

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Бикмулина Полина Юрьевна

**Фабрикация гидрогелевых тканеинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции в красном и ближнем инфракрасном диапазоне**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

доктор химических наук, профессор  
Тимашев Петр Сергеевич

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, доцент  
Кошелева Настасья Владимировна

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Трехмерная биопечать .....	12
1.2 Гидрогелевый компонент биочернил для 3D биопечати .....	17
1.3 Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в тканевой инженерии .....	20
1.4 Сфероиды как клеточный компонент биочернил для 3D биопечати.....	26
1.5 Моделирование регенерации и процессов морфогенеза в тканеинженерных конструкциях .....	28
1.6 Выживаемость клеток при 3D биопечати .....	32
1.7 Фотобиомодуляция (ФБМ).....	36
1.8 Оптические свойства скаффолдов и фотобиомодуляции .....	38
1.9 Параметры источников света для фотобиомодуляции.....	39
1.10 Клеточные механизмы фотобиомодуляции.....	40
1.11 Фотобиомодуляция в тканевой инженерии .....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	51
2.1 Монослойное (2D) культивирование клеток.....	51
2.2 Трехмерное (3D) культивирование клеток .....	51
2.3 Проточная цитофлуориметрия.....	52
2.4 Анализ дифференцировки монослойных культур .....	52
2.5 Фибриновый гидрогель .....	53
2.6 Фибрин-желатиновый гидрогель.....	54
2.7 Реометрия гидрогелей.....	54
2.8 Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (MPP, SAXS) .....	55
2.9 Визуализация полимерной сети гидрогеля.....	55
2.10 Трехмерная экструзионная биопечать .....	55
2.11 Оценка печатаемости .....	56
2.12 Оценка коэффициента набухания.....	56
2.13 Наноиндентирование и микроиндентирование.....	56
2.14 Фурье-спектроскопия и термогравиметрический анализ.....	57
2.15 Хемилюминесцентный анализ .....	57
2.16 Оценка остаточного рибофлавина в составе напечатанных конструкторов .....	57
2.17 Анализ пролиферативной активности и нормированной метаболической активности.....	58
2.18 Анализ продукции аденозинтрифосфата (АТФ).....	59
2.19 Анализ жизнеспособности клеток - Live-Dead assay .....	59

2.20 Иммуноцитохимия .....	59
2.21 Анализ дифференцировки конструкторов .....	60
2.22 Морфометрический анализ .....	60
2.23 Фотобиомодуляция .....	61
2.24 Ингибиторный анализ.....	61
2.25 Цейтраферная съемка.....	61
2.26 Метаболическая оценка - Seahorse assay.....	61
2.27 Статистический анализ .....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	63
3.1 Характеристика клеточного компонента биочернил (выделение, характеристика МСК, формирование клеточных сфероидов) .....	63
3.2 Разработка состава и характеристика гидрогелевого компонента биочернил.....	66
3.3 Разработка и оптимизация протокола 3D экструзионной биопечати .....	77
3.4 Исследование свойств конструкторов в процессе созревания .....	85
3.5 Подбор параметров и определение мишеней фотобиомодуляции в клетках.....	92
3.6 Разработка комплексного протокола 3D биопечати и фотобиомодуляции и исследование эффектов фотобиомодуляции в напечатанных конструкторах .....	105
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	109
4.1 Биочернила: подбор состава и характеристика .....	109
4.2 Протокол 3D экструзионной биопечати .....	111
4.3 Оптимизация подходов к анализу 3D тканеинженерных конструкций.....	114
4.4 Влияние фотобиомодуляции на мезенхимные стромальные клетки (МСК) .....	116
4.5 Комбинированный протокол 3D биопечати и фотобиомодуляции (ФБМ) для создания жизнеспособных и функциональных тканеинженерных конструкций .....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	121
ВЫВОДЫ.....	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время технология 3D биопечати является одним из ведущих направлений тканевой инженерии и регенеративной медицины. 3D биопечать имеет перспективы применения в качестве метода формирования органов для трансплантации в условиях недостатка и сложностей получения донорского материала, получения аналогов тканей и органов как экспериментальных моделей для тестирования лекарственных препаратов, косметических средств и исследования процессов регенерации. Однако, подход 3D биопечати сопряжен с различными сложностями, такими как выбор подходящих биоматериалов, типов клеток, факторов роста и дифференцировки, а также техническими проблемами, связанными с чувствительностью живых клеток и формированием архитектуры тканей [1]. Решение этих сложностей требует интеграции технологий из областей инженерии, науки о биоматериалах, клеточной биологии, физики и медицины.

Одним из потенциальных методов для решения этих проблем является фотобиомодуляция (ФБМ). На сегодняшний день ФБМ применяют в терапии заболеваний широкого профиля - поверхностных ран, сосудистых дисфункций, хронических заболеваний хрящей, слизистой оболочки рта онкологических больных, поврежденной приемом цитотоксических препаратов и для ускорения роста волос. Данный метод основан на нетепловом воздействии света красной и ближней инфракрасной (ИК) областей спектра на биологические мишени. Свет с длинами волн в диапазоне 600-1000 нм может быть применен не только для поверхностных тканей, но также и для более глубоких повреждений, так как излучение этого диапазона попадает в «оптическое окно» - такой свет мало поглощается жидкостью, содержащейся в тканях, что позволяет ему проникать на глубину до нескольких сантиметров. Эффекты ФБМ обусловлены различными механизмами, основными из которых являются фотолиз комплексов оксида азота с образованием сигнальной молекулы NO, и воздействие ФБМ на порфирины мембран митохондрий. Усиление пролиферации, антиапоптотические эффекты, повышение метаболической и регенеративной активности связывают с ФБМ-индуцированными изменениями дыхательной цепи митохондрий, приводящими к активации различных сигнальных каскадов. Однако, несмотря на большое количество данных, полученных после воздействия различных режимов ФБМ на разные клетки, до сих пор детально не изучены процессы запуска того или иного клеточного ответа

на ФБМ, прежде всего для первичных нетрансформированных культур, и имеются лишь ограниченные данные воздействия ФБМ на трехмерные культуры клеток.

### **Степень разработанности темы исследования**

В литературе имеются разрозненные данные о влиянии ФБМ на клетки в трехмерных условиях, с различными результатами в зависимости от режима ФБМ, типа клеток и свойств скаффолда. Комбинация ФБМ и 3D биопечати имеет потенциал благодаря минимальному поглощению света водой в гидрогелевых биочернилах и наличию светодиодов в экструзионных биопринтерах для фотосшивки. Это открывает перспективы для увеличения жизнеспособности клеток и модуляции их метаболизма и дифференцировки.

Однако в литературе отсутствуют данные о применении ФБМ для создания трехмерных тканеинженерных конструкций методом 3D биопечати. Имеются только экспериментальные результаты о влиянии ФБМ на клетки в ручных трехмерных гидрогелях и ограниченные исследования по клеточным сфероидам. В данной работе будет впервые создана тканеинженерная конструкция с использованием методов ФБМ и 3D биопечати с клеточными сфероидными из мезенхимальных стволовых клеток различных источников.

Несмотря на обширные исследования, механизмы клеточного ответа на ФБМ, особенно в контексте первичных культур и трехмерных систем культивирования, остаются недостаточно изученными. В данной работе представлены результаты анализа эффекта фотобиомодуляции различных режимов в условиях трехмерных биоэквивалентов, полученных методом 3D экструзионной биопечати.

### **Цели и задачи исследования**

Целью работы являлось создание гидрогелевых тканеинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции (ФБМ) в красном и ближнем инфракрасном диапазоне.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка состава биочернил на основе гидрогеля и МСК.
2. Разработка протокола 3D экструзионной биопечати тканеинженерных конструкций на основе разработанных биочернил.
3. Оптимизация подходов к оценке жизнеспособности и функциональности 3D тканеинженерных конструкций.
4. Установление оптимальных режимов фотобиомодуляции для МСК.

5. Установление основных мишеней ФБМ в красном и ближнем инфракрасном диапазоне для МСК.
6. Установление эффектов ФБМ в красном и ближнем инфракрасном диапазоне для МСК в 3D условиях.

Разработка комплексного протокола 3D биопечати и ФБМ для получения жизнеспособных и функциональных тканеинженерных конструкций.

### **Научная новизна**

На данный момент в литературе имеются обширные, но разрозненные данные по влиянию ФБМ на клетки в трехмерных условиях. В зависимости от режима ФБМ, типа клеток и свойств скаффолда описаны различные результаты – усиление пролиферативной активности, метаболической активности, более эффективная дифференцировка клеток в определенном направлении [1–3]. Комбинация методов ФБМ и 3D биопечати является выгодной и потенциально эффективной по нескольким причинам. Во-первых, ФБМ в красном и ближнем инфракрасном диапазоне попадает в «оптическое окно», в котором поглощение света водой в составе гидрогелевых биочернил минимально, и тем самым возможна экспозиция всей толщины тканеинженерной конструкции; во-вторых, конструкция подавляющего большинства экструзионных биопринтеров уже предполагает наличие светового диода для фотосшивки конструкции, что облегчает технические детали трансляции метода ФБМ в область тканевой инженерии. Все эти факторы обуславливают широкие перспективы применения ФБМ в тканевой инженерии для увеличения жизнеспособности клеток в составе конструкций, модуляции их метаболизма и направления дифференцировки.

Тем не менее, на данный момент в литературе отсутствуют данные о непосредственном применении ФБМ для создания трехмерных тканеинженерных конструкций методом 3D биопечати. Достаточно широко представлены экспериментальные результаты о влиянии ФБМ на метаболизм, пролиферацию и дифференцировку клеток в условиях трехмерных гидрогелей, полученных вручную [4,5]; также есть ограниченное количество работ одной научной группы, посвященное исследованию влияния ФБМ на трехмерные клеточные сфероиды [6]. Соответственно, какие-либо работы, исследующие потенциал метода ФБМ для трехмерных гидрогелевых конструкций с клеточными сфероидными, полученных методом 3D биопечати, также не представлены в литературе.

В данной работе впервые будет сформирована тканеинженерная конструкция с одновременным использованием методов ФБМ и 3D биопечати с использованием клеточных сфероидов из МСК, полученных из различных тканевых источников.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Показана нетоксичность и адгезивность биочернил на основе фибрина и желатина для МСК. Показано, что гидрогелевые конструкции, полученные методом 3D биопечати, обладают более высокой метаболической активностью и плотностью клеток, по сравнению со сформированными вручную, спустя 14 суток культивирования. Установлено, что для корректного анализа жизнеспособности объемных тканеинженерных конструкций необходимо использованием комплекса модифицированных методов оценки различных клеточных параметров. Показано, что основной клеточной мишенью ФБМ является IV комплекс дыхательной цепи митохондрий. Установлено, что ФБМ с длинами волн 633 нм и 840 нм имеют различные дополнительные механизмы воздействия на клетки. Показано, что ФБМ позволяет повысить выживаемость напечатанных конструкций, а также повысить продукцию АТФ и метаболическую активность клеток в их составе. Установлен оптимальный протокол комбинированной 3D биопечати и фотобиомодуляции для повышения жизнеспособных и функциональных тканеинженерных конструкций на основе МСК.

### **Методология и методы исследования**

В ходе проведенного научного исследования были осуществлены комплексные методы выделения и культивирования первичных клеточных культур из альвеолярной слизистой оболочки десны человека. Проточная цитофлуориметрия использовалась для анализа поверхностных маркеров МСК (CD90, CD73, CD105, CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR). Световая фазово-контрастная микроскопия использовалась для общего наблюдения за морфологией клеток. Флуоресцентная и сканирующая лазерная конфокальная микроскопия применялась для оценки жизнеспособности, визуализации специфических белков (виментин, фибронектин, коллаген I типа, ki-67), и трехмерной реконструкции образцов. Образцы для дальнейшего исследования формировали с использованием 3D экструзионного биопринтера BioX (CellInk, Швеция). Фотобиомодуляция проводилась в двух режимах: с длиной волны 633 нм и 840 нм. Реометрические методы применяли для оценки вязкости и характеристик полимеризации гидрогелевого компонента биочернил. Для анализа функционального состояния клеточных культур применяли биохимические тесты, такие как

тесты на жизнеспособность клеток (окрашивание на живые/мертвые клетки Live/Dead assay), оценка метаболической активности (резазуриновый тест AlamarBlue, Seahorse assay) и пролиферации клеток. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1 и Microsoft Office Excel.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанные биочернила на основе фибрина и желатина обеспечивают реактивацию сфероидов МСК, сопровождающуюся повышением метаболической и пролиферативной активности и миграцией клеток.
2. Использование метода 3D биопечати позволяет повысить функциональность тканеинженерных конструкций на основе сфероидов МСК.
3. Фотобиомодуляция в красном и ближнем инфракрасном диапазоне повышает метаболическую и пролиферативную активность МСК за счет воздействия на комплексы дыхательной цепи митохондрий.
4. Использование фотобиомодуляции при создании 3D тканеинженерных конструкций позволяет повысить их выживаемость.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин "Введение в регенеративную медицину", "Биопринтинг", "3D принтинг", читаемых студентам по направлениям подготовки (специальностям) 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия», 06.04.01 «Биология», 28.04.03 «Наноматериалы», 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов», акт о внедрении результатов диссертации №516 от 14.10.2024 г.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационной работы. Автор самостоятельно занимался постановкой цели и задач диссертационной работы, также тщательно изучал литературу по заданной тематике. Самостоятельно проведены экспериментальные исследования, результаты которых получены исключительно самим

автором или при его определяющем или непосредственном участии. Автору принадлежит ведущая роль в характеристике первичных культур мезенхимных стромальных клеток и гидрогелей различного состава, разработке способа 3D биопечати на основе сфероидов из мезенхимных стромальных клеток и анализа биологических свойств полученных биоэквивалентов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, направлениям исследований согласно пунктам: 10 (Создание заменителей органов и тканей); 11 (Разработка инженерных принципов и развитие концепции инженерного подхода в биологии для создания искусственных органов); 18 (Выращивание методами регенеративной медицины органов и тканей для компенсации утраченных или компенсации их пониженных физиологических функций).

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, направлениям исследований согласно пунктам: 11 (Изучение закономерностей изменения структурной и цитохимической организации клеток при культивировании их вне организма, изучение особенностей формирования тканей *in vitro*); 12 (3D-культуры); 14 (Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды); 18 (Энергетика клетки, регуляция редокс-статуса клетки).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов определяется использованием достаточного количества биологических образцов, рассчитанного при планировании эксперимента, а также использованием методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Исследование проводилось с использованием сертифицированного научного оборудования и реактивов. Были получены гистограммы и первичные данные проточной цитометрии для анализа иммунофенотипа мезенхимных стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки свободной десны человека. Был проведен анализ реологических свойств модифицированного фибринового гидрогеля с получением количественных значений модуля сохранения и модуля потерь при динамических измерениях. Выполнен анализ реологических свойств гидрогеля на основе фибрина и желатина с получением количественных значений модуля сохранения и модуля потерь при динамических измерениях и изменении температуры. Была создана и использована для расчетов электронная база микрофотографий

клеток и сфероидов в различных типах гидрогелей с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Был проведен анализ жизнеспособности и пролиферативной активности клеток и сфероидов в 2D и 3D условиях с получением количественных значений интенсивности флуоресценции. Собрана электронная база микрофотографий для расчета оптимальных параметров печатаемости гидрогеля на основе фибрина и желатина. Были получены микрофотографии и первичные данные морфометрического анализа спраутинга сфероидов и миграции клеток в 3D условиях. Проведен метаболический анализ культур при воздействии фотобиомодуляции двух различных режимов с получением количественных значений интенсивности флуоресценции.

Результаты исследования научно обоснованы, достоверность полученных результатов подтверждена проведенным статистическим анализом с использованием статистических методов в сертифицированной компьютерной программе GraphPad Prism 8.0.1.

Материалы диссертации доложены на Международной конференции по тканевой инженерии в терапии 2019 (Родос, Греция, 27-31 мая 2019), III, IV, V, VII Сеченовском международном биомедицинском саммите (Москва, 2019, 2020, 2021, 2023), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 20–23 ноября 2019), VII Троицкой конференции с международным участием "Медицинская физика" (Троицк, Россия, 19-21 октября 2020), IX съезде Российского Фотобиологического Общества (Шепси, Россия, 12-19 сентября 2021), XXV Saratov Fall Meeting 2021 (Саратов, Россия, 27 сентября – 1 октября 2021), форуме «Наука будущего – наука молодых» (Москва и Калининград, Россия, 17-20 ноября 2021), International Conference Laser Optics, ICLO 2022 (Санкт-Петербург, Россия, 20-24 июня 2022), конференции "3D технологии в клинической анатомии" (Самара, Россия, 8-10 сентября 2022), Всероссийском молодежном конкурсе научных проектов #ВЦЕНТРЕНАУКИ (Сочи, Россия, 1-3 декабря 2022), Regenerative Medicine International Symposium; Chronic and Degenerative diseases (Тегеран, Иран, 6 декабря 2022), Симпозиуме «Современные тренды в биофотонике» 2023 (Нижний Новгород, Россия, 3-6 июля 2023) и Royan International Twin Congress 2024 (Тегеран, Иран, 27-31 августа 2024).

Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации по грантовому соглашению № 075-15-2024-640 (Сеченовский университет) (3D экструзионная биопечать тканеинженерных конструкций) и государственным заданием Минздрава России тема №NZAF-2024-0016 (характеристика клеточного компонента биочернил).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 25 работ, в том числе:

Научных статей, отражающих основные результаты диссертации – 19 статей, из них:

- в журналах, включенных в международные базы: Scopus – 2 оригинальные статьи, Web of Science – 4 оригинальные статьи, Springer – 1 оригинальная статья;
- в иных изданиях – 12 статей.

Обзорных статей – 3.

Патент на изобретение – 3.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из списка основных сокращений, введения, обзора литературы, экспериментальной части (раздел «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение»), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Материал изложен на 152 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 54 рисунка. Список литературы включает 336 источников, в том числе 331 работа иностранных авторов и 5 русскоязычных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Трехмерная биопечать

Биофабрикация – это область, задачей которой является создание сложных биологических продуктов на основе живых клеток, внеклеточного матрикса, искусственных материалов [7]. Одной из важнейших групп технологий в биофабрикации являются аддитивные. 3D печать, известная также как fused deposition modeling (FDM), была запатентована в 1989 году. Данная технология относится к группе аддитивных и обеспечивает экструзию (выдавливание) материала в виде филамента (нити) при движении в плоскости X-Y послойно при движении вдоль оси Z [8]. В результате формируются объемные структуры. Биопечать – гибридная технология 3D печати, где в качестве материала для печати используется не пластик, а биочернила. 3D биопринтер представляет собой роботизированное устройство для аддитивной биофабрикации трехмерных тканей и органов на основе цифровых моделей [9]. Основными свойствами биопринтера являются автономность, возможность создания 3D структур и печати не только биоматериалами, но и живыми объектами (клетками/сфероидами/органоидами). Биопечать включает 3 стадии: препроцессинг (создание модели органа и протокола печати), процессинг (непосредственно 3D биопечать) и постпроцессинг (культивирование и процесс созревания) [10,11].

Технология 3D-экструзионной биопечати в настоящее время находится в состоянии непрерывного развития, находя все больше новых применений. Этот подход имеет многочисленные преимущества, включая наличие трехмерных условий, подобных внеклеточному матриксу, поддерживающему клетки [12,13]. Основными компонентами для биопечати являются непосредственно 3D биопринтер и биочернила, в состав которых входят клеточный компонент (отдельные клетки или клеточные сфероиды) и биоматериал, выполняющий функции внеклеточного матрикса (ВКМ) и механической опоры.

Экструзионная биопечать на данный момент представляет собой наиболее легко реализуемый и хорошо воспроизводимый в условиях лаборатории метод [14]. При данном методе печати происходит экструзия вязкого материала из картриджа биопринтера согласно определённой компьютерной программе [15]. Сложные трехмерные конструкции формируются путем совмещения непрерывной экструзии и перемещения экструдера по осям X, Y и Z. Помимо удобства использования, к преимуществам экструзионных биопринтеров относят также высокую клеточную плотность получаемых конструкций, что является ключевым моментом при формировании тканеподобных структур. Несмотря на неблагоприятные условия (высокие давления, колебания температуры и pH), при экструзионной биопечати возможно сохранить

относительно высокую жизнеспособность клеток – 70-80% [16]. Разрешение экструзионной биопечати ниже, чем струйной и лазерной (100-200 мкм), однако благодаря сохранению живых клеток существует возможность изготовления как микро-, так и макротканевых конструкций [17].

Материал, загружаемый в экструзионный биопринтер для последующей экструзионной биопечати, обычно называют биочернилами. Чаще всего биочернила включают в себя два основных компонента: непосредственно вязкий биоматериал синтетического либо натурального происхождения, и живую составляющую – клетки, агрегаты клеток, либо сфероиды [15]. Материалы, входящие в состав биочернил, должны обладать следующими свойствами :

#### 1. Вязкость и механические свойства

Для успешной экструзионной печати биочернила не должны быть слишком жидкими (в таком случае не удастся сформировать структуру трехмерного конструкта) или слишком вязкими (иначе давление, необходимое для экструзии биочернил, будет механически разрушать клеточные структуры). Оптимальные значения вязкости лежат в пределах от 30 до  $6 \cdot 10^7$  мПа, класс биоматериалов с такими механическими свойствами обычно называют гидрогелями [18].

#### 2. Нетоксичность

Так как после экструзионной биопечати клетки оказываются инкапсулированы в конструкт и в ряде случаев культивируются в нем в течение длительного времени, материал биочернил либо продукты его распада не должны оказывать какого-либо негативного влияния на жизнеспособность клеток.

#### 3. Адгезивность

Первичной целью экструзионной биопечати является создание тканеподобного конструкта, в котором биоматериал выполняет функции внеклеточного матрикса – передает механические напряжения, несет на себе сигнальные молекулы и пр. Более того, успешная дифференцировка и миграция клеток подразумевают ремоделирование внеклеточного матрикса. Поэтому биоматериал должен обладать различными сайтами для взаимодействия с клеточными рецепторами – интегринами.

#### 4. Пористость

В нативных условиях питательные вещества и кислород доставляются к клеткам через капилляры, расстояние до которых не превышает 100-200 мкм. Культивируемые тканеподобные конструкты в подавляющем большинстве не васкуляризированы, а обмен веществ с окружающей средой происходит путем пассивной диффузии. Поэтому микроструктура используемого биоматериала должна предусматривать поры, через которые беспрепятственно смогут проходить не только малые ( $O_2$ ,  $CO_2$ , глюкоза) молекулы, но и большие по размеру соединения (белки), а также везикулы.

#### 5. Способность к полимеризации (сшивке)

Требования к биоматериалу в процессе культивирования отличаются от таковых в процессе биопечати: он должен быть более механически прочным, стабильным и сохраняющим форму при температуре 37°C. Для достижения таких свойств после экструзионной биопечати обычно прибегают к полимеризации, или сшивке, конструкта.

Существует множество различных вариантов полимеризации гидрогелей [19]. Выделяют следующие варианты:

а. Физическая сшивка (полимеризация происходит при изменении физических параметров)

-Нагревание;

-Охлаждение (желатин, агароза);

-Смешивание полиэлектролитных растворов с ионами противоположного знака (альгинат и двухвалентные ионы);

б. Химическая сшивка

-Добавление кросс-линкеров (коллаген и глутаральдегид);

-Ферментативная сшивка (фибриноген и тромбин);

-Фотосшивка.

В случае биопечати фотосшивка является наиболее распространенным методом полимеризации [20,21]. Существует большое количество биоматериалов, модифицированных добавлением функциональных фотоактивных групп, которые меняют свою конформацию после поглощения света определенной длины волны. При встраивании таких групп в компоненты биоматериала и последующем облучении происходит необратимая сшивка функциональных групп с мономерами материала, в результате чего становится возможным получение прочной полимерной сети. Для фотосшивки напечатанных конструктов широко используют метакрилатные группы, в частности, GelMA - желатин, сшитый с метакрилатом. Для успешной полимеризации гидрогеля данным методом также необходимо добавление фотоинициатора. В подавляющем большинстве случаев при фотосшивке используют свет ультрафиолетовой (УФ) области спектра, поэтому недостатком данного метода является прежде всего негативное воздействие УФ света (360-380 нм) на клетки.

Каждый из типов материала и метода полимеризации обладает как преимуществами, так и недостатками, и первостепенной задачей при подборе биочернил для биопечати является их оптимальная комбинация. «Идеальный» материал для экструзионной биопечати должен обладать следующими свойствами [15]:

1. Печатаемость

Материал должен обладать вязкостью, реологическими свойствами и возможностью гелеобразования, которые максимально упрощают манипуляции с материалом в процессе печати.

## 2. Биосовместимость

Материал не должен вызывать нежелательные локальные или системные реакции со стороны организма, а также должен поддерживать биологические свойства конструкта.

## 3. Деградация

Скорость дегградации материала должна соответствовать способности клеток производить свой собственный ВКМ; побочные продукты разложения должны быть нетоксичными.

## 4. Механические свойства

Материалы следует выбирать на основе требуемых механических свойств конструкта, поддерживая баланс между прочностью и адгезивностью конструкта для клеток.

## 5. Биомиметичность

Структурные и функциональные свойства материала должны основываться на знаниях о специфике моделируемой ткани.

3D-культуры клеток и тканей позволяют преодолеть разрыв между двухмерными культурами и *in vivo* экспериментами, поскольку они имитируют микроархитектуру и микроокружение тканей конкретного органа в относительно упрощенном виде [22]. 3D-культуры эффективно реализуют принцип 3Rs (replacement, reduction, and refinement) и рассматриваются как перспективное направление для минимизации экспериментов на животных [23]. Ожидается, что они получат широкое распространение в доклинических исследованиях, скринингах лекарственных препаратов [24,25]. Однако выбор параметров контроля качества не всегда оптимален, а внутренним различиям протоколов печати и возможностям используемых 3D-моделей не всегда уделяется достаточно внимания. Стандартизация, не всегда правильно применяемая классификация, сложность и изменчивость могут вносить неясности в процесс создания биоэквивалентов.

Таблица 1 - Сравнение характеристик монослойных культур, сфероидов, клеток, инкапсулированными в гидрогель, сфероидов, инкапсулированных в гидрогель, и напечатанных сфероидов. Цвет означает степень сходства с нативными тканями и органами. Зеленый - высокая, желтый - умеренная, оранжевый - низкая, розовый - отсутствует. Адаптировано из [26]

Характеристика	Монослой	Сфероиды	Клетки в гидрогеле	Сфероиды в гидрогеле	Сфероиды напечатанные
Взаимодействие клетка-клетка	Ограничено 1 слоем	Сохраняется	Зависит от клеточной плотности	Сохраняется	Сохраняется
Взаимодействие клетка-ВКМ	Ограничено покрытием культуральной посуды	Ограничено секретиромым ВКМ	Матрикс гидрогеля	Матрикс гидрогеля	Матрикс гидрогеля

Продолжение Таблицы 1

Контроль механических свойств	Ограничен жесткостью субстрата	Сложно контролировать	Настраиваем через состав гидрогеля	Настраиваем через состав гидрогеля	Настраиваем через состав гидрогеля
Воспроизведение физиологии	Нет 3D структуры	Нет взаимодействия с ВКМ	Мало контактов с клетками	Комбинация взаимодействия с клетками и ВКМ	Комбинация взаимодействия с клетками и ВКМ
Градиент кислорода и питательных веществ	Нет	Присутствует, но слишком резкий	Минимальный	Воспроизведение ткани	Воспроизведение ткани
Потенциал к долговременной культуре	Ограничено конфлюентностью	Присутствует, но слишком резкий	Поддерживается	Поддерживается	Поддерживается
Возможность имиджинга с высоким разрешением	Присутствует	Ограничена размером сфероидов	Присутствует для прозрачных гидрогелей	Сложно для толстых конструкций	Сложно для толстых конструкций
Потенциал к масштабированию	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Высокий, но требуется оптимизация	Высокий, но требуется оптимизация
Совместимость с высокопроизводительными методами оценки	Легко адаптируема	Адаптируема	Зависит от типа гидрогеля	Требуется оптимизация	Требуется оптимизация
Поддержание тканеспецифичной функции	Часто пропадает	Поддерживается 3D структурой	Поддерживается ВКМ	Поддерживается 3D структурой и ВКМ	Поддерживается 3D структурой и ВКМ
Применимость для тестирования лекарств	Стандартные, но не физиологичные	Лучше, чем 2D	Применимы для лекарств, нацеленных на ВКМ	Физиологичный ответ	Физиологичный ответ
Возможность моделирования заболеваний	Ограничены клеточными эффектами	Подходят для моделирования опухолей	Подходят для моделирования взаимодействий с ВКМ	Может воспроизводить сложное окружение	Физиологичный ответ
Потенциал для васкуляризации	Нет	Ограничено специфическим типом клеток	Может обеспечивать рост сосудов	Может включать капиллярные структуры	Физиологичный ответ

## 1.2 Гидрогелевый компонент биочернил для 3D биопечати

Трудно переоценить роль гидрогелей при скаффолдном подходе тканевой инженерии, поскольку они обеспечивают среду для адгезии, миграции и взаимодействия клеток, механические сигналы для созревания тканей и т. д. Более того, топология конструкции и паттерны заполнения, создаваемые с помощью филаментов и пор, должны тщательно контролироваться для оптимизации механических и биологических свойств 3D- структур [27].

Одним из наиболее широко используемых биоматериалов для моделирования трехмерных условий является фибриновый гидрогель (рисунок 1). Помимо полной биосовместимости, фибрин биоразлагаем, и продукты его разложения нетоксичны. Более того, в отличие от многих других материалов, свойства фибрина (морфология волокна, стабильность, механические свойства) можно варьировать путем изменения концентрации компонентов, состава буферов и т. д. [28,29].

Фибрин представляет собой фибриллярный белок, образующийся из циркулирующего в крови фибриногена. Фибриноген – неактивный мономер фибрина – это удлиненный димерный гликопротеин, образованный тремя полипептидными цепями A $\alpha$ , B $\beta$  и  $\gamma$ , соединенными друг с другом в N-концевом E-домене дисульфидными мостиками [30–32]. Образование фибрина из фибриногена является одним из важных этапов ферментативного каскада пути свертывания крови, необходимого для остановки кровотечения [33,34]. Этот процесс можно разделить на две стадии: ферментативную и неферментативную. На первой стадии тромбин (фактор II) индуцирует протеолитическое расщепление и высвобождение фибринопептида из цепей A $\alpha$  и B $\beta$  с образованием, соответственно, двух областей полимеризации -  $\alpha$  и  $\beta$ . Эти центры взаимодействуют с дополнительными центрами полимеризации a- и b- в областях  $\gamma$ C и  $\beta$ C на D-узле другого мономера фибрина, что приводит к постепенному образованию протофибрилл. Агрегация протофибрилл в поперечном и продольном направлениях приводит к формированию разветвленных волокон, в результате образующих фибриновую сеть [35,36].

Образование фибрина, известное как фибриногенез, связано с гемостазом, одним из основных этапов заживления ран. При формировании обширной пористой сети волокна фибрина играют роль временного каркаса для мигрирующих и пролиферирующих клеток в области повреждения. Помимо этого, фибрин обладает ангиогенными свойствами. При миграции клеток их рецепторы связываются со специфическими участками на фибриновых волокнах, которые не только обеспечивают клеточную адгезию, но также запускают различные внутриклеточные сигнальные пути. Адгезия клеток к фибрину в основном обеспечивается двумя сайтами аргинилглициласпарагиновой кислоты (RGD), расположенными на  $\alpha$ -цепи через интегрины ( $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 и т. д.). Было показано, что данные типы интегринов ( $\alpha$ v $\beta$ 3 и  $\alpha$ 5 $\beta$ 1) отвечают за

образование просвета эндотелиальными клетками [37]. Синтетическое встраивание дополнительных участков селективного связывания для интегрина  $\alpha\beta 3$  в молекулы фибрина способствует ангиогенезу и образованию сосудов [38]. Помимо RGD сайтов, эндотелиальные клетки взаимодействуют также с последовательностью  $\beta 15-42$  фибрина через VE-кадгерин [39]. Адгезия МСК к фибрину обеспечивается другим типом интегринов -  $\alpha\beta 1$  [40]. Непосредственно при ангиогенезе фибрин выступает больше не как прочный каркас для поддержания клеток, а в качестве ремоделируемой среды для вновь образующихся сосудов [41]. Процесс ремоделирования фибрина регулируется в первую очередь матриксными металлопротеиназами (ММП, MMP). Среди различных типов MMP наиболее важную роль играют MMP2, MMP9 и MT1-MMP. Было показано, что в эндотелиальных клетках VEGF индуцирует экспрессию MMP9 и MT1-MMP посредством передачи сигналов Notch [42]. Начальные стадии васкулогенеза коррелируют с повышением уровня профермента проММП-2 и снижением проММП-9, однако сами ММП-2 и ММП-9 не были обнаружены в значительных количествах. MT1-MMP играет первичную роль в образовании сосудов как эндотелиальными клетками, так и МСК [43]. Более того, фибрин обеспечивает синтез белков ВКМ, таких как ламинин и коллаген IV типа [44,45], стабилизирующих сформированную микрососудистую сеть.

К недостаткам фибрина как биоматериала можно отнести относительно высокую скорость деградации и низкую вязкость. Одним из вариантов модификации фибрина для их устранения является добавление полиэтиленгликоля (ПЭГ). При ПЭГилировании бифункциональный ПЭГ с концевыми реактивными группами связывается с молекулами белка-мишени [46]. ПЭГилированный фибриноген представляет собой комплексную структуру, содержащую как специфические сайты для клеточной адгезии (в частности, сайты RGD), так и обладающую механической прочностью и стабильностью. ПЭГилирование фибрина может также обеспечить усиленную миграцию и распластывание эндотелиальных клеток и МСК, экспрессирующих специфические типы ММП [44,45,47]. По сравнению с гидрогелем из нативного фибрина, ПЭГилированный фибрин способствует увеличению скорости роста, ветвления и длины тубул, образованных сфероидными МСК жировой ткани (МСК-Ж) [48].

Низкая вязкость раствора фибриногена делает его пригодным для струйных методов биопечати [49]. Однако формообразующие и механические свойства таких гелей сильно уступают другим, более вязким биоматериалам. Для применения при экструзионной биопечати существуют варианты печати смесью фибриногена и тромбина при низких температурах (так как полимеризация происходит необратимо при физиологических температурах), либо добавление тромбина к конструкту после биопечати [50]. При печати сформированным гелеобразным фибрином происходит разрушение его структуры, поэтому одной из выигрышных стратегий является добавление к фибрину других компонентов для улучшения механических свойств

печатаемых конструктов. В настоящее время успешно используются комбинации фибрина с желатином [51], альгинатом [52], коллагеном [53], и гиалуроновой кислотой [54].

Желатин – это растворимый белок, получаемый из коллагена кожи, шкур либо костей различных животных путем частичного щелочного/кислотного гидролиза коллагена [55]. К основным преимуществам желатина относят биосовместимость, низкую иммуногенность, биodeградируемость. Полимеризованный желатин подобно фибрину содержит многочисленные мотивы RGD, которые модулируют клеточную адгезию [56]. Желатин имеет большое число разнообразных и доступных функциональных групп, которые могут выступать в качестве платформы для дальнейшей модификации. Он обладает способностью к обратимой температурозависимой полимеризации: в зависимости от способа получения и молекулярной массы (значения Блума) температура перехода от твердого к жидкому состоянию составляет около 30°C [15]. Данное свойство делает желатин подходящим структурным компонентом для применения в качестве биочернил для экструзионного биопринтера, как в нативном состоянии, так и в качестве компонента более сложных по составу биочернил [15] (рисунок 1).

Кроме основных компонентов гидрогеля, зачастую используют добавки, такие как акрированный ПЭГ, которые позволяют повысить биосовместимость гидрогеля и удобство его использования [32,44].

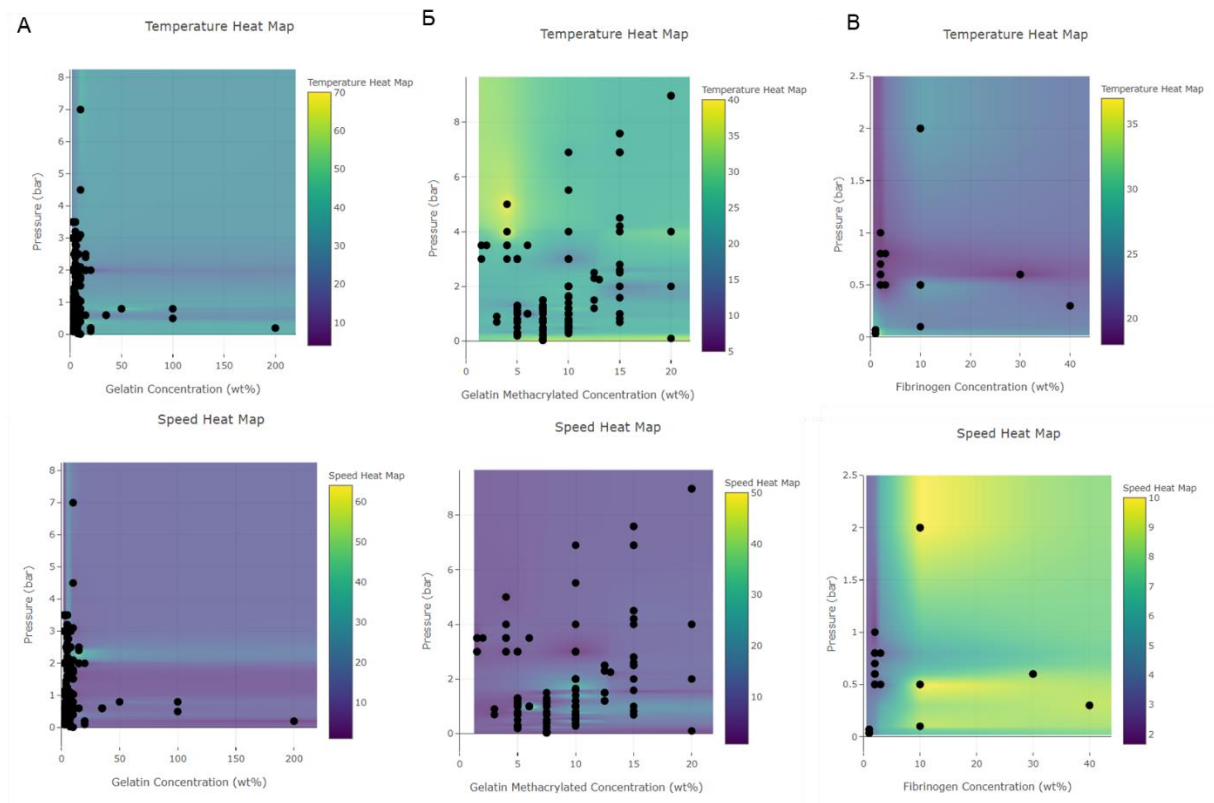


Рисунок 1 - Фазовые диаграммы параметров биопечати для желатина (А), GelMA (Б), фибрина (В). Графики получены с использованием базы данных [57]

Состав гидрогеля зачастую выбирают на основе исследований печатаемости; требуется минимизировать давление при печати, чтобы избежать гибели клеток. Повреждение клеток во время экструзионной биопечати зависит от таких факторов, как вязкость гидрогеля и диаметр сопла. Обычно нежелательные эффекты начинают наблюдаться при давлении от 80 кПа [58]. При приложении давления 100 кПа появляются апоптотические и некротические популяции клеток, что приводит к снижению жизнеспособности клеток на 10-15% [59]. Если используется сопло 250 мкм, жизнеспособность клеток падает до 60% при давлении 130 кПа [60]. Более того, такой диаметр больше диаметра сфероидов, что помогает преодолеть существенные проблемы с засорением сопла [61]. В то время как для функционализированного желатина концентрация обычно не превышает 10 мг/мл [62,63], для смешанных гидрогелей она может быть выше. Что касается гидрогелей желатина/фибрина, концентрация желатина варьируется от 5 мг/мл до 35 мг/мл [32]. В данном случае гидрогель на основе фибрина/желатина действовал как стандартная и высоко биосовместимая основа для 3D-биопечати, чтобы обеспечить возможность сравнения исследований, связанных с биопечатью МСК. Таким образом, параметры биопечати можно определить, как настройки биопринтера (параметры в программном обеспечении), необходимые для правильного создания структур. В этом смысле только определенный диапазон значений адекватен для биопечати, и его выбор является ключевым фактором для получения жизнеспособных тканеинженерных конструкций. Однако эти значения сильно зависят от состава гидрогеля, поэтому их следует тщательно подбирать в каждом конкретном случае.

