

Т.А. Астрелина, А.С. Самойлов

АДДИТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ 3D-БИОПЕЧАТИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Астрелина Татьяна Алексеевна, t_astrelina@mail.ru

Резюме

Развитие тканевой инженерии в последнее время связано с использованием аддитивных технологий для производства трансплантатов и применения их в регенеративной медицине. Трехмерная 3D биопечать открывает большие перспективы для получения сложных, физиологически трехмерных тканевых конструкций и позволяет проектировать, изготавливать такие конструкции с контролем их размера и функции. В обзоре рассмотрены три основных метода трехмерной биопечати: экструзия, капельная и лазерная биопечать, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. Полученные тканевые конструкции, созданные с помощью трехмерной 3D биопечати, открывают новые возможности в тканевой инженерии, регенеративной медицине для исследователей.

Ключевые слова: аддитивные технологии, 3D-биопечать, биопринтер, регенеративная медицина, биоматериал, тканеинженерные конструкции

Для цитирования: Астрелина Т.А., Самойлов А.С. Аддитивные технологии 3d-биопечати для регенеративной медицины // Клинический вестник ФМБЦ им. А.И. Бурназяна 2022. № 1. С. 5–12. DOI: 10.33266/2782-6430-2022-1-5-12

Additive Technologies of 3D Bioprinting for Regenerative Medicine

T.A. Astrelina, A.S. Samoilov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: Tatiana Astrelina, t_astrelina@mail.ru

Abstract

The development of tissue engineering in recent years is associated with the use of additive technologies for the production of transplants and their application in regenerative medicine. 3D bioprinting opens up great prospects for obtaining complex, physiologically three-dimensional tissue structures and makes it possible to design and manufacture such structures with control over their size and function. The review considers three main methods of three-dimensional bioprinting: extrusion, droplet and laser bioprinting, each of which has its own advantages and disadvantages. The resulting tissue constructs, created using 3D bioprinting, open up new possibilities in tissue engineering and regenerative medicine for researchers.

Keywords: additive technologies, 3D bioprinting, bioprinter, regenerative medicine, biomaterial, tissue engineering structures

For citation: Astrelina TA, Samoilov AS. Additive Technologies of 3D Bioprinting for Regenerative Medicine. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center Clinical Bulletin. 2022.1:5-12. (In Russian) DOI: 10.33266/2782-6430-2022-1-5-12

Введение

В июле 2021 года Правительством Российской Федерации была утверждена Стратегия развития аддитивных технологий в Российской Федерации на период до 2030 года, одним из ключевых направлений которой является развитие аддитивных технологий в области медицины [1]. Сегодня аддитивные технологии, в частности 3D-биопринтинг с биопечатью, являются одним из перспективных и активно развивающихся методов тканевой инженерии. Среди актуальных направлений биопечати: биопечать in vivo в ходе хирургических операций; разработка новых материалов для биопечати, многокомпонентная печать; использование тканеинженерных конструкций с биodeградируемым матриксом. Печать 3D-структуры будущего органа производится каплями, содержащими живые клетки.

В рамках реализации национального проекта «Наука» на базе Центра биомедицинских и аддитивных технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России в 2021 году открыта лаборатория аддитивных технологий.

Аддитивные технологии — отрасль экономики, включающая в себя разработку и производство аддитивного оборудования, комплектующих, материалов для аддитивного производства и специализированного программного обеспечения, а также услуг и инжиниринга в сфере аддитивных технологий. Поиск альтернативных источников биологического материала обуславливается нехваткой трансплантационного материала. Так, тканевые конструкции, созданные с помощью аддитивных технологий трехмерной 3D-биопечати, открывают новые перспективы и возможности в персонализированной медицине, тканевой инженерии и регенеративной медицине. Особенно это актуально при травматических повреждениях, онкологических заболеваниях с нарушением целостности органов и тканей, когда возникает потребность в проведении реконструктивных операций для сохранения здоровья и улучшения качества жизни пациентов.

3D-биопринтинг

Методы тканевой инженерии в основном сосредоточены на 2D-моделях клеточных культур или первичных клеток, растущих на пластике для тка-

невых культур. Достижения в области аддитивного производства показали, что методы трехмерной биопечати позволяют проектировать сверху вниз и изготавливать клеточные конструкции с контролируемым размером, интервалом и функцией, а высокая степень контроля тканеинженерной архитектуры – создавать более сложные, физиологически релевантные трехмерные тканевые конструкции [2]. На сегодняшний день существуют три основных метода трехмерной биопечати: экструзия, капельная и лазерная биопечать, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки (Рис. 1, Табл. 1).

3D-биопечать – это быстро развивающаяся область, которая дает исследователям возможность создавать тканевые конструкции, которые являются более сложными и физиологически значимыми, чем традиционные методы 2D-культивирования [3-5].

Создаваемые трехмерные клеточные культуры соответствуют нормальным физиологическим условиям человека за счет более широкого диапазона межклеточных взаимодействий, чем традиционные двухмерные методы. Использование биотехнологии тканей позволяет использовать последовательные

