 3D printing and the future of manufacturing // *CSC Leading Edge Forum.* 2012. № 7. P. 36.

79. Susienka M. J., Wilks B. T. and Morgan J. R. Quantifying the kinetics and morphological changes of the fusion of spheroid building blocks // *Biofabrication.* 2016. № 3. P 45–47.

80. Tasoglu S., Demirci U. Bioprinting for stem cell research // *Trends Biotechnol.* 2013. Vol. 31. №1. P. 10–19.

81. Tobias C. A., Dhoot N. O., Wheatley M. A. et al. Grafting of the BDNF Producing Fibro blasts into the Injured Spinal Cord without Immune Suppression in the Adult Rats // *J. Neurotranspl.* 2001. Vol. 18. № 3. P. 287–301.

82. Tseluyko S. S., Kushnarev V. A. Regenerative biological medicine: Achievements and Prospects // *Amur Medical Journal.* 2016. №1(13). P.7–15.

83. Tuan R. S., Boland G., Tuli R. Adult me senchymal stem cells and cell based tissue engineering // *Arthr. Res.Ther.* 2003. Vol. 5. № 1. P. 32–45.

84. Tumbleston J. R, Shirvanyants D., Ermoshkin N., et al. Additive manufacturing. Continuous liquid interface production of 3D objects // *Science.* 2015. № 4. P. 52.

85. Utke I., Hoffmann P., Melngailis J. Gas-assisted focused electron beam and ion beam processing and fabrication. // *J. Vac. Sci. Technol.* 2008. № 6. P. 1197–1272.

86. Utke I., Hoffmann P., Melngailis J. Gas-assisted focused electron beam and ion beam processing and fabrication. Sutter Instruments. P-97 Pipette cookbook (Rev. D) // *J. Vac. Sci. Technol. B* 26. 2017. P. 197–272

87. Vos P. de, Faas M. M., Strand B., et al. Alginate based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. № 32. P. 5603–5617.

88. Weber W., Rimann M., Schafroth T. et al. // Design of high throughput compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa // J. Biotechnol. 2006. V. 123, N 2. P. 155–163.

89. Weibel D. B., DiLuzio W. R., Whitesides G. M. Microfabrication meets microbiology // Nature Reviews Microbiology. 2007. Vol. 5, № 3. P. 209–218.

90. Xu M., West E., Shea L. D., Woodruff T. K. Identification of a stage specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development // Biol. Repr. 2006. № 14 P. 916–923.

91. Yaul M., Bhatti R., Lawrence S. Evaluating the process of polishing borosilicate glass capillaries used for fabrication of in – vitro fertilization (iVF) micro-pipettes // Biomedical Microdevices. 2017. № 5. P. 123–128.

92. Yoshida N., Perry A. C. F. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI) // Nature Protocols. 2007. № 4. P. 296–304.

93. Zimmermann H., Shirley S. G., Zimmermann U. Alginate based encapsulation of cells: past, present and future // Cur. Diabetes Rep. 2007. № 7. P. 314–320.

94. Агентство по инновациям и развитию. URL: <http://www.innoros.ru/news/regions/13/09/trekhmernyi-printer-napechataet-lyuboi-organ>. (дата обращения: 02.11.2017).

95. Биопечать органов на 3D принтере, как это работает? URL: <http://make-3d.ru/articles/biopechat-organov-na-3d-printere> (дата обращения: 02.11.2017).

96. Еженедельник 2000. URL: Аспекты: Наука: Сердце, напечатанное на принтере. Режим доступа: <http://2000.net.ua/2000/aspekty/nauka>. (дата обращения: 02.11.2017).

97. Журнал «Наука и жизнь», статья «Биопринтингом тканей и органов занялись в Москве» URL: <http://www.nkj.ru/news/23148/>. (дата обращения: 04.11.2017).

98. Журнал «Наука и жизнь», статья «Напечатайте мне почку» URL:

<http://www.nkj.ru/news/21766/>. (дата обращения: 04.11.2013).

99. Купревич И. С. URL: Физико-химические свойства стекла // Стекло. 2008. URL: <http://ru.knowledgr.com>. (дата обращения: 23.04.18).