### **1.3 Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в тканевой инженерии**

МСК представляет собой один из самых охарактеризованных типов первичных культур клеток. Причиной этого является множество разнообразных доступных источников данного клеточного материала, возможность поддержания стабильно пролиферирующих популяций в культуре, возможность мультипотентной дифференцировки и успешность их терапевтического применения в *in vivo* исследованиях вследствие низкой иммуногенности и высокой паракринной активности. В настоящее время существует более 900 клинических исследований, посвященных МСК (<https://clinicaltrials.gov/> [64]). Впервые гетерогенная популяция фибробластоподобных клеток (колониеобразующая единица фибробластов, КОЕ-Ф, CFU-F) была выделена в 1968 году из костного мозга и селезенки [65]. Эти клетки были адгезивны к пластику, обладали свойствами колониеобразующей единицы и спонтанно дифференцировались в остеобласты. В 1988 году такой фракции клеток дали название стромальных стволовых клеток костного мозга [66]. Непосредственно термин МСК окончательно закрепился за этими клетками благодаря работам группы Арнольда Каплана [67]. В настоящее время в научном сообществе под термином МСК

обычно понимают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки - адгезивные к пластику клетки, экспрессирующие определенный набор поверхностных маркеров и способные к трилинейной дифференцировке в условиях *in vitro* [68]. Помимо способности к дифференцировке, отмечают «хоминг» или тропность МСК к местам травм и повреждений и секрецию ими иммуномодуляторных противовоспалительных факторов [69,70]. В последнее время принято считать, что МСК – это неоднородная популяция, где клетки имеют разные свойства в зависимости от эмбрионального срока и ткани-источника [71,72]. В 2010 году автором термина «МСК» Арнольдом Капланом было предложено перейти от классической расшифровки МСК, специфицирующей потенциальность (мультипотентная), происхождение (мезенхимная), ткань-источник (стромальная) к более широкой - медицинские сигнальные клетки [73]. Несмотря на это, МСК из различных источников все еще обладают признанным набором общих свойств, объединяющих их в одну популяцию по крайней мере по эмбриональному происхождению и функциям.

Мезенхима – это ткань, характеризующаяся неполярными слабо связанными друг с другом клетками, способными к амёбовидному движению и окруженными большим количеством ВКМ. Первые мезенхимные клетки, образующие первичную полосу, возникают из эпибласта путем эпителиально-мезенхимного перехода. После дифференцировки и миграции примитивные мезенхимные клетки разделяются на три основных компонента, формирующих латеральную пластинку, промежуточную и параксиальную мезодерму. Кроме того, пул ранних мезенхимных клеток дают начало экстраэмбриональной мезодерме, которая участвует в формировании внезародышевых оболочек и кровеносных сосудов желточного мешка и аллантаоиса [74]. Помимо мезодермального происхождения, часть мезенхимы происходит из нервного гребня – популяции эктодермальных клеток, выселяющихся из краев нервной трубки. Мезенхимные клетки, происходящие из нервного гребня, включаются в состав ряда производных, в том числе, в черепно-лицевые соединительные ткани, в то время как другие соединительные ткани в организме имеют преимущественно мезодермальное происхождение [74].

Перицитам отводится особое место с точки зрения определения происхождения МСК. Каждая тканеспецифичная стволовая клетка обладает своей нишей, которая включает эндотелиальные клетки сосудов и МСК (перициты) [75]. При этом свойства перицитарных клеток отличаются в зависимости от ткани, из которой они происходят [76,77]. Таким образом, в данный момент превалирует мнение, что МСК мезодермального происхождения – это гетерогенная популяция клеток, обладающая рядом общих признаков и одновременно с этим имеющая различия в зависимости от ткани-источника, происходящая из «активированных» высвобожденных сайт-специфичных перицитов [71].

Черепно-лицевая мезенхима в процессе эмбриогенеза формируется мезодермой и клетками нервного гребня. У человека, начиная со стадии 4 сомитов, краниальные клетки нервного гребня заселяют жаберные дуги, мигрируя вентролатерально, и дают начало мезенхимальным структурам, таким как хрящ, кость и зубы, в черепно-лицевой области [78]. В качестве популяции клеток нервного гребня, дающих впоследствии начало МСК, были определены Sox1<sup>+</sup> нейроэпителиальные клетки [79,80]. Было показано, что некоторые популяции МСК челюстно-лицевого отдела, например, клетки пульпы зуба и одонтобласты у мыши, происходят из локальной глии [81]. В области десны были обнаружены прогениторные клетки, происходящие как из мезодермы, так и из нервного гребня, обладающие общей способностью к мультилинейной дифференцировке и экспрессией маркеров МСК. Однако клетки-потомки нервного гребня обладают большими потенциями к дифференцировке в нейральном и хондрогенном направлении [82]. Было также показано, что МСК-потомки нервного гребня в сравнении с МСК костного мозга обладают меньшим потенциалом к мультилинейной дифференцировке, но лучше пролиферируют; их секретомы также отличаются – у МСК из нервного гребня экспрессируется больше факторов, отвечающих за взаимодействие с ВКМ и нейрональные сигнальные пути [83].

Таким образом, в челюстно-лицевом отделе на ранних стадиях эмбриогенеза могут закладываться МСК-потомки нервного гребня, существенно отличающиеся от мезодермальных МСК по профилю экспрессии и потенциям (рисунок 2).

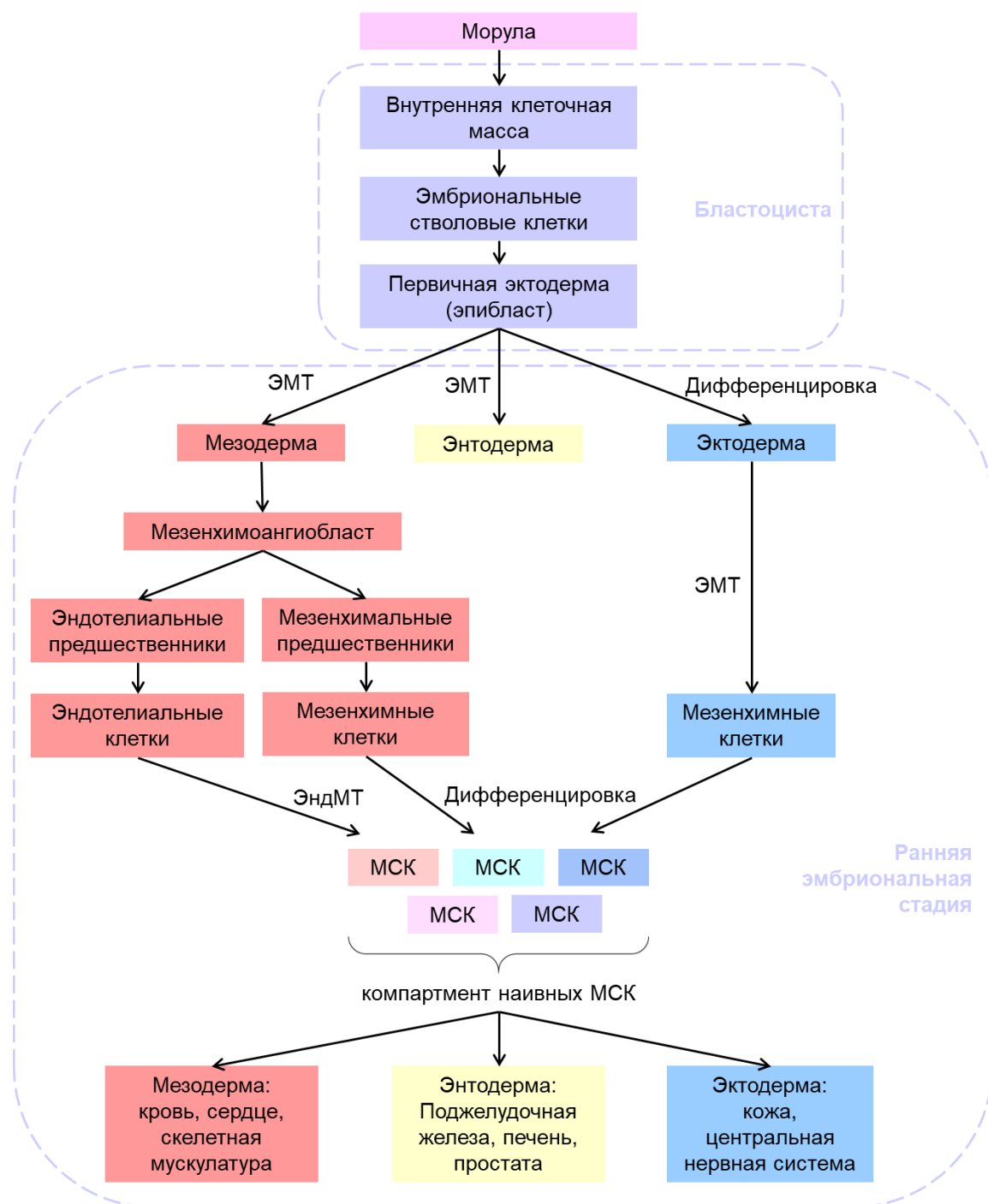


Рисунок 2 – Схема происхождения МСК в эмбриогенезе. ЭМТ – эпителиально-мезенхимный переход. Адаптировано из [84]

Среди постнатальных МСК можно выделить преимущественно мезодермальные (МСК жировой ткани, костного мозга) и потомки нервного гребня (МСК ротовой полости). Исторически процесс описания МСК строился на клетках именно из классических мезодермальных источников – соединительной ткани. Поэтому сейчас такие МСК принимают за золотой стандарт и именно они обладают устоявшимся и признанным набором свойств МСК – трилинейная дифференцировка в мезодермальные производные (адипо-, хондро, остеобласты) и экспрессия поверхностных маркеров CD73, CD105 и CD90 [68].

МСК, выделенные из различных областей ротовой полости, представляют собой более нетривиальный объект исследований. Клетки, выделенные из слизистой оболочки ротовой полости человека, экспрессируют маркеры МСК, при этом 40-60% из них положительны по маркерам плюрипотентности Sox2, Oct4, Nanog, и 60-80% экспрессируют маркеры нервного гребня. Помимо стандартных потенциалов, для них показаны также дифференцировки в дефинитивную энтодерму и в эктодермальном (нейральном) направлениях [85].

Помимо мультипотентных свойств и, соответственно, дифференцировки в мезодермальные производные, МСК также играют важную роль в регенерации путем взаимодействия с иммунными клетками в месте повреждения. МСК паракринно секретируют трофические и иммуномодулирующие белки, тем самым создавая способствующее регенерации микроокружение [86].

Непосредственно после повреждения ткани резидентные МСК активируются микробными патогенами и/или аларминами, высвобождаемыми из поврежденных клеток, и после активации приобретают провоспалительный фенотип (MSC1). Активированные МСК продуцируют набор хемокинов (CCL2, CCL3, CXCL2, CCL12), которые привлекают циркулирующие моноциты к месту повреждения и воспаления. При фагоцитозе микробных патогенов и апоптотических клеток резидентные макрофаги ткани и рекрутированные моноциты приобретают провоспалительный (M1) фенотип и начинают продуцировать CCL5, CCL2, CXCL12, IL-8. MSC1 также секретируют противовирусные цитокины (IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ), которые повышают цитотоксичность NK-клеток и усиливают NK-клеточную элиминацию инфицированных клеток [87]. Кроме того, MSC1 усиливают фагоцитарную способность нейтрофилов и макрофагов, обеспечивая эффективное удаление апоптотических клеток, некротической ткани и клеточного дебриса. Таким образом, МСК увеличивают цитотоксичность NK-клеток, повышают способность антиген-презентации дендритных клеток и улучшают фагоцитарные свойства нейтрофилов и макрофагов.

Во время заживления тканей МСК также модулируют поведение иммунных клеток. При восстановлении ткани МСК приобретают противовоспалительный и иммуносупрессивный (MSC2) фенотип. MSC2 секретируют большое количество иммуносупрессивных и ангиомодуляторных факторов, которые способствуют восстановлению тканей, уменьшая продолжающееся воспаление и способствуя неоваскуляризации в регенерированных тканях. С помощью юстакринной и паракринной секреции MSC2 индуцируют пролиферацию и активацию AREG- и IL-22-экспрессирующих лимфоцитов, которые защищают целостность эпителиального барьера. MSC2 также продуцирует TSG-6, который снижает продукцию активных форм кислорода и индуцирует усиленную экспрессию IL-10 в нейтрофилах, способствуя их поляризации в иммуносупрессивный (N2) фенотип [87]. Через TSG-6, IL-1Ra,

PGE2 и IDO МСК индуцируют превращение M1 воспалительных макрофагов в M2 иммуносупрессивные. Также через IDO путь MSC2 индуцируют образование и распространение иммуносупрессивных Treg и NKreg. Treg и NKreg продуцируют иммуносупрессивные цитокины, которые ослабляют продолжающееся воспаление и обеспечивают более эффективное восстановление тканей [88]. Кроме того, MSC2 индуцируют повышенную продукцию VEGF в нейтрофилах N2 и макрофагах M2, способствуя лучшей неоваскуляризации заживающих тканей [89]. Таким образом, во время заживления ткани МСК приобретают иммуносупрессивный фенотип и с помощью секреции иммуномодулирующих факторов вызывают образование противовоспалительного и регуляторного фенотипа в нейтрофилах, макрофагах, Т-клетках и дендритных клетках.

МСК рассматриваются как перспективный тип клеток для биофабрикации с использованием сфероидов. Этот тип клеток легко изолировать и размножать в короткие сроки, что важно для доступной и быстрой трансплантации искусственных тканей/органов для пациентов. МСК могут регулировать надлежащую микросреду в месте дефекта посредством секреции фактора роста, паракринных эффектов, при этом будучи способными вызывать толерантность к трансплантату [90]. В настоящее время термин «МСК» является наиболее часто встречающимся ключевым словом в работах, связанных с биопечатью [91]. Применение МСК представляется основной тенденцией в отношении источника клеток для биопечати, с ожидаемым большим количеством исследований сфероидов. Эта тенденция уже реализована на практике: сфероиды из МСК используются для инженерии костной ткани [92] и для регенерации мягких тканей с поддержкой ангиогенеза [63,93].

МСК являются важным компонентом любой ткани, обеспечивая надлежащее микроокружение. Внедрение МСК в специфические тканеподобные конструкции позволяет увеличить плотность клеток, их жизнеспособность и функциональность. Такой подход показал свою эффективность, например, для объединения сфероидов МСК и эндотелиальных клеток, гепатоцитов, клеток поджелудочной железы, остеобластов [94]. Введение МСК в состав биочернил позволяет повысить выживаемость биоэквивалентов, а зачастую и направить дифференцировку [95–97]. Таким образом, МСК следует рассматривать как важный вспомогательный компонент для 3D-биопечати. Следует отметить, что одним из главных преимуществ МСК является их доступность и простота выделения по сравнению с другими типами клеток. Наряду с «классическими» источниками МСК, такими как жировая ткань, костный мозг и пуповина, которые показали свой потенциал в биофабрикации [48,98], также исследуются новые источники. Перспективным и высокодоступным источником МСК является полость рта, в частности десны [99]. Клетки, выделенные из полости рта, например, из периодонтальной связки, пульпы зуба и десны, демонстрируют широкий дифференцировочный

потенциал [100–102]. Такие МСК экспрессируют расширенную панель остеохондральных маркеров в большей степени, чем МСК из жировой ткани [103]. Более того, показано, что МСК десны имеют преимущества по сравнению с МСК, полученными из классических источников [104]. МСК десны показали большую способность к пролиферации и миграции, чем МСК жировой ткани, в монослойных культурах [105]. МСК, выделенные из пульпы зуба, продемонстрировали самый высокий остеогенный потенциал среди клеток, полученных из жировой ткани и костного мозга [106]. Причина этого может крыться в альтернативном эмбриональном источнике. Xu et al. продемонстрировали смешанное происхождение МСК десны, при этом 90% их популяции происходит из нервного гребня, а 10% - из мезодермы [82]. Популяция, происходящая из нервного гребня, обладает более выраженными возможностями к дифференцировке в нервную, хондрогенную и миогенную линии [82,107]. Что касается источника МСК, следует отметить клинические перспективы: пуповина и костный мозг ограничены в использовании из-за сложностей аллогенного использования и высокоинвазивной процедуры получения клеток, соответственно. Поэтому МСК из других источников востребованы в качестве клеточного компонента для биофабрикации.

В целом иммунофенотип и возможности дифференцировки могут значительно различаться в зависимости от источника МСК [103,108]. Таким образом, для каждой конкретной цели следует выбирать соответствующий источник МСК. Особенно важен этот момент, если задействованы трехмерные условия гидрогеля и процесс биопечати.

#### **1.4 Сфероиды как клеточный компонент биочернил для 3D биопечати**

В настоящее время использование сфероидов в качестве строительных блоков привлекает внимание все большего числа исследователей [95,109–111]. Сфероиды обладают более выраженными регенеративными способностями по сравнению с монослойными клеточными культурами и клеточными суспензиями, они имитируют физиологические условия и способны к самоорганизации [94,112,113]. Кроме того, клетки в сфероиде образуют больше межклеточных контактов, приобретают более естественную морфологию и имеют более полную экспрессию генов [114,115]. Уже существует множество примеров комбинирования скаффолдов и сфероидов для создания тканеподобных конструкций с целью замены поврежденных [116]. Более того, сфероиды – это высокопроизводительная технология, которая обеспечивает возможность масштабирования подхода трехмерной биопечати [94]. Уже показаны успешные случаи применения такой стратегии: трансплантированные сфероиды из МСК увеличивают количество сосудов в ишемизированных конечностях мышей, предотвращая некроз и потерю конечности [117].

Сфероиды имеют высокую клеточную плотность, гомогенную размер и форму; они могут сливаться друг с другом и реактивироваться (вторично прикрепляться к матриксу), тем самым представляя универсальную единицу ткани [111]. Сфероиды широко используются в качестве всевозможных *in vitro* моделей, в том числе для тестирования лекарственных препаратов. Существует база данных MISpheroID <https://www.mispheroid.org/>, агрегирующая информацию о различных свойствах сфероидов. Несмотря на широкое распространение, существует гетерогенность в лабораторных практиках [118,119]. Помимо разного размера, типа клеток и метода формирования сфероидов, специфических для разных задач, отмечены различия в среде для культивирования, методах характеристики. Все это влияет на выживаемость, размер, метаболизм, способность к ангиогенезу, чувствительность к терапии.

При культивировании МСК в форме сфероидов обнаружили более полную дифференцировку в остеобласты, адипоциты, эндотелиальные клетки [120,121]. Ключевые преимущества при культивировании в 3D условиях представлены на рисунок 3.

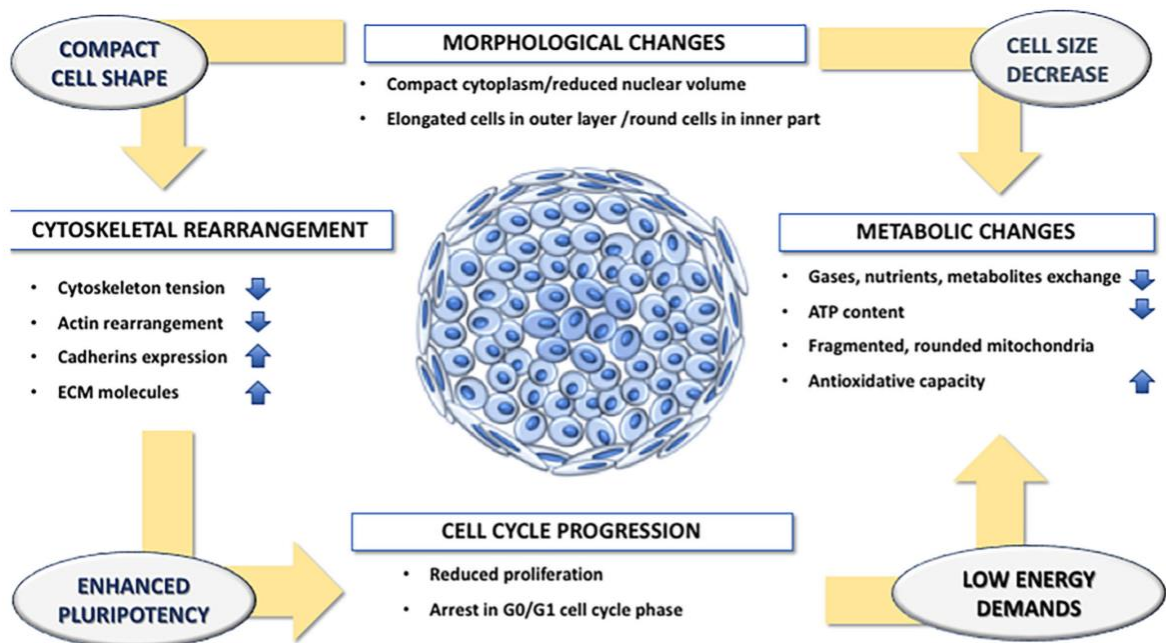


Рисунок 3 – Преимущества 3D культуры в сравнении с классической монослойной 2D культурой [122]

Была показана способность сфероидов из МСК самоорганизовываться, сливаться в тканеподобные структуры и дифференцироваться в хондрогенном направлении [123], в том числе, формировать многослойные тороиды [124]. Было также обнаружено, что совместная биопечать поддерживающих клеток, таких как МСК, модулирует морфогенез в пространстве и времени, изменяя начальный фенотип клеток [125]. В кишечных органоидах включение мезенхимальной ниши усилило рост и развитие кишечных структур посредством облегчения

мезенхимально-эпителиальных перекрестных взаимодействий [126]. Сфероиды из МСК, инкапсулированные в фибриновые гидрогели, обладают улучшенной жизнеспособностью клеток, пролиферацией, противовоспалительными свойствами и секрецией ангиогенных цитокинов (VEGF/PGE2) по сравнению с диссоциированными отдельными клетками [127]. Совместно культивируемые сфероиды в непосредственной близости (~200 мкм) улучшают миграцию клеток для формирования преваскуляризированных сетей, а также способствуют более высокой жизнеспособности клеток, пролиферации и распространению, одновременно усиливая остеогенез [28,128]. Сфероиды МСК, инкапсулированные в гидрогели GelMA различной жесткости (0,5–3 кПа), показали измененную пролиферацию, рост и дифференцировку в зависимости от свойств гидрогеля. При более низкой жесткости МСК внутри сфероидов могли легко ремоделировать свое окружение, размножаться и мигрировать наружу, чтобы слиться с соседними сфероидами, в то время как высокая жесткость вызывала повышенную гипоксическую среду и стимулировала экспрессию остео/проангиогенных генов [129]. Другие исследования, изучающие более высокие диапазоны жесткости гидрогелей GelMA, продемонстрировали схожие результаты с более низкой жесткостью (<3,5 кПа), что позволило клеткам внутри сфероидов ремоделироваться, мигрировать наружу и дифференцироваться в направлении хондро/остеогенной линии даже без дифференцировки. Интересно, что жесткие гидрогели (>8 кПа) поддерживали адипогенную дифференцировку, поскольку сфероиды оставались сферическими и статичными внутри гидрогеля, что предполагает снижение натяжения цитоскелета. Жесткость гидрогеля также изменялась с помощью времени облучения при сшивке или концентрацией полимера. Более жесткие гидрогели GelMA уменьшали количество и длину отростков [130]. Совместные культуры МСК и эндотелия могут действовать синергетически, улучшая преваскуляризацию, как показано на примере гидрогеля из коллагена/фибрина [109,131].

### **1.5 Моделирование регенерации и процессов морфогенеза в тканеинженерных конструкциях**

Тканевая инженерия в настоящее время часто рассматривается как тип прикладной биологии развития. Морфогенез, ремоделирование тканей и миграция клеток изменяют трехмерную организацию самого микроокружения, и в двумерных системах культивирования воспроизвести эти процессы не представляется возможным. Важнейшее понятие - триада тканевой инженерии, включающая в себя скаффолд, клетки и биоактивные факторы, обеспечивает простейшее моделирование этих процессов в условиях *in vitro* [132].

В условиях *in vivo* клетки взаимодействуют друг с другом, а также с внеклеточным матриксом (ВКМ). Поэтому двумерные клеточные культуры, хотя по-прежнему широко используются для различных целей, имеют серьезные ограничения. Некоторые из них могут быть преодолены путем перехода к трехмерному культивированию. В 3D условиях тканеинженерной конструкции есть возможность для накопления клетками ВКМ, передачи механических сигналов, а также создания химических градиентов [133–135]. Использование бескафолдных трехмерных культур (эмбрионидных телец и сфероидов) позволяет дольше поддерживать стабильность фенотипа индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) [136]. Также трехмерные культуры более чувствительны к лекарствам из-за организации поверхностных рецепторов; кроме того, клетки часто находятся на разных стадиях дифференцировки, подобно условиям *in vivo*. Поскольку 3D-культуры позволяют сокультивировать различные клеточные линии нужной ткани или органа, они представляют собой более точное воспроизведение живой ткани, включая морфологию и функциональность органа-мишени. А благодаря воспроизведению ключевых гистологических и физиологических характеристик 3D-модели могут использоваться в качестве исследовательских инструментов или даже для замены поврежденных живых тканей у пациентов [137]. Нативные ткани и органы *in vivo* характеризуются различными вариантами морфологии и топографии, обеспечивающими выполнение тканеспецифических функций. Скафолды с определенной геометрией, включая топологию поверхности и внутренние структуры, могут эффективно направлять самоорганизацию стволовых клеток и формировать функциональные структуры высокого порядка, напоминающие целевую ткань (рисунок 4). Еще в 2006 году было показано, что исходная геометрия гидрогелей определяет положение ветвления и образования новых канальцев эпителиальных клеток молочной железы, выращенных в скафолде [138]. Этот процесс определялся аутокринными ингибирующими морфогенами, локально секретируемыми эпителиальными клетками. Было показано, что топология скафолда влияет на метаболическую активность клеток [139]. Наличие пор в тканеинженерных конструкциях может быть основной причиной повышенной жизнеспособности и пролиферации клеток по сравнению с ручным смешиванием [140].

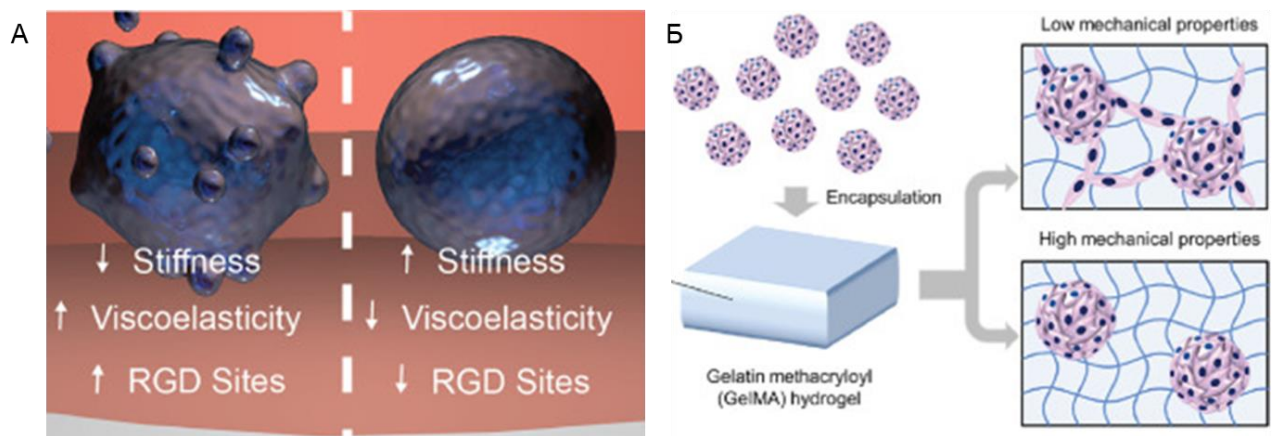


Рисунок 4 – Влияние свойств матрикса на морфологию и дифференцировку клеток. Адаптировано из [141]

Самоорганизация в тканевой инженерии означает спонтанную химическую или биологическую ассоциацию компонентов для формирования отдельной функциональной конструкции, напоминающей нативную ткань [132]. Самосборка рассматривается как модульное явление «снизу вверх» (bottom-top), которое регулируется взаимодействиями на коротких расстояниях (например, от масштаба ангстрема для ковалентных или водородных связей до наномасштаба для ионных или электростатических связей), различными видами сил (например, Ван-дер-Ваальса, электростатическими, магнитными, молекулярными и энтропийными) и условиями равновесия. В живых, самовоспроизводящихся организмах самосборка является динамическим процессом, который запускается изменениями в равновесии или внешними стимулами. Например, изменения в равновесии во время развития диктуют самоорганизацию тканей, тогда как в ответ на травму или патофизиологию самосборка задействуется для восстановления физиологического морфогенеза и функции.

Биоинженерный подход позволяет контролировать процессы самоорганизации. Так, воспроизведение геометрии ткани *in vitro* обеспечивает локальные отличия среды, что приводит к различной морфологии и организации клеток и, в свою очередь, обеспечивает стандартный морфогенез ткани [142]. Например, геометрическое паттернирование возникает из-за пространственных различий в упаковке клеток и неоднородностей в механосенсорике/трансдукции YAP1 и сигнализации Notch, которые, в свою очередь, определяют домен крипты или ворсинки. Клетки на концах становятся более упакованными из-за скученности в ограниченном пространстве, тогда как клетки в боковых областях остаются рассредоточенными.

Другим вариантом самоорганизации клеток в тканеинженерных конструкциях является слияние клеточных структур (сфероидов, органоидов, ассемболоидов и т.д.). Процесс слияния включает ремоделирование внеклеточного матрикса, миграцию клеток, восстановление

контактов между клетками или комбинации этих явлений [10]. Зачастую феномен слияния клеточных структур обеспечивается биопечатью [143].

Более того, существующие методы тканевой инженерии, такие как микрофлюидика и биопечать, позволяют воспроизводить параметры на уровне организма, включая градиент морфогенов, движение, уровень жидкости и кислорода, которые необходимы для морфогенеза и гомеостаза тканей, но часто отсутствуют в традиционных системах культивирования [144].

Понимание поведения клеток в гидрогеле важно для правильного построения ткани. Сфероиды могут эффективно заполнять весь объем гидрогелевой конструкции. Они могут выступать в качестве центров организации клеток, мигрирующих по всей конструкции, или в качестве строительных блоков ткани, сливающихся во время созревания (рисунок 5). Фенотип и происхождение клеток могут изменить результирующую морфологию и структуру эквивалента ткани, полученного из слитых сфероидов [115,145,146]. Однако явление коллективной миграции клеток из сфероида в гидрогелевую среду после 3D-биопечати до конца не изучено. И динамика, и морфология клеток создают разный внешний вид печатных конструкций.

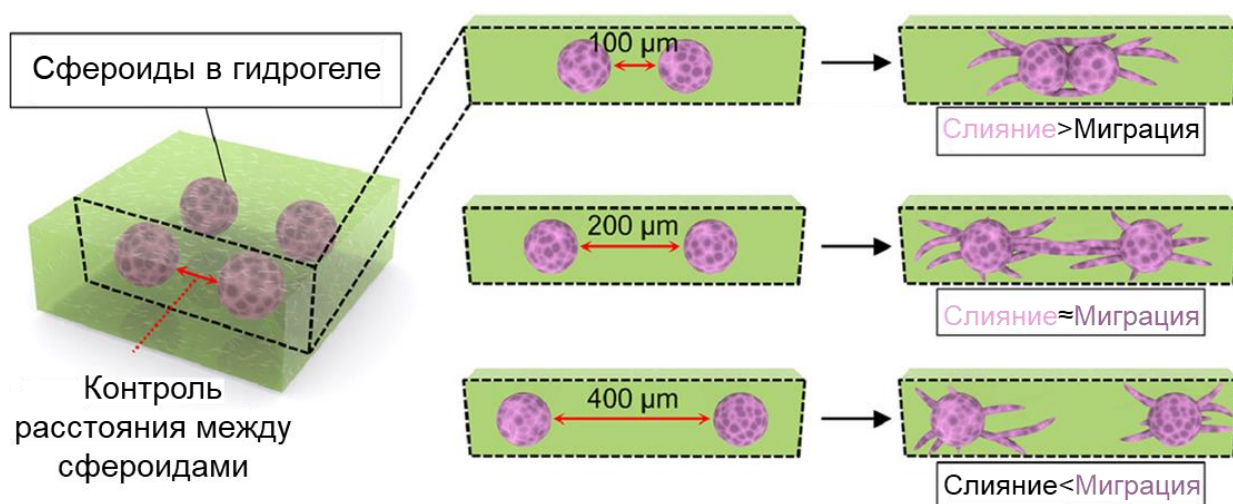


Рисунок 5 – Варианты развития биоэквивалента после трехмерной биопечати. Адаптировано из [128]

Наблюдаемые различия в росте сфероидов и миграции клеток подтверждают идею: «то, что вы печатаете, — это не то, что вы получаете» «what you print is not what you get» [147]. Что касается процессов самоорганизации в сфероидах, пролиферации клеток и деградации гидрогеля, то трудно предсказать, как будет развиваться конструкция в процессе созревания. Недавнее исследование показало роль расстояния между сфероидами в морфологии конечной конструкции [128]. Расстояние между сфероидами влияет на миграцию, взаимодействие, распределение и плотность клеток; эти факторы определяют успешность воспроизведения структуры ткани [148]. Оптимальное расстояние между сфероидами составило 200 мкм. Расположенные на расстоянии

400 мкм друг от друга сфероиды не смогли развить выраженные отростки. В то время как высокая плотность клеток желательна для конструкций, созданных с помощью тканевой инженерии, концентрация клеток или сфероидов при биопечати часто ограничена [148]. Понимание закономерностей развития сфероидов после биопечати позволит преодолеть этот пробел и получить эквиваленты тканей с желаемой структурой и плотностью клеток. Эти данные предоставят информацию о ранней динамике созревания тканей. Она может коррелировать с оптимальным временем для размещения сфероидов в гидрогеле, слияния, миграции и т. д. Понимание этих временных точек обеспечит стандартизированные рабочие процессы созревания, особенно для автоматизированных роботизированных систем высокопроизводительного получения биоэквивалентов [149].

### 1.6 Выживаемость клеток при 3D биопечати

Несмотря на целый ряд преимуществ, различные 3D-системы часто имеют недостатки, такие как ограниченная диффузия и отсутствие васкуляризации, что может привести к гипоксии, пищевому стрессу и гибели клеток [150,151].

Коэффициенты диффузии молекул могут варьироваться в зависимости от различных свойств скаффолда. Прежде всего, следует отметить размер молекулы, концентрацию белков, образующих скаффолд, и скорость метаболической активности клеток [152]. Диффузионный транспорт также определяется структурными свойствами скаффолда, такими как пористость, размер пор, общий линейный размер, извилистость, микрополости и геометрические особенности [153].

Средние коэффициенты диффузии декстрана в коже человека составляют  $9 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  для 500 kDa и  $2,3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  для 40 kDa [154]. Что касается макропористых скаффолдов, то коэффициент диффузии малых молекул (кислорода, глюкозы, кальция, фосфатов) обычно составляет около  $10^{-9} - 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ , а для более крупных (молекулярная масса 4,4 кДа - 2 МДа) она лежит в диапазоне от  $10^{-10}$  до  $10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  [155–157]. Как показано в [152], коэффициент диффузии кислорода в различных биоматериалах варьируется от 0,24 до  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ , в то время как в воде он составляет  $2,7 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ . Однако некоторые исследования показывают, что внеклеточный матрикс не ограничивает диффузию малых молекул [158]. В соответствии с [152], определяющим фактором уровня кислорода внутри конструкции является не концентрация полимера, а плотность клеток. Потребление кислорода в 3D-конструкции зависит от свойств культуры клеток монослоя перед посевом на подложку. Клетки, культивируемые при низкой конфлюэнтности, быстро потребляют кислород, что приводит к падению уровня кислорода почти до нуля через 8-10 часов после инокуляции [159].

Соответствующий уровень кислорода является одним из важнейших условий нормальной физиологии клеток. Обычно клетки культивируются в нормоксии (21% кислорода), хотя уровень кислорода *in vivo* составляет около 5-8% [160,161]. Было показано, что низкое содержание кислорода поддерживает активное состояние популяций стволовых и прогениторных клеток [162]. С другой стороны, недостаток кислорода в тканеинженерной конструкции может снизить жизнеспособность клеток [152,155,163]. Типичные расстояния диффузии кислорода в тканях ограничены 100-150 мкм [164]. В случае превышения этого значения через несколько дней культивирования уровень кислорода внутри скаффолда резко падает, что приводит к гибели клеток [165]. Некоторые авторы считают основным ограничивающим фактором уровень глюкозы, а не кислорода [166]. Средние расстояния диффузии для таких метаболитов, как глюкоза, находятся в диапазоне от 5 до 200 мкм [164].

Ограниченная диффузия усугубляется отсутствием васкуляризации. Клетки в конструкции могут быть удалены на несколько миллиметров от ближайшего капилляра, тогда как в нативных тканях эти расстояния не превышают 20-30 микрон [167]. В условиях статической культуры участки тканеподобных конструкций, удаленные от поверхности чем на 0,5-1 мм, содержат только мертвые клетки [168]. Если глубина конструкции превышает 100–200 мкм, жизнеспособность клеток существенно снижается из-за пищевого стресса и недостатка кислорода [169–171] (Рисунок 6). Такая обширная гибель клеток считается одной из основных причин неудачных трансплантаций [172,173].

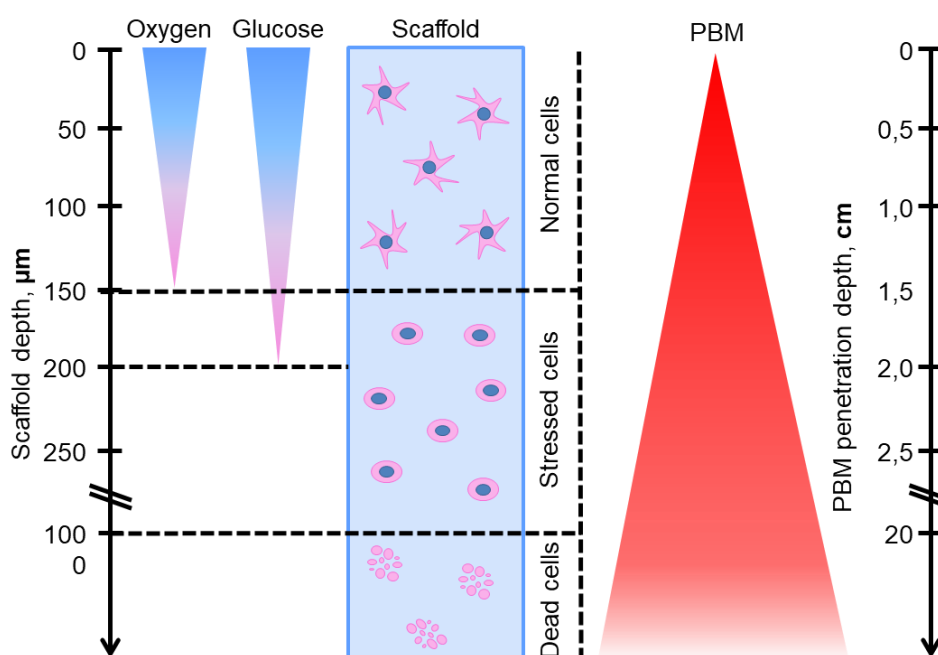
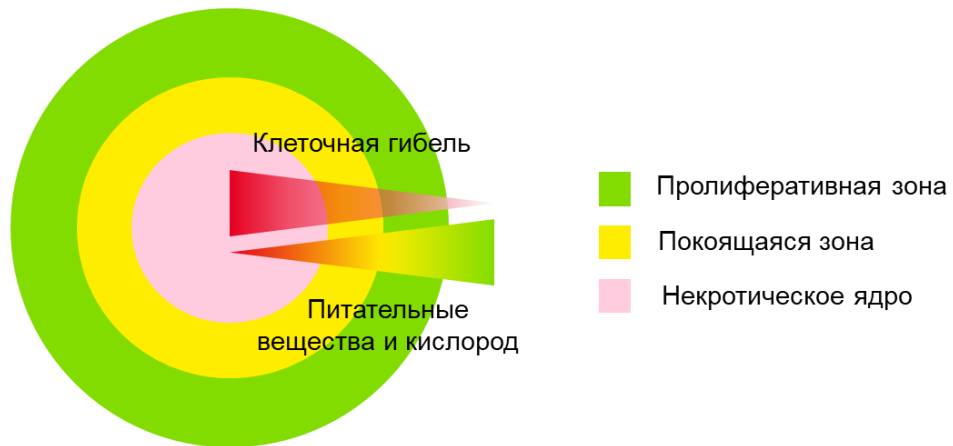


Рисунок 6 – Соответствие расстояний диффузии кислорода и питательных веществ жизнеспособности клеток на разных глубинах скаффолда и глубине проникновения ФБМ мкм [174–176]

Кроме того, растущая сложность трехмерных многоклеточных «строительных блоков» заставляет пересмотреть определение и количественную оценку жизнеспособности и гибели клеток (рисунок 7). Это поднимает несколько вопросов об общей жизнеспособности всех клеток в 3D-объеме и о выборе подходящего, непрерывного и неразрушающего анализа жизнеспособности, позволяющего проводить анализ одной клетки [177].