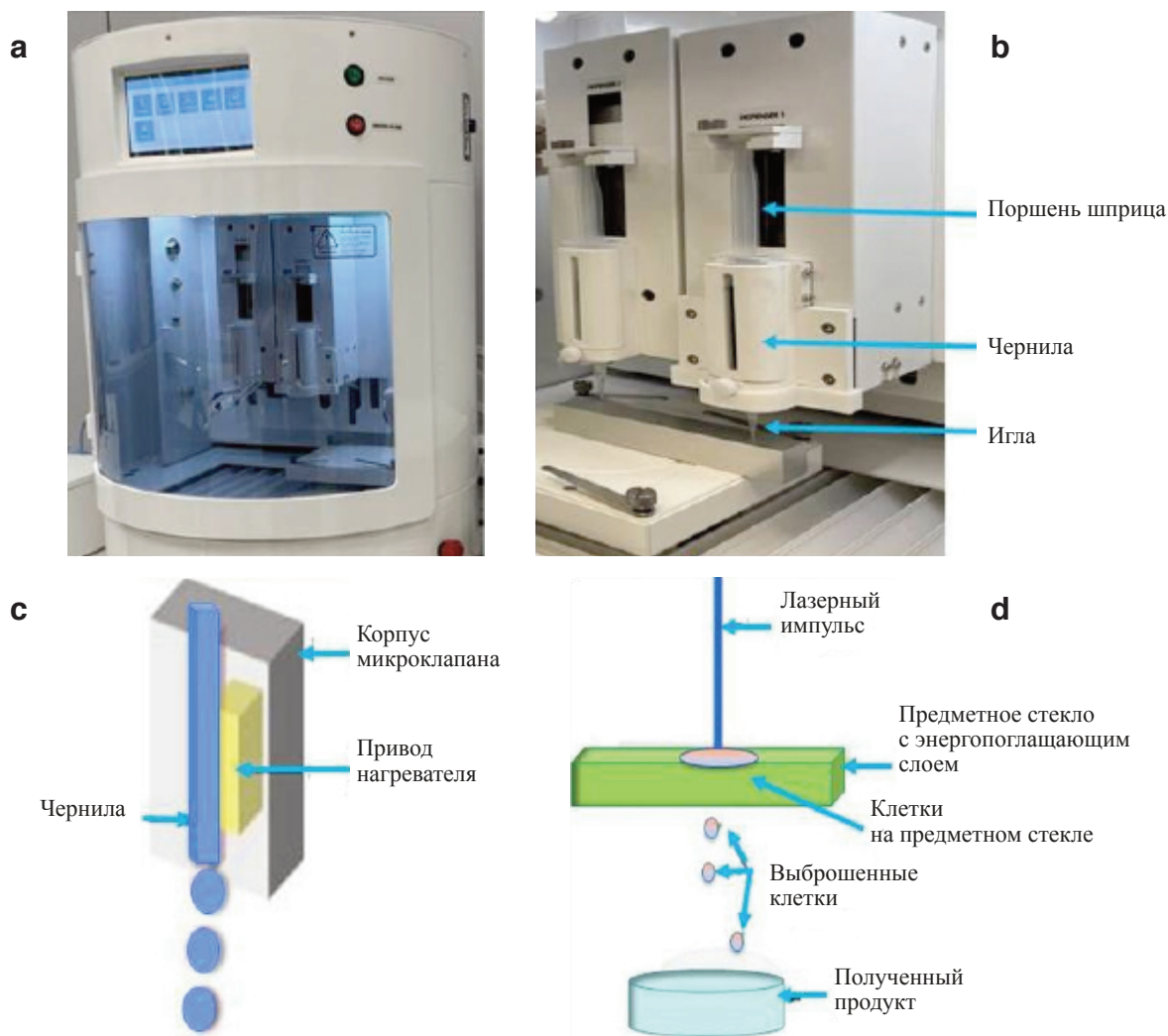
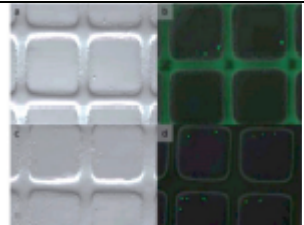
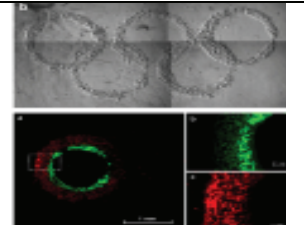
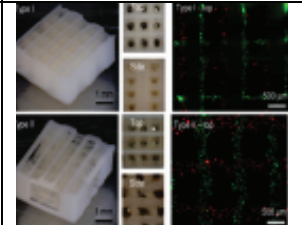


Рис. 1 а – Биопринтер; б – Схема биопечати на основе экструзии. Чернила загружаются в корпус шприца, и давление проталкивает биочувствительный элемент через иглу за счет пневматического или механического привода плунжера или выдавливания. Перенос шприца позволяет формировать биочувствительный элемент в направлениях X, Y и Z; с – Схема капельной биопечати. Биочернила поступает из резервуара и каплями выходит из корпуса микроклапана. Механизм, такой как микронагреватель или пьезоэлектрический элемент, создает силу, необходимую для выталкивания биочувствительного элемента из отверстия в нижней части микроклапана; д – Схема биологической лазерной печати. Клетки помещают на предметное стекло («ленту») с энергопоглощающим слоем. Лазерный импульс попадает в этот поглощающий энергию слой, вызывая выброс клеток с поверхности предметного стекла. Эти выброшенные клетки следуют по баллистической траектории к своей цели. Смещение слайда или мишени и регулировка расстояния между лентой контролируют положение XYZ выталкиваемой ячейки.

Fig. 1 а – Bioprinter; б – Diagram of extrusion-based bioprinting. The ink is loaded into the body of the syringe and pressure pushes the bio-sensing element through the needle by means of a pneumatic or mechanical drive of the plunger or extrusion. Syringe transfer allows the biosensing element to be formed in the X, Y and Z directions; с – Scheme of drip bioprinting. The bio-ink comes from the tank and drips out of the micro-valve body. A mechanism, such as a microheater or a piezoelectric element, generates the force necessary to push the bio-sensing element out of the hole at the bottom of the microvalve; д – Scheme of biological laser printing. Cells are placed on a glass slide («tape») with an energy-absorbing layer. A laser pulse strikes this energy-absorbing layer, causing cells to be ejected from the surface of the glass slide. These ejected cells follow a ballistic trajectory towards their target. Slide or target offset and tape spacing control the XYZ position of the ejected cell.