100. Национальное географическое общество URL: <http://www.rusngo.ru/index>. (дата обращения: 02.11.2017).

101. Новый век. URL: 3D-печать органов человека. Режим доступа: <http://уvek.ru> (дата обращения: 02.11.2017).

102. Седов А. Б. Микрокузница MF-900 // Научный парк СПбГУ. 2016. URL: <http://researchpark.spbu.ru/rmkt-eq-rus/138-equipment-rmkt-dlya-raboty-s-kletochnimi-kulturami> (дата обращения: 23.04.18).

103. Сколково URL: <http://community.sk.ru/press/b/weblog4/archive/2013/10/21/portrety-uchastnikov-otkrytyh-innovaciy-3d-bioprinting-solyushens.aspx>. (дата обращения: 03.11.2017).

104. Трехмерная печать. URL: <http://3dpr.ru/trehmernaya-pechat>, свободный. (дата обращения: 02.11.2017).

105. Федеральный специализированный журнал «Кто есть, Кто в медицине», №1(58). 2013 год, Наталья Лучкина. URL: <http://www.ktovmedicine.ru/news/2013/1/3d-bioprinting-revolyuciya-v-regenerativnoy-medicine.html>. (дата обращения: 01.11.2013).

106. Хабрахабр URL: <http://habrahabr.ru/company/invitro/blog/194064/>. (дата обращения: 01.11.2013).

107. Filipino students develop 3D printed trachea using stem cells from patients. URL: <http://www.3ders.org/articles/20150219-filipino-students-develop-3d-printed-trachea-using-stem-cells-from-patients.html> (дата обращения: 25.06.2017).

108. Live Journa. URL: Биопринтер уже реальность. Режим доступа: <http://ifuture.livejournal.com/348317.html>. (дата обращения: 04.11.2017)

109. Organovo. URL: Официальный сайт Режим доступа: <http://www.organovo.com>. (дата обращения: 02.11.2017).

110. PitBit [Электронный ресурс]: Технологии: Медицина: Гибридный 3D-биопринтер позволил «напечатать» хрящевую ткань. URL: http://pitbit.ru/news/technology/gibridnyu_3d_bioprinter_pozvolil_napечатat_khr_yashchevuuyu_tkan. (дата обращения: 01.11.2013).

Приложения



Рис. 1 Свидетельство о регистрации в качестве ноу-хау результат интеллектуальной деятельности

**XI Международный биотехнологический
Форум-выставка «РосБиоТех -2017»**

23-25 мая 2017г.



ДИПЛОМ

награждается золотой медалью

**ФГАОУ ВО «Белгородский государственный
национальный исследовательский университет»**

Микронасадка для экструдера биопринтера

**Наеждин Сергей Викторович к.б.н.,
Афанасьев Андрей Юрьевич**

Председатель Оргкомитета
Академик РАН, член Президиума РАН

Лисицын А.Б.

Рис. 2. Диплом участника Международного Биотехнологического форума-выставки.



Частное учреждение Лаборатория биотехнологических исследований "ЗД Биопринтинг Солюшенс"

115409, Москва, Каширское шоссе, дом 68, корпус 2, тел.: +7 (499) 769 50 18

Исх. № 25/08/16С от

«20» августа 2017 года

ООО "НПП "Цито-инструмент БелГУ"

Настоящим сообщаем Вам, что в лаборатории ЧУ «ЗД Биопринтинг Солюшенс» на биопринтере Fabion V1 были проведены испытания стеклянных капилляров (насадки на шприц) с различным выходным диаметром (от 250 до 350 мкм). В результате испытаний насадки(капилляры) показали себя с хорошей стороны, с помощью их можно точно позиционировать тканевые сфероиды/гидрогель, а благодаря тому, что они полностью прозрачны, можно наблюдать структурное состояние сфероидов/гидрогеля в капилляре. Присланные Вами образцы мы готовы использовать на ЗД биопринтере для печати трехмерных биокаркасов/органных конструкторов.

Генеральный директор
ЧУ "ЗД Биопринтинг Солюшенс"




М.С. Баканов

Рис. 3. Письмо компании об использовании изготовленных микронасадок.