По данным систематического обзора, средняя жизнеспособность клеток непосредственно после биопечати составляет 82,70%, хотя данные весьма неоднородны. В большинстве случаев жизнеспособность еще больше снижается к сроку 1 сутки после биопечати. Такой эффект может быть связан с тем, что в первые часы после биопечати клеткам необходимо адаптироваться к новым условиям, что часто может остановить их рост и привести к смерти. В зависимости от типа клеток и материала период адаптации может быть разным, но зачастую фиксируют увеличение жизнеспособности после 3 дней культивирования [178].

А



Б

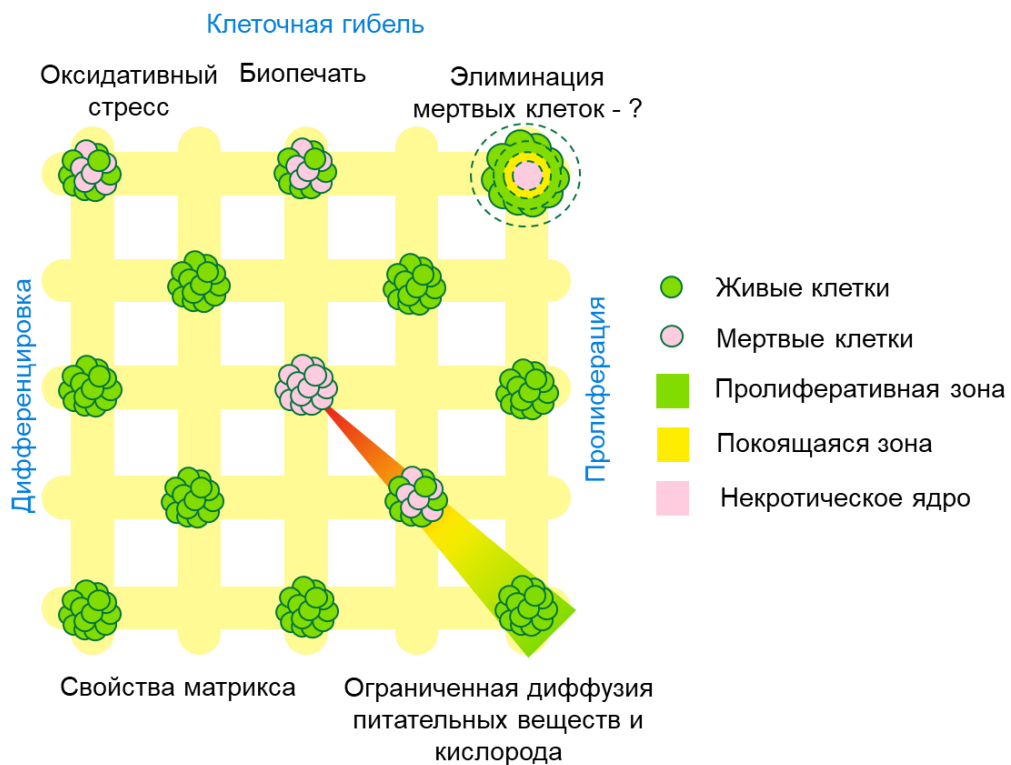


Рисунок 7 – Сходства и различия клеточной гибели и жизнеспособности в многоклеточном сфероиде (А) и напечатанном биоэквиваленте на основе сфероидов (Б). А: Три основные зоны в сфероиде обозначены цветами. Клеточная гибель и пролиферация постоянно изменяют свои темпы во время формирования сфероиде и зависят от размера, внутренних градиентов и внешних условий, таких как состав среды. Развивающиеся градиенты от периферии к ядру играют главную роль в регуляции судьбы клеток внутри сфероидов. Б: В классической напечатанной (желтая «вафельная» сетка) конструкции на основе скаффолда (гидрогеля) баланс между пролиферацией, дифференцировкой и гибелью клеток регулируется множественными внутренними (факторы, связанные со сфероидом) и внешними факторами (свойства скаффолда, процедура биопечати, диффузия питательных веществ, локальная концентрация  $O_2$ ). Адаптировано из [177]

## 1.7 Фотобиомодуляция (ФБМ)

Фотобиомодуляция (ФБМ) — это нетермический процесс, в котором используются неионизирующие формы источников света, включая лазеры, светодиоды и широкополосный свет в видимом (400–750 нм) и инфракрасном диапазонах (750–1100 нм) [179,180]. Процесс фотобиомодуляции биологических объектов обычно называют облучением [181–183]. Исторически применение ФБМ в клиниках началось раньше, чем любые клинические испытания, *in vivo* или *in vitro* тесты этого метода. Сами эффекты ФБМ были впервые обнаружены в 1967 году Эндре Местером в процессе лечения меланомы у одного из его пациентов [184]. Заинтригованный результатами лазерного облучения, противоположным ожидаемым, Местер продолжил свои эксперименты на мышах – и его работы стали первым известным подтверждением эффектов ФБМ [185]. В настоящее время ФБМ широко используется для различных клинических и терапевтических целей. ФБМ в красном и ближнем ИК диапазонах доказали свою эффективность в восстановлении дефектов хрящей и костей [186,187], широкого спектра нейрональных расстройств [188], а также для снижения боли, уменьшения воспаления и ускорения заживления [189–191]. В настоящее время зарегистрировано более 600 клинических испытаний, связанных с ФБМ, и более половины из них были успешно завершены. Клинические состояния включают послеоперационные раны, хронические боли, кожные заболевания и многое другое (Таблица 1). На основании этих клинических исследований устройства ФБМ, использующие как лазеры, так и светодиоды, были одобрены для продажи FDA [192–194].

Использование ФБМ в клинической практике сопровождалось постепенным пониманием его механизмов. Цитохром-с-оксидаза (ССО) считается основной мишенью красного и ближнего инфракрасного (ИК) света в клетке. ФБМ может влиять на окислительные процессы в клетках, продукцию АТФ, кальциевые волны и другие процессы, связанные с метаболизмом митохондрий. Вторичные мессенджеры, такие как NO, АТФ, активные формы кислорода (АФК) и  $Ca^{2+}$ , активируются посредством окислительно-восстановительных изменений митохондриальной цепи переноса электронов [195,196]. Это приводит к регуляции различных клеточных путей, связанных с пролиферацией клеток, дифференцировкой, метаболическими изменениями, антиапоптотическими или противовоспалительными эффектами [197]. С развитием методов клеточной биологии становится возможным более глубокое понимание эффектов и механизмов ФБМ. Более того, развивающиеся области тканевой инженерии предоставляют новую платформу для применения ФБМ. Как упоминалось выше, терапевтический диапазон длин волн ФБМ (600-1000 нм) обусловлен не только клеточной восприимчивостью, но и свойствами проникновения света. Так называемое оптическое окно прозрачности позволяет ФБМ проникать в обводненные ткани, скаффолды и гидрогели с

высокой эффективностью [198,199]. В последние десятилетия сфера применения таких систем 3D-культивирования в области биологии и медицины постоянно расширяется. Биоматериалы с требуемыми механическими свойствами часто могут влиять на жизнеспособность клеток из-за ограниченной диффузии, механического и пищевого стресса. Поэтому эффективные и удобные подходы к поддержанию жизнеспособности 3D-конструкций представляют большой интерес. Метод ФБМ является неинвазивным и не требует прямых манипуляций со скаффолдами или клеточной средой. Свет проникает через гидрогели в диапазоне наиболее часто используемых толщин. Кроме того, с развитием светодиодных источников становится доступной точная техническая характеристика применяемого света. В отличие от дорогих лазеров, которые неудобны для использования в стерильных условиях, светодиоды представляют собой мобильные, компактные и управляемые устройства. Большинство существующих экструзионных биопринтеров имеют ультрафиолетовые светодиоды для фотосшивки напечатанных конструкций. Здесь следует отметить практическое удобство светодиодов, поскольку биопечать требует точной дозы и продолжительности облучения в условиях ограниченного пространства и времени. Как видно из разнообразия как коммерческих, так и оригинальных экструзионных биопринтеров, светодиоды успешно удовлетворяют всем этим требованиям. Более того, дополнение 3D-биопринтера красным или ближним ИК-диодом для ФБМ клеток во время печати не вызовет технических проблем. Несколько исследований уже показали потенциал ФБМ для лучшей интеграции скаффолда в ткани организма [200], стимулирования васкуляризации [3] и как метода прекондиционирования для дальнейшей клеточной терапии [201,202].

Все эти факторы делают рациональным и эффективным использование красного и ближнего ИК-света в сочетании с оптически прозрачными скаффолдами, содержащими ослабленные клетки. Однако из-за разнообразия источников и параметров ФБМ, типов клеток, составов и геометрий скаффолдов трудно предсказать, будет ли выбранная комбинация факторов эффективной.

Таблица 2 – Завершенные клинические испытания ФБМ

Номер	Число пациентов	Состояние/Заболевание	Результаты
NCT02383472	53	Легкая черепно-мозговая травма	Положительное влияние на вербальную и зрительную память, сокращение времени реакции, увеличение скорости зрительно-моторной деятельности
NCT01439724	94	Оральный мукозит на фоне химиотерапии	Снижение заболеваемости, профилактика рецидивов орального мукозита
NCT02267850	29	Время ортодонтического лечения	Ускоренное перемещение зубов
NCT02181400	21	Диабетический макулярный отек	Анатомическое улучшение макулярного отека
NCT03741062	11	Заживление ран небной ткани человека	Улучшение заживления ран и послеоперационного комфорта, профилактика рубцов, меньшее потребление анальгетиков
NCT00929773	100	Хроническая боль в шее и плечах	Увеличение диапазона движений, снижение сообщаемой степени боли
NCT01821352	53	Ожирение	Уменьшение окружности бедер, талии и верхней части живота
NCT02588599	54	Онихомикоз ногтей на ногах	Увеличение степени чистоты ногтей
NCT01538199	28	Депрессивное расстройство	Снижение оценок депрессии после лечения

### 1.8 Оптические свойства скаффолдов и фотобиомодуляции

Важной особенностью, определяющей неинвазивные свойства ФБМ, является окно прозрачности, характеризующееся глубиной проникновения (рисунок 8). Глубину проникновения можно определить как световой путь, на котором интенсивность света принимает значение  $1/e$  от своего изначального. Свет с длиной волны от 600 до 1300 нм лишь в незначительной степени поглощается водой и поэтому может проникать в ткани на глубину до нескольких сантиметров [198,199]. Средняя глубина проникновения транскраниального красного/ближнего инфракрасного света (630-810 нм) составляет до 70% у мышей и до 10% у людей [188]. Более того, большинство скаффолдов (особенно гидрогелей) сильно гидратированы, и, следовательно, они практически прозрачны в видимой и ближней инфракрасной областях спектра. Попадая в оптическое окно прозрачности, ФБМ в красном и ближнем ИК-спектре может превосходить пороговые расстояния диффузии. При этом клетки на глубине более 150 мкм испытывают стресс, и поэтому могут быть более восприимчивы к ФБМ [203,204].

Однако степень воздействия на клетки, расположенные в скаффолде, будет изменена из-за поглощения и рассеивания света в объеме. В среднем интенсивность света или плотность мощности уменьшаются с глубиной скаффолда. Сильное различие может привести к частичному воздействию клеток за пределами «терапевтического диапазона» ФБМ. Для оценки этого эффекта важно знать распределение интенсивности света по всему объему скаффолда [205].

Таким образом, точный контроль параметров ФБМ имеет решающее значение для прогнозирования поведения клеток, особенно в присутствии скаффолда. Хотя большинство гидрогелей оптически прозрачны для красных и ближних ИК-волн, рассеяние света может нарушить равномерность воздействия ФБМ. В таких случаях предпочтительны источники LED, представляющие собой простую, гибкую и воспроизводимую систему для стимуляции физиологии клеток.

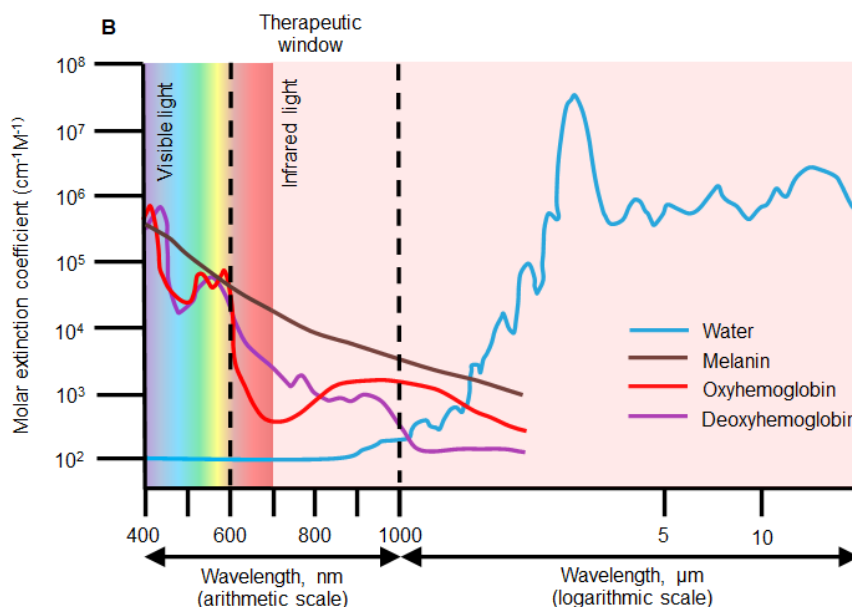


Рисунок 8 – Оптическое окно, где поглощение света минимально, находится между 600 и 1300 нм. Наиболее распространенные и эффективные длины волн РВМ находятся в диапазоне 600-1000 нм

### 1.9 Параметры источников света для фотобиомодуляции

Биологическая реакция на ФБМ сильно зависит от параметров облучения, таких как длина волны, интенсивность (мощность на единицу облученной площади) и доза (энергия на единицу облученной площади, которая может быть определена как интенсивность, умноженная на время воздействия) [195,206]. Результат ФБМ зависит от выбранной длины волны. Например, было показано, что длины волн 623, 672, 767 и 812 нм стимулируют синтез ДНК [207], в то время как 915 нм не оказали никакого влияния на пролиферацию клеточной линии MG63 [208]. Зависимость эффективности ФБМ от интенсивности или дозы можно описать законом Арндта-

Шульца о двухфазной интенсивности и дозозависимом эффекте [209]. Рост клеток может быть усилен в узком диапазоне довольно малых доз ( $0,17 \text{ Дж/см}^2$ ), в то время как более высокие дозы обычно подавляют метаболическую активность клеток [210,211].

Большинство авторов отмечают, что эффекты ФБМ не зависят от когерентности источника [212,213]. Преимущества использования светодиодных медицинских приборов включают отсутствие необходимости соблюдения мер безопасности при работе с лазером и значительно более низкую стоимость [214,215]. Следует отметить, что с развитием электронных приборов и полупроводниковых материалов на рынке появилось большое разнообразие полупроводниковых лазеров, которые, как и светодиоды, дешевы, просты в эксплуатации и позволяют создавать матрицы для облучения больших площадей и миниатюрные носимые устройства.

### **1.10 Клеточные механизмы фотобиомодуляции**

Механизмы ФБМ изучаются уже долгое время, однако, до сих пор нет четкого понимания всех механизмов. Причина этого кроется в высокой изменчивости применяемых параметров ФБМ, используемых биологических объектов и клеточной среды, влияющей на доставку света. В целом, существует длинный список мишеней ФБМ в клетке, включая каналы и рецепторы клеточной поверхности, митохондриальные хромофоры и внеклеточные ферменты [196,204]. Такие мишени, как каналы транзиторного рецепторного потенциала (TRPC), криптохромы и опсины, обычно реагируют со светом в зеленом и синем спектре. Антиоксидантные ферменты, а именно глутатион (GSH), супероксиддисмутаза (SOD) и каталаза (CAT), часто присутствуют во внеклеточном пространстве тканей и могут быть активированы или ингибированы в ответ на ФБМ для уменьшения воспаления [216–218].

Цитохром-с-оксидаза (ССО) в митохондриальной цепи переноса электронов считается наиболее важным акцептором красного и ближнего инфракрасного света в клетках [196,219]. Этот комплекс отвечает за перенос электронов от цитохрома с к молекулярному кислороду и может модулировать окислительно-восстановительные процессы в клетке [196]. ССО, или комплекс IV, содержит поглощающие свет гемовые и медные центры [220–222].

Начальные биохимические процессы, инициированные красным или ближним инфракрасным светом, относятся к самой ССО. В условиях окислительного стресса или воспаления iNOS (индуцируемая NOS, NOS типа II) собирается для производства оксида азота (NO) [223]. NO действует как антиоксидант, контролируя уровень свободных радикалов в процессах перекисного окисления липидов, расслабляет стенки кровеносных сосудов, регулирует ферменты, индуцирует дифференциацию эндотелиальных клеток и модулирует воспаление [220,224]. NO может связываться с ССО и обратимо ингибировать его, что приводит

к снижению митохондриального дыхания [225,226]. ФБМ может вызывать фотолиз комплекса ССО-NO, что приводит к высвобождению ССО и стимуляции активности цепи переноса электронов [227], за этим следует увеличение митохондриального мембранного потенциала (ММП), что способствует образованию АТФ, АФК и накоплению  $Ca^{2+}$ [219]. Более того, фотопродуцируемый NO может принимать участие в регуляции клеточных путей. Однако после стимуляции митохондриальной цепи переноса электронов, вызванной ФБМ и опосредованной ССО, митохондрии могут преобразовывать больше молекул кислорода ( $O_2$ ) в АФК, такие как супероксидный радикал ( $O_2\cdot$ )[228–230]. Высокие концентрации АФК вредны для клеток, однако небольшие количества могут регулировать физиологию клеток [231].

Одним из наиболее выраженных метаболических эффектов ФБМ является увеличение продукции АТФ [228]. АТФ, как источник энергии, поддерживает метаболизм клетки самостоятельно, а также участвует в синтезе белка и ДНК, экспрессии генов и стимуляции пути ERK1/2. ФБМ часто увеличивает концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$  за счет его высвобождения из внутриклеточных депо [232,233]. Внутриклеточный кальций участвует в регуляции клеточного цикла, изменениях цитоскелета и активации клеточных путей. Например, изменение концентрации  $Ca^{2+}$  является важным митогенным сигналом [234]. NO, АТФ,  $Ca^{2+}$  и АФК, как вторичные мессенджеры, участвуют в различных клеточных каскадах, что приводит к широкому спектру нисходящих эффектов (рисунок 9). Эти эффекты включают повышенную пролиферацию (через клеточный путь MAPK11), устойчивость к окислительному стрессу, антиапоптотические процессы, регуляцию дыхательной цепи и репарацию ДНК [235].

Многие пути, индуцируемые ФБМ, связаны с окислительно-восстановительными процессами и, следовательно, с выработкой АФК. NF- $\kappa$ B (ядерный фактор каппа В) является одним из них; он регулирует многочисленные физиологические процессы, такие как апоптоз, дифференцировка, экспрессия провоспалительных генов и ответы на окислительный стресс [236]. Активация NF- $\kappa$ B, зависящая от АФК, запускает эпигенетические механизмы посредством ацетилирования гистонов [237]. Другие пути, активируемые изменением окислительно-восстановительного статуса, включают протеинкиназы, факторы роста, хемокины и многое другое [238].

В зависимости от параметров ФБМ, типа клетки и ее окислительно-восстановительного статуса, внешних условий и других факторов клетки могут реагировать на свет по-разному. Одним из наиболее частых эффектов ФБМ является стимуляция пролиферации. Этот эффект зависит от длины волны; стимуляция пролиферации наблюдалась только для красного и ближнего инфракрасного света, но не для зеленого и синего света той же интенсивности [228,239]. Проллиферация клеток была обусловлена активацией пути PI3K/PKB, PI3K/Akt,

Ras/Raf/ERK, PKC, Notch-1 или экспрессией циклинов D1, E и A [240,241]. Обычно эти процессы опосредованы сигнализацией  $Ca^{2+}$ . Все эти механизмы ФБМ просуммированы на рисунок 9.

Дифференцировка — это *in vitro* эффект ФБМ, противоположный пролиферации. Наиболее часто применяемое лечение включает комбинацию ФБМ с классическими индукторами дифференцировки и приводит к более ранней экспрессии специфических маркеров [242,243]. Показана высокая эффективность ФБМ для эндотелиальной дифференцировки за счет стимуляции eNOS и образования NO [244]. Еще одной полезной особенностью ФБМ является способность ингибировать апоптоз, в первую очередь посредством модуляции экспрессии белков Bcl-2 и Bax [245,246]. Помимо биохимических результатов ФБМ, она может быть вовлечена в регуляцию баланса слияния и деления митохондрий. Слияние обеспечивает защиту от пищевого и окислительного стресса, аутофагии, апоптоза и митохондриальных мутаций [247]. Избыточное деление или фрагментация может привести к снижению дыхательной активности и участвует в инициации апоптоза [248]. Было показано, что ФБМ увеличивает экспрессию MFN2, одного из белков, ответственных за слияние митохондрий [249].

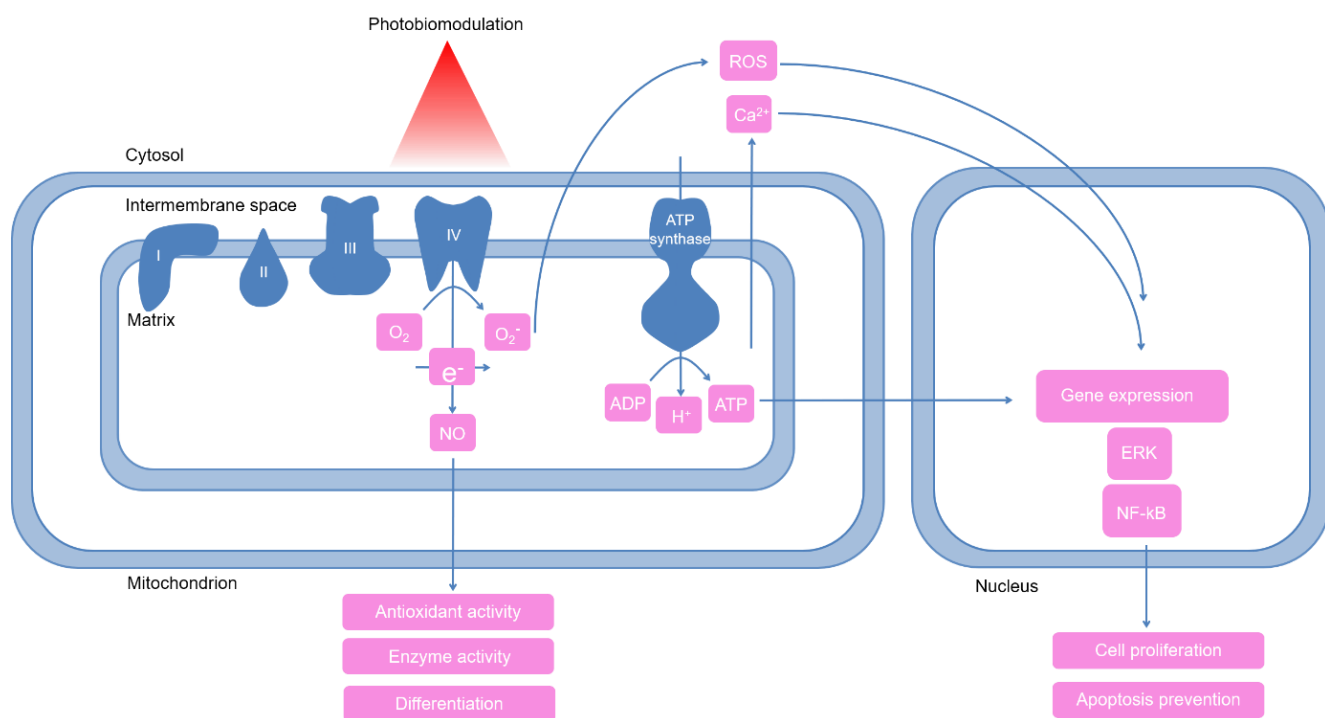


Рисунок 9 – Первичные события в клетках, вызванные красным и ближним инфракрасным светом. Свет поглощается ССО и, как следствие, высвобождается NO [222]. NO обеспечивает эндотелиальную дифференцировку и регуляцию ферментов. Активность ССО увеличивается и стимулирует транспорт электронов в дыхательной цепи. В результате увеличивается утечка электронов, и молекулы кислорода ( $O_2$ ) преобразуются в супероксидный радикал ( $O_2^-$ ). АФК способствуют высвобождению митохондриального  $Ca^{2+}$  в цитозоль [219]. Все эти факторы могут действовать вместе или по отдельности как медиаторы клеточных путей и приводить к активации пролиферации, дифференцировке клеток, защите клеток от окислительного повреждения и модуляции апоптоза

### 1.11 Фотобиомодуляция в тканевой инженерии

Первая проблема, которую необходимо решить в отношении применения ФБМ, — это разнообразие в зависимости от разных типов клеток. Например, МСК, полученные из костного мозга человека и из жировой ткани, реагируют противоположным образом на одинаковое воздействие. В первом случае пролиферация усиливается, а во втором случае жизнеспособность клеток снижается [250]. Это можно объяснить разнообразием антиоксидантных систем и окислительно-восстановительных потенциалов различных клеток [251,252]. Состав и структура используемых 3D-систем также должны учитываться при выборе подходящего типа клеток и режима ФБМ. Например, следует ожидать остеогенной дифференцировки в жестких минералсодержащих скаффолдах, нейрональной в мягких гидрогелевых системах и ангиогенной в гидрогелях на основе фибрина [253–256].

Одним из интересных эффектов ФБМ, который может иметь большое практическое значение, является его защитная способность. Она была отмечена при нейротравмах и неонатальной гипоксии-ишемии [201,257]. Упоминается, что ФБМ включает механизмы прекондиционирования, подобные ишемии, гипертермии, гипотермии и гипербарическому кислороду, и связана с повышением уровня АТФ, предотвращая фрагментацию митохондрий и высвобождение цитохрома С [201,202]. Эффекты наиболее выражены в ослабленных клетках, культивируемых в условиях дефицита питательных веществ и факторов роста, которые обычно моделируются путем снижения концентрации сыворотки в среде [258–261].

Морфология, физиология и поведение клеток в скаффолдах определяются химической структурой материала, локальной топографией, архитектурой и механикой скаффолда. Все эти свойства скаффолда могут либо усиливать, либо подавлять эффекты ФБМ [262]. Несмотря на общую неоднородность параметров, описанных в статьях, можно выявить некоторые общие принципы. Большинство исследований направлено на стимуляцию пролиферации клеток (для достижения высокой плотности клеток перед трансплантацией тканеинженерной конструкции) или дифференцировки (для интеграции конструкции в ткань организма). Переход между пролиферацией и дифференцировкой является критическим моментом для клеточной физиологии и может регулироваться ФБМ [263,264]. К сожалению, информация о точных комбинациях типа клеток и конкретного набора параметров для определенной цели (например, активация пролиферации или управление дифференцировкой) в настоящее время отсутствуют. Однако известно, что эффекты ФБМ зависят от типа клеток, а именно окислительно-восстановительных систем клетки [204,265]. Недавнее исследование показало различную динамику и эффекты одного и того же режима ФБМ, применяемого к нормальным фибробластам

или линиям раковых клеток [266]. Наличие различных метаболических путей, таких как преобладающий гликолиз в линиях раковых клеток, радикально меняет конечный результат. Rupel и др. показали, что окислительно-восстановительное состояние клетки может определять уровни продукции АФК в клетках в ответ на ФБМ [267]. Измененное состояние митохондрий, например, вызванное воздействием специфических ингибиторов митохондриального комплекса, приводит к различным реакциям. Различные концентрации ингибиторов либо стимулируют активность митохондрий, либо еще больше ее снижают в зависимости от концентрации ингибитора [203]. Более того, даже количество митохондрий в клетке было связано с наблюдаемыми вариациями эффектов ФБМ [268]. Поэтому тщательный выбор источника клеток, типа клеток, условий культивирования и параметров ФБМ имеет решающее значение для прогнозирования поведения клеток после ФБМ.

Пролиферация клеток жизненно важна для создания жизнеспособных структур с помощью тканеинженерных конструкций. Было показано, что ФБМ поддерживает клеточный цикл МСК после посадки на BMP-модифицированный скаффолд до 6-го дня культивирования, что привело к усиленному отложению минералов [2]. Аналогичные результаты были получены в [269], где было показано, что МСК жировой ткани, посеянные на бесклеточной дермальной матрице, лучше пролиферируют и остеointегрируются после воздействия ФБМ с длиной волны 633 нм. ФБМ ближнего ИК-диапазона также способна влиять на пролиферацию фибробластов посредством активации экспрессии EGF [270]. Как красный, так и ближний ИК-режим стимулируют метаболическую активность и пролиферацию МСК десны, инкапсулированных в фибриновый гидрогель [271]. По-видимому, ФБМ стимулирует деление клеток в достаточно мягких скаффолдах, таких как децеллюляризованные дермальные матрицы и гидрогели [4,269,270].

Многочисленные исследования посвящены стимуляции регенерации кости с помощью ФБМ, включая экспозицию поврежденной области без клеток, трансплантированных на скаффолдах. Целью ФБМ в этом случае является стимуляция собственных клеток в дефектах костей и окружающих тканях. Ближний ИК-свет (730-830 нм) повышает эффективность остеointеграции титанового каркаса в модели остеопороза, репарации костей черепа и интеграции аутологичной костной конструкции [200,272,273]. ФБМ также способствует организации окружающих соединительных тканей в области имплантации тканеинженерной конструкции [274]. Сообщалось о повышении уровня трансформирующего фактора роста-бета (TGF- $\beta$ ), фактора роста фибробластов-2 (FGF-2), остеопротегерина (OPG), активатора рецептора ядерного фактора  $\kappa$  (RANK), остеокальцина (OCN) и BMP-9 в поврежденных костных тканях после ФБМ [275,276]. Кроме того, ФБМ с длиной волны 780 нм увеличила отложение гидроксиапатита кальция и уменьшила концентрацию органических компонентов в

керамическом костном трансплантате, что важно для заживления переломов костей [277]. Аналогичные результаты были получены для скаффолдов, заселенных клетками. При облучении красным светом МСК дифференцируются в остеогенном направлении быстрее в случае коралловых матриц и скаффолдов из PLGA [5,278,279]. ФБМ с длиной волны 780 нм ускоряет интеграцию деминерализованного трансплантата костного матрикса в области пародонта после операций по реконструкции альвеолярного отростка [280]. Некоторые работы показывают, что ФБМ увеличивает экспрессию одонтогенных маркеров, таких как DSPP, Osterix, RUNX2, BMP-2 [264].

В отличие от остеогенных и одонтогенных клеток, для нейрональных клеток наиболее предпочтительной 3D-системой является гидрогель. Было показано, что при воздействии ближнего ИК-излучения эмбриональные нейроны в геле на основе гиалуроновой кислоты приобретают зрелую нейрональную морфологию [281]. ФБМ индуцирует нейрональную дифференцировку и ингибирует глиальную дифференцировку нейрональных стволовых клеток, культивируемых в геле GelMA/PEGDA [282]. После облучения было отмечено увеличение диаметра нервного волокна, толщины миелиновой оболочки и уменьшение атрофии мышц вокруг нерва [283].

В нескольких работах показано усиление васкуляризации при использовании совместных культур HUVEC и МСК жировой ткани человека в фибриновых гелях после ФБМ в красном спектре [3]. С другой стороны, имеются данные, указывающие на то, что ФБМ не оказывает влияния на ангиогенную дифференцировку эндотелиальных клеток [284]. Как ангиогенез, так и дентиногенез были продемонстрированы в модели *in vitro* на основе среза человеческого зуба при использовании света длиной волны 810 или 660 нм с интенсивностью 1 Дж/см<sup>2</sup> [285].

Эффекты ФБМ при воспалении были широко изучены на различных моделях животных, включая ожоговую травму, острое повреждение легких, фиброз легких. Уровни провоспалительных факторов, таких как TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6, IL-1 $\beta$ , снижались после красного или ближнего ИК-облучения [286–289]. Также было показано, что прекондиционирование с помощью ФБМ приводит к снижению уровня провоспалительных цитокинов после индукции воспаления с помощью липополисахарида [290]. Противовоспалительная активность была выявлена также для иммунных клеток. Например, в модели фиброза легких терапия ФБМ привела к снижению инфильтрации иммунных клеток в альвеолярные капилляры [289]. ФБМ в ближнем ИК-диапазоне направляла поляризацию макрофагов с M1 (воспалительную) на M2 (противовоспалительную) [291]. Аналогичные эффекты были продемонстрированы *in vitro*: красное облучение индуцировало транскрипцию мРНК IL-1 $\beta$  и IL-6 и снижало транскрипцию IL-8 в культивируемом аналоге человеческой кожи [292].

Поскольку ФБМ может влиять на различные сигнальные пути, биополимеры подвергаются реструктуризации, впоследствии изменяя поведение клеток. Будучи одновременно динамической структурой и важнейшим участником сигнальных путей клеток, цитоскелет является основной системой биополимеров, реагирующих на ФБМ. Было показано, что красный свет изменяет расположение фибрилл F-актина [243]. Возможно, этот механизм лежит в основе миграции клеток внутри гидрогелей [1]. Аналогичные эффекты были показаны в отношении синтеза компонентов ВКМ. ФБМ приводит не только к экспрессии и синтезу коллагена [1,270], но и к получению более упорядоченных агрегатов биополимеров по сравнению с необлученными клетками [200]. Эффекты ФБМ в различных условиях обобщены в таблице 3.

Таким образом, ФБМ имеет высокий потенциал для применения в современной регенеративной медицине и тканевой инженерии, в частности, для скаффолдов и 3D-биопечати. Эти методы перспективны для воссоздания структуры нативной ткани, но они имеют несколько важных ограничений. В процессе биопечати клетки страдают от давления, УФ-излучения во время полимеризации и колебаний температуры (рисунок 10). Источники ФБМ технически легко внедряемы в биопринтеры и могут обеспечивать доставку света к ослабленным клеткам в оптически прозрачных гидрогелях или скаффолдах. Такая модификация подходов к биопечати может повысить выживаемость биоэквивалентов.

Таблица 3 - Параметры и эффекты РВМ в скаффолдах

Тип клеток	Скаффолд	Тип источника	Длина волны, нм	Плотность энергии (флюенс) Дж/см <sup>2</sup>	Плотность мощность и мВт/см <sup>2</sup>	Культирование после ФБМ	Результат	Ссылка
МСК пульпы	Гидрогель Pluronic® F-127 с BMP4	Лазер	660	3 или 5	710	21 день in vitro 8 недель in vivo	Усиление пролиферации клеток, ускорение одонто/остеогенной дифференцировки	[2]
Первичные фибробласты десны	Коллагеновый матрикс	LED	780	0,5; 1,5; 3	25	6 дней in vitro	Усиление экспрессии генов hCOL-I и hEGF и повышение жизнеспособности клеток	[270]
Vero (эпителиальная клеточная линия)	Серозный коллаген свиньи	LED	630	30	24,1	7 дней in vitro	Увеличение отложения ВКМ и пролиферации	[4]
МСК костного мозга	Bio-Oss (депротеинизированная бычья кость)	Лазер	810	4	200	3 недели in vivo	Образование новой костной ткани	[272]
МСК	Коралловый матрикс	Лазер	633	-	0,5 mW	1–7, 10, 14, 21, 28 дней in vitro	Остеогенная дифференцировка Более высокие уровни минерализации кости	[278]
МСК жировой ткани	Бесклеточный дермальный матрикс	Лазер	633	1	-	14, 28, 56 дней in vivo	Повышение жизнеспособности и пролиферации, регенерация костей	[269]

Продолжение Таблицы 3

Нейральные стволовые клетки	GelMA/PEGDA	LED	635	-	10,95	14 дней in vitro	Нейрональная дифференцировка и подавление глиальной дифференцировки	[282]
Эмбриональные нейральные стволовые клетки	NVR-Gel (Сшитая гиалуроновая кислота, обогащенная ламинином, BDNF и IGF-1)	Лазер	780	-	20-500	24 дня in vitro	Усиление прорастания нейронов	[281]
МСК пульпы	Биокерамические скаффолды на основе магния, сшитые цинком	Лазер	660	2 или 4, каждые 3 дня	-	28 дней in vitro	Увеличение маркеров, связанных с одонтогенезом, образование костной ткани	[264]
HUVEC и МСК жировой ткани	Фибриновый гель	LED	632	24	12	7 дней in vitro	Усиленная васкуляризация	[3]
L929 и NIH3T3	Фукоидан/альгинат-полиэтиленгликоль-геллановая камедь 27 (Fu/AL-PEG@GGH) гидрогель	Лазер	635	4	417	1, 2 или 3 дня in vitro	Усиление миграции клеток, повышение жизнеспособности клеток, отложения коллагена	[1]
МСК костного мозга	Шелковый скаффолд	Полихроматическая лампа	590, 633, 666, 712, 812, 1018, 1128, 1356, 1395	-	130	7, 14 или 28 дней in vitro	Остеогенная дифференцировка, отложение минералов, реорганизация F-актина	[243]

Продолжение Таблицы 3

МСК жировой ткани	PLGA	Лазер	660	13,3	24.62	16 недель in vivo	Образование новой костной ткани Остеогенная дифференцировка	[279]
МСЗТЗ (клеточная линия остеобластов)	Стеклокерамический скаффолд (Биосиликат)	Лазер	830	10	-	7 дней in vitro	Усиление пролиферации	[293]
МСК костного мозга	Коллаген I типа	Лазер	810	4; через день	430	3 недели in vivo	Формирование кости	[294]
МСК пульпы	Агарозный гель	Лазер	660	3,3; каждые 6 часов	-	7 и 14 дней in vitro	Более эффективная остеогенная, хондрогенная или адипогенная дифференцировка	[5]

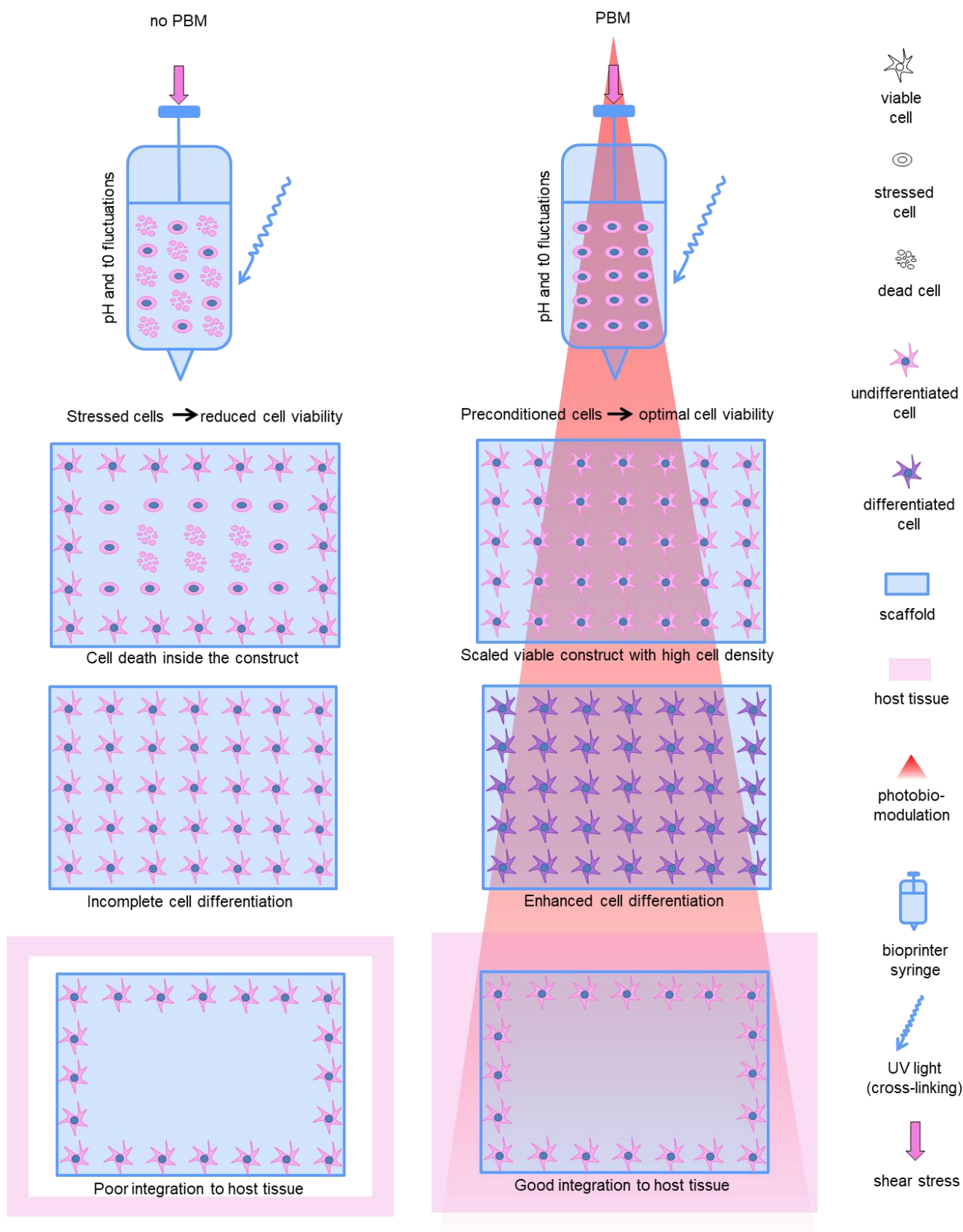


Рисунок 10 – Возможности ФБМ в стимуляции различных аспектов клеточной физиологии в трехмерных тканевых инженерных конструкциях (скаффолдах или гидрогелях) в процессе биопечати, культивирования, дифференцировки и трансплантации

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Монослойное (2D) культивирование клеток

В работе использовали мезенхимные стромальные клетки (МСК) человека, выделенные из альвеолярной слизистой оболочки свободной десны [48,107,295]. Клетки культивировали на адгезивных пластиковых чашках Петри в стандартных условиях (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) в питательной среде следующего состава: DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия), L-глутамин (2мМ/л, ПанЭко, Россия), гентамицин (50 мкг/мл, ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка FBS (10%, Thermo Fisher, США), инсулин-трансферрин-селенит (1:100, БиолоТ, Россия), bFGF (10нг/мл, ProSpec, Израиль). Смену сред осуществляли каждые 2-3 дня. По достижении 80-90% конфлюентности клеточные культуры пассировали с использованием растворов версена и 0,25% трипсина, действие трипсина инактивировали добавлением питательной среды.