Таблица 1

Сравнение технологии трех биопринтеров [8]
Comparison of technology of three bioprinters [8]

Параметры	Капельный биопринтер	Лазерный биопринтер	Экструзионный биопринтер
Стоимость	низкая	высокая	средняя
Вязкость материала	3,5-12 мПа/с	1-300 мПа/с	30 до $> 6 \times 10^4$ мПа/с
Разрешение	10-100 мкм	75 мкм	0 мкм
Качество структуры	низкая	быстрая	высокая
Печать	быстрая	средняя	медленная
Жизнеспособность клеток	$>85\%$	$>95\%$	40-80%
Примеры			

воспроизводимые методы построения моделей, специфичных для тканей и органов, включая внеклеточный матрикс (ВКМ), клетки и передачу сигналов факторов роста.

Наиболее частое применение, полученных напечатанных тканеинженерных конструкций кожи используется для закрытия ожоговых ран. [6,7] Использование трехмерной биопечати позволяет обеспечить воспроизводимость и точность для создания трехмерной архитектуры ткани.

3D-печать – это процесс аддитивного производства, в котором сложная структура создается путем нанесения последовательных 2-мерных (2D) слоев материала для создания 3D-объекта [2]. Подвижная печатающая головка движется в направлении XY с третьим измерением (Z) с вертикальным движением столика в течение времени. Можно проектировать и изготавливать сложные формы [2]. Используя методы 3D-печати, исследователи в области биопечати разработали методы построения сложных биологических структур и моделей различных тканей и органов.

Материалы для 3D-биопечати

Для 3D-биопечати необходимы материалы (биочернила), которые используются на 3D-биопринтере.

Биочернила – это биоматериал с физическими, химическими и механическими свойствами, который позволяет печатать его в трехмерной структуре [2,8,9]. Биочернила представляют собой либо суспензию клеток или сфероидов (клеточных агрегатов, состоящих из одного или нескольких типов клеток), либо современные биочувствительные элементы, полученные из синтетических и природных полимеров или биологическую ткань.

Биополимерные гидрогели, связанные с их химической структурой и внутренними ионными зарядами, обеспечивают структурную поддержку клеток, аналогичную естественному внеклеточному матриксу (ВКМ), окружающего клетки в тканях человека. Обычно используют биополимеры, охарактеризованные и легко доступные, такие как альгинат, гиалуроновая кислота или коллаген [10,11].

Гидрогелевая инженерия имеет несколько механизмов гелеобразования, включая термическое, хи-

мическое сшивание или затвердевание под действием ультрафиолетовых лучей. Кинетика гелеобразования гидрогеля может широко варьироваться в зависимости от используемого материала и метода сшивания; такие параметры необходимо учитывать при проектировании трехмерной конструкции с биопечатью [2,12]. Возможно применение бесклеточных гидрогелевых каркасов, с использованием клеток перед печатью или могут после печати или при гелеобразовании. При введении клеток в гидрогель, требуются особые условия для обеспечения жизнеспособности клеток. Биочернила хранятся при комнатной температуре или температуре тела для благоприятных условий для клеток, гелеобразования и сшивающих агентов.

Применение широкого спектра биополимеров, может способствовать пролиферации, дифференцировке или поддержанию желаемого клеточного фенотипа. Использование дополнительно факторов роста или сигнальных молекул может обеспечивать дополнительную гибкость в создании определенного микроокружения.

Синтетические полимеры, полученные из биологического или нефтехимического сырья используют для биопечати в сочетании с материалами, которые позволяют прикреплять клетки. Так как такие полимеры лишены белков, способствующих адгезии и миграции клеток. Используются термопласты: поли (ε-капролактон), поли (L-молочной кислоты) и поли (lactic-совместно – гликоливая кислота) для структурной или механической опоры, например для костной ткани [13,14]. Такие полимеры можно смешивать с другими небιологическими материалами, такими как гидроксиапатит или графен, для улучшения механических свойств печатной конструкции и влияния на окружающие клетки. Другие синтетические полимеры, такие как полимеры семейства Pluronic, являются текучими при низких температурах ($<10^\circ\text{C}$) и образуют гидрогели при более высоких температурах [15]. Они могут быть эффективными как летучие чернила и удаляются из конструкции при биопечати в определенное время, создавая каналы или поры для улучшения обмена питательных веществ.

Методы 3D биопечати

Экструзия

Для биопечати используют экструзионные системы, функционирующие путем дозирования биочернил с помощью пневматического давления, плунжера и способные печатать широкий спектр материалов – синтетические биосовместимые полимеры, биополимеры (например, коллаген), плотные суспензии клеток, биоматериалы (Рисунок 1Б). Биосовместимые синтетические полимеры плавятся при нагревании или растворяются в растворителе, экструдируются в желаемый узор, а затем затвердевают путем охлаждения или испарения растворителя. Такие условия обработки не подходят для выживания клеток, поэтому экструдированные части используются для образования более жестких и надежных бесклеточных каркасов, которые впоследствии можно модифицировать или засеять клетками. Природные биополимеры и биосовместимые полимеры обычно экструдируются в виде гидрогелей биочернил [16,17,18]. Можно настроить механические свойства гидрогеля в соответствии с конкретными параметрами экструзии, такими как давление печати. Биочернила гидрогеля могут быть представлены клетками, обеспечивающие метод прямой печати клеток с окружающей поддерживающей матрицей.

Пространственное разрешение экструзионных печатных конструкций определяется физическими и химическими свойствами экструдируемого материала.

Преимущества экструзионной биопечати

Системы трехмерной биопечати на основе экструзии имеют ряд преимуществ по сравнению с другими методами биопечати, включая масштабируемость, разнообразие биочернил и осаждение с высокой плотностью клеток. Экструзия легко поддается массовому производству и масштабированию; как только биочернила и траектория инструмента определены, масштаб процесса можно увеличить, просто добавив дополнительные печатающие головки [19]. Биочернила с широким спектром физических характеристик для биопечати методом экструзии включают в себя: клеточные сфероиды, децеллюляризованные гидрогели ВКМ. Экструзионная печать в настоящее время является единственным методом биопечати жизнеспособных биочернил высокой плотности. Так как ткань человека состоит из плотно упакованных клеток, для любых изготовленных тканеинженерных конструкций для использования *in vivo*, потребуется печать клеток с высокой плотностью [20].