Рутинный анализ монослойных культур проводили с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия).

### 2.2 Трехмерное (3D) культивирование клеток

Трёхмерное культивирование проводили в нескольких вариантах:

- Клетки, инкапсулированные в гидрогель;
- Клетки в составе трехмерных напечатанных конструктов;
- Клеточные сфероиды;
- Клеточные сфероиды, инкапсулированные в гидрогель;
- Клеточные сфероиды в составе трехмерных напечатанных конструктов.

Клеточные сфероиды получали с помощью культивирования на неадгезивных агарозных планшетах. Агарозу растворяли при нагревании в смеси сред DMEM/F12 1:1 с добавлением гентамицина (50 мкг/мл) в концентрации 0.02 г/мл и наносили на силиконовые молды-реплики (MicroTissues 3D Petri Dish, Merck, США). После застывания агарозы планшеты вынимали из молдов и обрабатывали УФ светом по 5 минут с каждой стороны. Для получения сфероидов в каждый планшет вносили суспензию клеток, в состав каждого сфероида входила 1000 клеток. Сфероиды формировались в лунках планшетов, один сфероид на лунку, и через 3 суток культивирования в 3D условиях сфероиды использовали для дальнейших манипуляций.

Методики формирования трехмерных культур на основе гидрогеля и методом 3D биопечати описаны далее (секции 3.5 и 3.10, соответственно).

### 2.3 Проточная цитофлуориметрия

Для подтверждения соответствия иммунофенотипа МСК принятым критериям [68] первичные культуры клеток исследовали на проточном цитофлуориметре Sony SH800S (Sony Biotechnology, USA) на предмет наличия специфических поверхностных маркеров МСК (CD90, CD73, CD105) и отсутствия гемопоэтических и лимфоцитарно-лейкоцитарных маркеров (CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79а или CD19, HLA-DR). Суспензии живых клеток, полученные обработкой версеном и 0,25% трипсином, в количестве не менее 1 млн клеток на образец окрашивали антителами против CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR (все – конъюгированные с флуорохромом PE (phycoerythrin), Myltenyi Biotec, Германия) в соотношении 1:100 (1 мкл антител на 100 мкл клеточной суспензии) в течение 15 минут в темноте. В качестве изотипического контроля использовали антитела против иммуноглобулинов мыши (IgG1-PE, Myltenyi Biotec, Германия), также для установления уровня автофлуоресценции и фоновой флуоресценции часть суспензии клеток оставляли неокрашенной. Затем образцы отмывали от антител в фосфатно-солевом буфере (PBS) и загружали в проточный цитофлуориметр. Измерения проводили с использованием лазера с длиной волны 488 нм. Анализ каждого образца останавливали по достижении 20000 событий, зафиксированных проточным цитофлуориметром. Клеточные популяции признавали принадлежащими к популяции МСК, если экспрессия положительных маркеров составляла  $\geq 95\%$ , а негативных  $\leq 2\%$ .

Также проводили тест на апоптоз с использованием пропидий йодида (Sigma-Aldrich, Германия) и аннексина V (Lumiprobe, США). Суспензию клеток отмывали от питательной среды в PBS и инкубировали с раствором аннексина V в темноте в течение 15 минут. После отмывки аналогично клеточную суспензию окрашивали попидием йодида. Анализ проводили с использованием лазера 488 нм и детекторов FITC (для аннексина V, апоптотические клетки) и PE (для пропидия йодида, мертвые клетки).

### 2.4 Анализ дифференцировки монослойных культур

Для полного подтверждения принадлежности выделенных первичных культур к популяциям МСК проводили стандартную дифференцировку в трех направлениях: адипогенном, остеогенном и хондрогенном. Клетки высевали на поверхность пластика и культивировали до достижения монослоя. Далее, производили замену стандартных питательных сред на индукционные: остеогенную (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit, ThermoFisher Scientific, США), хондрогенную (StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit, ThermoFisher Scientific, США) и адипогенную (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit, ThermoFisher Scientific, США).

Смену индукционных сред осуществляли раз в 3 дня в течение последующих 21 дней. Для каждого направления дифференцировки был предусмотрен негативный контроль, культивируемый также в течение 21 дня в условиях стандартной питательной среды.

Для анализа дифференцировки МСК применяли классические красители: масляный красный О (Oil Red O, Sigma-Aldrich, Германия), ализариновый красный (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich, Германия) и альциановый синий (Alcian Blue, Sigma-Aldrich, Германия). Все образцы монослойных культур перед окраской были отмыты от питательной среды в PBS и зафиксированы в PFA (4%, pH 6.9, Sigma-Aldrich, Германия) в течение 20 минут при температуре 4°C.

Для анализа адипогенной дифференцировки после фиксации образцы отмывали в PBS, промывали 60% изопропанолом и оставляли на воздухе на 5 минут. Далее, к образцам добавляли краситель – 0.2% Oil Red O, также приготовленный на 60% изопропанол. Инкубировали в течение 30 минут и по окончании окраски промывали в дистиллированной воде 5 раз, после чего незамедлительно проводили цифровую съемку на световом фазово-контрастном микроскопе (Zeiss, Axio Vert.A1, Германия).

Для анализа остеогенной дифференцировки после фиксации образцы отмывали в PBS и добавляли 2% раствор ализаринового красного (pH 4.2) в PBS. Инкубировали в течение 30 минут, затем промывали в PBS 5 раз и проводили цифровую съемку на световом фазово-контрастном микроскопе.

Для анализа хондрогенной дифференцировки после фиксации образцы отмывали в 1% уксусной кислоте. Затем добавляли 1% раствор альцианового голубого (pH 2.5) в уксусной кислоте. Инкубировали ночь при температуре 4° С, затем отмывали и проводили цифровую съемку на световом фазово-контрастном микроскопе.

## 2.5 Фибриновый гидрогель

В качестве первого компонента гидрогеля для дальнейшей биопечати был выбран фибрин. Для повышения оптической прозрачности и стабильности гидрогеля, бычий фибриноген (Sigma Aldrich, Германия) концентрации 12.5 мг/мл, 25 мг/мл либо 50 мг/мл был модифицирован добавлением вещества О,О'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукциниламино)этил]поли(этиленгликоль) (ПЭГ; Sigma Aldrich, Германия). Навеску ПЭГ растворяли в стерильном PBS и добавляли к фибриногену в молярном соотношении 5:1 (ПЭГ:фибриноген). Полученный раствор инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C. Для полимеризации гидрогеля в лунки планшета добавляли бычий тромбин (Sigma Aldrich, Германия) в концентрации 5 U/мл в соотношении 1:1 (фибриноген:тромбин).

Для инкапсуляции клеточного компонента модифицированный фибриноген смешивали с суспензией клеток объемом не более 50 мкл для получения концентрации 500 тыс. кл./мл и наносили в лунки 48-луночного планшета. Затем добавляли готовый раствор тромбина, быстро и аккуратно перемешивали и оставляли на 5-10 минут при температуре 37°C.

## 2.6 Фибрин-желатиновый гидрогель

В качестве гидрогелевого компонента биочернил использовали разработанный фибриновый гидрогель (концентрация 25 мг/мл) с дополнительными компонентами. Для модификации фибриногена использовали ПЭГ, конъюгированный с фотоактивной акрилатной группой (молярное соотношение 5:1, Poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate, Sigma-Aldrich, Германия). Для придания вязкости и соответствующих механических свойств использовали желатин из бычьей кожи (7,5%, Sigma-Aldrich, Германия). Также в качестве фотоинициатора для дальнейшей фотополимеризации акрилатных групп добавляли рибофлавин (0.02%, Sigma-Aldrich, Германия). После смешивания всех компонентов, за исключением фотоинициатора, гидрогель инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C в темноте.

Для получения биочернил непосредственно перед биопечатью жидкий гидрогель смешивали с фотоинициатором и с суспензией клеток (1 млн кл./мл) или сфероидов (1000 сф./мл), переносили полученные биочернила в картридж для экструзионного биопринтера и охлаждали при постоянном перемешивании до комнатной температуры (до застывания биочернил).

## 2.7 Реометрия гидрогелей

Реологические эксперименты проводили на реометре MCR 302 (Anton Paar, Австрия) с функцией температурного контроля. Для измерений использовали геометрию типа пластина-пластина. Объем наносимого образца гидрогеля составлял 250 мкл, расстояние до верхней пластины – 0.5 мм. Были проведены как изотермические измерения (при температуре 37° С), так и динамические температурные измерения (при нагревании от 17 до 37 °С или охлаждении с 37 до 17°С со скоростью 1°С/мин). Измерения повторяли не менее трех раз, измеряли модуль упругости  $G'$  (Па) и модуль потерь  $G''$  (Па).

## 2.8 Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (MPP, SAXS)

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (MPP, SAXS) – это метод качественного и количественного исследования структуры интактного материала без какой-либо специальной подготовки образцов. В частности, MPP позволяет изучать структуру биологических макромолекул в растворе в естественных физиологических условиях. Данные MPP были получены на станции EMBL P12 синхротронного кольца PETRA-III (DESY, Гамбург, Германия) [29,296]. Образцы гидрогеля помещали в ячейки, состоящие из двух каптоновых окон (толщина ячейки 1 мм), центрированных вдоль пути луча, и проводили измерения при 20°C. Данные регистрировали с помощью детектора 2M PILATUS (DECTRIS, Швейцария) на расстоянии 3 м от образца до детектора при длине волны  $\lambda = 0,124$  нм. Для построения формы частиц *ab initio* использовали программы DAMMIN [297] и PyMol. Частицы представляли в виде шаров, так как такая модель наилучшим образом аппроксимировала экспериментальные данные.

## 2.9 Визуализация полимерной сети гидрогеля

Для визуализации структуры гидрогеля использовали фибриноген, конъюгированный с флуоресцентным красителем AlexaFluor-488 (Fibrinogen Alexa Fluor™ 488 Conjugate, ThermoFisher, США). Гидрогель готовили согласно стандартной процедуре (см. п. 3.5), съемку полимеризованного гидрогеля проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (LSM 880 with Airyscan, Zeiss, Германия) с использованием возбуждающего лазера с длиной волны 488 нм.

## 2.10 Трехмерная экструзионная биопечать

В работе использовали экструзионные биопринтеры BioX и BioX6 (CellInk, Швеция). Биочернила помещали внутрь картриджа объемом 3 мл при помощи шприца и переходника. Температуру биочернил внутри печатающей головки (BioX temperature-controlled printhead, CellInk, Швеция) и после печати на столике-платформе также поддерживали на уровне 23°C. Для картриджа использовали одноразовые сопла 25 G (диаметр сопла 250 мкм).

В качестве трехмерных моделей конструкторов использовали stl-файлы из открытой библиотеки Bioverse (<http://bioverse.co/topic/support-material/>), которые с использованием ПО биопринтера конвертировались в g-code. В качестве субстрата для биопечати использовали 24-луночные культуральные планшеты. Программа экструзионной биопечати предусматривала послойную фотосшивку при длине волны 365 нм, при этом происходила полимеризация

метакрилатного компонента биочернил. После этого также была проведена химическая сшивка тромбином для полимеризации фибриногена. Затем конструкты отмывали в PBS от остатков тромбина и рибофлавина. Для дальнейшего культивирования к конструктам добавляли модифицированную ростовую среду, в которой содержание сыворотки FBS было снижено до 5% и был добавлен апротинин – ингибитор протеаз (в частности, металлопротеиназ) (0.02 мг/мл, Sigma-Aldrich, Германия).

### **2.11 Оценка печатаемости**

Была проведена оценка оптимумов температуры и давления в экструзионном биопринтере для наилучшей печатаемости чернил. К картриджу с биочернилами при температуре от 17 до 37° С последовательно прикладывали давление от 5 до 200 кПа (с шагом 5 кПа). Шаг температуры в интервале от 20 до 30° С составлял 1° С (при температурах менее 20° С и более 30° С чернила были неэкструдиремы). Нагревание и охлаждение проводили в течение 15 минут.

### **2.12 Оценка коэффициента набухания**

Данные для расчета коэффициента набухания были получены с использованием микровесов WXTS3DU (Mettler Toledo, Швейцария). Образцы напечатанных конструктов взвешивали сразу после биопечати, после 24-часовой инкубации в PBS при 37°С и после 7-дневной сушки на воздухе. Коэффициент набухания рассчитывали согласно стандартным рекомендациям [298].

### **2.13 Наноиндентирование и микроиндентирование**

Локальные механические характеристики измеряли с помощью наноиндентера Chiago (Optics11). Модуль Юнга вычисляли в соответствии с моделью контактной механики Герца для сферического тела, вдавливающегося в плоскую поверхность, с использованием встроенного программного обеспечения Piuma. Использовали кантилевер с жесткостью пружины 0,048 Н/м и наконечник с радиусом кривизны 8,5 мкм. Площадь отображения модуля Юнга составляла 1500x1500 мкм с шагом 150 мкм по осям X, Y. На основании результатов измерений вычисляли эффективный модуль Юнга, строили его распределение по поверхности и рассчитывали среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) модуля Юнга.

Механические свойства всей конструкции оценивали с помощью микротестера G2 (CellScale, Канада). Измерения проводили в режиме индентирования с использованием сферы

диаметром 1,5 мм в растворе PBS при комнатной температуре. Обработку данных проводили с использованием модели Герца и стандартной линейной твердотельной вязкоупругой модели.

### **2.14 Фурье-спектроскопия и термогравиметрический анализ**

Лиофилизированные образцы гидрогеля исследовали с помощью спектрометра Spectrum Two FT-IR (PerkinElmer, Waltham, США) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (Attenuated Total Reflectance, ATR). Применяли высокопроизводительный детектор LiTaO<sub>3</sub> MIR при комнатной температуре, стандартную оптическую систему с окнами KBr для сбора данных в спектральном диапазоне 8300–350 см<sup>-1</sup> с разрешением 0,5 см<sup>-1</sup>. Полученные спектры были нормализованы с использованием полосы амида I в качестве внутреннего стандарта. Термогравиметрический анализ был проведен с использованием синхронного термического анализатора STA 6000 (PerkinElmer, USA). 10 мг каждого образца инкапсулировали в стандартные тигели PerkinElmer и разрушали в среде азота при скорости потока газа 20 мл/мин и линейной скорости нагрева 10 °С/мин.

### **2.15 Хемилюминесцентный анализ**

Для определения оптимального протокола сшивки напечатанных конструкторов был исследован механизм сшивки метакрилатных групп рибофлавином. Готовили смесь следующего состава: рибофлавин (0.02%), люминол (100 мкМ), микропероксидаза хрена (2 мкМ). Данную смесь хорошо перемешивали, облучали УФ светом с длиной волны 365 нм в течение 10 сек (аналогично режиму УФ облучения в биопринтере) и измеряли кинетику образования хемилюминесцентных соединений с использованием хемилюминометра (Lum-1200, Россия).

### **2.16 Оценка остаточного рибофлавина в составе напечатанных конструкторов**

Для измерения количества остаточного рибофлавина готовили ряд образцов на разных стадиях после биопечати и анализировали их с использованием длины волны возбуждения 450 нм и длины волны эмиссии 530 нм на спектрофлуориметре VictorNivo (PerkinElmer, США). Готовили следующие образцы: bioink – исходный гидрогель, гомогенизированный с использованием протеиназы К, crosslinked – гидрогель после биопечати и УФ-сшивки, гомогенизированный с использованием протеиназы К, thrombin (wash0) – гидрогель после биопечати, УФ-сшивки и сшивки тромбином, PBS (wash1) – гидрогель после 1ой отмывки, PBS

(wash2) – гидрогель после 2ой отмывки, PBS (wash3) – гидрогель после 3ей отмывки, homogenized -гомогенизированные остатки гидрогеля.

### **2.17 Анализ пролиферативной активности и нормированной метаболической активности**

В качестве параметров жизнеспособности оценивали метаболическую активность (AlamarBlue assay, ThermoFisher Scientific, США) и пролиферативную активность (Quant-iT PicoGreen kit, ThermoFisher Scientific, США).

Принцип работы аламарового синего основан на восстановлении нефлуоресцентного окрашенного в синий цвет резазурина до флуоресцентного окрашенного в розовый цвет резоруфина под действием митохондриальных ферментов. Аламаровый синий добавляли в лунки культуральных планшетов в объеме 10% от жидкости в лунке. Инкубацию проводили при температуре 37°C в течение 2 часов для монослойных культур, 4 часов для трехмерных культур с клетками и 24 часов для трехмерных культур со сфероидов. Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре VictorNivo (Perkinelmer, США) при длине волны возбуждения 580/20 нм и эмиссии 625/30 нм.

Для измерения количества ДНК в образцах после аламарового синего лунки 3 раза промывали PBS, в каждую лунку добавляли дистиллированную воду, и проводили 3 цикла замораживания-оттаивания (по 30 минут) для получения лизата клеток. Образцы, содержащие гидрогель, дополнительно обрабатывали протеиназой К (100 мкг/мл, Sigma-Aldrich, Германия) в течение 30 минут при температуре 37°C. Далее, в соотношении 1:1 к лизату добавляли раствор PicoGreen (приготовленный в соответствии с рекомендациями производителя) и инкубировали 5 минут в темноте. Измерения проводили на спектрофлуориметре VictorNivo (Perkinelmer, США) в режиме флуоресценции (возбуждение 480/30 нм, эмиссия 530/30 нм).

Для трехмерных конструкторов определяли нормированную метаболическую активность, которую рассчитывали как отношение флуоресцентного сигнала аламарового синего к количеству ДНК в пробе. Данный подход позволял, во-первых, учесть возможные искажения значений флуоресценции в конструкторах со сложной пространственной структурой, во-вторых, сравнивать между собой образцы, которые исходно могли содержать различное количество клеток и сфероидов (например, конструкторы, полученные методом биопечати, и смешанные вручную), и, в-третьих, определить удельную физиологическую активность клеток.

### 2.18 Анализ продукции аденозинтрифосфата (АТФ)

В качестве параметров жизнеспособности оценивали метаболическую активность (AlamarBlue assay, ThermoFisher Scientific, США) и пролиферативную активность (Quant-iT PicoGreen kit, ThermoFisher Scientific, США).

Для анализа продукции АТФ в сфероидах использовали ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Sigma-Aldrich, Германия). По окончании срока культивирования сфероиды лизировали с использованием протеиназы К (100 мкг/мл, Sigma-Aldrich, Германия) на термошейкере при температуре 37°C в течение 30 минут. Лизат переносили в лунки 96-луночного планшета в объеме 50 мкл на лунку. Для количественной оценки концентрации АТФ готовили калибровочные кривые стандартов АТФ с концентрациями 0, 4, 8, 12, 16, 20 мкМ. Далее, готовили смесь для реакции: ATP assay buffer (45.8 мкл), ATP probe (0.2 мкл), ATP converter (2 мкл), Developer mix (2 мкл). Полученную смесь добавляли в объеме 50 мкл к экспериментальным образцам/стандартам АТФ и инкубировали на шейкере в темноте в течение 30 минут. Измерения проводили на спектрофлуориметре VictorNivo (Perkinelmer, США) в режиме флуоресценции (возбуждение 530/30 нм, эмиссия 580/20 нм).

### 2.19 Анализ жизнеспособности клеток - Live-Dead assay

Для визуализации жизнеспособности клеток и сфероидов в конструктах проводили окраску живых и мертвых клеток (Live/Dead assay). Живые клетки окрашивали кальцеином 0.5 мг/мл (Calcein-AM, Sigma-Aldrich, Германия), мертвые – йодидом пропидия 1.5 мкМ (ThermoFisher Scientific, США), также были докрашены ядра (0.004 мг/мл Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Окраску конструктов проводили в течение 30 мин при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем образцы отмывали средой DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия) 3 раза, и анализировали с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Zeiss, Германия) с использованием для возбуждения лазеров с длинами волн 405, 488 и 594 нм.

### 2.20 Иммуноцитохимия

Для иммуноцитохимического окрашивания трехмерные гидрогелевые конструкты фиксировали в 4% растворе параформальдегида (pH 6.9, Sigma-Aldrich, Германия) ночь при температуре 4°C, затем трижды отмывали от фиксатора в PBS (pH 7,4). После этапов пермеабиллизации (10 мин, 0.2% раствор Triton X-100, PanReac AppliChem, США) и блокирования (10 мин, 5% FBS, HyClone, США) конструкты инкубировали в течение 48 часов при 4°C с

первичными антителами против виментина, фибронектина, коллагена I и Ki-67 (1:1000 и 1:250, соответственно, Abcam, Великобритания). Растворы первичных антител содержали 0,1% Triton X-100 для улучшения проницаемости мембраны. Затем образцы трижды промывали PBS (pH 7,4) и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 (1:1000, Thermo Scientific, США) при комнатной температуре в темноте в течение 4 ч. Ядра клеток контрастировали бисбензими́дом (Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Окрашенные образцы анализировали с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Zeiss, Германия) с использованием для возбуждения лазеров с длинами волн 405, 488 и 594 нм.

### **2.21 Анализ дифференцировки конструкторов**

Для анализа дифференцировочного потенциала напечатанных конструкций, культивируемых в течение 21 дня, были использованы те же наборы, что и для характеристики монослойных культур (п. 3.4). Для оценки дифференцировки также использовали красители: масляный красный O, ализариновый красный S и альциановый голубой. Количественную оценку проводили путем экстракции красителей и измерения оптической плотности с использованием длин волн 510 нм, 405 нм и 630 нм, соответственно.

### **2.22 Морфометрический анализ**

Реактивацию (распластывание) сфероидов на пластик в двумерных условиях оценивали путем анализа площади, занятой клетками, с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, Bethesda, США). Анализировали изображения, полученные с помощью светового фазово-контрастного микроскопа Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия). Было проанализировано не менее 30 изображений на каждую группу и каждую временную точку.

Поведение клеток (миграцию и спраутинг) в трехмерных условиях количественно анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, Bethesda, США). Автоматический расчет параметров (количество отростков, их общая и средняя длина, средняя ширина и среднее количество разветвлений на каждый отросток) проводили с помощью плагина Sprouting. Кроме того, рассчитывали среднее количество ядер и общую площадь клеток. Анализировали изображения, полученные с помощью светового фазово-контрастного микроскопа Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) и флуоресцентного микроскопа Evos (Thermo Fisher Scientific, США).

### 2.23 Фотобиомодуляция

Клетки в монослойных и трехмерных условиях облучали с помощью немонохроматичных светодиодных излучателей СДМ-07 (LDM-07, Институт фотонных технологий РАН, Россия). Облучение проводили в красном (633 нм, 1200 сек, 2.2 Дж/см<sup>2</sup>) и инфракрасном диапазонах (840 нм, 600 сек, 2.2 Дж/см<sup>2</sup>) (таблица 2). Колебания температуры в процессе облучения не превышали десятых долей градуса. Перед началом процесса фотобиомодуляции планшеты с клеточными культурами заворачивали в фольгу и помещали в инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### 2.24 Ингибиторный анализ

Для определения первичных мишеней ФБМ в клетке применяли ингибиторный анализ. Использовали ингибиторы различных комплексов дыхательной цепи митохондрий - ротенон (0,001 - 150 мкмоль, Sigma-Aldrich, Германия), азид натрия (1 – 50 мМ, Sigma-Aldrich, Германия), нитропруссид натрия (20 – 100 мкмоль, Sigma-Aldrich, Германия).

### 2.25 Цейтраферная съемка

Анализ активности митохондрий в динамике проводили с помощью установки для длительной прижизненной цейтраферной микроскопии клеток CellInsight CX7 (ThermoFisher Scientific, США). Перед посевом клеток либо инкапсуляцией их в гидрогель суспензии клеток предварительно окрашивали флуоресцентными красителями Hoechst 33258 и MitoTracker Green FM (ThermoFisher Scientific, США). После ФБМ клеток проводили автоматизированную фоторегистрацию слоя гидрогеля толщиной 50 мкм от дна планшета каждые 20 минут. Были использованы режимы съемки в светлом поле и во флуоресцентном режиме (возбуждение – 490 нм, эмиссия – 516 нм). В каждой лунке было отснято 25 полей площадью 0,0025 см<sup>2</sup>. Анализ полученных изображений проводили с помощью программного пакета SpotDetector, была измерена средняя интенсивность флуоресценции сигнала MitoTracker Green FM.

### 2.26 Метаболическая оценка - Seahorse assay

Количественный анализ активности митохондрий проводили с применением установки Seahorse XF96 Analyzer (Agilent, США), позволяющей оценить скорости потребления кислорода клетками. После установления базального дыхания в лунки с клетками добавляется олигомицин – ингибитор АТФ-синтазы, в результате чего становится возможным оценить количество

кислорода, идущее на фосфорилирование. Далее, протонофор СССР вызывает сброс потенциала митохондрий, в результате можно измерить максимальную скорость дыхания митохондрий. В последнюю очередь ингибиторы III и I комплекса – антимицин и ротенон – окончательно разрушают дыхательную цепь, и можно оценить немитохондриальное (пероксидазы, НАДФН-оксидазы) потребление кислорода. На выходе была получена зависимость скорости потребления кислорода (Oxygen Consumption Rate, OCR) от времени. Расчеты активности митохондрий проводили по значениям разобщенного дыхания.

### **2.27 Статистический анализ**

Все серии экспериментов повторяли не менее трех раз. Проверку нормальности распределения полученных данных проводили с применением критериев Шапиро-Уилка. Экспериментальные данные приведены в виде среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнение экспериментальных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Различия принимали статистически значимыми, если р-значение составляло менее 0.05.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Характеристика клеточного компонента биочернил (выделение, характеристика МСК, формирование клеточных сфероидов)

Для возможности применения в исследованиях первичных культур клеток и корректного анализа полученных результатов требуется их характеристика с использованием стандартного набора методов. Для мезенхимных стромальных клеток (МСК) одним из наиболее распространенных и принятых является набор минимальных критериев, предложенный Dominici et al.: адгезивность к пластику, наличие специфических поверхностных антигенов и способность к мультипотентной дифференцировке [68]. Было проведено иммунофенотипирование МСК альвеолярной слизистой оболочки свободной десны человека МСК по ряду поверхностных маркеров. Иммунофенотип клеток соответствовал принятым критериям МСК, более 95% клеток популяции несли положительные маркеры (CD90, CD73, CD105), негативные маркеры присутствовали менее, чем у 2% клеток (CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR) (рисунок 11А, таблица 4) [299]. Культура клеток при этом имела стандартную для МСК веретеновидную морфологию (рисунок 11Б) и была способна к дифференцировке в хондро- (рисунок 11В), адипо- (рисунок 11Г) и остеогенном (рисунок 11Г) направлении при индукции коммерческими средами в течение 21 суток. Дополнительно анализировали жизнеспособность монослойных культур МСК и наличие характеристических белков, как, например, виментин. В стандартных условиях клетки обладали высокой жизнеспособностью (рисунок 12А, Б), активно пролиферировали и имели явный виментиновый цитоскелет (рисунок 12В).

A

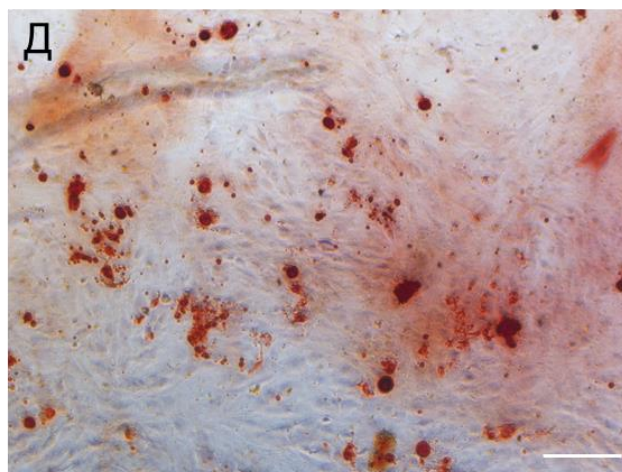
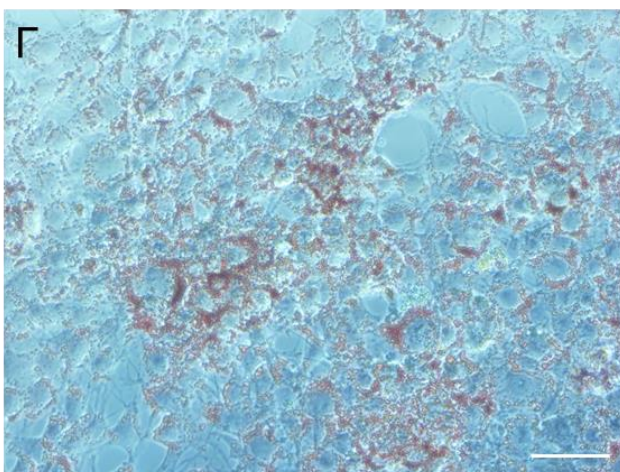
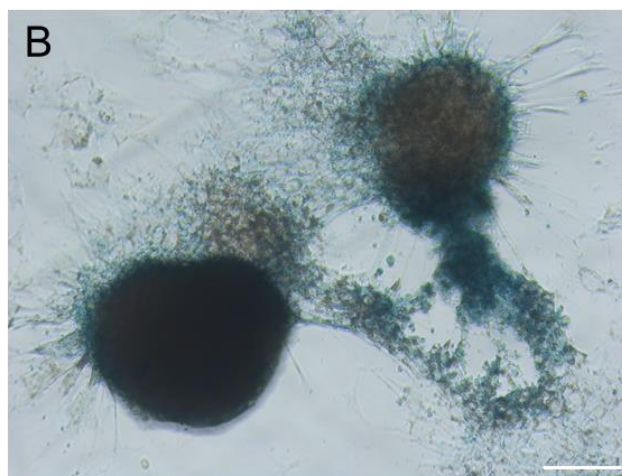
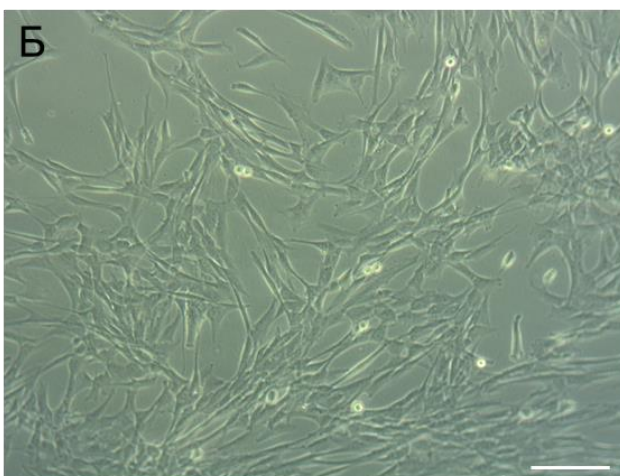
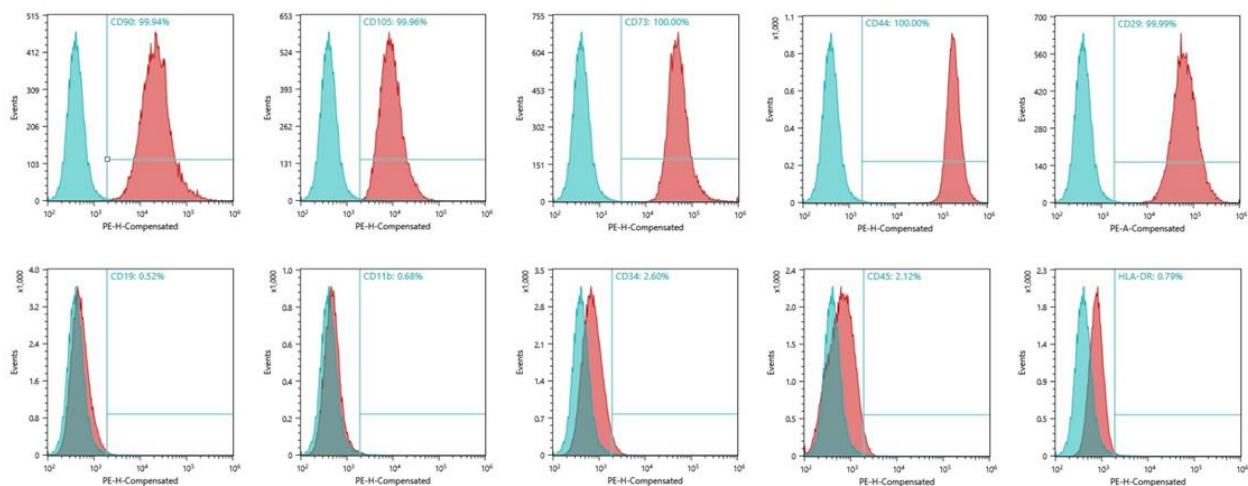


Рисунок 11 – Характеризация первичных культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) 4-го пассажа, выделенных из альвеолярной слизистой оболочки свободной десны человека. А – анализ иммунофенотипа МСК, проточная цитофлуориметрия. Б – морфология МСК в монослойной культуре, световая фазово-контрастная микроскопия. В – анализ способности МСК к дифференцировке в хондрогенном направлении, окрашивание толуидиновым синим. Г - анализ способности МСК к дифференцировке в адипогенном направлении, окрашивание масляным красным О. Д - анализ способности МСК к дифференцировке в остеогенном направлении, окрашивание ализариновым красным S

Таблица 4 - Анализ иммунофенотипа МСК 4-го пассажа, выделенных из альвеолярной слизистой оболочки свободной десны человека, проточная цитофлуориметрия

	Маркеры	Клеток в популяции, %
Отрицательные	CD19	
	CD11b	
	CD34	
	CD45	
	HLA-DR	
Положительные	CD90	
	CD105	
	CD73	
	CD44	
	CD29	

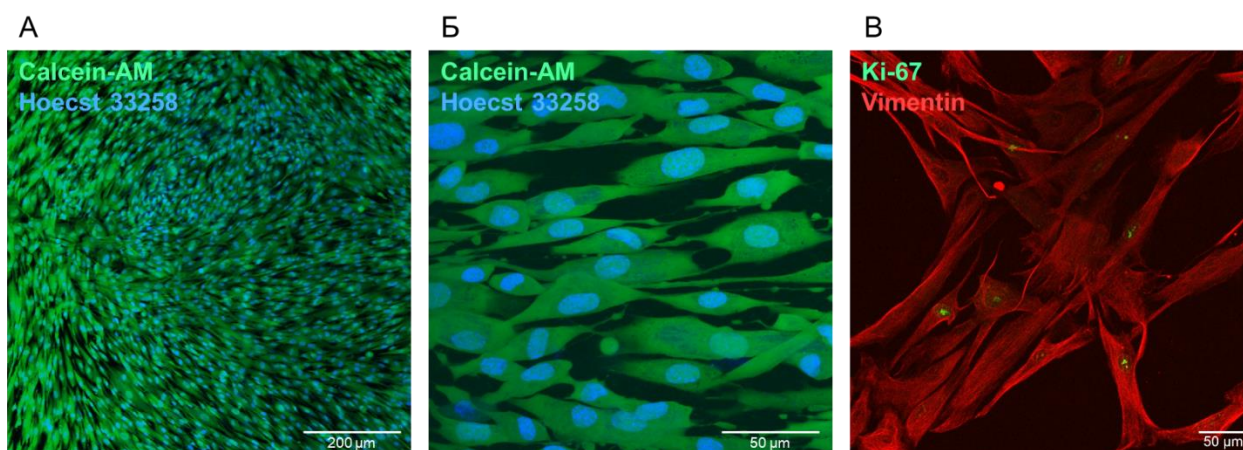


Рисунок 12 – Характеризация морфологии и жизнеспособности МСК 4-го пассажа в монослойной культуре. А, Б – анализ жизнеспособности МСК, Live/Dead тест и флуоресцентная микроскопия. В – анализ распределения виментина в клетках, иммуноцитохимическое окрашивание и лазерная конфокальная сканирующая микроскопия

При помещении суспензии клеток в неадгезивные многолуночные агарозные планшеты в количестве 1000 клеток на лунку (на сфероид) МСК формировали округлые клеточные сфероиды, компактизирующиеся через 3 суток культивирования (рисунок 13 А, Б) [300,301]. Также была проанализирована жизнеспособность полученных сфероидов: МСК формировали плотный сфероид без признаков некротического ядра в центре (рисунок 13В). Такие сфероиды в дальнейшем использовали для всех экспериментов [302].

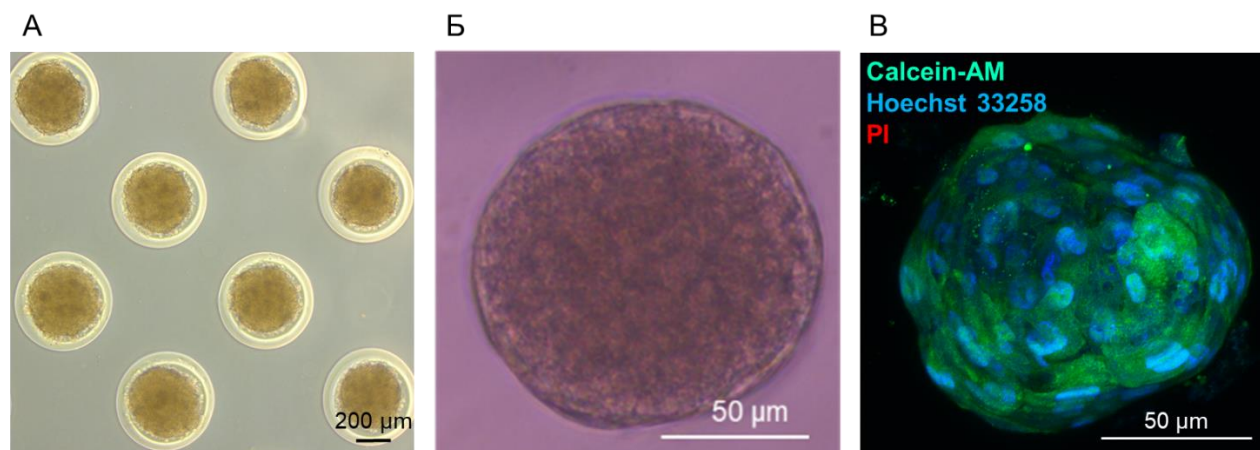


Рисунок 13 – Характеризация морфологии и жизнеспособности МСК в составе 3-дневных сфероидов (1000 клеток/сфероид). А, Б – анализ морфологии и диаметра сфероидов, фазово-контрастная световая микроскопия. В – анализ жизнеспособности сфероидов, Live/Dead тест и флуоресцентная микроскопия

### 3.2 Разработка состава и характеристика гидрогелевого компонента биочернил

В качестве основного компонента гидрогелей и в дальнейшем для биочернил был выбран фибрин, модифицированный полиэтиленгликолем (ПЭГ) либо ПЭГ-метакрилатом для повышения стабильности, прозрачности и разветвленности полимерной сети. Для исследования микроструктуры функциональных частиц (димеров) фибрина, модифицированных ПЭГ и ПЭГ-метакрилатом, применяли метод малоуглового рентгеновского рассеяния (MPP, SAXS). По результатам измерений, проведенных на базе исследовательского центра по физике частиц DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron, Гамбург, Германия), в программах DAMMIN и PyMol были рассчитаны и построены *ab initio* модели трехмерных частиц фибрина (рисунок 14). Было показано, что конъюгаты ПЭГ-фибрин и ПЭГ-метакрилат-фибрин состоят из нитевидных частиц, структура которых зависит от молярного отношения и состава модификации. Модификация ПЭГ увеличивает ветвистость частицы (рисунок 14 Б), в то время как модификация ПЭГ-метакрилатом сопровождается увеличением плотности (рисунок 14 В). Данные модификации способствуют ветвлению фибриновой сети в процессе полимеризации, что позволяет получить регулярную полимерную сеть. Фибрин имел разветвленную фибриллярную структуру, плотность которой возрастала с увеличением концентрации фибриногена от 12.5 до 50 мг/мл (рисунок 15А). Анализ 3 различных концентраций фибриногена показал, что при концентрации фибриногена 25 мг/мл соотношение «зародышевых центров» и «разветвленных участков» является оптимальным (рисунок 15А). По результатам реологического анализа фибриногена было определено, что равновесный модуль сохранения увеличивается примерно в 5 раз с каждым увеличением концентрации фибриногена в 2 раза (рисунок 15Б, таблица 5). Время кроссовера,

показывающее переход гидрогеля в сшитое состояние, определяли как время, при котором модуль сохранения пересекался с модулем потерь, и фактор потерь (отношение модуля потерь к модулю сохранения) становился меньше 1. Время кроссовера при этом зависит от применяемой при измерениях частоты; время кроссовера во всех случаях было достигнуто чуть более чем за 1 минуту (таблица 5). Точка гелирования, в свою очередь, от применяемой частоты не зависит, и определяет момент перехода аморфного материала из жидкого в твердое состояние вследствие процесса гелирования. Однако ни время кроссовера, ни точка гелирования не отражает полной картины процесса полимеризации фибрина. Поэтому дополнительно был рассчитан полупериод гелирования – время, необходимое для достижения половины равновесного модуля сохранения. Не было выявлено явной зависимости полупериода гелирования от концентрации фибриногена, что может говорить о том, что первичные процессы сшивки и ветвления происходили относительно быстро, а затем наступала более медленная фаза латеральной агрегации, роста и дополнительного переплетения волокон (таблица 5). Полный равновесный модуль сохранения показывает механическую жесткость, в то время как равновесный коэффициент потерь отражает то, насколько твердым является сформированный гидрогель (таблица 5). Все варианты гидрогелей были довольно мягкими и обладали вязкоэластичным поведением. Равновесный коэффициент потерь составил около 0.1 – 0.2, причем более высокие концентрации имели более высокий коэффициент, что говорит о более эластичном поведении (таблица 5).