Недостатки экструзионной биопечати

К заметным недостаткам экструзионной 3D-биопечати относятся низкая скорость изготовления, низкая жизнеспособность клеток, ограниченное разрешение, ограниченная вязкость и кинетика гелеобразования печатного материала. Каждый слой экструдируется как непрерывная нить последовательно и может привести к длительному времени наращивания каждого слоя, что может повлиять на жизнеспособность клеток [18]. При экструзии

клетки подвергаются действию сил сдвига, что снижает их жизнеспособность по сравнению с другими методами биопечати. Величина усилий сдвига в значительной степени зависит от диаметра наконечника экструзионного наконечника и вязкости полимера.

Применение экструзионной биопечати медицине возможно при травмах опорно-двигательного аппарата [13,14] (печать менисков в основном биополимеры, однако эти мягкие тканевые конструкции на основе гидрогеля не обладают такими же механическими свойствами, как нативная ткань, и могут преждевременно изнашиваться; мышечной ткани [21,22], включая сердце (кардиомиоциты с биопечатью могут генерировать синхронизированные сокращения для сердечной ткани, скелетные мышцы для индукции образования миофибрилл и подобных иерархических структур); кожи [23–25] (гидрогель из фибробластов, биочувствительных элементов на основе коллагена, кератиноцитов).

Капельная биопечать

Методы капельной биопечати основаны на технологиях, разработанных для струйных принтеров [26]. При таком способе печати биочернила формируются в виде капель пиколитрового объема и распределяются через сопло [26]. Импульсы давления, приводящие к образованию этих капель, генерируются микроклапанами, тепловыми, пьезоэлектрическими или акустическими приводами. Их можно выбрасывать с очень высокой скоростью (до десятков тысяч в секунду) и, следовательно, они должны иметь очень быстрое время гелеобразования, чтобы полностью сформироваться перед нанесением на принимающую подложку [27,28]. Высокое отношение площади поверхности к объему капель может быть выгодным важно для определенных методов химического гелеобразования; однако более жесткие требования к времени гелеобразования ограничивают количество материалов, которые можно использовать по сравнению с методами, основанными на экструзии.

Главным элементом капельной биопечати является взаимодействие между вязкостью биочернил и гелеобразованием, а также их влияние на осаждение биочернил. В идеале гелеобразование должно происходить после того, как капля биочернил выброшена из сопла, чтобы ограничить засорение отверстия сопла (Рисунок 1В). Биочернила, используемые в капельной биопечати, должны иметь более низкую вязкость (аналогичную воде), чем те, которые используются в экструзионных системах (аналогично меду), из-за диаметра сопла и силы, необходимых для выброса капель. Методы печати капель биочернил на других жидкостях, таких как масло или сшивающие агенты, были разработаны для сохранения сферической формы и объема капель во время гелеобразования. Применение капельной печати чрезвычайно важно для контроля пористости напечатанного каркаса; создавая удаляемые капли геля и изменяя их конкретный размер, можно поддерживать высокую степень контроля над размером пор, вязкостью и общей пористостью гидрогеля. Примечательно, что это применимо практически ко

всем тканям, имеющим отношение к биопечати, поскольку пористость необходима для обмена питательными веществами, роста и жизнеспособности клеток.

Преимущества капельной биопечати

Капельные системы имеют несколько преимуществ: жизнеспособность клеток выше, чем у экструзионных систем (меньше усилий сдвига и высокая скорость капельной печати и гелеобразования по сравнению с экструзионными системами), капельная биопечать имеет небольшой размер капель, что обеспечивает отличное пространственное разрешение, системы капель позволяют более точно и равномерно размещать несколько типов клеток и контролировать их локальное микроокружение по сравнению с традиционной двумерной культурой [29].

Недостатки капельной биопечати

У капельных систем есть свой набор уникальных недостатков: низкая вязкость, быстрое гелеобразование и низкая плотность клеток [30]. Высокая вязкость биочернил приводит к засорению сопла, что может привести к прерыванию всего тиража печати [31]. Для создания более прочных трехмерных структур необходимо использование ультрафиолетового света или химических сшивающих агентов с последующей плотной печатью, что может ограничить общий размер конструкций с биопечатью из капель, особенно по сравнению с экструзионной биопечатью. Низкая объемная пропускная способность и невозможность печати термопластичных материалов-носителей капельных систем по сравнению с экструзией.

Применение капельной биопечати в медицине для печати кожи [32,33], менисков [34] и гладких мышц [35]. Для этого используются биочернила на основе желатина, альгината или коллагена, которые можно легко распределять через струйные печатающие головки. Было продемонстрировано сочетание капель и экструзии для создания больших объемных гидрогелей и осаждения клеток с более высоким пространственным разрешением и преодоление ограничений индивидуальных методов капельной биопечати [36].

Одной из важных областей медицины, где капельная биопечать может иметь преимущества с точки зрения пространственного разрешения, является печать сосудистой сети. Сосудистая сеть важна для производства более крупных тканей с клетками, транспорта питательных веществ и сигнальных молекул и продуктов жизнедеятельности [15]. Распространение питательных веществ и отходов в настоящее время ограничивает производство тканей несколькими сотнями мкм. Без адекватного снабжения питательными веществами и удаления отходов напечатанные тканевые конструкции некротизируются. Использование методов капельной печати с поддерживающими носителями позволяет струйной биопечать использовать для создания сложных сосудистых структур с просветами и бифуркациями [37,38]. Разрешение капельной биопечати в настоящее время не позволяет напечатать функциональные микрососуды с размера артериол или капилляров.

Лазерная биопечать

Методы биопечати с лазерным прямым переносом (также называемые биологической лазерной печатью или BioLP) используют сфокусированные лазерные импульсы для переноса материалов с опорной «мишени» на «принимающую» подложку (Рисунок 1Г) [39,40]. Опорная мишень, обычно кварцевое или стеклянное предметное стекло, покрытая слоем металла или оксида металла толщиной ~ 100 нм, поглощающего лазер. Водный раствор биочернил (клетки или другие биоактивные компоненты) наносят поверх поглощающего слоя, и лазерный луч фокусируется на границе раздела целевой подложки и поглощающего металла. В импульсном режиме лазер вызывает тепловое испарение объема биочернил, вызывая образование микропузырька. Создание и расширение этого микропузырька вызывает выброс капли биочернил. Осаждение капли на подложке в определенном месте достигается за счет использования управляемых компьютером этапов трансляции; этапы выровнены таким образом, что капля падает в определенном месте. Весь процесс печати не приводит к потере жизнеспособности или повреждению ДНК ни бактерий, ни клеток млекопитающих [41,42].

Преимущества лазерной биопечати

Лазерная биопечать имеет несколько преимуществ из-за отсутствия сопла и использования лазера в качестве движущей силы для печати. Отсутствие традиционного печатающего сопла означает, что можно печатать биочернилами с более высокой вязкостью, так как нет опасений по поводу контаминации. Кроме того, биочувствительные элементы с различными свойствами материала или клеточными составами можно легко изменить, просто переключив опорную мишень. Использование лазера для осаждения капель микроразмера позволяет использовать эту технику для очень точной печати. В зависимости от частоты лазера и скорости перемещения цели за одну секунду можно напечатать сотни капель. Плотность клеток печатанных биочернил можно легко настроить так, чтобы каждый отдельный лазерный импульс приводил к осаждению одной клетки на подложке.

Недостатки лазерной биопечати

У лазерной биопечати есть некоторые существенные недостатки, в основном из-за сложности системы. Как и другие методы биопечати, лазерную биопечать необходимо устанавливать в асептических условиях, чтобы гарантировать стерильность конечного продукта. Однако, в отличие от других методов биопечати, это может вызвать серьезные операционные проблемы, связанные с необходимостью этапов трансляции и лазерной юстировки. Таким образом, стоимость всего принтера и настройки высокая. Капельный характер лазерной биопечати также ограничивает объем наносимого материала; хотя сотни отдельных клеток могут быть напечатаны в минуту, они размещаются в микрообъемах. Это приводит к осаждению общего объема с течением времени и требует поддержания среды подложки. Целевой субстрат необходимо подгото-

вить и сохранить перед печатью. Чтобы сохранить свойства биочернил и жизнеспособность клеток, материал необходимо напечатать сразу после приготовления, так как он может быстро испариться. Что требует создания влажной среды вокруг целевой подложки, что еще больше увеличивает сложность и стоимость системы. По сравнению с 2D-культурой лазерная биопечать позволяет очень точно использовать несколько типов клеток и компонентов ВКМ, а также предлагает беспрецедентный контроль над 3D-взаимодействиями между клетками.

Применение лазерной биопечати в медицине

Лазерная биопечать может применяться для печати различных тканей в первую очередь кожи и костей. С помощью лазерной биопечати напечатаны многослойные кожные конструкции, включая кератиноциты и фибробласты для лечения ожогов [43]. Напечатанная ткань была успешно трансплантирована мышам, и в ней образовались мелкие кровеносные сосуды, что указывает на частичную васкуляризацию биоткани [44]. Лазерная биопечать использовалась для печати костной ткани, отмечалось значительное увеличение костеобразования и заживления раневой поверхности в течение двух месяцев после печати, особенно в центре костного дефекта. Дополнительные эксперименты лазерной биопечати костных биоматериалов, таких как гидроксиапатит, продемонстрировали успех в создании костной ткани *in vitro* [45]. Использование этой технологии для быстрого лечения на месте травматических повреждений костей или изготовления биоактивных костных вставок для хирургического приживления, может обеспечить более быстрое восстановление и возвращение к работе.

Перспективы и будущие направления 3D-биопечати

При 3D-биопечати существуют проблемы, которые необходимо решать. С инженерной точки зрения скорость печати и размер продукта ранее были обратно пропорциональны: детали с более мелкими продуктами и более высоким пространственным разрешением требующие больше времени для печати [46,47]. Новые технологии, такие как стереолитографическая биопечать, начинают устранять эти недостатки. Однако у этих технологий есть свои ограничения (например, материалы и типы клеток), которые необходимо решать с помощью дополнительных инноваций или комбинации с другими методами биопечати [48-52]. В настоящее время биочернила ограничены по сложности, совместимости с клетками и возможностью печати. ВКМ в нативной ткани имеет несколько белковых компонентов, а также механические и химические градиенты. Задача создания биочувствительных элементов, которые могут воспроизводить механические и химические сигналы, поддерживать жизнеспособность клеток и при этом оставаться пригодными для печати, требует поиска со стороны химиков, биологов и инженеров. Параллельно с усовершенствованием процессов биопечати и биочувствительных элементов исследователи и клиницисты должны определить, что

составляет функциональную биоткань. Например, иннервация – активная область исследований в биопечати, но в настоящее время отсутствует в большинстве напечатанных тканеинженерных конструкций, но необходима для полного восстановления функции ткани [53]. Для ускорения жизнеспособных клинических решений необходимо сбалансировать правильное количество дизайна биопечати с возможностями самосборки и восстановления клеток-хозяев и напечатанных клеток. Для массового производства тканей с трехмерной биопечатью необходимо будет разработать нормативно-правовую базу и производственную инфраструктуру.