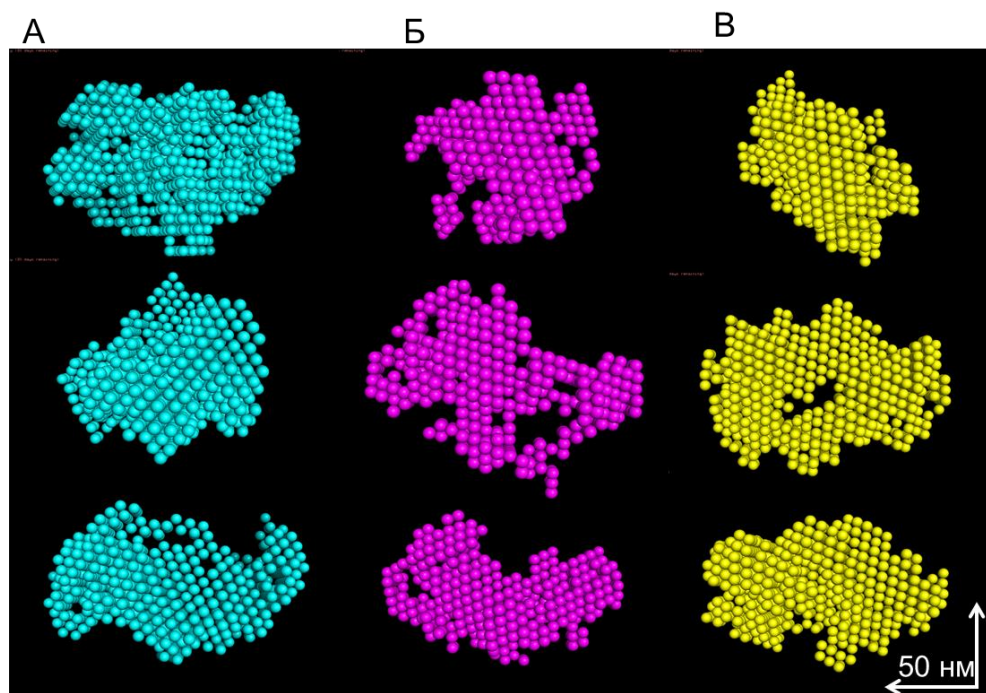


Рисунок 14 – *ab initio* модели фибриновых частиц (3 проекции, получаемые поворотом на 90°). А - модели фибриновых частиц. Б –модели частиц фибрина, модифицированного ПЭГ. В – модели частиц фибрина, модифицированного ПЭГ-метакрилатом, малоугловое рентгеновское рассеяние

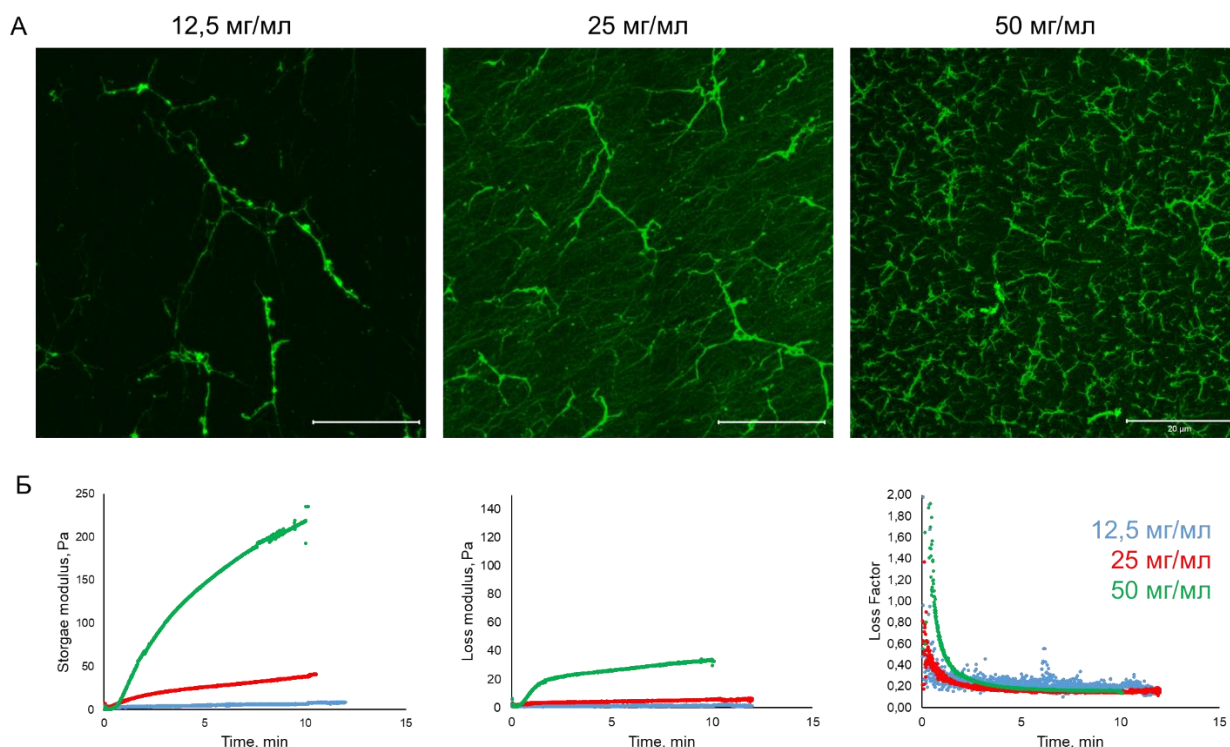


Рисунок 15 – Характеристика физических свойств модифицированного фибринового гидрогеля. А – микроструктура фибриновой сети, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Б – реологическое поведение модифицированного фибрина различной концентрации, реометрия

Таблица 5 – Реологические параметры фибринового гидрогеля

	12.5 мг/мл	25 мг/мл	50 мг/мл
Равновесный модуль сохранения, Па	$9 \pm 2$	$50 \pm 6$	$250 \pm 40$
Равновесный коэффициент потерь	$0.19 \pm 0.1$	$0.13 \pm 0.1$	$0.12 \pm 0.1$
Время кроссовера, сек	$80 \pm 10$	$70 \pm 3$	$90 \pm 5$
Полупериод гелирования, сек	$900 \pm 100$	$240 \pm 60$	$220 \pm 50$

Результаты сканирующей электронной микроскопии подтвердили данные о разветвленной и пористой структуре фибринового гидрогеля (рисунок 16А). Особенностью модифицированного ПЭГом фибрина является не только его стабильность, но также и оптическая прозрачность. Данная особенность является важным параметром материала, во-первых, для биопечати, а во-вторых, для ФБМ. В обоих случаях прозрачность позволяет повысить глубину проникновения света и обеспечить фотосшивку материала либо обеспечить экспозицию клеток, соответственно. Было протестировано пропускание света с длинами волн 633 нм и 840 нм через столбик модифицированного фибрина 25 мг/мл высотой 1 см. Светопропускание через гидрогель такой толщины составило 43% для света с длиной волны 630 нм и 46% для 840 нм (рисунок 16Б). Кроме того, была проанализирована зависимость

флуоресцентного сигнала резазурина/резорурфина (AlamarBlue assay) от толщины и концентрации фибринового гидрогеля. Полученные для толщин 1, 1.5 и 3 мм и для концентраций 12.5, 25 и 50 мг/мл значения не обладали статистически значимыми различиями (рисунок 17). При этом все значения флуоресценции находились на одном уровне с контролем – лунками без гидрогеля – что говорит о возможности применения данного теста для трехмерных конструкций на основе фибриногена.

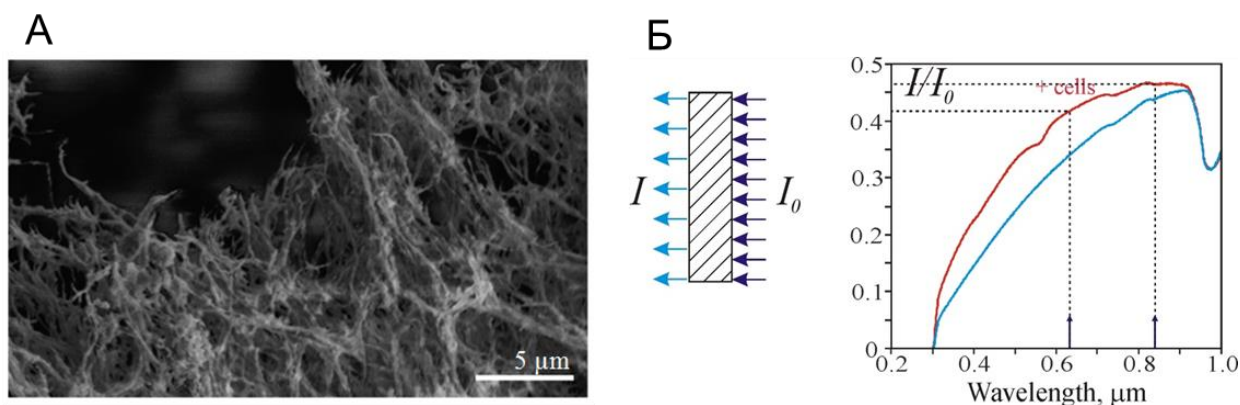


Рисунок 16 – Характеристика структуры и прозрачности модифицированного фибринового гидрогеля. А – микроструктура фибриновой сети, сканирующая электронная микроскопия. Б – пропускание света с длинами волн 633 нм и 840 нм через столбик гидрогеля высотой 1 см, спектрофотометрия

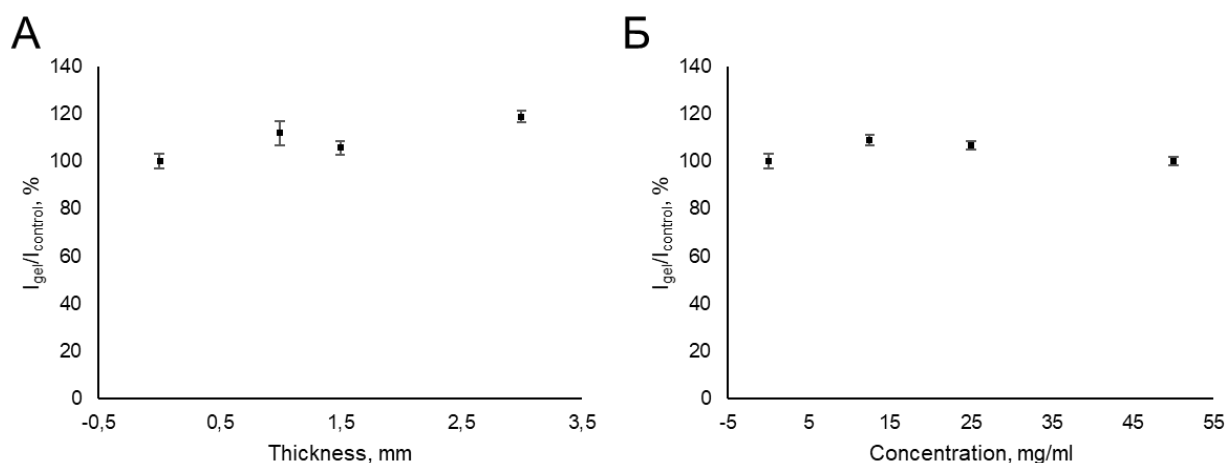


Рисунок 17 – Зависимость флуоресцентного сигнала от различных свойств модифицированного фибринового гидрогеля при использовании теста AlamarBlue. А – фибриновый гидрогель разной толщины. Б – фибриновый гидрогель разной концентрации, спектрофлуориметрия

Далее была протестирована жизнеспособность клеток при культивировании в модифицированном фибриновом гидрогеле концентрации 25 мг/мл. Спустя 3 дня культивирования метаболическая активность клеток не отличалась при сравнении стандартной монослойной и трехмерной гидрогелевой культуры (рисунок 18А). Концентрация ДНК при этом

во второй группе была ниже на примерно на 30%, что объясняется сниженными темпами пролиферации клеток при переведении в трехмерные условия (рисунок 18Б). В течение дальнейших 7 дней культивирования гидрогель сохранял свою стабильность, и на 10 сутки был проведен анализ на живые/мертвые клетки (Live/Dead assay). Подавляющее большинство клеток окрашивалось кальцеином, и были отмечены только единичные мертвые клетки (рисунок 18В). При этом МСК имели вытянутую морфологию, формируя многоядерные тубулоподобные структуры.

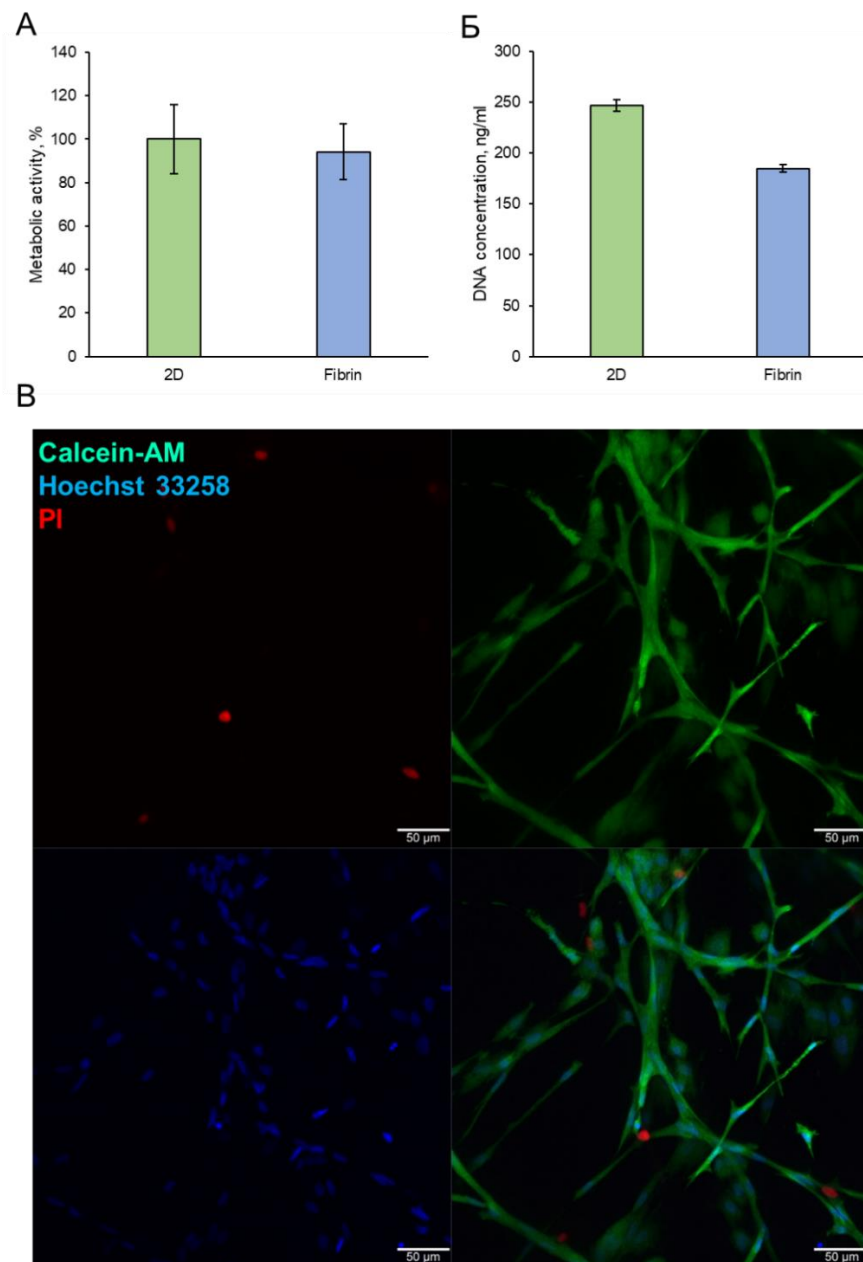


Рисунок 18 – Жизнеспособность клеток после инкапсуляции в модифицированный фибриновый гидрогель. А – метаболическая активность, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия, 3 суток культивирования. Б – пролиферативная активность, PicoGreen тест, спектрофлуориметрия, 3 суток культивирования. В – общая жизнеспособность, Live/Dead тест и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, 10 суток культивирования

Таким образом, фибриновый гидрогель обеспечивал формирование разветвленной полимерной сети, доступной для адгезии МСК и применения фотобиомодуляции. Однако ввиду низкой вязкости и высокой текучести фибриногена до сшивки не представлялось возможным создание композиции биочернил для биопечати с использованием только этого компонента. Поэтому для увеличения вязкости гидрогелевой системы и достижения «гелеобразной» консистенции дополнительно вводили в состав желатин. Кроме того, для биопечати использовали вариант модификации фибриногена ПЭГ-акрилатом с последующим воздействием УФ света для быстрого фотоотверждения напечатанной конструкции. Дополнительно было проведено исследование реологических свойств данной многокомпонентной композиции, включающей в себя фибриноген, желатин, ПЭГ-метакрилат и рибофлавин, подвергающейся затем двухэтапной сшивке – с использованием УФ света и тромбина. Было проанализировано 4 группы: несшитый гидрогель; гидрогель, сшитый только УФ-облучением; гидрогель, сшитый только ферментативно (путем добавления тромбина); гидрогель, сшитый и УФ-облучением, и ферментативно. В ходе реологического анализа образцов гидрогеля измеряли такие показатели, как модуль сохранения (Storage modulus - характеризует способность материала запасать механическую энергию при деформации) и модуль потерь (Loss modulus - мера энергии, рассеиваемой в виде тепла при деформации), являющиеся общепринятыми параметрами, используемыми для характеристики упругих материалов. Было показано, что через 5-7 минут после добавления сшивающего агента значения модулей сохранения и потерь выходят на плато; при этом максимальные значения (модуль сохранения – около 90 Па, модуль потерь – около 18 Па) наблюдаются для образцов, подвергавшихся двойной сшивке (рисунок 19 А, Б). Эти данные были подтверждены анализом зависимости модуля от частоты (рисунок 19В). Таким образом, из результатов анализа различных режимов гелирования во времени следует, что наилучшие показатели обеспечиваются параллельной полимеризацией гидрогеля УФ-облучением и ферментативно, что дополнительно подтверждается результатами анализа зависимости модуля от частоты. Реологические свойства гидрогелевого компонента биочернил в зависимости от температуры представлены на рисунок 11. При температуре 23 °С (температура при биопечати) основной вклад в вязкость вносит желатин, в результате чего модуль упругости (сдвига) превышает 300 Па (рисунок 20А, Б). При нагреве модуль сдвига значительно падает. Гидрогель демонстрирует гистерезисное поведение: температура перехода при нагревании выше, чем при охлаждении, и при нагревании система быстрее претерпевает изменения. Для моделирования свойств конструкции после биопечати измерения проводили при 37 °С во время сшивки тромбином и УФ-излучением (рисунок 20В, Г). Процесс изменения состояния гидрогеля от жидкого к гелеобразному происходил в течение 1 мин (таблица 6). Модуль упругости гидрогеля

при температуре 37 °С после 10 мин инкубации составил около 85–90 Па. Этот вариант отражает механические параметры гидрогеля в условиях дальнейшего культивирования в инкубаторе. Помимо вязкости, также были проанализированы механические свойства полностью сшитого гидрогеля при 37 °С в культуральной среде. По результатам расчета средний модуль Юнга по поверхности составил 0,55 кПа, а модуль Юнга всей конструкции — 1,4 кПа (таблица 6). Было обнаружено, что степень набухания сшитой конструкции составила  $S = 25,3\%$ , что указывает на высокое содержание воды (таблица 6).

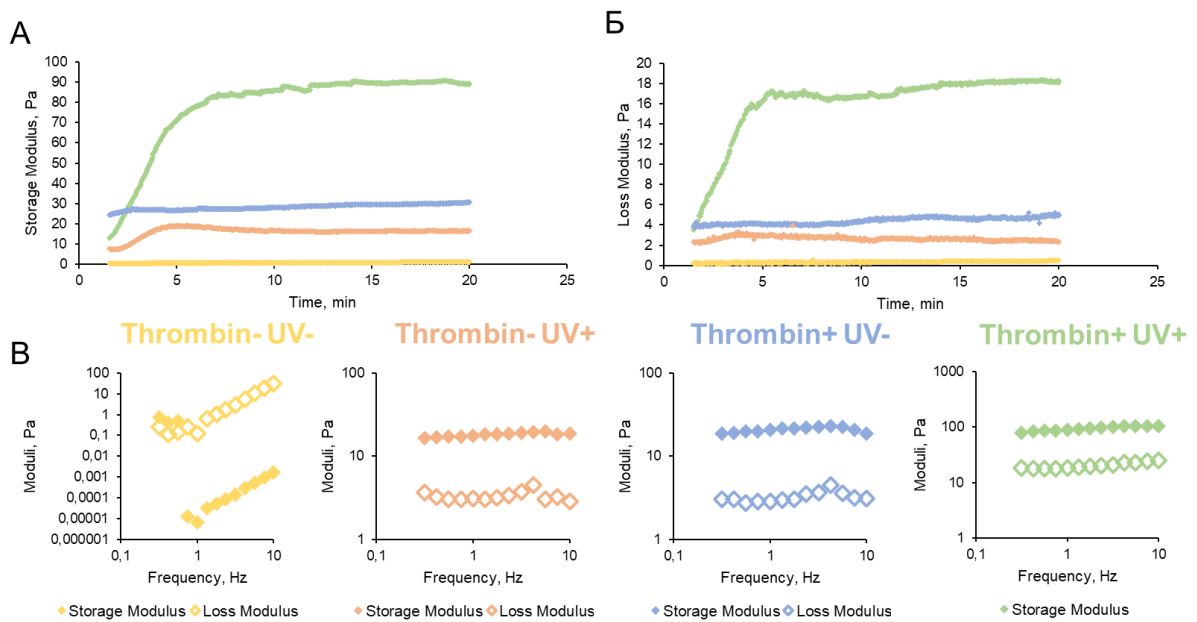


Рисунок 19 – Реологический анализ фибрин-желатинового гидрогеля при разных режимах гелирования. А – зависимость модуля сохранения от времени. Б – зависимость модуля потерь от времени. В – зависимости модуля сохранения (заполненные точки) и модуля потерь (незаполненные точки) от частоты. Thrombin-UV- (желтый цвет) - несшитый гидрогель, Thrombin-UV+ (оранжевый цвет) – гидрогель, сшитый только УФ-облучением, Thrombin+UV- (синий цвет) – гидрогель, сшитый только ферментом (тромбин), Thrombin+UV+ (зеленый цвет) - полностью сшитый гидрогель, реометрия

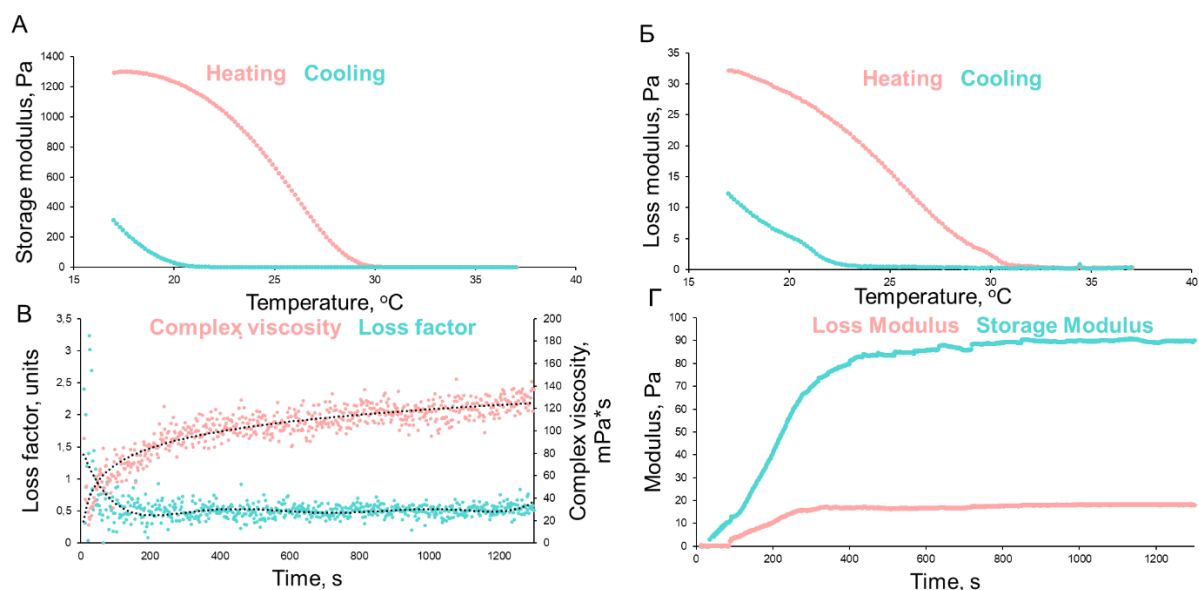


Рисунок 20 – Реологический анализ фибрин-желатинового гидрогеля при различных температурах. А – гистерезисное поведение модуля сохранения при нагревании/охлаждении. Б – гистерезисное поведение модуля потерь при нагревании/охлаждении. В – кинетика модуля сохранения и комплексной вязкости при гелировании. Г – кинетика модулей сохранения и потерь при гелировании

На рисунок 21 А, Б показан ИК-спектр сшитых и несшитых образцов гидрогеля в диапазоне  $1800-750\text{ см}^{-1}$ . Можно наблюдать небольшое смещение и уменьшение интенсивности полосы амида II. Это может быть связано с изменением надмолекулярной структуры полипептидов в результате сшивки гидрогеля. Спектральный диапазон  $1200-750\text{ см}^{-1}$  подробно показан на рисунок 21Б, где можно наблюдать уменьшение интенсивности полосы  $850\text{ см}^{-1}$ . Можно предположить, что снижение связано с колебаниями группы  $\text{C}=\text{C}$  после сшивки. Из данных термогравиметрического анализа (ТГА, рисунок 21В) видно, что начало деградации происходит практически при одинаковой температуре в сшитых и несшитых образцах, и они не различаются по своей термической стабильности. Сшитый образец несколько менее гидратирован. При высоких температурах масса коксового остатка у этого образца больше, что свидетельствует о большей степени сшивки.

Таблица 6 – Механические и реологические свойства фибрин-желатинового гидрогеля

Коэффициент набухания, %	Время релаксации, сек	Модуль Юнга, кПа (микроиндентирование, полный объем)	Модуль Юнга, кПа (наноиндентирование, поверхность)	Время кроссовера, сек
$25.3 \pm 0.4$	$5.7 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.4$	$0.55 \pm 0.58$	$54 \pm 4$

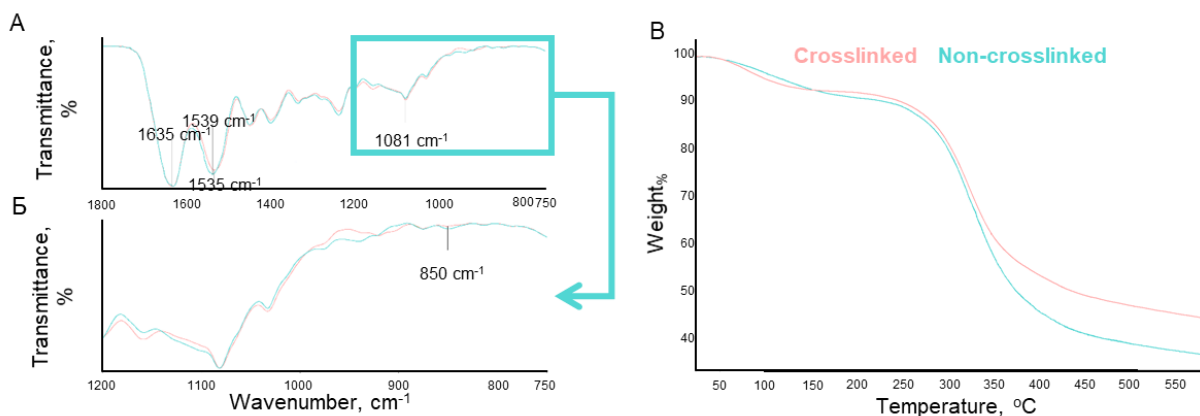


Рисунок 21 – А, Б - FTIR (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) спектроскопия, В - термогравиметрический анализ сшитых (оранжевый цвет)/несшитых (синий цвет) образцов фибрин-желатинового гидрогеля

Далее, для определения оптимального протокола шивки напечатанных конструктов был исследован механизм шивки метакрилатных групп рибофлавином. Формирование радикалов активно происходило в течение первой минуты после облучения, затем их концентрация постепенно снижалась (рисунок 22А). При добавлении азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в качестве ингибитора радикалов синглетного кислорода наблюдали значительно меньшие по своей амплитуде и продолжительности вспышки. Кроме того, при добавлении азида натрия в состав гидрогеля, дальнейшей печати и стандартном УФ-облучении не происходило шивки конструкта (рисунок 22Б). Эти данные говорят о том, что рибофлавин обеспечивает кросслинкинг гидрогеля в первую очередь за счет радикалов синглетного кислорода.

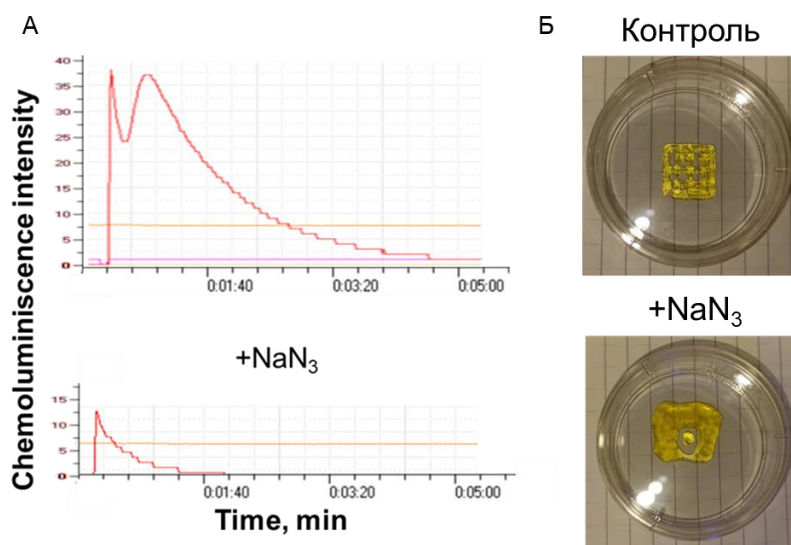


Рисунок 22 – Механизм фотополимеризации фибрин-желатинового гидрогеля. А - исследование кинетики фотоактивации рибофлавина УФ светом с длиной волны 365 нм и при добавлении азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в качестве ингибитора образующихся синглетных кислородных радикалов. Б – стабильность напечатанной конструкции после 15-минутной инкубации при температуре 37°C в контроле и при добавлении азида натрия, хемолуминесцентные измерения

Так как рибофлавин является фотоинициатором и при высоких концентрациях может оказывать токсическое воздействие на клетки, был подобран протокол отмывки остаточного рибофлавина из конструкторов после проведения биопечати. Было проанализировано наличие рибофлавина на нескольких стадиях и в различных образцах: биочернила до печати (максимальная концентрация), сшитый конструктор (после УФ-облучения), раствор тромбина, 3 смены PBS и гомогенизированный конструктор после всех стадий отмывки (рисунок 23). Было зафиксировано снижение количества рибофлавина на каждой стадии; после двухэтапной сшивки и 3 смен PBS рибофлавина в составе конструктора практически не обнаруживалось, что позволило избежать потенциально негативного воздействия на клетки в периоде культивирования после биопечати.

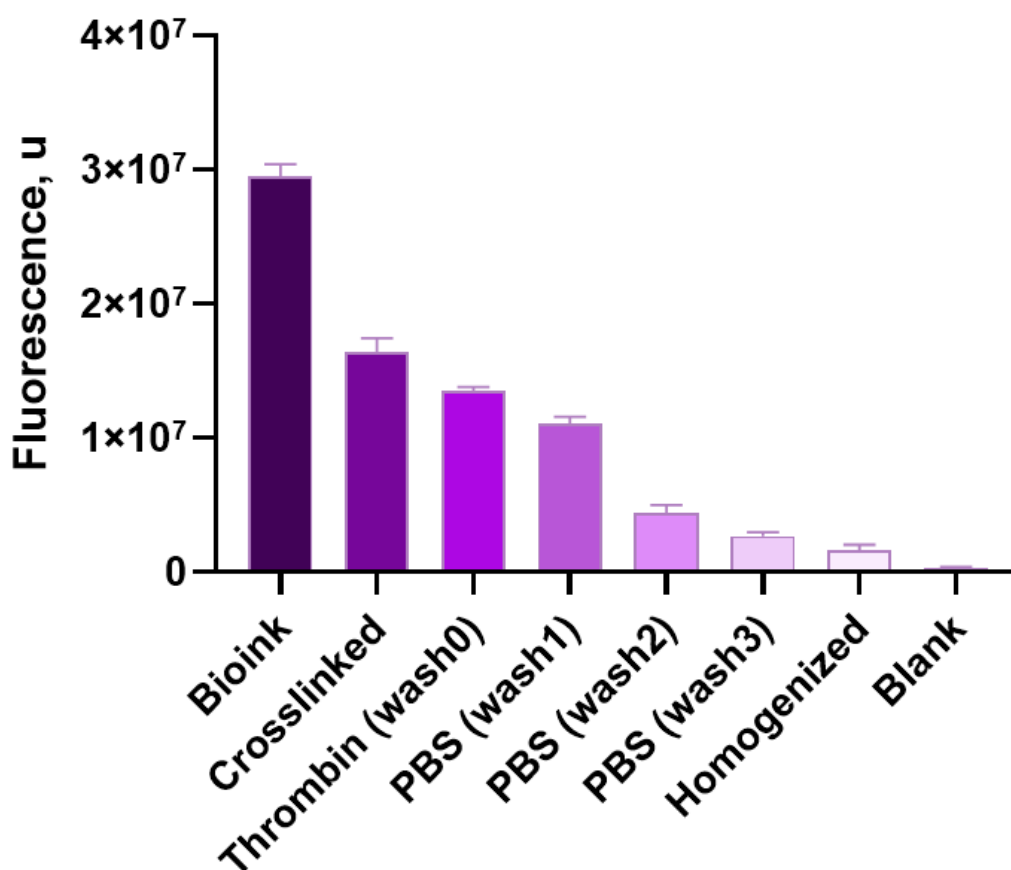


Рисунок 23 – Остаточная флуоресценция рибофлавина на различных стадиях получения и отмывки конструктора на основе фибрин-желатинового гидрогеля, спектрофлуориметрия

Аналогично фибриновому гидрогелю, была протестирована жизнеспособность клеток при культивировании фибрин-желатиновом гидрогеле. Спустя 3 дня культивирования метаболическая и пролиферативная активность клеток имела тенденцию к более быстрому увеличению, чем в стандартной монослойной культуре (рисунок 24А, Б). Так же на 10 сутки

культивирования был проведен анализ на живые/мертвые клетки (Live/Dead assay). Как и в случае с фибриновым гидрогелем, клетки обладали высокой жизнеспособностью (рисунок 24В). Однако в данном случае МСК имели другой внешний вид: вытянутые клетки формировали не тубулоподобные структуры, а агрегаты отдельных клеток (рисунок 24В). Визуально клеточная плотность при этом была выше, что также коррелирует с повышенной метаболической и пролиферативной активностью.

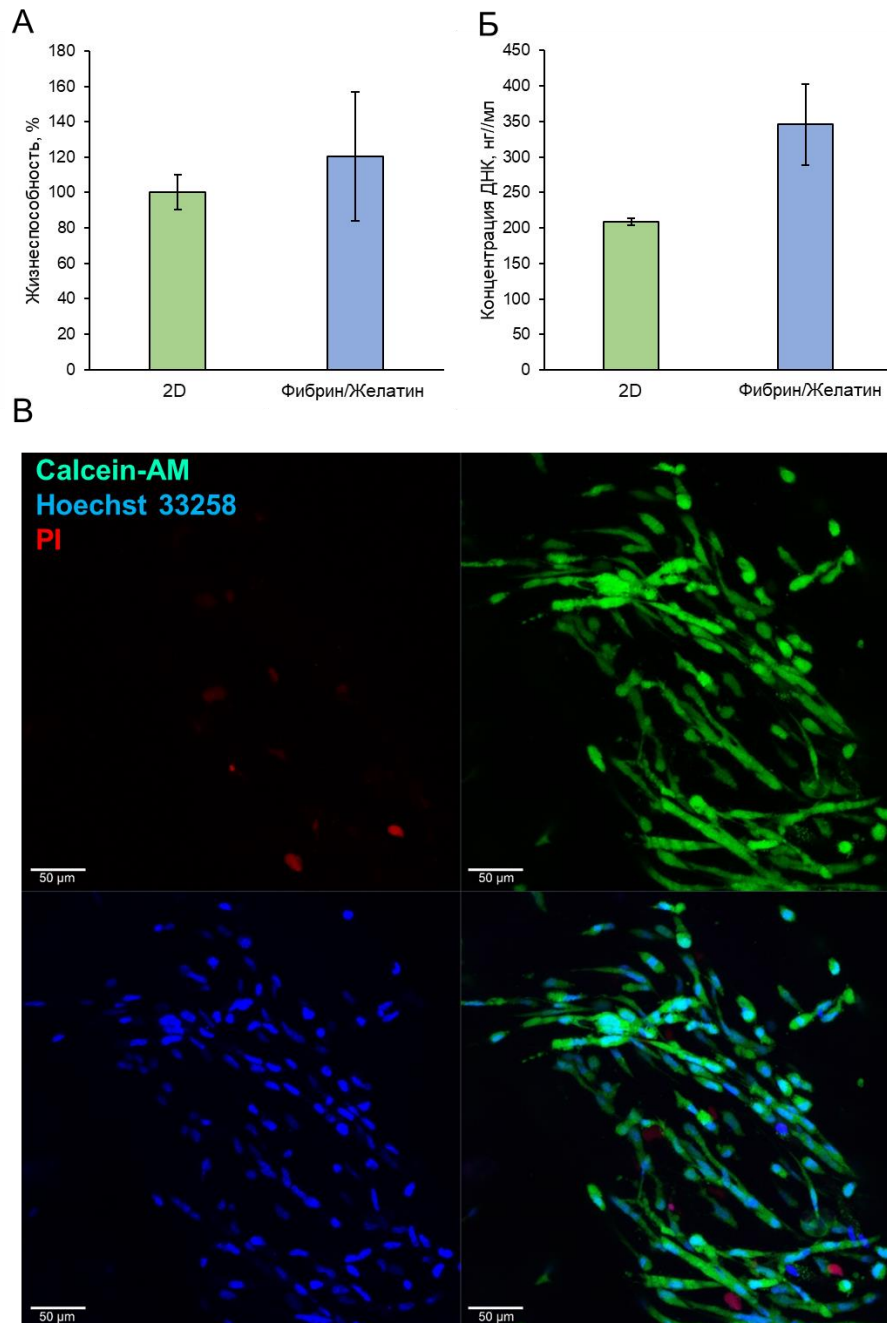


Рисунок 24 – Жизнеспособность клеток после инкапсуляции в желатин-фибриновый гидрогель. А – метаболическая активность, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия. Б – пролиферативная активность, PicoGreen тест, спектрофлуориметрия. В – общая жизнеспособность, Live/Dead тест и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

### 3.3 Разработка и оптимизация протокола 3D экструзионной биопечати

Для трехмерной биопечати конструкторов использовали экструзионный 3D биопринтер BioX (CellInk, Швеция) (рисунок 25А). На рисунке 25А, Б представлены основные компоненты устройства для 3D биопечати: 1 – НЕРА-фильтр для поддержания стерильности; 2 – рельсы для перемещения передвижного модуля по осям X и Y; 3 – печатающая головка биопринтера с картриджем, прикрепленная к передвижному модулю; 4 – рельса для перемещения передвижного модуля по оси Z; 5 – платформа для емкости, в которую ведется печать (чашка Петри, планшет); 6 – управляющий модуль, реализованный в виде сенсорного экрана; 7 – адаптер для картриджа; 8 – картридж с биочернилами; 9 – корпус печатающей головки; 10 – вентилятор; 11 – радиатор для отвода тепла; 12 – стопорный винт для закрепления картриджа; 13 – адаптер для устройства подачи давления; 14 – поршень; 15 – биочернила; 16 – различные варианты насадок для картриджа (а – крышка для картриджа, используется во время подготовительных манипуляций; б – игла для биопечати; в – сопло для биопечати).