Проблемы, с которыми сталкивается трехмерная биопечать клеточных каркасов для регенерации тканей, связаны с конкретными техническими, материальными и клеточными аспектами процесса биопечати. Подходы к потенциальному улучшению биопечати с васкуляризацией включают компьютерное моделирование, микромасштабную технологию и печать. Компьютерное моделирование – мощный инструмент для создания инженерной ткани с желаемыми свойствами, такими как градиентная пористость и механические свойства. Использование смоделированных на компьютере моделей для оптимизации конструкции сосудистой сети станет инструментом, расширяющим возможности для повышения эффективности использования питательных веществ.

Выбор чернил остается серьезной проблемой и ограничением в 3D-биопечати клетками каркаса для регенерации тканей, поскольку выбранные материалы должны учитывать как их совместимость с ростом и функциями клеток, так и их характеристики пригодные для печати. По этой причине во многих опубликованных исследованиях выбирается ограниченный диапазон материалов, включая альгинат, желатин, коллаген, фиброин шелка, хитозан, ПЭГ и агарозу [8]. Между тем, у каждого типа биоматериала есть свои преимущества и недостатки. Распространенный подход – это печать на нескольких материалах. Он может не только лучше имитировать природные органические и неорганические гибридные компоненты костной ткани, но также обеспечивает способ улучшения точности формы и механической прочности. Канг и соавт. изготовили каркас структурной целостности свода черепа размером с человека с печатью нагруженного hAFSC композитного гидрогеля с каркасом поли (ε-капролактон) (PCL) / трикальцийфосфат (TCP) с использованием встроенного принтера ткани-органа [54]. Результаты показали образование крупных кровеносных сосудов во вновь сформированной костной ткани по всей костной конструкции с биопечатью, включая центральную часть. Включение нескольких материалов также остается проблемой при создании градиентов клеток или факторов роста из-за необходимости готовить множество независимых решений. Необходимо разработать дополнительные интеллектуальные биоматериалы. Перспективными разработками являются создание материалов для самосборки и гидрогелей, реагирующих на раздражители.

Самосборка – это способ создания материалов (наночастиц или гидрогеля), клеток и белков для создания новой супрамолекулярной архитектуры на микроуровнях, что обеспечит способ создания сложных комбинаций и градиентов природных компонентов костного ВКМ [55]. Гидрогели, реагирующие на раздражение, можно разделить на механо-, химио-, тепловые, pH- и светочувствительные гидрогели. Биопечатанные конструкции со способностью изменять форму могут быть сформированы путем стратегического размещения гидрогелей с различными реакциями на стимулы. Более того, за деградацией каркасов гидрогеля можно следить за счет включения сайтов, чувствительных к клеткам. Чтобы имитировать естественное микроокружение ткани, разработаны биореакторы для приложения комбинированной механической силы к трехмерным каркасам, нагруженным клетками. Будущие исследования будут сосредоточены на более сложной механической системе, которая имитирует условия механической нагрузки естественной ткани *in vivo* с различными стимуляциями, такими как биохимическая, механическая, электрическая и перфузионная. После созревания каркаса *in vitro* в системе биореактора формируется целый функциональный орган.

Заключение

Таким образом, аддитивные технологии 3D-биопечати стремительно развиваются. Во всем мире исследования направлены на увеличение скорости, пространственного разрешения и разнообразия материалов и типов клеток, напечатанных с помощью технологии 3D-биопечати. При практическом при-

менении трехмерная биопечать посредством компьютерного проектирования обеспечивает воспроизводимость, необходимую для обеспечения надежного изготовления тканей. Биопечать является прорывом в приложениях трансляционной регенеративной медицины и позволяет создавать новые модели тканей для фундаментальных и прикладных исследований. Трехмерная биопечать на основе экструзии позволяет печатать более крупные структуры с более низким пространственным разрешением с использованием самых разных биоматериалов, от гидрогелей до термопластов. Капельная 3D-биопечать имеет лучшее пространственное разрешение, чем методы экструзии, но ограниченный диапазон материалов, которыми можно печатать, так как для печатающих головок требуются чернила более низкой вязкости. Лазерная биопечать обеспечивает чрезвычайно высокую точность и жизнеспособность клеток, но стоимость такого принтера высокая и сложные, и не создают таких больших структур, как при экструзии и капельной биопечати. Трехмерная биопечать имеет прямое применение в фундаментальных исследованиях медицины, позволяющая ускорить поиск решений в регенеративной медицине для восстановления повреждений кожи у ожоговых пациентов, мышц и / или нервов, или других утраченных тканей и органов. Успех тканевой инженерии зависит от способности создавать сложные, жизнеспособные трехмерные структуры, аналогичные нативной ткани. Поэтому проектирование, создание архитектуры и топографии каркасов из биоматериалов, являются жизненно важным аспектом функционирования ткани.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

- R1. Strategy for the Development of Additive Technologies for the Period up to 2030. Decree of the Government of the Russian Federation Dated of July 14, 2021, No. 1913-р. (In Russ.). [Стратегия развития аддитивных технологий на период до 2030 года: Распоряжение Правительства Российской Федерации от 14.07.2021 г. N 1913-р].
- Jordan F. Betz, Vincent B. Ho., Joel D. Gaston 3D Bioprinting and Its Application to Military Medicine. *Military Medicine*. 2020;185;9/10:e1510-1519.
- Rossi G., Manfrin A., Lutolf M.P. Progress and Potential in Organoid Research. *Nat. Rev. Genet.* 2018;19;11: 671. doi: 10.1038/s41576-018-0051-9.
- Duval K., Grover H., Han L.-H., et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*. 2017;32;4:266–277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- Knight E., Przyborski S. Advances in 3D Cell Culture Technologies Enabling Tissue-Like Structures to be Created in Vitro. *J. Anat.* 2015;227;6:746–756. doi: 10.1111/joa.12257.
- Hickerson W.L., Compton C., Fletchall S., Smith L.R. Cultured Epidermal Autografts and Allodermis Combination for Permanent Burn Wound Coverage. *Burns*. 1994;20:S52–56. doi: 10.1016/0305-4179(94)90091-4.
- Min J.H., Yun I.S., Lew D.H., Roh T.S., Lee W.J.: The Use of Matriderm and Autologous Skin Graft in the Treatment of Full Thickness Skin Defects. *Arch. Plast. Surg.* 2014;41;4:330–336. doi: 10.5999/aps.2014.41.4.330.
- Zhang J., Wehrle E., Rubert M., Müller R. 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:3971. <https://doi.org/10.3390/ijms22083971>.
- Cubo-Mateo N., Gelinsky M. Wound and Skin Healing in Space: The 3D Bioprinting Perspective. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:720217. doi: 10.3389/fbioe.2021.720217.
- Hospodiuk M., Dey M., Sosnoski D., Ozbolat I.T. The Bioink: a Comprehensive Review on Bioprintable Materials. *Biotechnol Adv.* 2017;35;2: 217–239. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.006.
- Panwar A., Tan L.P. Current Status of Bioinks for Microextrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules*. 2016;21;6:685. doi: 10.3390/molecules21060685.
- Brumberg V., Astrelina T., Malivanova T., Samoilov A. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. *Biomedicines*. 2021;9:1235-1249. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091235>.
- Bittner S.M., Smith B.T., Diaz-Gomez L., et al. Fabrication and Mechanical Characterization of 3D Printed Vertical Uniform and Gradient Scaffolds for Bone and Osteochondral Tissue Engineering. *Acta. Biomater.* 2019;90:37–48. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.041.
- Wang W., Caetano G., Ambler W.S., et al. Enhancing the Hydrophilicity and Cell Attachment of 3D Printed PCL/Graphene Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*. 2016;9;12:992. doi: 10.3390/ma9120992.
- Kolesky D.B., Homan K.A., Skylar-Scott M.A., Lewis J.A. Threedimensional Bioprinting of Thick Vascularized Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016;113;12:3179–3184. doi: 10.1073/pnas.1521342113.
- Placone J.K., Engler A.J. Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications. *Adv. Healthc. Mater.* 2018;7;8:1701161. doi: 10.1002/adhm.201701161.
- Ning L., Chen X. A Brief Review of Extrusion-Based Tissue Scaffold Bio-Printing. *Biotechnol J.* 2017;12;8:1600671. doi: 10.1002/biot.201600671.
- Ozbolat I.T., Hospodiuk M. Current Advances and Future Perspectives in Extrusion-Based Bioprinting. *Biomaterials*. 2016;76:321–343. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.