Так как в работе использовали биочернила на основе температурозависимого желатина, было предусмотрено поддержание температуры 23°C на всех этапах биопечати. При постоянном перемешивании картридж с биочернилами охлаждали и помещали в печатающую головку биопринтера с температурным контролем (рисунок 25Б, В). Далее проводили 3D биопечать на поверхность лунок 24-луночного планшета (рисунок 25В).

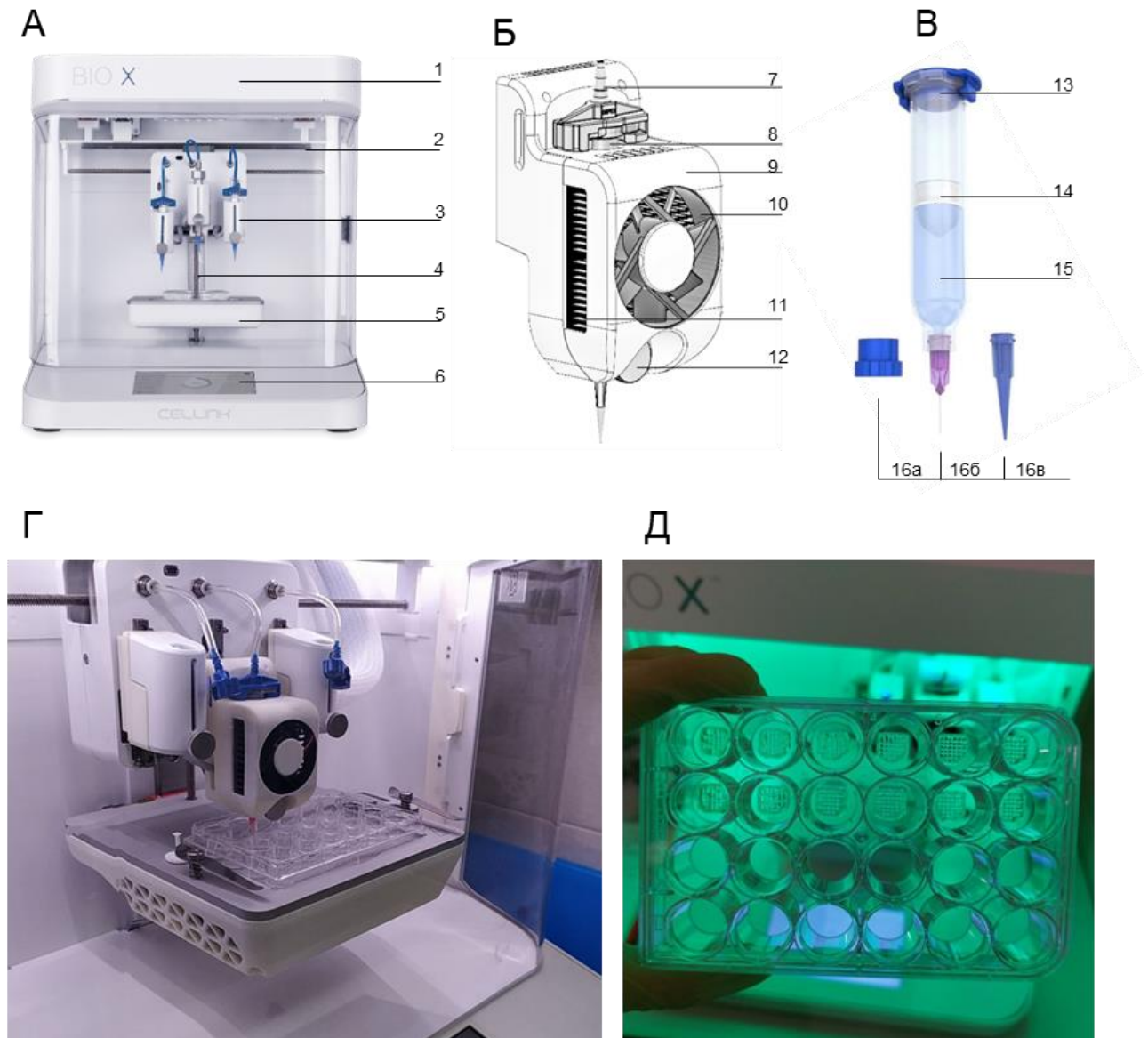


Рисунок 25 – Схема устройства стандартного экструзионного биопринтера и его составных частей. А – экструзионный биопринтер, Б – терморегулируемая печатающая головка, В – картридж для биопечати, Г – процесс 3D биопечати в 24-луночный планшет с использованием терморегулируемой головки, Д – внешний вид конструкций, напечатанных в 24-луночный планшет

В качестве 3D модели использовали квадратную сетку размерами 10x10x4 мм (рисунок 25Д, 26). С одной стороны, данная модель позволяет получить объемный конструкт с размерами, при которых обычно наблюдается снижение жизнеспособности клеток ввиду отсутствия васкуляризации и затрудненной диффузии, а с другой стороны, имеет удобную для оценки печатаемости геометрию. Кроме того, модели такого типа позволяют быстро получить большое количество конструктов, что важно для их всестороннего анализа различными методами.

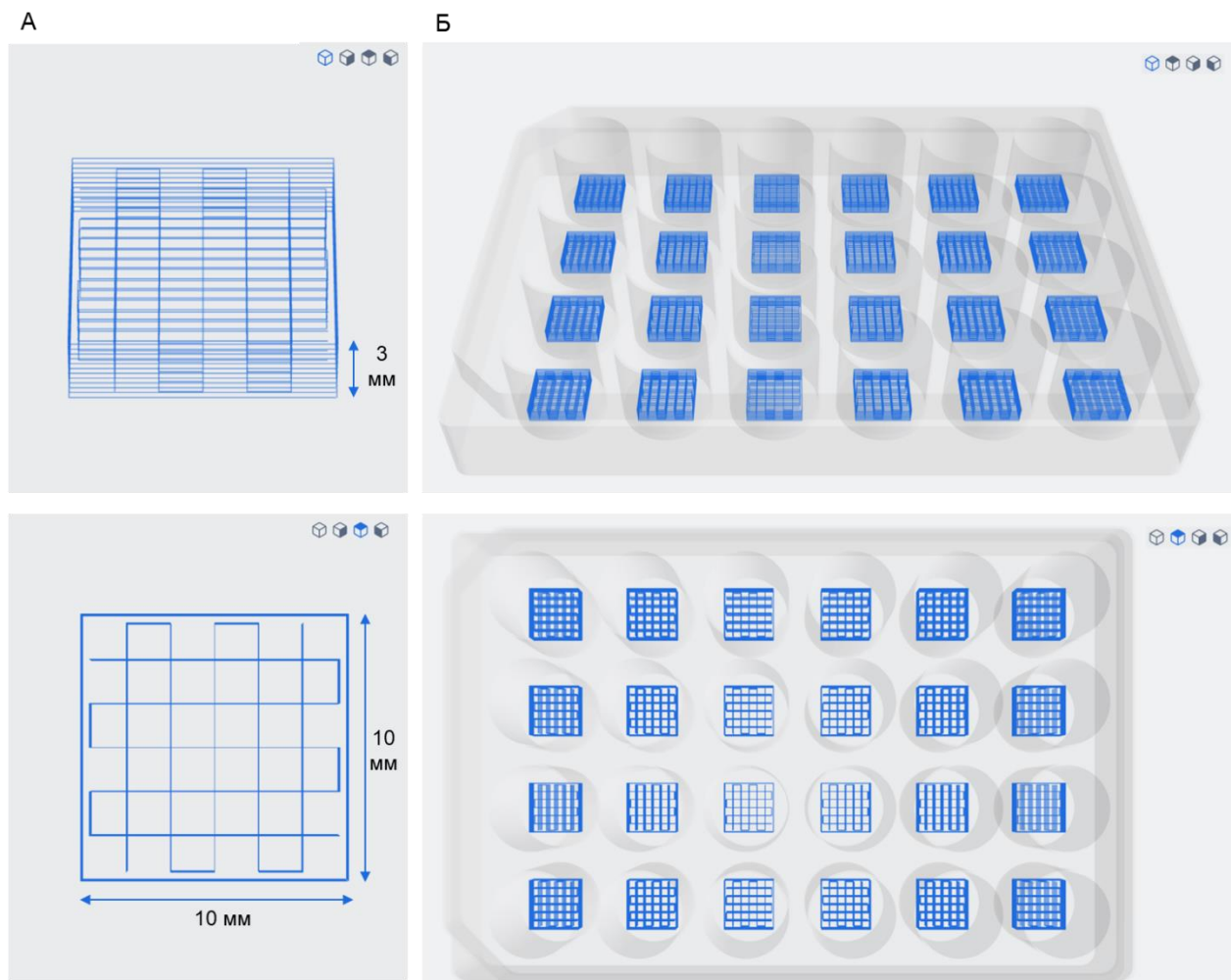


Рисунок 26 – 3D-модель конструкта (DNA Software). А – внешний вид модели в различных проекциях, Б – внешний вид моделей, расположенных в 24-луночном планшете в различных проекциях. Вид проекции отмечен в верхней правой части каждого рисунка. Ширина и длина конструкта составляет 10 мм, высота – 3 мм

Оптимальная концентрация желатина, температура и давление биопечати были подобраны, исходя из определения печатаемости. При концентрации желатина 7.5% окно печатаемости оказалось наиболее широким – от 23°C до 26°C (рисунок 27А). Кроме того, при данной концентрации было возможно получать конструкты при давлении в диапазоне от 30 до 60 кПа (рисунок 27Б). Такое окно, с одной стороны, включает значения давления, не слишком негативно влияющие на жизнеспособность клеток, а с другой стороны, обеспечивающие возможность более точной настройки параметров в процессе биопечати. Для выбора финальных параметров при печати биочернилами с содержанием желатина 7.5% была протестирована печатаемость в диапазонах 20-30 °С и 20-60 кПа (рисунок 27В).

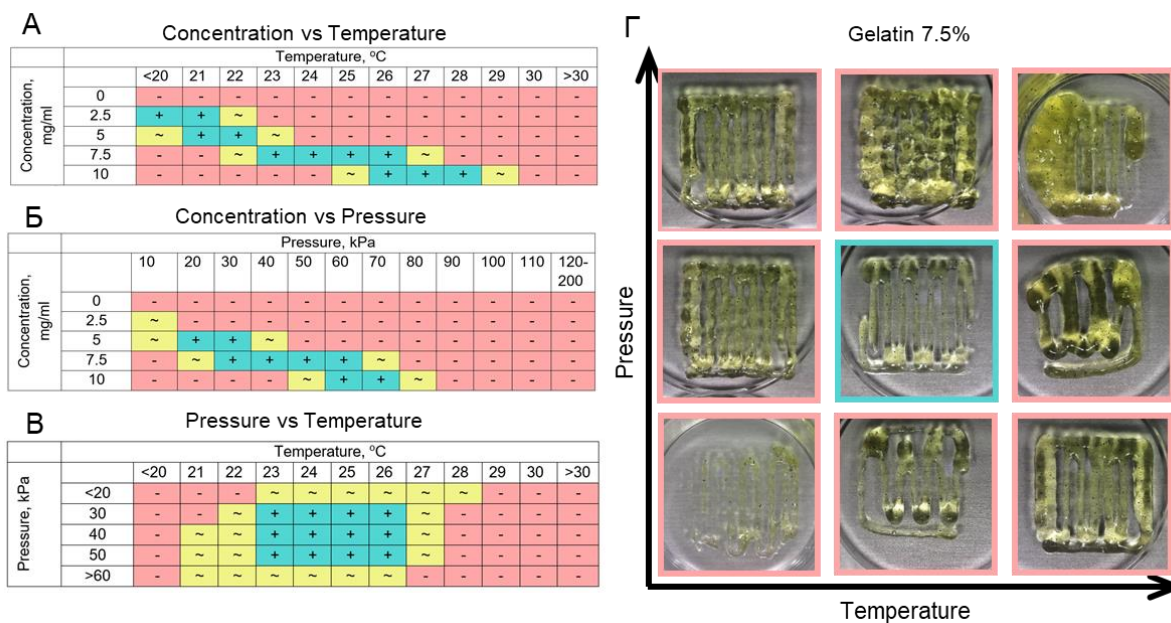


Рисунок 27 – Определение окна печатаемости фибрин-желатинового гидрогеля. А – концентрация против температуры, Б – концентрация против давления, В – давление против температуры, Г- репрезентативные фотографии конструкций (1 слой), полученных при различных параметрах 3D биопечати

Были разработаны критерии определения оптимальной печатаемости на основе соответствия напечатанного конструкта исходной трехмерной модели (рисунок 28А). Хорошая печатаемость определялась двумя параметрами: различия (distinction) стремились к 0%, а сходство (similarity) стремилось к 100%, где различия =  $(S_{\text{printed}}/S_{\text{model}} * 100\%) - 100\%$ , а сходство =  $S_{\text{intersection}}/S_{\text{model}} * 100\%$ . Согласно данным критериям, температура 23 °C и давление 40 кПа оказались оптимальными для биопечати (рисунок 27Г, 28Б). Биопечать далее проводили с использованием сопла диаметром 25G. Таким образом, было показано, что выбранная композиция гидрогеля является оптимальной как с точки зрения печатаемости, так и биосовместимости. Полный список параметров и значений, используемых при 3D биопечати, представлен в таблица 7.

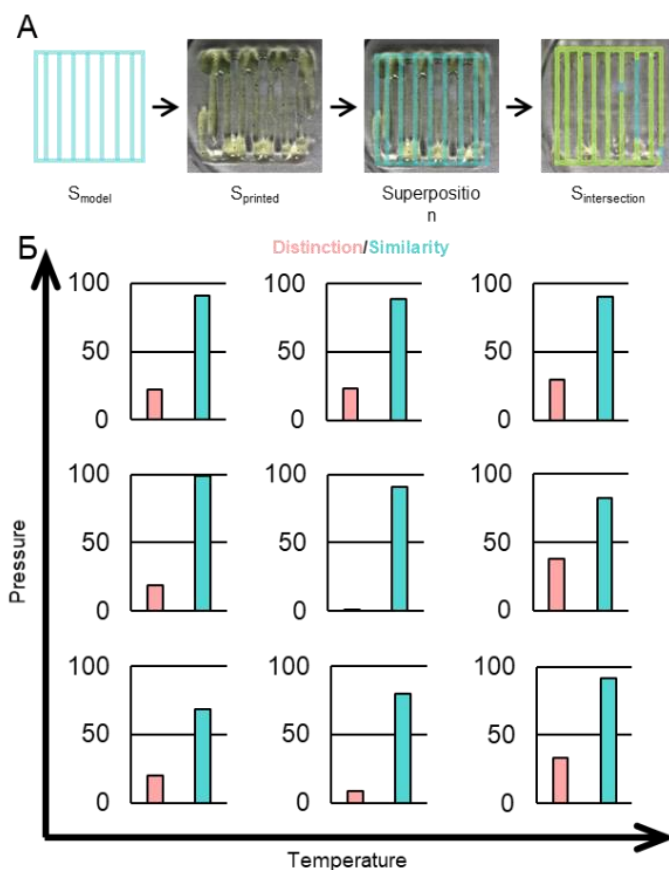


Рисунок 28 – Оценка печатаемости фибрин-желатинового гидрогеля. А – схема, отображающая процесс сбора данных и определяющая  $S_{model}$ ,  $S_{printed}$  и  $S_{intersection}$  для следующих измерений. Б – количественная оценка конструктов, напечатанных при разных давлениях и температурах. Оранжевые столбцы обозначают различия, синие столбцы – сходство между исходной 3D моделью и напечатанным конструктом

Таблица 7 – Параметры, используемые при 3D биопечати фибрин-желатиновым гидрогелем

Параметр	Значение
Mode (режим)	Bioprinting
Nozzle (сопло)	25G
Pressure (давление)	45 kPa
Printhead $t^0$ (температура печатающей головки)	23°C
Printbed $t^0$ (температура платформы)	23°C
Speed (скорость печати)	15 mm/sec
Infill pattern (паттерн заполнения)	Grid
Infill density (плотность заполнения)	13%
Layer height (высота слоя)	0.25 mm
Photocrosslinking wavelength (длина волны фотосшивки)	365 nm
Photocrosslinking mode (режим фотосшивки)	5s at 3cm

Так как в состав биочернил для трехмерной биопечати входили 2 компонента: гидрогелевый и клеточный, далее определяли оптимальные свойства клеточной составляющей. В первую очередь, сравнивали жизнеспособность конструкторов на основе вносимой в биочернила суспензии МСК либо сфероидов МСК. В обоих случаях использовали клетки 4-го пассажа одинаковой концентрации: в случае суспензии МСК - 1 млн клеток/мл, в случае сфероидов – 1000 сфероидов/мл (так же 1 млн клеток/мл). Каждый сфероид состоял из 1000 клеток, сфероиды культивировали до биопечати в течение 3 суток для компактизации. После проведения биопечати клетками либо сфероидами с указанными выше параметрами полученные конструкторы культивировали в течение 3 дней, после чего проводили анализ жизнеспособности качественными (Live/Dead assay) и количественными (AlamarBlue) методами. Помимо напечатанных образцов (группа Bioprinting) исследовали также контрольные группы – конструкторы на основе тех же биочернил, но смешанные вручную (группа Manual mixing) и монослойные культуры/реактивирующиеся сфероиды (группа 2D). Через 3 суток культивирования в клетки на периферии конструктора были жизнеспособны и распластывались, в то время как при удалении в глубь конструктора на 600-800 мкм обнаруживалась зона мертвых клеток (рисунок 29А). Метаболическая активность МСК в гидрогеле на коротком сроке (3 суток) была ожидаемо ниже, чем в монослойной культуре, примерно на 20% (рисунок 29Б). Однако в группе напечатанных конструкторов метаболическая активность была значительно ниже, составляя всего около 60% от контроля (рисунок 29Б). В случае же сфероидов их реактивация происходила медленнее – через 3 суток еще не было выявлено признаков миграции клеток из сфероида в гидрогель (рисунок 29В). При этом метаболическая активность, хотя и имела тенденцию к снижению при введении гидрогеля, не отличалась значимо от контроля (рисунок 29Г) [303].

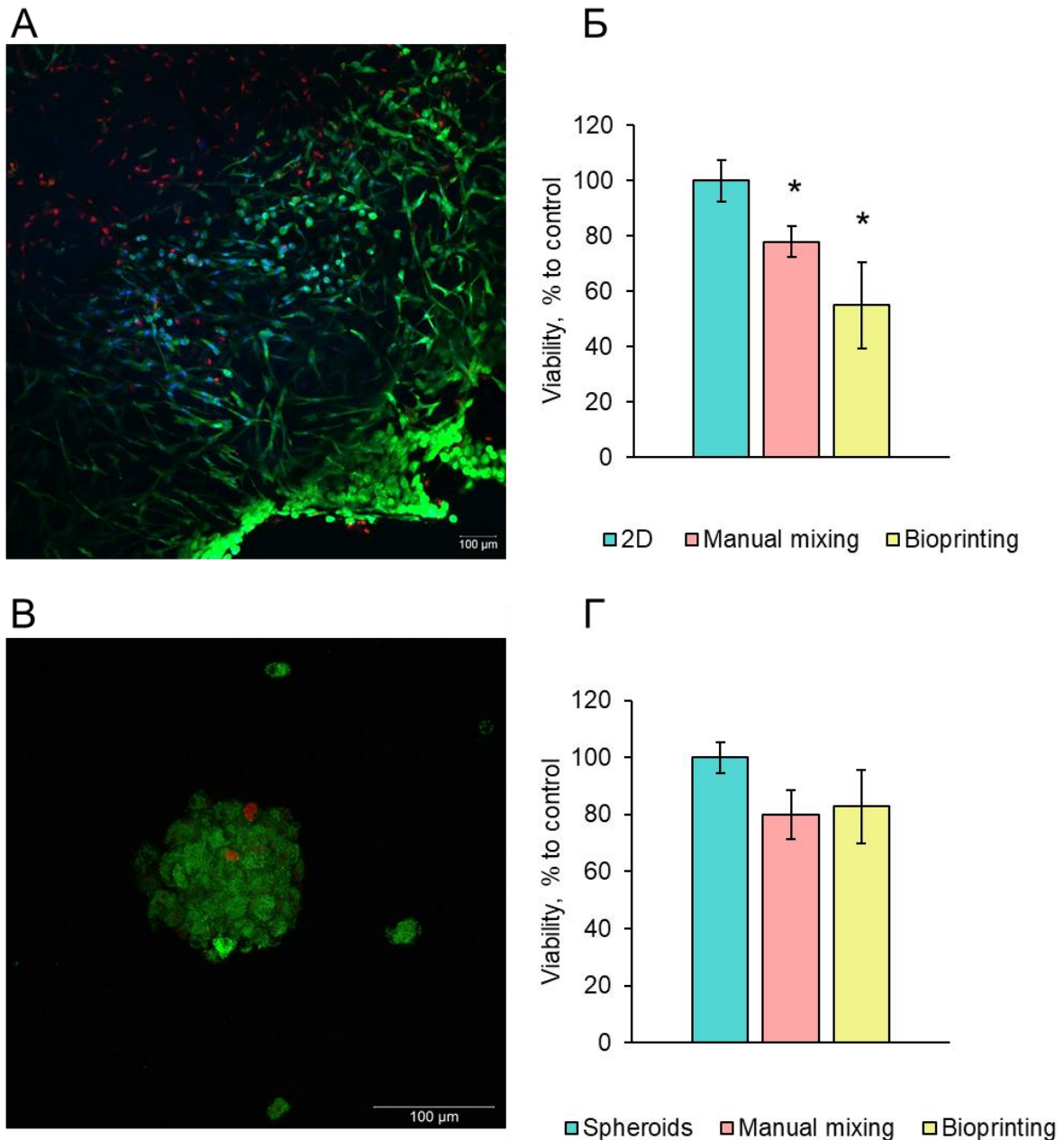


Рисунок 29 – Жизнеспособность клеток и сфероидов после 3D биопечати. А, Б – общая жизнеспособность клеток и сфероидов, соответственно, анализ через 1 сутки культивирования, Live/Dead тест и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. В, Г - метаболическая активность клеток и сфероидов, соответственно, анализ непосредственно после биопечати, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия. \* $p < 0.05$  относительно других образцов в группе

При дальнейшем культивировании сфероидов в напечатанных конструктах было обнаружено, что на 4-5 сутки культивирования происходит деградация гидрогеля в местах нахождения сфероидов, в результате чего они осаждаются на дно лунки и реактивируются, переходя в состояние монослойной культуры (рисунок 30А). Такой эффект был обусловлен предположительно высокой секреторной активностью МСК и влиянием матричных металлопротеиназ на фибрин и желатин. Для избежания предварительной деградации гидрогеля

была протестирована модифицированная среда для конструктов со сниженным содержанием эмбриональной сыворотки (5%) и добавлением апротинина (ингибитор протеаз, 20 мкг/мл). Через 5 суток культивирования в двух вариантах сред не было зафиксировано отличий в метаболической активности сфероидов (рисунок 30Б). Вследствие реактивации части сфероидов при культивировании в стандартной среде наблюдали, с одной стороны, повышенную среднюю метаболическую активность, а с другой стороны – большие разбросы, в то время как модифицированная среда обеспечила стабильность гидрогеля и соответствующие предыдущим результатам значения метаболической активности (рисунок 30Б).

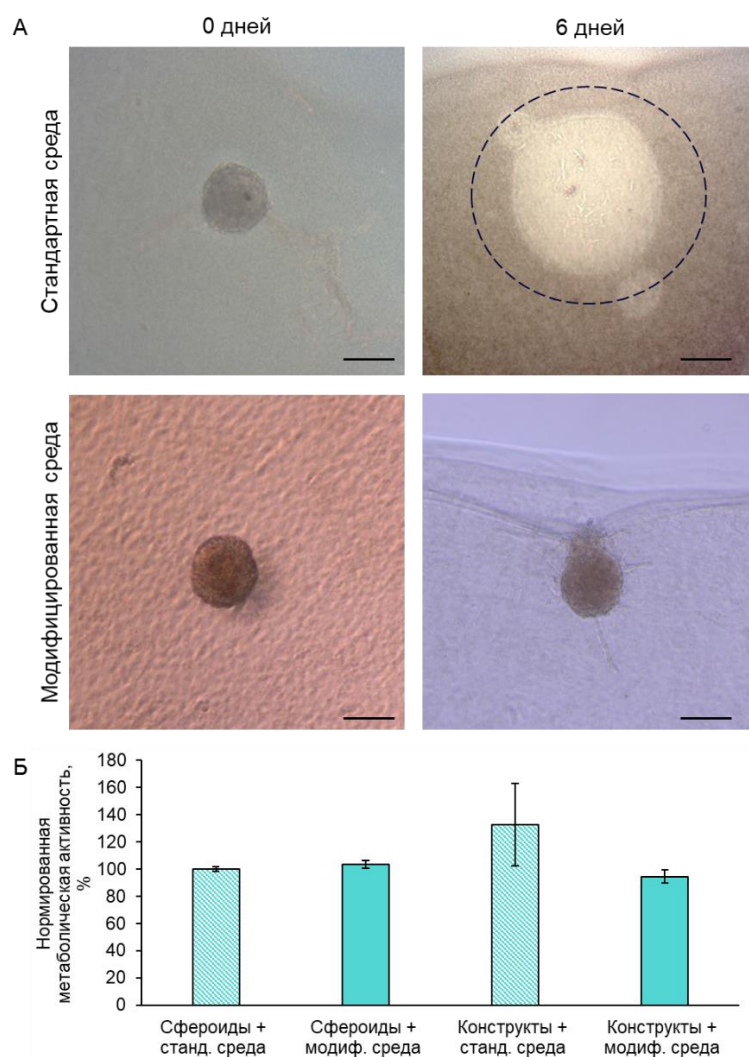


Рисунок 30 – Оптимизация состава ростовой среды для культивирования напечатанных конструктов со сфероидами МСК. А – внешний вид конструктов в разных типах сред, пунктирной линией отмечена область деградации гидрогеля и адгезии клеток к пластику. Б – оценка метаболической активности конструктов в различных типах сред, AlamarBlue тест, спектрофлуориметрия

### 3.4 Исследование свойств конструкций в процессе созревания

На основе разработанных подходов далее формировали конструкции методом 3D биопечати, детальная схема эксперимента представлена рисунком 31. С помощью теста для анализа метаболической активности и количественного анализа ДНК была определена жизнеспособность клеток в конструктах, содержащих гидрогель фибрин+желатин, после биопечати со сфероидами из МСК-Д через 3, 7 и 14 дней культивирования. Параллельно вели 2 контрольные группы – 1 – сфероиды, культивируемые на неадгезивных агарозных планшетах и 2 – сфероиды, смешанные с гидрогелевым компонентом биочернил вручную (с помощью пипетки), без биопечати, которые представляли собой крупные конструкции неправильной формы с нерегулярным распределением сфероидов.

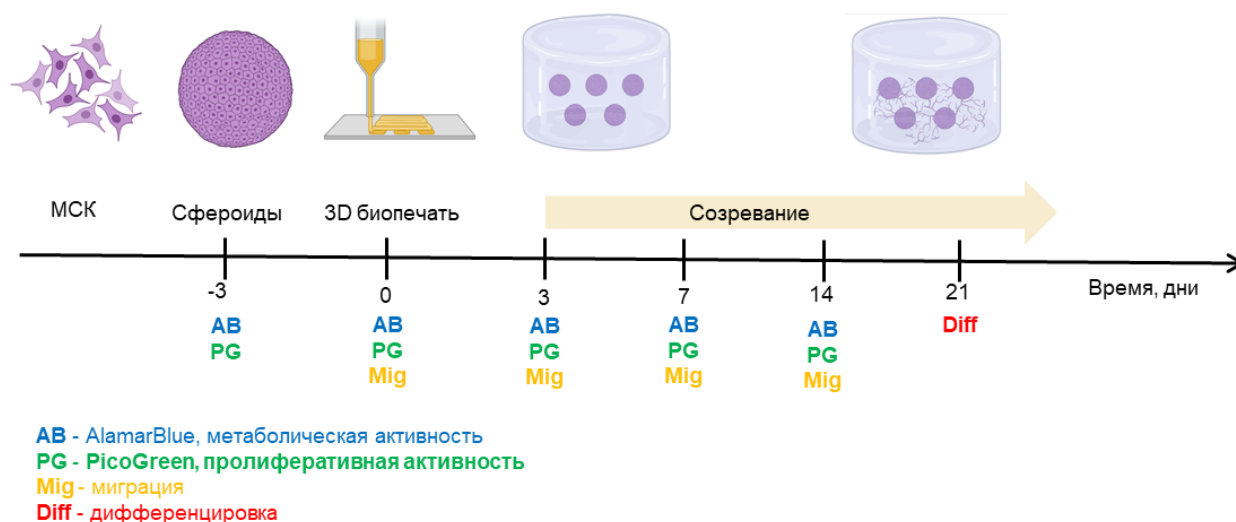


Рисунок 31 – Дизайн эксперимента по 3D биопечати конструкций на основе разработанных биочернил

В группах с гидрогелем наблюдали тенденцию к увеличению метаболической активности и пролиферации на протяжении всего срока культивирования (рисунок 32А, Б). Снижение значений в группе «сфероиды» можно связать, прежде всего, с продолжающейся компактизацией сфероидов и следующими за этим снижением диффузии и гибелью клеток. При этом начиная со срока 3 дня и вплоть до 21 дня культивирования нормированная метаболическая (определяемая как отношение метаболической активности, измеряемой по восстановлению резазурина к количеству ДНК, измеренного с помощью флуоресцентного определения двуцепочечной ДНК PicoGreen) была максимальна в группе «биопринтинг» (рисунок 32В). Это говорит о том, что на протяжении всего срока культивирования напечатанных конструкций со сфероидами из МСК-Д поддерживались активный метаболизм и пролиферация клеток. Нормированная метаболическая активность сфероидов МСК-Д постепенно повышалась в соответствии со сроком культивирования на 100% и 200% для контрольной группы 1 (сфероиды), на 125% и 200% для

контрольной группы 2 (пипетка), и на 75% и 150% для группы биопринтинг (рисунок 32В). Таким образом, в каждый из промежутков культивирования 3-7 дней и 7-14 дней фактически происходило удвоение нормированной метаболической активности. При этом за счет того, что группа Биопринтинг обладала наиболее высокими значениями анализируемых показателей в начале культивирования, в напечатанных конструктах была достигнута и самая высокая метаболическая активность через 14 суток.

Эти данные были подтверждены анализом жизнеспособности Live/Dead - на всех сроках культивирования напечатанные конструкты были жизнеспособны, были обнаружены лишь единичные мертвые клетки в 3-дневных конструктах (рисунок 32Г). С увеличением срока культивирования площадь, занятая клетками, увеличивалась в связи с миграцией клеток из сфероидов в толщу гидрогеля. При этом клетки активно пролиферировали, что было подтверждено иммуноцитохимическим окрашиванием маркера активной пролиферации Ki-67 (рисунок 32Г) [304].

Кроме того, был проведен анализ характерных для МСК маркеров в сфероидов через 14 суток культивирования гидрогеля. В длинных отростках сфероидов обнаруживался виментин – маркер клеток мезенхимы (рисунок 33). Фибронектин, важный для направления миграции клеток по субстрату, наблюдался в больших количествах в зонах спраутинга. Напротив, коллаген I типа, который является одним из основных коллагенов, секретируемых МСК, концентрируется только в центральных областях сфероидов (рисунок 33) [305].

Таким образом, разработанная гидрогелевая система не является цитотоксичной и напротив, поддерживает жизнеспособность, миграцию пролиферацию клеток [306].

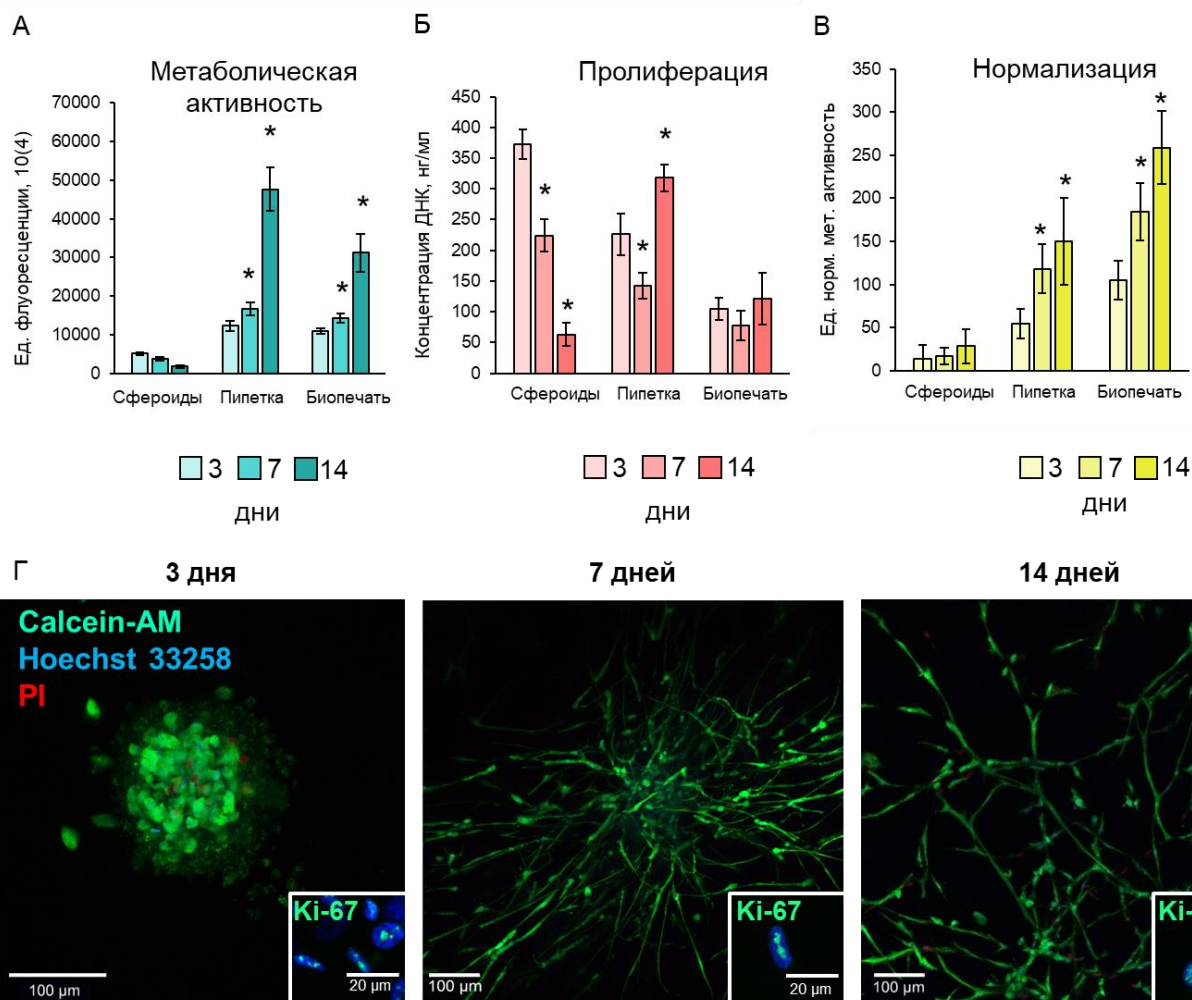


Рисунок 32 – Жизнеспособность напечатанных конструктов на различных сроках и в различных условиях. Группы сравнения: Сфероиды – культивируемые в неадгезивных планшетах (контрольная группа 1), Пипетка – конструкты, смешанные вручную (контрольная группа 2), Биопринтинг – конструкты, напечатанные на экструзионном биопринтере. А – метаболическая активность, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия, Б - пролиферативная активность, PicoGreen тест и спектрофлуориметрия, В – нормированная метаболическая активность, полученная отношением метаболической активности (AlamarBlue тест) к количеству ДНК (PicoGreen тест), Г - жизнеспособность и морфология сфероидов через 3, 7 и 14 дней культивирования, кальцеином окрашены живые клетки (зеленый), йодидом пропидия – мертвые (красный), красителем хёхстом – ядра (синий), Ki-67 (центры активной пролиферации, зеленый), Live/Dead тест/иммуноцитохимия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. \* $p < 0.05$  относительно других образцов в группе

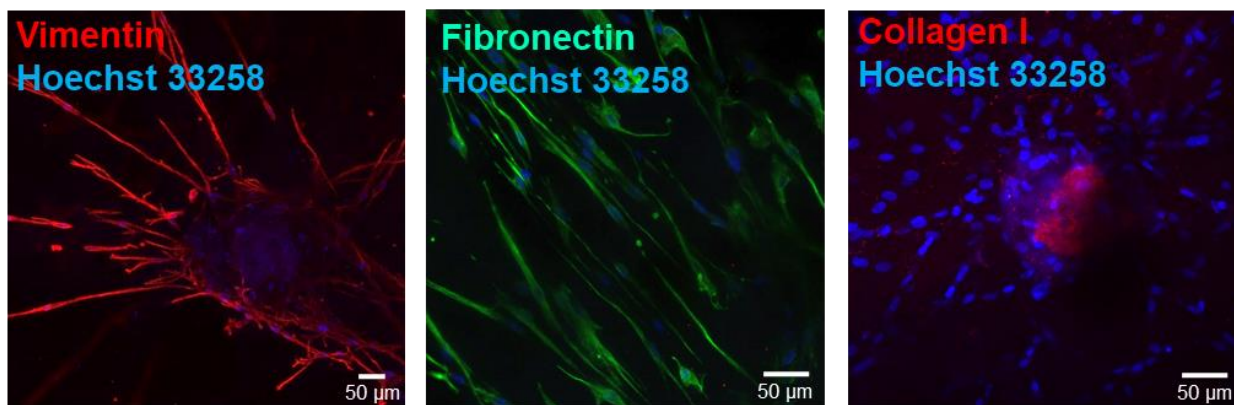


Рисунок 33 – Морфология и наличие характеристических маркеров сфероидов МСК в составе напечатанных конструкций через 14 дней культивирования, иммуноцитохимия и сканирующая лазерная конфокальная микроскопия

При сравнении групп с гидрогелем («Bioprinting» и «Manual mixing») была отмечена разница в динамике реактивации сфероидов, выразившейся в спраутинге – формировании и прорастании отростков в гидрогель. Через 3 суток культивирования было отмечено появление отростков в группе «Manual mixing», в то время как в группе «Bioprinting» на этом сроке сфероиды сохраняли свой округлый вид (рисунок 34). Спраутинг в этом случае начинался на 5-6 день. К 14 суткам культивирования в обеих группах сфероиды имели большое количество длинных отростков, клетки мигрировали от исходного сфероида на расстояния более чем 1000 мкм (рисунок 34).

Дальнейшее детальное сравнение таких параметров, как количество отростков, их суммарная и средняя длина, средняя ширина, среднее количество разветвлений на отросток между группами «Bioprinting» и «Manual mixing» показало разницу в динамике миграции клеток (рисунок 34, 35). В течение 14 дней культивирования количество отростков, их длина и количество разветвлений имеют тенденцию к увеличению, в то время как ширина отростков, напротив, уменьшается (рисунок 35А–Д). В конструкциях, смешанных вручную, сфероиды быстрее развивают отростки, до 10 суток они длиннее и более разветвлены (рисунок 35А–Г). На 3-й день, в отличие от группы напечатанных конструкций, они становятся значительно тоньше (рисунок 35В). Однако при дальнейшем культивировании группа «Bioprinting» достигает тех же значений, и на 14-й день количество разветвлений на отросток в этой группе увеличивается в 1,7 раза (рисунок 35Г). Схема динамики спраутинга сфероидов представлена на рисунок 35Е: сначала появляется небольшое количество утолщенных отростков, затем они удлиняются, становятся тоньше и ветвятся на протяжении всего периода культивирования.