19. Skylar-Scott M.A., Mueller J., Visser C.W., Lewis J.A. Voxlated Softmatter Via Multimaterial Multinozzle 3D Printing. *Nature*. 2019;575:330–335. doi: 10.1038/s41586-019-1736-8.
20. Kang H.-W., Lee S.J., Ko I.K., Kengla C., Yoo J.J., Atala A. A 3D Bioprinting System to Produce Human-Scale Tissue Constructs with Structural Integrity. *Nat. Biotechnol.* 2016;34:3:312–319. doi: 10.1038/nbt.3413.
21. Cross J.D., Ficke J.R., Hsu J.R., Masini B.D., Wenke J.C. Battlefield Orthopaedic Injuries Cause the Majority of Long-Term Disabilities. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2011;19:1:S1–7. doi: 10.5435/00124635-201102001-00002.
22. Corona B.T., Rivera J.C., Owens J.G., Wenke J.C., Rathbone C.R. Volumetric Muscle Loss Leads to Permanent Disability Following Extremity Trauma. *J. Rehabil. Res. Dev.* 2015;52:7:785–792. doi: 10.1682/JRRD.2014.07.0165.
23. Yan W.-C., Davoodi P., Vijayavenkataraman S., et al. 3D Bioprinting of Skin Tissue: Past, Present and Future. *Product Evaluation. Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2018;132:270–295. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.016.
24. Cubo N., Garcia M., Del Cañizo J.F., Velasco D., Jorcano J.L. 3D Bioprinting of Functional Human Skin: Production and in Vivo Analysis. *Biofabrication.* 2016;9:1:015006. doi: 10.1088/1758-5090/9/1/015006.
25. Derr K., Zou J., Luo K., et al. Fully Three-Dimensional Bioprinted Skin Equivalent Constructs with Validated Morphology and Barrier Function. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019;25:6:334–343. doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0318.
26. Gudapati H., Dey M., Ozbolat I. A Comprehensive Review on Droplet-based Bioprinting: Past, Present and Future. *Biomaterials.* 2016;102:20–42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.012.
27. Ying Aqueous Two-Phase Emulsion Bioink-Enabled 3D Bioprinting of Porous Hydrogels. *Advanced Materials. Wiley Online Library.* 2019. accessed June 12. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201805460>.
28. Graham A.D., Olof S.N., Burke M.J., et al. High-Resolution Patterned Cellular Constructs by Droplet-Based 3D Printing. *Sci. Rep.* 2017;7:1:7004. doi: 10.1038/s41598-017-06358-x.
29. Ozbolat I.T., Moncal K.K., Gudapati H. Evaluation of Bioprinter Technologies. *Addit Manuf.* 2017;13:179–200. doi: 10.1016/j.addma.2016.10.003.
30. Hölzl K., Lin S., Tytgat L., Vlierberghe S.V., Gu L., Ovsianikov A. Bioink Properties Before, During and after 3D Bioprinting. *Biofabrication.* 2016;8:3:032002. doi: 10.1088/1758-5090/8/3/032002.
31. Knowlton S., Anand S., Shah T., Tasoglu S. Bioprinting for Neural Tissue Engineering. *Trends Neurosci.* 2018;41:1:31–46. doi: 10.1016/j.tins.2017.11.001.
32. Lee V., Singh G., Trasatti J.P., et al. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;20:6:473–484. doi: 10.1089/ten.tec.2013.0335.
33. Lee W., Debasitis J.C., Lee V.K., et al. Multi-Layered Culture of Human Skin Fibroblasts and Keratinocytes Through Three-Dimensional Freeform Fabrication. *Biomaterials.* 2009;30:8:1587–1595. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.009.
34. Filardo G., Petretta M., Cavallo C., et al. Patient-Specific Meniscus Prototype Based on 3D Bioprinting of Human Cell-Laden Scaffold. *Bone Joint Res.* 2019;8:2:101–106. doi: 10.1302/2046-3758.82.BJR-2018-0134.R1.
35. Moon S., Hasan S.K., Song Y.S., et al. Layer by Layer Three-Dimensional Tissue Epitaxy by Cell-Laden Hydrogel Droplets. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;16:1:157–166. doi: 10.1089/ten.tec.2009.0179.
36. Kim B.S., Lee J.-S., Gao G., Cho D.-W. Direct 3D Cell-Printing of Human Skin with Functional Transwell System. *Biofabrication.* 2017;9:2:025034. doi: 10.1088/1758-5090/aa71c8.
37. Norotte C., Marga F.S., Niklason L.E., Forgacs G. Scaffold-Free Vascular Tissue Engineering Using Bioprinting. *Biomaterials.* 2009;30:30:5910–5917. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.034.
38. Christensen K., Xu C., Chai W., Zhang Z., Fu J., Huang Y. Freeform Inkjet Printing of Cellular Structures with Bifurcations. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112:5:1047–1055. doi: 10.1002/bit.25501.
39. Bohandy J., Kim B.F., Adrian F.J. Metal Deposition from a Supported Metal Film Using an Excimer Laser. *J. Appl. Phys.* 1986;60:4:1538–1539. doi: 10.1063/1.337287.
40. Hopp B., Smausz T., Kresz N., et al. Survival and Proliferative Ability of Various Living Cell Types after Laser-Induced Forward Transfer. *Tissue Eng.* 2005;11:11-12:1817–1823.
41. Ringeisen B.R., Chrisey D.B., Piqué A., et al. Generation of Mesoscopic Patterns of Viable Escherichia Coli by Ambient Laser Transfer. *Biomaterials.* 2002;23:1:161–166. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00091-6.
42. Ringeisen B.R., Kim H., Barron J.A., et al. Laser Printing of Pluripotent Embryonal Carcinoma Cells. *Tissue Eng.* 2004;10:3–4:483–91. doi: 10.1089/107632704323061843.
43. Wu P.K., Ringeisen B.R. Development of Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) and Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cell (HUVSMC) Branch/Stem Structures on Hydrogel Layers via Biological Laser Printing (BioLP). *Biofabrication.* 2010;2:1:014111. doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014111.
44. Michael S., Sorg H., Peck C.-T., et al. Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice. *PLoS One.* 2013;8:3:e57741. doi: 10.1371/journal.pone.0057741.
45. Keriquel V., Oliveira H., Rémy M., et al. In Situ Printing of Mesenchymal Stromal Cells, by Laser-Assisted Bioprinting, for in Vivo Bone Regeneration Applications. *Sci. Rep.* 2017;7:1:1–10. doi: 10.1038/s41598-017-01914-x.
46. Derakhshanfar S., Mbeleck R., Xu K., Zhang X., Zhong W., Xing M. 3D Bioprinting for Biomedical Devices and Tissue Engineering: a Review of Recent Trends and Advances. *Bioact Mater.* 2018;3:2:144–156. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.
47. Catros S., Fricain J.-C., Guillotin B., et al. Laser-Assisted Bioprinting for Creating on-Demand Patterns of Human Osteoprogenitor Cells and Nano-Hydroxyapatite. *Biofabrication.* 2011;3:2:025001. doi: 10.1088/1758-5082/3/2/025001.
48. Zhang Y.S., Yue K., Aleman J., et al. 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Ann. Biomed Eng.* 2017;45:1:148–163. doi: 10.1007/s10439-016-1612-8.
49. Kelly B.E., Bhattacharya I., Heidari H., Shusteff M., Spadaccini C.M., Taylor H.K. Volumetric Additive Manufacturing Via Tomographic Reconstruction. *Science.* 2019;363:6431:1075–1079. doi: 10.1126/science.aav7114.
50. Xue D., Zhang J., Wang Y., Mei D. Digital Light Processing-Based 3D Printing of Cell-Seeding Hydrogel Scaffolds with Regionally Varied Stiffness. *ACS Biomater Sci. Eng.* 2019;5:9:4825–4833. doi: 10.1021/acsbomaterials.9b00696.
51. Grigoryan B., Paulsen S.J., Corbett D.C., et al. Multivascular Networks and Functional Intravascular Topologies Within Biocompatible Hydrogels. *Science.* 2019;364:6439:458. doi: 10.1126/science.aav9750.
52. Bernal P.N., Delrot P., Loterie D., et al. Volumetric Bioprinting of Complex Living-Tissue Constructs Within Seconds. *Adv Mater.* 2019;31:42:1904209. doi: 10.1002/adma.201904209.
53. Saliba J., Daou A., Damiati S., Saliba J., El-Sabban M., Mhanna R. Development of Microplatforms to Mimic the in Vivo Architecture of CNS and PNS Physiology and Their Diseases. *Genes.* 2018;9:6:285. doi: 10.3390/genes9060285.
54. Kang H.W., Lee S.J., Ko I.K., Kengla C., Yoo J.J., Atala A. A 3D Bioprinting System to Produce Human-Scale Tissue Constructs with Structural Integrity. *Nat. Biotechnol.* 2016;34:3:312–319.
55. Huebsch N., Mooney D.J. Inspiration and Application in the Evolution of Biomaterials. *Nature.* 2009;462:426–432.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.01.2022. **Принята к публикации:** 01.02.2022.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study had no sponsorship.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.01.2022. **Accepted for publication:** 01.02.2022