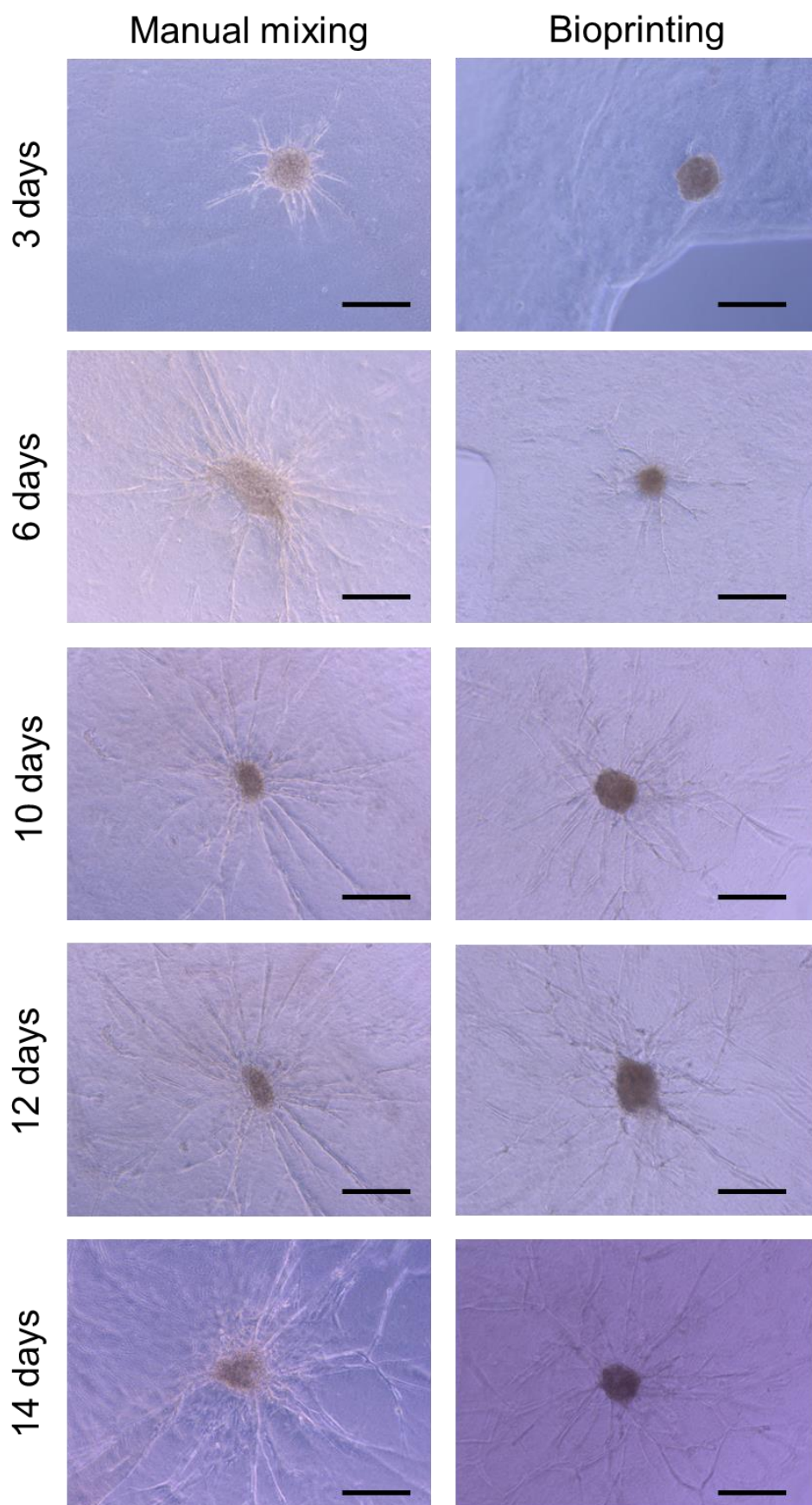


Рисунок 34 – Динамика спраутинга сфероидов и миграции клеток в смешанных вручную/напечатанных конструктах, световая фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм

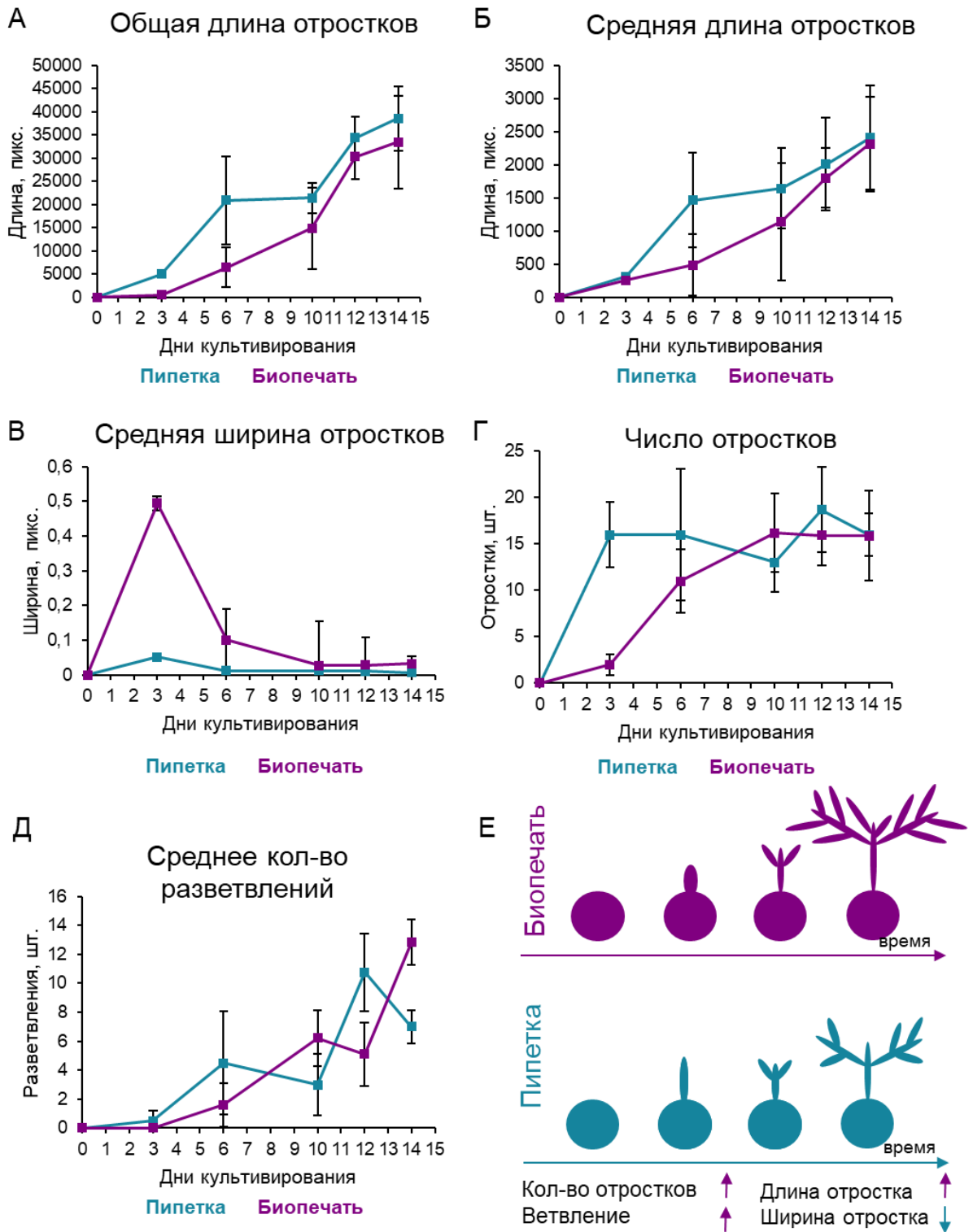


Рисунок 35 – Анализ параметров спраутинга сфероидов и миграции клеток в конструктах в динамике на сроках культивирования от 0 до 14 дней. А – общая длина отростков, Б – средняя длина одного отростка, В – средняя ширина одного отростка, Г – число отростков, Д – среднее число соединений на поле зрения, Е – схема изменения морфологии сфероидов в смешанных вручную/напечатанных конструктах

Далее была протестирована способность сфероидов из МСК к сохранению дифференцировочного потенциала в различных условиях 3 групп. Способность к

дифференцировке в osteo-, хондро- и адипогенном направлениях во всех группах, в то время как отрицательный контроль оставался неокрашенным (рисунок 36А). Для количественной оценки различий между группами проводили экстракцию красителя и колориметрический анализ полученных растворов (рисунок 36Б). Во всех случаях эффективность дифференцировки сфероидов из контрольной группы уступала эффективности гидрогелевых культур. Показано, что в условиях напечатанных конструкций сфероиды из МСК имели наиболее выраженную тенденцию к дифференцировке в остеогенном направлении (рисунок 36Б).

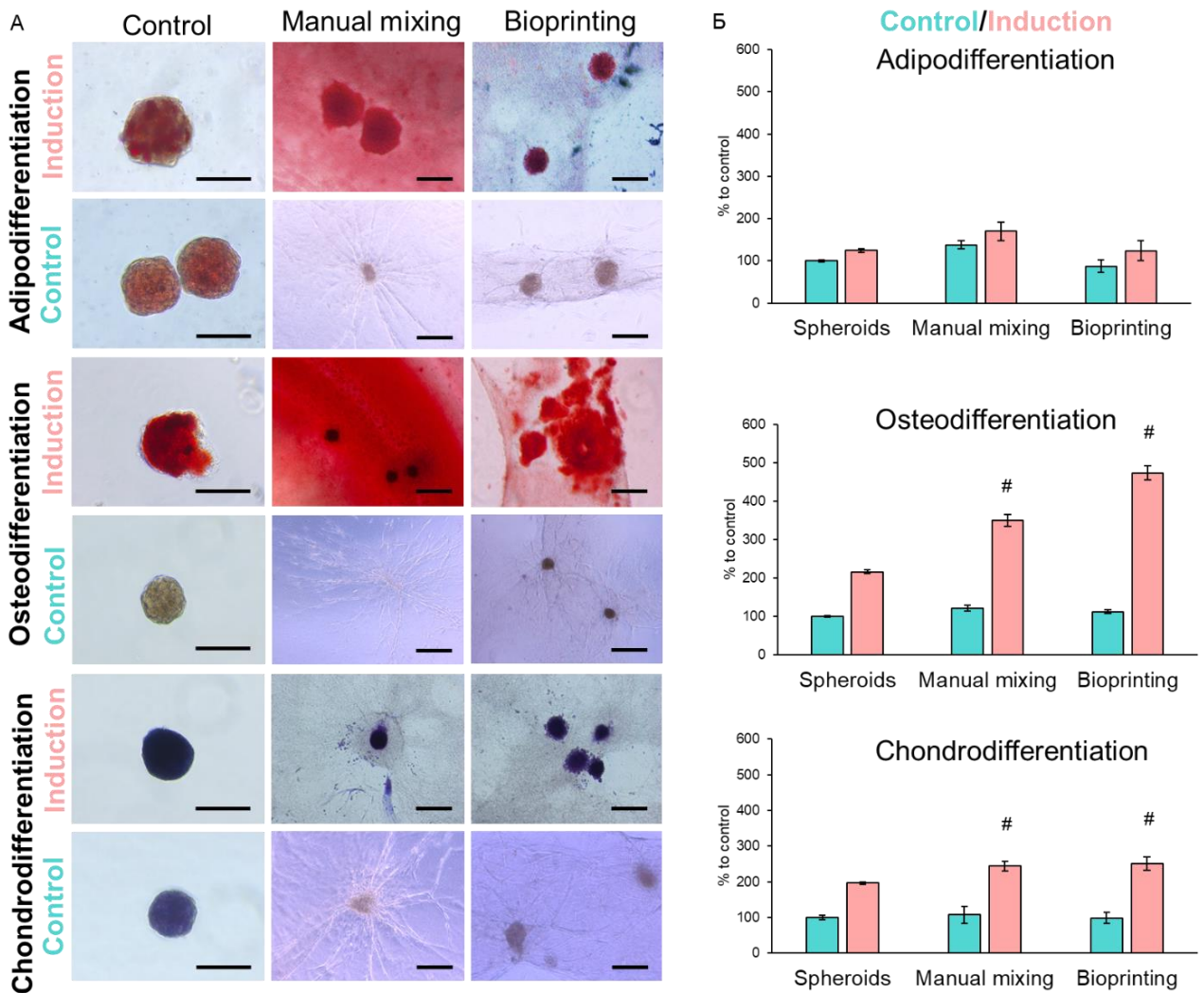


Рисунок 36 – Дифференцировка сфероидов МСК в контрольной группе (сфероиды), смешанных вручную конструктах и напечатанных конструктах. А – окраска масляным красным О (адипогенная дифференцировка), ализариновым красным S (остеогенная дифференцировка) и толуидиновым синим (хондрогенная дифференцировка), световая фазово-контрастная микроскопия, Б – количественная оценка дифференцировки, спектрофотометрия. Масштабный отрезок – 100 мкм

### 3.5 Подбор параметров и определение мишеней фотобиомодуляции в клетках

Клетки в монослойных и трехмерных условиях облучали с помощью немонохроматических светодиодных излучателей LDM-07 (Институт фотонных технологий РАН, Россия) (рисунок 37А). Облучение планшетов с образцами проводили в красном (633 нм, 1200 сек, 2.2 Дж/см<sup>2</sup>) или инфракрасном диапазонах (840 нм, 600 сек, 2.2 Дж/см<sup>2</sup>) после калибровки установки (рисунок 37Б, В). Подробные параметры установки для облучения представлены в таблица 8. Колебания температуры в процессе облучения не превышали десятых долей градуса [307].

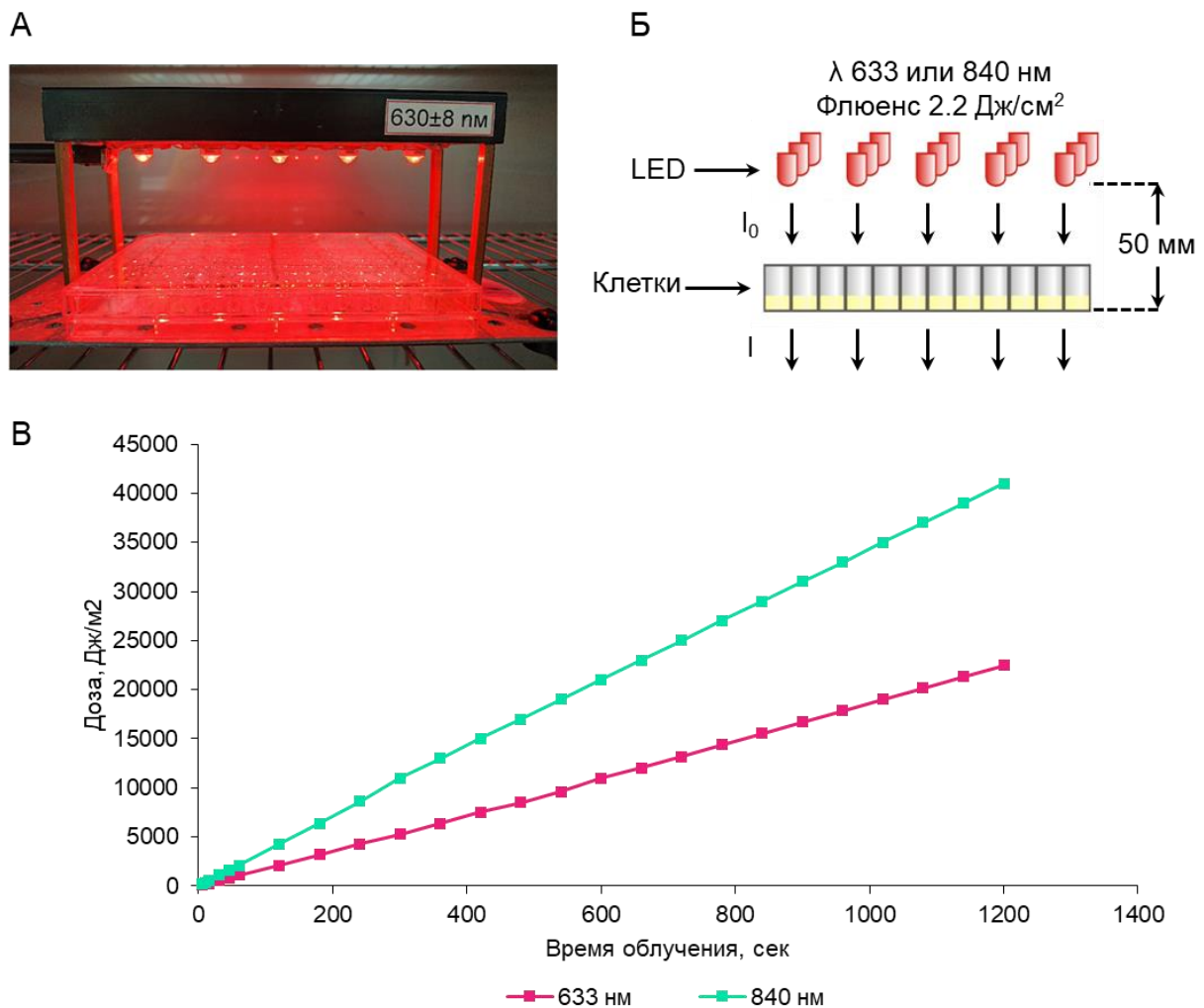


Рисунок 37 – Фотобиомодуляция с использованием установки LDM-07. А – процесс облучения планшета с клетками на установке LDM-07 при длине волны 633 нм, Б – схема матричной установки для облучения клеток, В - калибровочный график зависимости дозы от времени облучения

Таблица 8 – Параметры LED-установок для облучения

<b>Источник света</b>	<b>LED матрица</b>	<b>LED матрица</b>
<b>Длина волны, нм</b>	633±8	840±18
<b>Мощность, мВт</b>	160±20	320±40
<b>Плотность потока, мВт/см<sup>2</sup></b>	1.8±0.2	3.6±0.4
<b>Флюенс (интенсивность), Дж/см<sup>2</sup></b>	2.2±0.2	2.2±0.2
<b>Энергия, Дж</b>	96±10	96±10
<b>Время облучения, сек</b>	1200	600
<b>Число сессий облучения</b>	1	1

Эффекты ФБМ выражаются в основном в воздействии на клетки со сниженной активностью метаболизма. На клеточные популяции, находящиеся в резко неблагоприятных условиях, ФБМ, как правило, не оказывает воздействия. Поэтому первым шагом исследования стал подбор таких ингибиторов клеточного дыхания и их концентраций, которые смогли бы обратимо понизить жизнеспособность клеток. В дальнейшем данные ингибиторного анализа использовали для определения оптимальных доз и условий воздействия ФБМ, а также для определения первичных мишеней ФБМ.

Азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) широко известен как ингибитор IV комплекса электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Для ингибирования жизнеспособности клеток обычно используют концентрации в пределах 100 мМ. При воздействии азид натрия на МСК в течение 24 часов наблюдали постепенное снижение жизнеспособности при увеличении концентрации ингибитора (рисунок 38А). Полулетальная доза составила 50 мМ. Повышение концентрации сопровождалось также снижением плотности клеток и изменением их морфологии в направлении менее распластанных и более ошаренных (рисунок 38Б).

Ротенон – ингибитор I комплекса ЭТЦ митохондрий. В небольших концентрациях его действие сказывается в основном на метаболизме клетки, при повышении дозы и времени воздействия он вызывает апоптоз, известны также накопительные эффекты этого ингибитора. Полулетальная доза ротенона для МСК составила около 1 мкМ, при дальнейшем повышении концентрации жизнеспособность оставалась примерно на уровне 50% (рисунок 38В). Также при воздействии ротенона в течение 24 часов клетки «поджимались», конфлюентность культуры была заметно ниже, чем в контроле (рисунок 38Г). Для ингибирования клеточных культур далее использовали концентрации 0,01 мкМ и 0,1 мкМ (снижающий жизнеспособность на 20%).

Нитропруссид натрия - еще один ингибитор IV комплекса ЭТЦ. При попадании в клетку нитропруссид распадается с образованием большого количества молекул NO, способных

связываться с цитохром с-оксидазой. При воздействии нитропрусида концентрации от 2 до 200 мкМ линейно снижалась жизнеспособность культуры (рисунок 39А), визуальное изменение плотности клеток отмечали с от 25 мкМ (рисунок 39Б). Для дальнейших экспериментов были выбраны точки 25 мкМ (снижает жизнеспособность на 20%) и 100 мкМ.

Цисплатин - широкоиспользуемый противоопухолевый препарат, обладающий цитотоксическим действием за счет связывания с ДНК, ее деградации и последующей индукции апоптоза. При концентрациях цисплатина выше 30 мкМ жизнеспособность клеток начинает быстро снижаться (рисунок 39В). При этом их морфология меняется, клетки становятся более вытянутыми (рисунок 39Г). Далее использовали цисплатин 15 мкМ в качестве более низкой концентрации (снижает жизнеспособность на 20%) и 30 мкМ – в качестве более высокой.

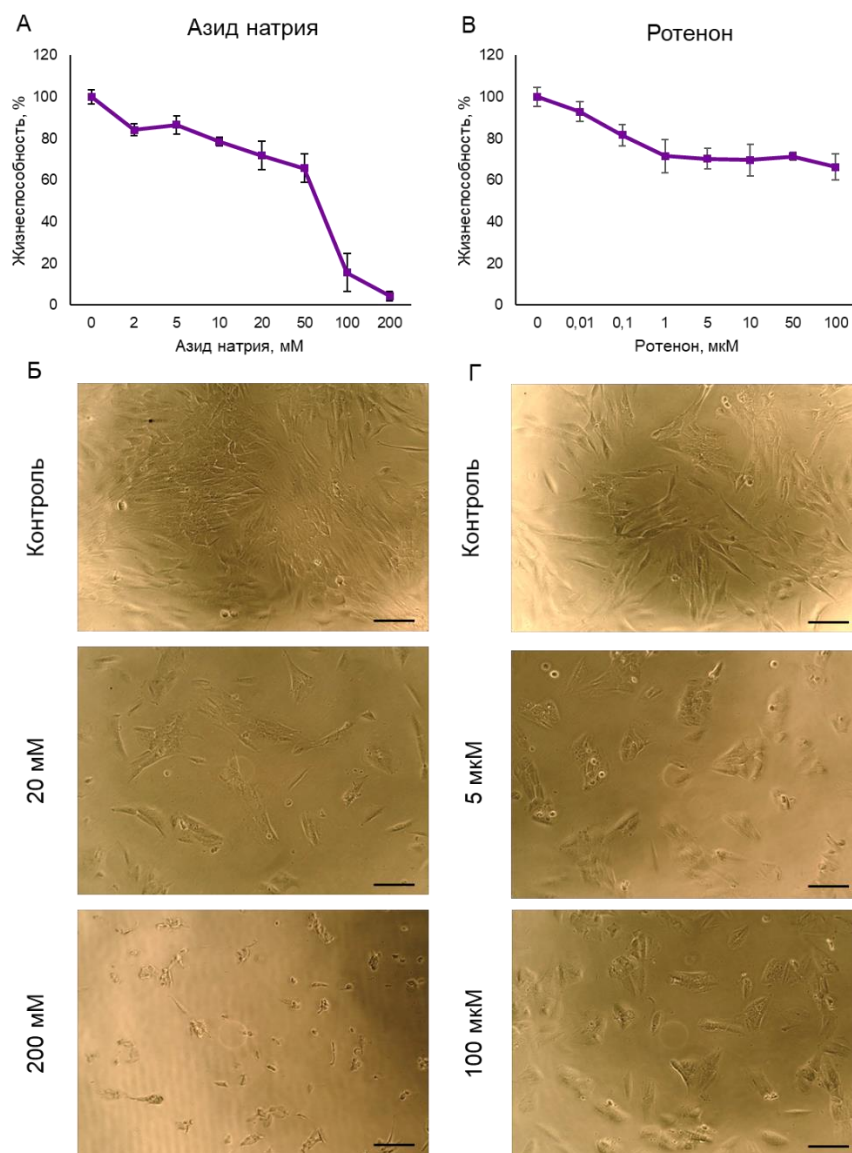


Рисунок 38 – Зависимость жизнеспособности клеток от концентрации токсических агентов. А, Б – кривые выживаемости клеток при 24-часовом воздействии азид натрия и ротенона, соответственно, МТТ-тест и спектрофотометрия, В, Г – внешний вид монослойных культур клеток при 24-часовом воздействии азид натрия и ротенона, соответственно, световая фазово-контрастная микроскопия

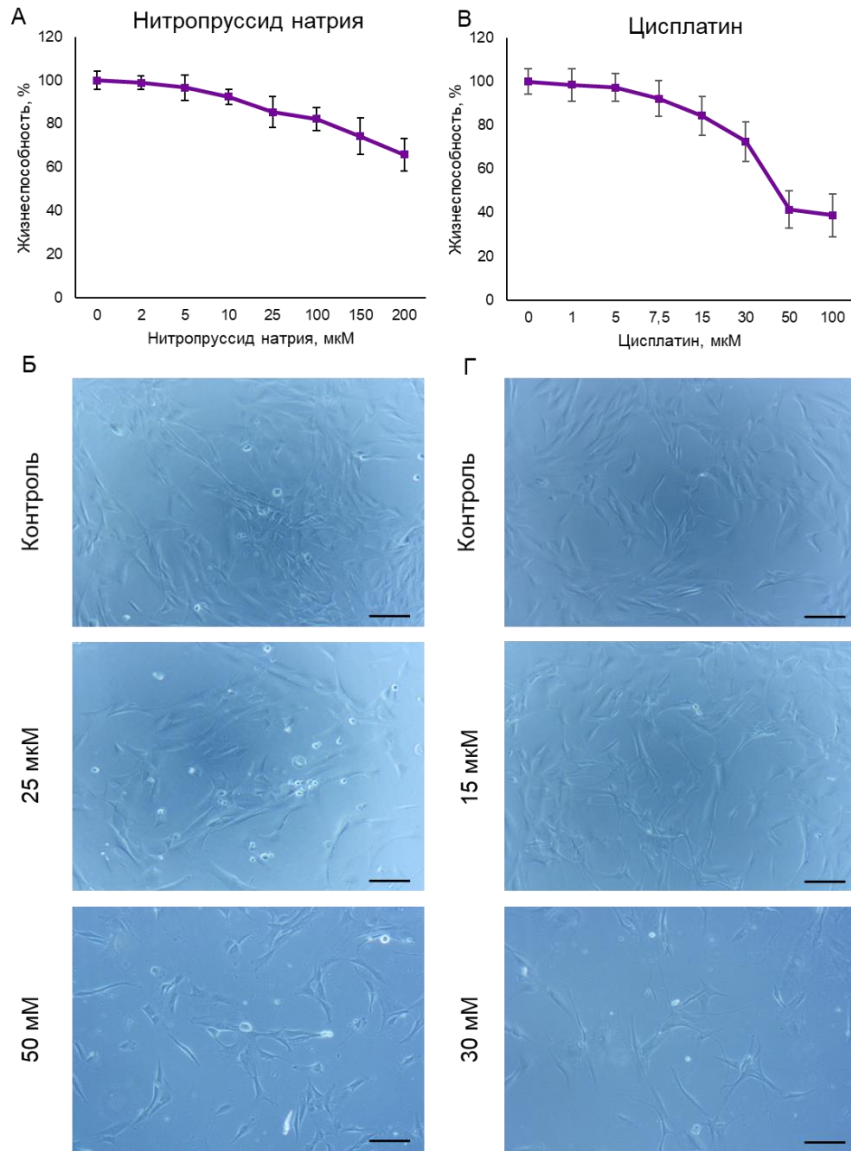


Рисунок 39 – Зависимость жизнеспособности клеток от концентрации токсических агентов. А, Б – кривые выживаемости клеток при 24-часовом воздействии нитропруссиде натрия и цисплатина, соответственно, МТТ-тест и спектрофотометрия, В, Г – внешний вид монослойных культур клеток при 24-часовом воздействии нитропруссиде натрия и цисплатина, соответственно, световая фазово-контрастная микроскопия

Далее оценивали жизнеспособность монослойных культур при воздействии определенных доз ингибиторов и одновременной ФБМ двух различных режимов. Для более корректного трактования результатов использовали 2 различных метода – apoptotic assay (проточная цитофлуориметрия) и МТТ-тест (спектрофотометрия). При первом типе анализа в контрольных образцах жизнеспособность МСК составляла более 95% (рисунок 40А), мертвых клеток – менее 2% (рисунок 40Б), клеток в стадии раннего апоптоза – до 7% (рисунок 40В), суммарная доля апоптотических клеток в популяции не превышала 10% (рисунок 40Г). Стоит отметить, что при воздействии ФБМ на интактные культуры заметно снижалось количество апоптотических клеток (рисунок 40 В,Г).

После ингибирования МСК нитропруссидом низкой концентрации (25 мкМ) и дальнейшей ФБМ снижалась доля клеток в раннем апоптозе (и суммарно апоптотических клеток на 3-5% (рисунок 40В, Г). При воздействии высоких концентраций нитропрусида (100 мкМ) не было выявлено изменений между группами, за исключением влияния ФБМ 840 нм на количество клеток в раннем апоптозе (рисунок 40В).

В случае цисплатина также основные эффекты были отмечены для более низкой концентрации ингибитора и концентрации раннеапоптотических клеток (рисунок 40В). Для более высокой концентрации можно было отметить как снижение количества клеток как в ранней, так и в поздней стадии апоптоза (рисунок 40Б, В), однако вклад в общую жизнеспособность был незначителен (рисунок 40А).

Для ротенона обеих концентраций было выявлено снижение доли клеток в раннем апоптозе примерно на 3% (рисунок 40В).

Более детально были протестированы эффекты ФБМ разных режимов и интенсивности при ингибировании МСК ротеноном (рисунок 41). В контрольных группах с помощью МТТ-теста не было выявлено каких-либо эффектов ФБМ, что подтверждает предыдущие утверждения о наибольшей выраженности ФБМ в условиях стресса. При «мягком стрессе» (ротенон 0.01 мкМ) ФБМ с флюенсом 2.2 Дж/см<sup>2</sup> лучше всего повышала жизнеспособность (на 20-40%). Дальнейшее повышение интенсивности не влияло на жизнеспособность таким образом, а при воздействии высоких доз ротенона – наоборот, способствовало еще большему снижению метаболической активности клеток. Поэтому для дальнейшего исследования был выбран флюенс 2.2 Дж/см<sup>2</sup> как, с одной стороны, безопасный даже в сильных стрессовых условиях, а с другой стороны – наиболее эффективный.

Таким образом, эффекты ФБМ были более выражены в группах, подвергающихся воздействию ингибиторов более низких концентраций (снижающих жизнеспособность клеток не более чем на 20%) [308]. При этом в случае воздействия ротенона и цисплатина более явными оказывались эффекты режима 840 нм, что позволяет предположить механизм ингибирования апоптоза, вовлекающий в себя I комплекс ЭТЦ митохондрий.

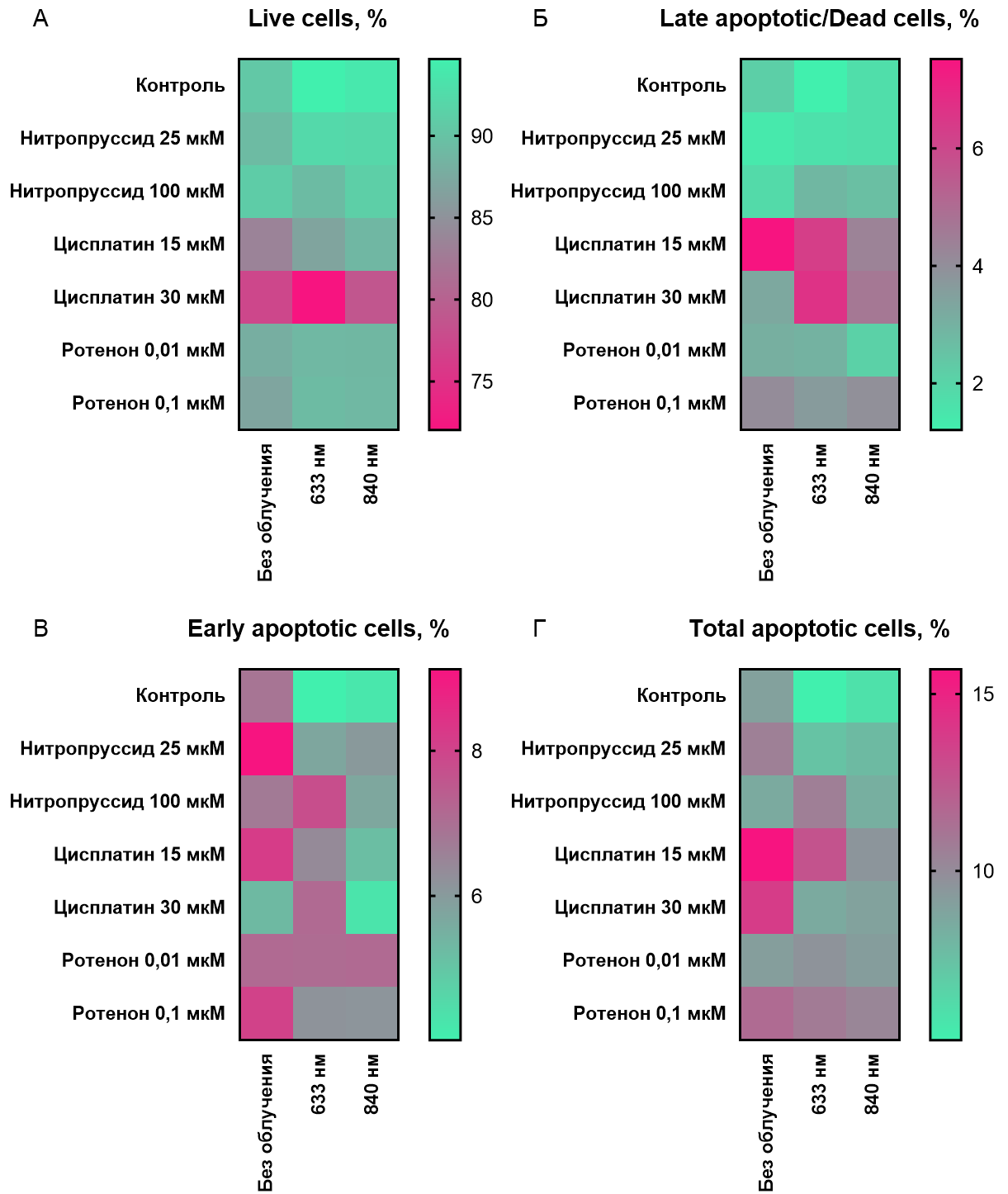


Рисунок 40 – Жизнеспособность клеток при воздействии токсических агентов, А – процент живых клеток в популяции, Б – процент позднеапоптотических/мертвых клеток в популяции, В – процент раннеапоптотических клеток в популяции, Г – суммарный процент апоптотических клеток в популяции, Apoptosis assay, проточная цитофлуориметрия

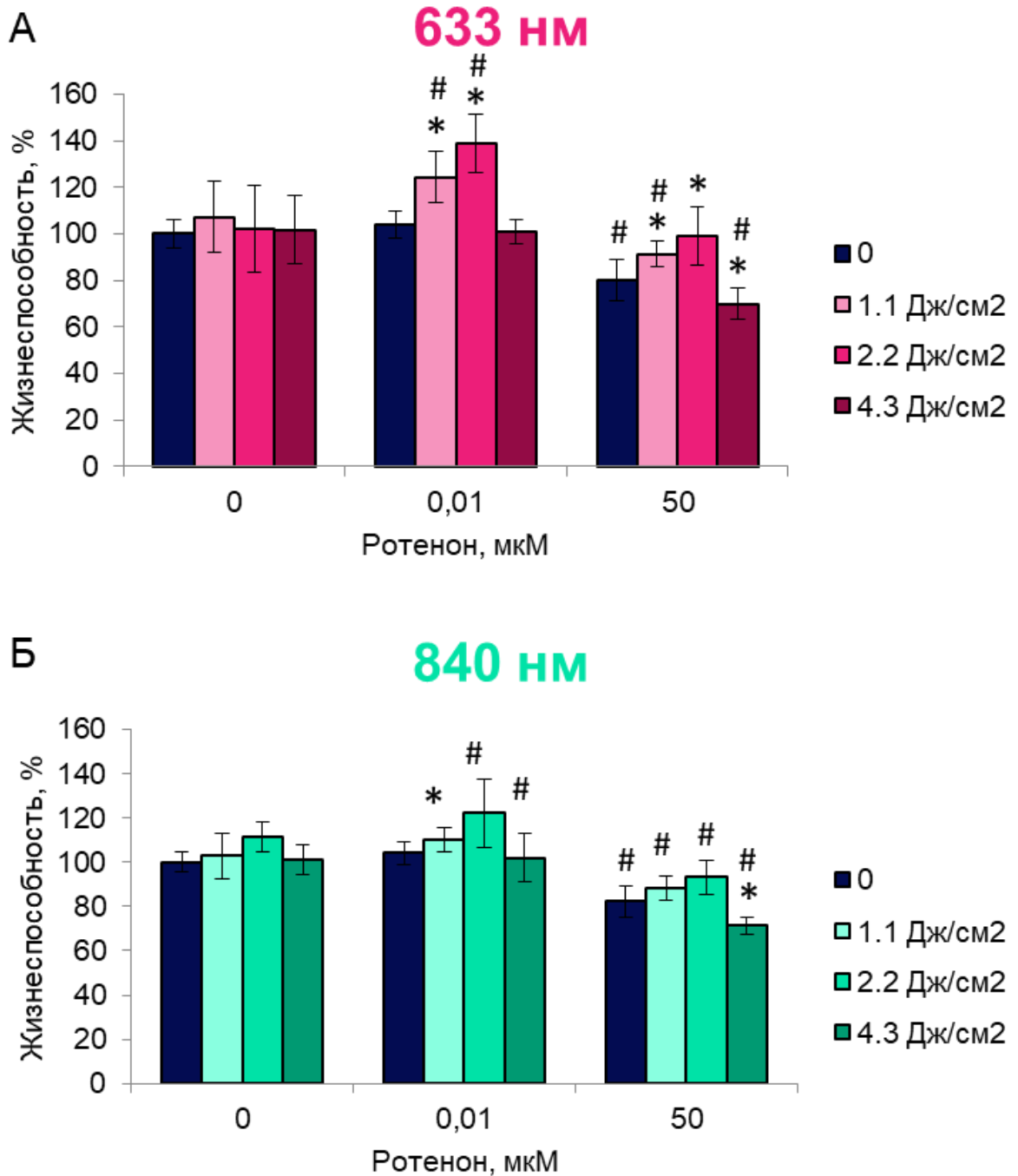


Рисунок 41 – Дозиметрические исследования ФБМ, оценка жизнеспособности клеток после ФБМ различных доз в присутствии/отсутствии ротенона. А – ФБМ в красной области спектра (длина волны 633 нм), Б - ФБМ в ближней ИК области спектра (840 нм). \* $p < 0.05$  относительно других режимов в группе, #  $p < 0.05$  относительно других групп. AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия

С учетом полученных данных относительно оптимальной дозы облучения, тестировали также различные варианты оптимальной временной точки облучения. Для этого использовали один из параметров метаболического профайлинга – OCR (oxygen consumption rate, скорость потребления кислорода), измеренный с помощью Seahorse XF96 Analyzer (Agilent Seahorse XF Cell Metabolic Profiling Kit, Seahorse assay, детали тестов приведены ниже). Монослойные

клеточные культуры подвергали воздействию ФБМ и дальнейшие измерения проводили через 2, 4 или 6 часов (рисунок 42А). Интенсивность аэробного дыхания существенно возрастала через 2 часа после воздействия света с длиной волны как 633 нм, так и 840 нм, и в дальнейшем снижалась (рисунок 42Б). Это указывает на быстрое развитие эффектов ФБМ.

В контрольных условиях также не было зафиксировано значительных изменений после ФБМ ни по данным количественной оценки скорости потребления кислорода митохондриями (Seahorse assay), ни по нормированной метаболической активности (AlamarBlue/PicoGreen) (рисунок 43). При высоких концентрациях обоих ингибиторов (0.1 мкМ и 100 мкМ для ротенона и нитропруссид натрия, соответственно) скорость потребления кислорода снижалась на 40-60%, и ФБМ в этом случае не оказывала никаких эффектов (рисунок 43 А, Б, столбцы "0.1 мкМ ротенон" и "100 мкМ нитропруссид"). Однако при воздействии 0.01 мкМ ротенона и ФБМ в красной области спектра происходило повышение скорости потребления кислорода на 40% - до контрольных значений (рисунок 43 А, столбец "0.01 мкМ ротенон"). В случае действия 25 мкМ нитропруссид натрия, скорость потребления кислорода возрастает на 30%, наоборот, после ФБМ в ближней ИК области (рисунок 43 А, столбец "25 мкМ нитропруссид"). Те же эффекты наблюдали и при исследовании нормированной метаболической активности – она повышалась при ФБМ с длиной волны 633 нм на фоне 6-часового воздействия ротенона 0.01 мкМ, и при ФБМ с длиной волны 840 нм при 2- либо 6-часовом воздействии азида натрия 10 мМ (рисунок 43 Б) [203].

Таким образом, при ингибировании I комплекса ЭТЦ митохондрий более эффективным оказалось ФБМ в красной области спектра, а при ингибировании IV комплекса – в ближней ИК области. Этот феномен можно объяснить тем, что главной мишенью красного света является IV комплекс, и при ингибировании участка ЭТЦ происходит компенсирование недостатка дыхательной активности IV комплексом. Ближний ИК свет, по-видимому, обладает более сложным механизмом, который помимо IV комплекса (так как при ингибировании I комплекса и ИК ФБМ также наблюдаются компенсаторные эффекты) включает и другие мишени, которые стимулируются ФБМ при заблокированной цитохром с-оксидазе.

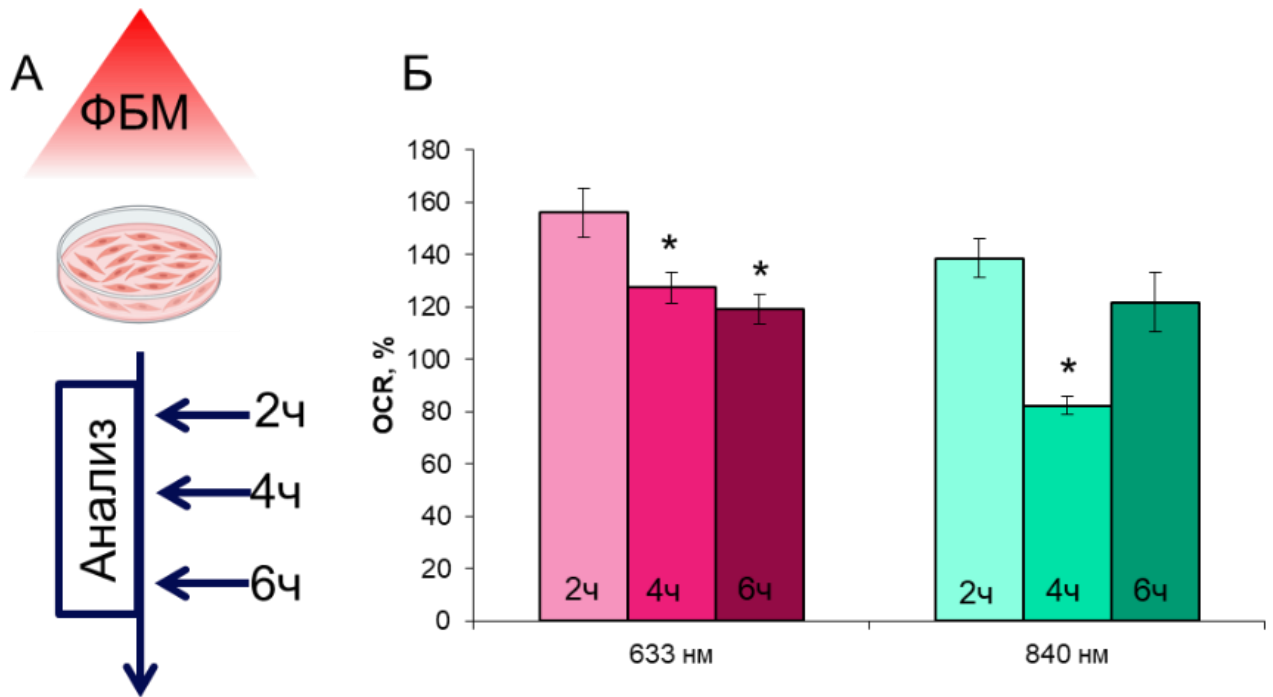


Рисунок 42 – А – схема исследования эффективности ФБМ в зависимости от времени после воздействия. Б - Скорость потребления кислорода интактными клетками (OCR, Oxygen Consumption Rate) через 2, 4 и 6 часов после воздействия (Seahorse assay).

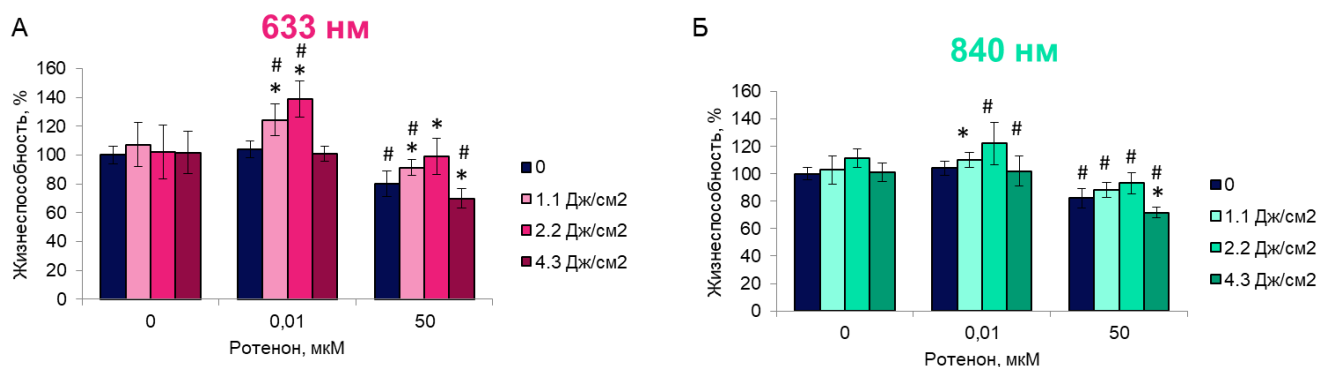


Рисунок 43 – А – нормированная метаболическая активность клеток, полученная отношением метаболической активности (AlamarBlue assay) к количеству ДНК (PicoGreen). ФБМ проводили одновременно с добавлением ингибиторов (ротенон 0.01 мкМ и азид натрия 10 мМ), анализ проводили через 2 либо через 6 часов. \* $p < 0.05$  относительно других режимов в группе. Б - Скорость потребления кислорода клетками (OCR, Oxygen Consumption Rate) через 2 часа после ФБМ на фоне суточных воздействий ротенона и нитропрусида натрия (ингибиторы дыхательной цепи митохондрий). Seahorse assay. \* $p < 0.05$  относительно других режимов в группе, #  $p < 0.05$  относительно других групп.

Так как энергетический метаболизм является основополагающим для множества клеточных процессов, далее более детально был проведен анализ влияния ФБМ на метаболизм МСК в стрессовых условиях с помощью тестов Seahorse. Принцип технологии Agilent Seahorse SF заключается в измерении концентраций кислорода и протонов во внеклеточной среде (и, следовательно, скорости потребления кислорода и закисления среды) в режиме реального

времени с помощью сенсора, помещаемого в лунки планшета. XF Cell Mito Stress Test применяется для оценки функции митохондрий в различных условиях. Производится оценка сразу нескольких ключевых параметров метаболизма, включая базовое дыхание, АТФ-опосредованное дыхание и резервная дыхательная способность (spare respiratory capacity, SRC). SRC часто используется для оценки способности клеток адаптироваться к стрессовым энергетическим условиям при процессах активации, дифференцировки и/или пролиферации, и таким образом участвует в определении судьбы клеток. Для проведения теста после измерения в стартовых (контрольных) условиях (измерение базового дыхания) происходит серийное добавление олигомицина (ингибитор АТФ-синтазы, оценка АТФ-опосредованного дыхания), FCCP (деполяризует мембрану митохондрий, оценка максимального дыхания) и ротенона + антимицина А (ингибируют I и III комплексы митохондрий, оценка немитохондриального дыхания). Разница между максимальным и АТФ-опосредованным дыханием определяет SRC (рисунок 44А). При воздействии ФБМ на клетки в контрольных условиях (без воздействия ингибиторов) не было зафиксировано значимых различий (рисунок 44Б). Добавление нитропрусида не вызывало значительных изменений в общей картине, однако при воздействии более высокой концентрации отмечали повышение максимального дыхания в группе 840 нм (рисунок 44 В, Г). Цисплатин, напротив, приводил к повышению всех параметров, включая базовое дыхание. В то время как при влиянии высокой концентрации эффектов отмечено не было, при более низкой ФБМ обоих режимов обеспечивала более высокое максимальное дыхание и SRC, соответственно (рисунок 44 Д, Е).

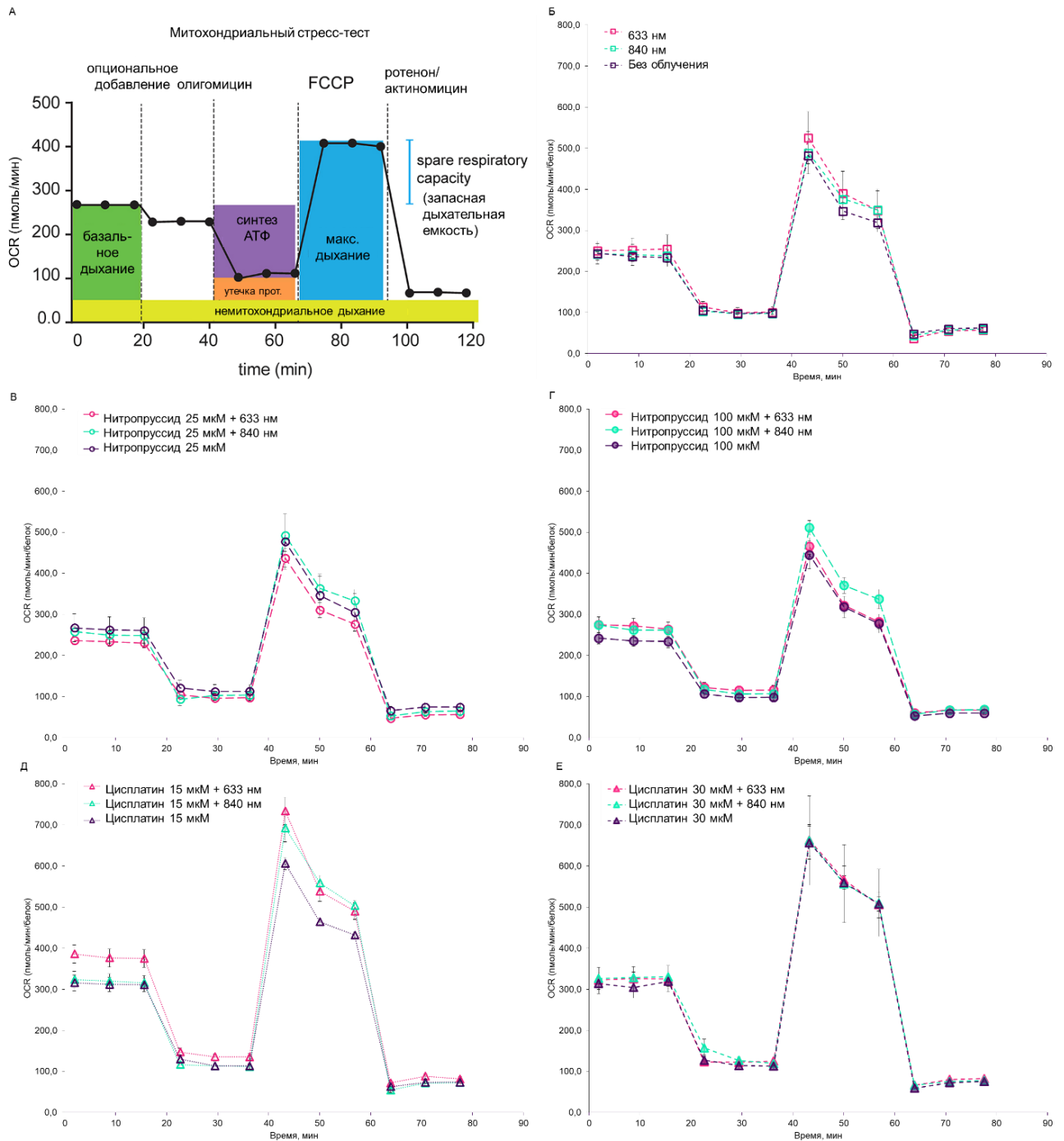


Рисунок 44 – Профиль стресс-теста митохондрий, полученный на Agilent Seahorse XF, показывающий ключевые параметры функции митохондрий. А – общая схема характеристики метаболического потенциала, адаптировано из 10.1016/j.xcrp.2021.100386, Б – метаболический потенциал контрольной группы (только ФБМ), В-Е – метаболический потенциал при воздействии токсических агентов

XFp Cell Energy Phenotype Test позволяет измерить митохондриальное дыхание и гликолиз в базовых и стрессовых условиях и определить 3 ключевых параметра энергетического метаболизма клетки: базовый фенотип, стрессовый фенотип и метаболический потенциал (рисунок 45А). При этом измеряется скорость потребления кислорода (Oxygen Consumption Rate, OCR) – скорость снижения концентрации кислорода в среде, показывает скорость

митохондриального дыхания. Скорость внеклеточного закисления (Extracellular acidification rate, ECAR) – скорость повышения концентрации протонов (либо снижения pH) в среде, показывает скорость гликолиза. Базовый фенотип – значения OCR и ECAR в стартовых (контрольных) условиях измерений; стрессовый фенотип - значения OCR и ECAR при индуцированном запросе митохондрий на энергию (в присутствии стрессовых агентов); метаболический потенциал – процент превышения стрессового OCR над базовым и стрессового ECAR над базовым. Метаболический потенциал отражает то, на сколько клетка способна адаптироваться к условиям повышенной необходимости в энергии путем дыхания и гликолиза. Для определения данных параметров после измерения базовых значений одновременно добавляется олигомицин (ингибирует АТФ-синтазу и вызывает компенсаторное повышение скорости гликолиза для получения достаточного количества энергии) и FCCP (деполяризует мембрану митохондрий, приводя к повышению скорости потребления кислорода вследствие попытки восстановить мембранный потенциал митохондрий).

В соответствии с ожидаемыми результатами, при проведении теста наблюдали переход клеток в более энергетическое состояние, сопровождающееся повышением ECAR и OCAR (рисунок 45Б). При воздействии нитропрусида значения ECAR в среднем были немного выше по сравнению с контролем, а группа 840 нм в стрессовом состоянии в случаях обеих концентраций оказывалась в наиболее «энергетическом» положении (рисунок 45 В, Г). Интересно, что для цисплатина наблюдали другие эффекты: добавление этого агента вызывало значительное увеличение OCR. В то время как для более высокой концентрации цисплатина снова не наблюдали выраженных эффектов ФБМ, при 15 мкМ и группа 633 нм, и группа 840 нм обеспечивали более высокий метаболический потенциал (рисунок 45 Д, Е) [309].

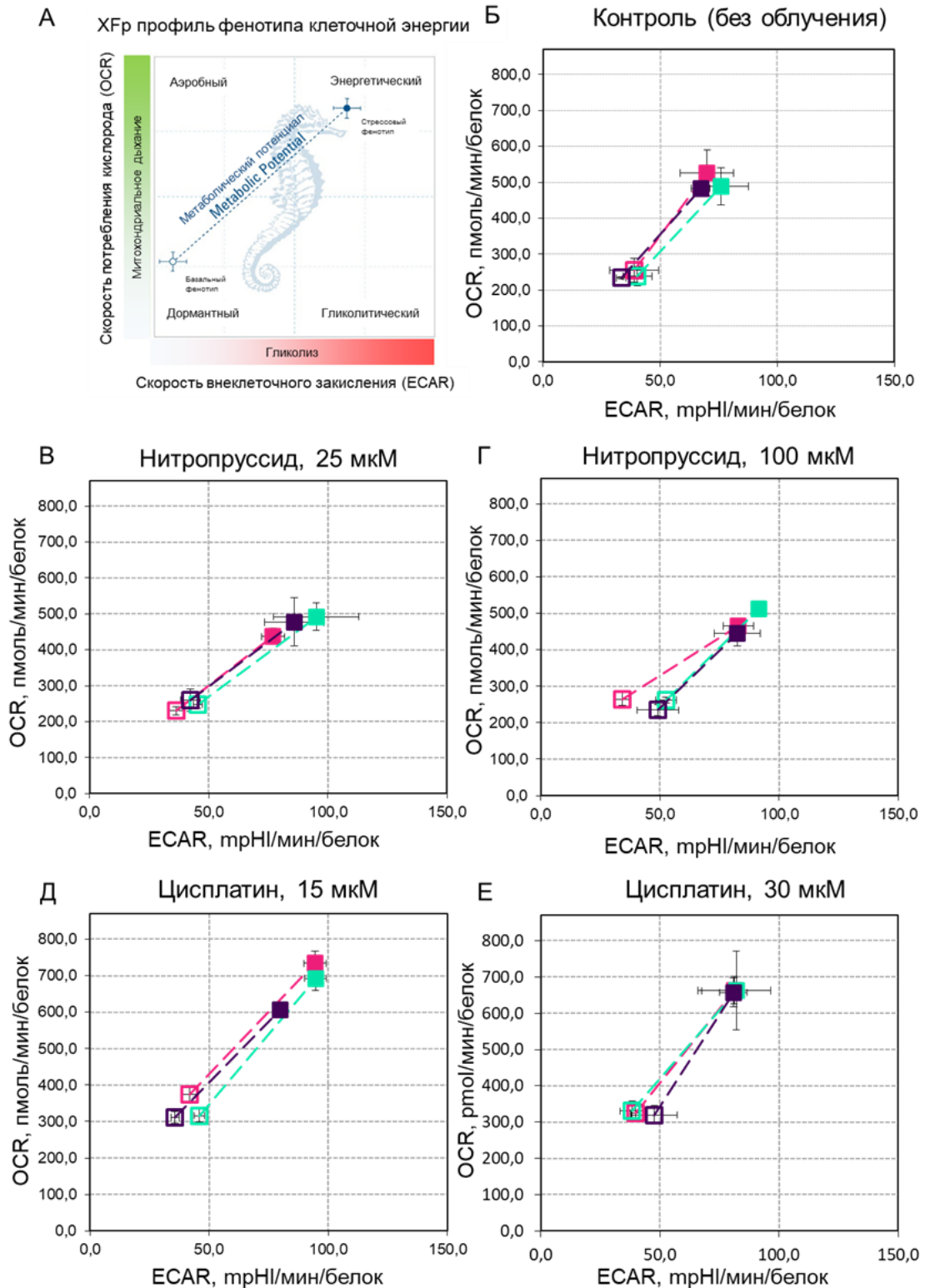


Рисунок 45 – Профиль фенотипа энергии клеток, полученный на Agilent Seahorse XF. Относительное использование двух энергетических путей клетки популяции определяют как в исходных (базовый фенотип), так и в стрессовых (стрессовый фенотип) условиях. Ответом на индуцированную потребность в энергии является их метаболический потенциал. А – общая схема характеристики метаболического потенциала, Б – метаболический потенциал контрольной группы (только ФБМ), В-Е – метаболический потенциал при воздействии токсических агентов

### 3.6 Разработка комплексного протокола 3D биопечати и фотобиомодуляции и исследование эффектов фотобиомодуляции в напечатанных конструктах

С учетом полученных результатов далее исследовали влияние ФБМ на трехмерные культуры в направлении усложнения: клетки в гидрогеле, сфероиды, сфероиды в гидрогеле (3D биопечать). При помещении клеток в гидрогель с повышенной толщиной (3 мм против стандартных 1.5 мм) и концентрацией фибриногена (50 против 25 мг/мл) метаболическая активность клеток ожидаемо понижалась на 20-30% (рисунок 46А) вследствие затрудненной диффузии кислорода и питательных веществ. Для пролиферации клеток наиболее стрессовыми условиями оказался утолщенный гидрогель, в котором число обнаруженной ДНК было значительно ниже, чем в контроле (рисунок 46Б). Однако ФБМ оказалась способна частично обратить этот эффект – в образцах, подверженных ФБМ в красной и ближней ИК области концентрация ДНК была выше на 15% и 40%, соответственно (рисунок 46Б) [310,311]. С этими данными коррелирует также активность митохондрий МСК, оцененная по общей интенсивности флуоресценции митохондриального красителя MitoTracker Green. Данный краситель аккумулируется в активных митохондриях живых клеток, ковалентно связываясь с тиольными группами митохондриальных белков. Таким образом, возможно количественно оценить число функциональных митохондрий в популяции клеток. В начальном периоде измерения различия между режимами находятся в пределах ошибки, однако после пересечения отметки 180 минут (3 часа) заметно увеличение активности митохондрий, подверженных ФБМ 840 нм, по сравнению с контролем и ФБМ 633 нм (рисунок 46В) [312]. В целом, это коррелирует с данными скорости поглощения кислорода клетками в монослойной культуре.

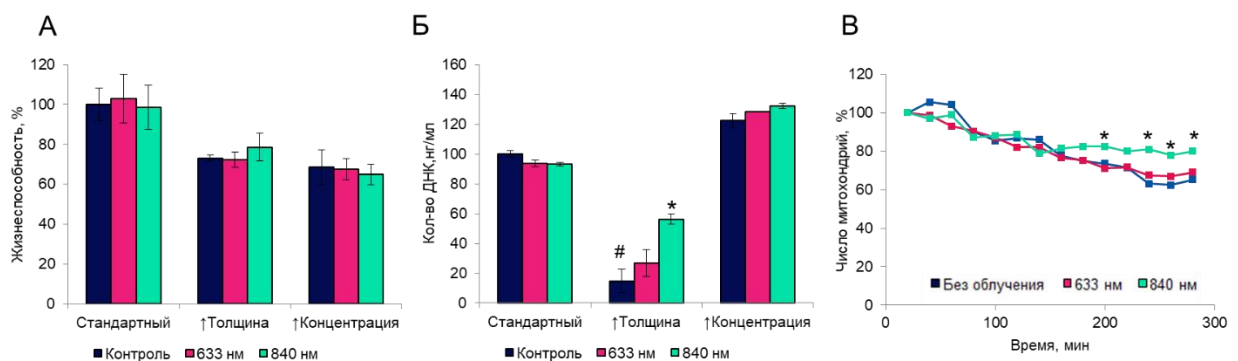


Рисунок 46 – Влияние ФБМ на клетки, инкапсулированные в модифицированный фибриновый гидрогель. А – метаболическая активность (AlamarBlue тест), Б - пролиферация (PicoGreen тест) через 3 суток культивирования. Стандартный – толщина 1.5 мм, концентрация 25 мг/мл; ↑толщина – утолщенный, 3 мм и 25 мг/мл; ↑концентрированный – 1.5мм и 50 мг/мл. В – динамика активности митохондрий МСК-Д в течение 5 часов после ФБМ, цейтраферная флуоресцентная съемка. \* $p < 0.05$  относительно других режимов в группе, #  $p < 0.05$  относительно других групп

Для исследования эффектов ФБМ на физиологическую активность сфероидов провели ряд тестов на метаболическую (AlamarBlue assay), пролиферативную (PicoGreen assay) и функциональную активность (АТФ assay, реактивация сфероидов) МСК в составе сфероидов. В целом, метаболическая активность сфероидов и продукция АТФ в 3 различных группах (контроль, 633 нм и 840 нм) находилась на одном уровне (рисунок 47А, Б). Однако, пролиферативная активность в группе 840 нм оказалась несколько ниже (рисунок 47В). Схожая тенденция наблюдается и для динамики реактивации сфероидов (рисунок 47Г). Эти данные могут говорить об изменении состояния клеток при воздействии ФБМ 840 нм и их переходе от пролиферации и миграции к другим физиологическим состояниям (например, дифференцировке).

Реактивация сфероидов на поверхности пластика происходила в основном за счет миграции групп клеток единым фронтом на большие расстояния (рисунок 48). Клетки передвигались быстро, к 4-ым суткам (96ч) отдельные клетки мигрировали на расстояния до 1500 мкм [313].

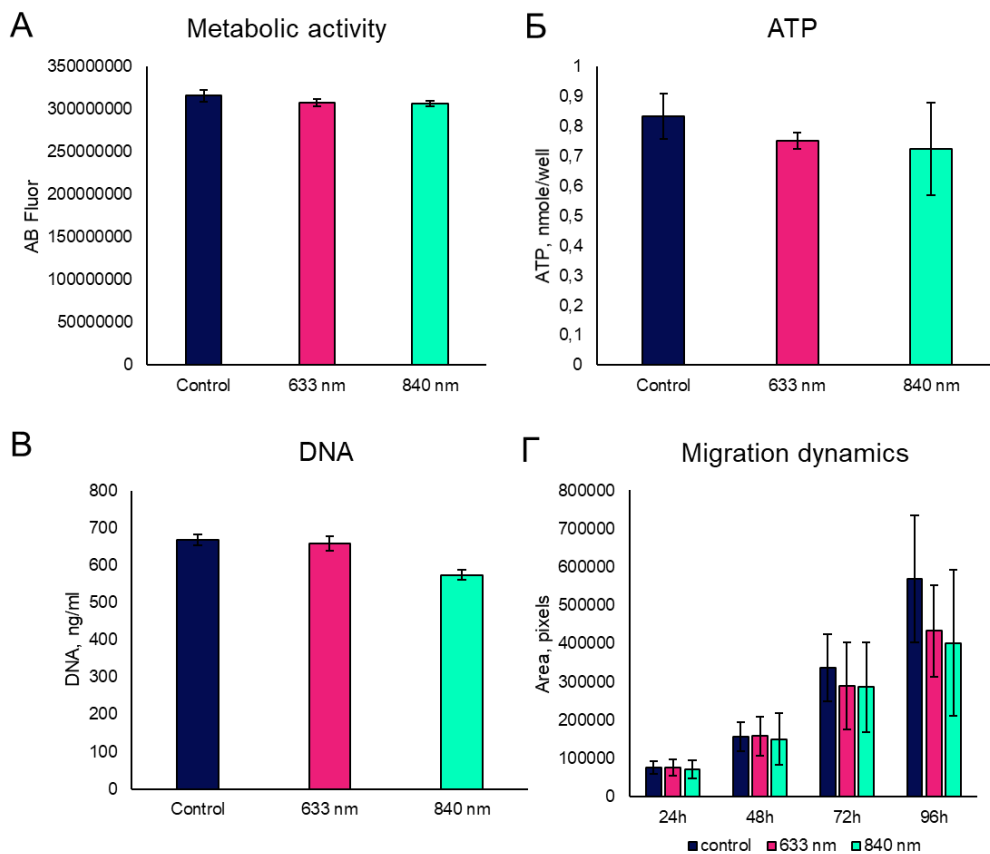


Рисунок 47 – Оценка воздействия ФБМ на клеточные сфероиды. А – оценка метаболической активности (AlamarBlue тест), Б – оценка концентрации АТФ (АТФ тест), В – оценка концентрации ДНК (PicoGreen тест), Г – оценка динамики реактивации сфероидов и миграции клеток. Control – контроль (без воздействия ФБМ), 633 nm – ФБМ с длиной волны 633 нм, 840 nm – ФБМ с длиной волны 840 нм

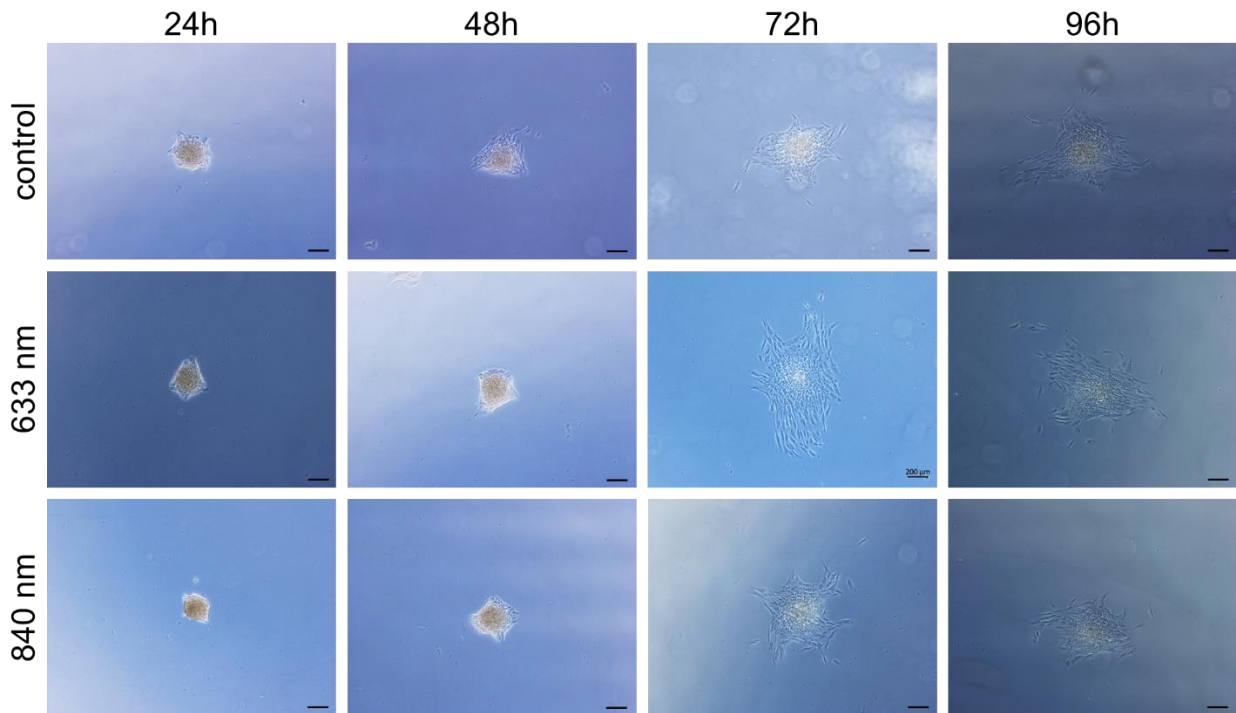


Рисунок 48 – Динамика реактивации сфероидов и миграции клеток (24ч, 48ч, 72ч, 96ч). Control – контроль (без воздействия ФБМ), 633 nm – ФБМ с длиной волны 633 нм, 840 nm – ФБМ с длиной волны 840 нм. Световая фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок = 200 мкм

Далее схожие методы анализа были применены для напечатанных конструктов, содержащих сфероиды из МСК. На протяжении первых 3 дней культивирования как контроль, так и группы, подверженные ФБМ, были малоактивны, что согласуется с предыдущими данными. Метаболическая активность, концентрация АТФ и ДНК, площадь покрытия оставались примерно на одном уровне от 1 до 3 дня культивирования (рисунок 49). Однако стоит отметить, что концентрация АТФ уже спустя 24ч после биопечати оказалась выше примерно на 50% по сравнению с контролем (рисунок 49Б). При дальнейшем культивировании все эти параметры возрастали, причем во всех случаях более выраженные эффекты наблюдали для группы 840 нм. Были отмечены повышение метаболической активности на 20% (рисунок 49А), АТФ на 60% (рисунок 49Б), концентрации ДНК на 70% (рисунок 49В) и миграционной активности на 50% (рисунок 49В) по сравнению с контрольной группой через 14 суток культивирования. Клетки в составе сфероидов обладали высокой жизнеспособностью, и в результате активной миграции клеток происходил сначала спраутинг сфероидов, а затем дальнейшее образование тубул и расселение клеток по объему гидрогеля (рисунок 50) [314].

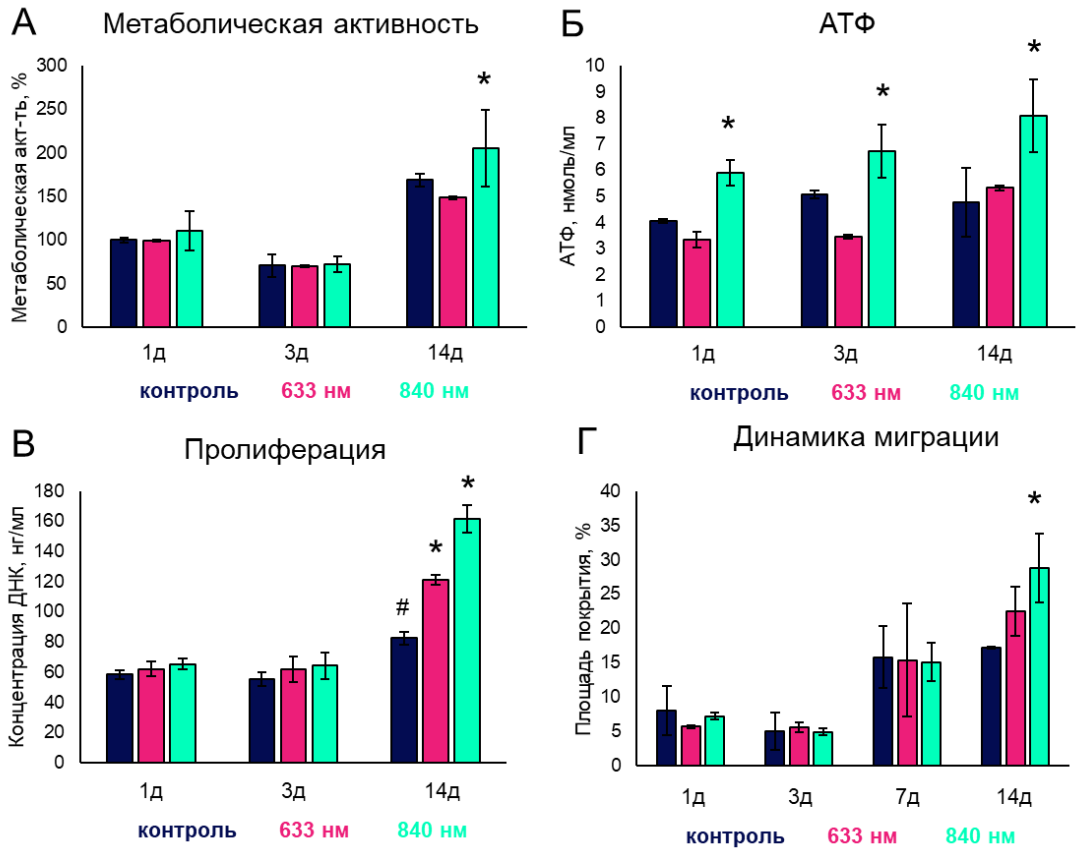


Рисунок 49 – Оценка воздействия ФБМ на напечатанные конструкции. А – оценка метаболической активности (AlamarBlue тест), Б – оценка концентрации АТФ (АТР тест), В – оценка концентрации ДНК (PicoGreen тест), Г – оценка динамики реактивации сфероидов и миграции клеток. Control – контроль (без воздействия ФБМ), 633 nm – ФБМ с длиной волны 633 nm, 840 nm – ФБМ с длиной волны 840 nm.

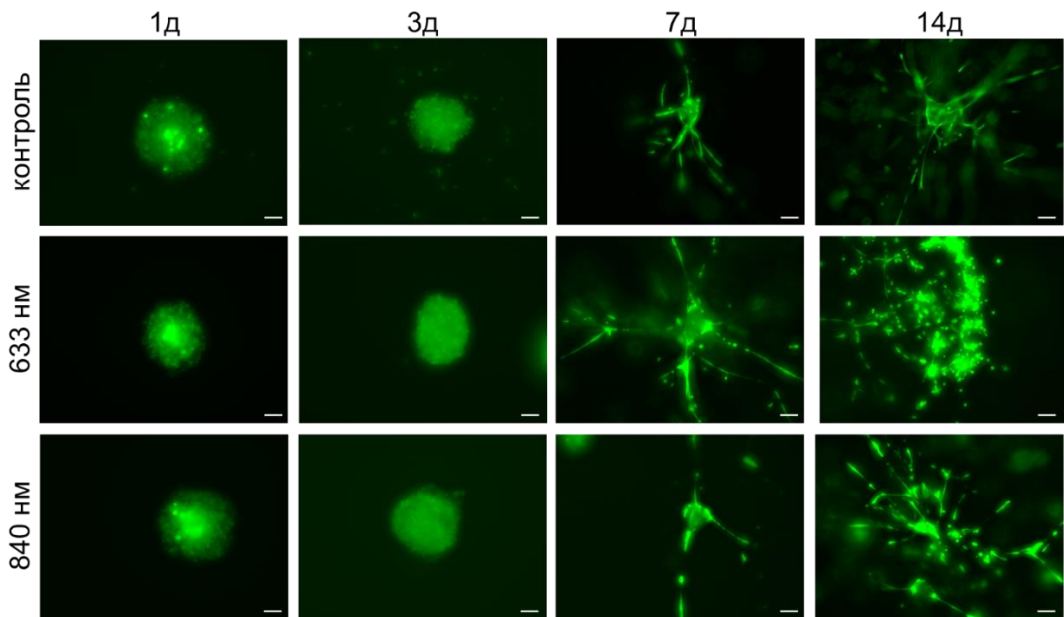


Рисунок 50 – Динамика реактивации сфероидов и миграции клеток в напечатанных конструктах (1, 3, 7 и 14 дней). Control – контроль (без воздействия ФБМ), 633 nm – ФБМ с длиной волны 633 nm, 840 nm – ФБМ с длиной волны 840 nm. Live/Dead тест, флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок = 50 мкм.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Биочернила: подбор состава и характеристика

Большое количество исследований, посвященных 3D-биопечати, неуклонно продолжает расти с каждым годом. В последние 5-10 лет в данной области уделяется особое внимание биопечати сфероидами, в том числе на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) – лидера по частоте применений в области биофабрикации [91]. Значение и биологическую роль МСК для тканеинженерных конструкций сложно переоценить. Простота их получения в сочетании с многочисленными поддерживающими свойствами часто определяют использование МСК как «базового» компонента напечатанных конструкций [94]. Для получения таких трехмерных конструкций необходим этап разработки биочернил, содержащих не только клеточный, но и биоматериальный компонент. Материал, входящий в состав биочернил, должен иметь достаточную для 3D печати вязкость и при этом быть нетоксичным и адгезивным для клеток, что усложняет процедуру разработки состава. Используемые в данной работе основные компоненты биочернил – фибрин и желатин – довольно широко используются для экструзионной 3D биопечати и в биофабрикации в целом.

Фибрин зарекомендовал себя как биосовместимый полимер, обеспечивающий хорошую адгезию и высокие темпы миграции для различных типов клеток [32]. Кроме того, было показано, что модификация фибрина полиэтиленгликолем (ПЭГ) позволяет добиться более разветвленной структуры полимерной сети, что обеспечивает повышение количества сайтов, доступных для адгезии клеток, а также приводит к улучшению стабильности [48]. При этом нельзя не отметить, что модификация ПЭГ также приводит к повышению прозрачности гидрогеля, что является очень удобным свойством при дальнейшем анализе объемных структур различными методами [45].

Однако, существенным недостатком фибрина для экструзионной биопечати является его низкая вязкость [49]. Такие механические свойства не позволяют сохранить форму филамента и, соответственно, воссоздать вертикальную структуру ткани. Поэтому в качестве второго компонента был выбран желатин, меняющий свою вязкость в ответ на изменение температуры [15]. Такие гибкие свойства удобны с точки зрения многостадийного процесса биопечати. Кроме того, так как желатин является продуктом неполного гидролиза коллагена, он также обладает хорошей биосовместимостью и адгезивностью [55].

Однако желатин привносит только временную высокую вязкость, необходимую для процесса непосредственно биопечати. Далее должна быть проведена полноценная

полимеризация компонентов, которая в дальнейшем будет стабильна при температуре 37°C (в отличие от желатина). В данном случае необходимым кросслинкером для получения фибрина выступал тромбин. Однако доступная форма его применения (добавление объема жидкости к объемному конструкту после печати) сопряжена с рисками нарушения структуры конструкта, т.к. время, требуемое для диффузии тромбина внутрь конструкта и полимеризация фибриногена могут превышать время, достаточное для перехода желатина в жидкое состояние при 37°C. Поэтому был добавлен второй этап сшивки – фотополимеризация, нацеленная на сшивку метакрилированных групп ПЭГ под воздействием УФ света. Такой способ позволяет «зафиксировать» полученную структуру после послойной засветки и обеспечить ее сохранение в течение последующей сшивки тромбином.

Введение нескольких компонентов и двухэтапной сшивки потребовало исследования динамики изменения реологических свойств при различной температуре, проведенным на основе предложенных в [315] алгоритмах. После предварительного скрининга нескольких вариантов композиций с различной концентрацией компонентов исследовали реологическое поведение гидрогелей. В первую очередь, необходимо определить значение напряжения сдвига (shear stress), при котором вязкость материала значительно падает (материал, сначала деформирующийся эластически, начинает течь). Данное значение – предел текучести (yield stress) – позволяет установить границы напряжения сдвига, в котором материал может быть экструдирован. Также важным шагом является определение тиксотропных свойств материала (shear thinning). Данный параметр позволяет предсказать наличие и диапазон окна печатаемости. Кроме того, в контексте сшивки конструкта после биопечати необходимо проведение кинетических измерений, так как по их результатам становится возможным сделать вывод о необходимой длительности этапа полимеризации. Также описание реологических свойств гидрогеля позволяет сравнивать результаты с данными литературы, что значительно ускоряет дальнейший подбор параметров биопечати для оптимальной печатаемости. Так, описанные в данном исследовании значения модуля упругости и модуля потерь попадают в диапазон описанных в литературе реологических свойств гидрогелей на основе фибрина и желатина [316,317].

В целом, исследование реологических и механических свойств материалов для биопечати становится неотъемлемой частью процесса разработки биочернил. Реологические измерения позволяют «предсказать» поведение биочернил при их экструзии, течении, сшивке, и таким образом обеспечивают моделирование всего процесса уже на стадии первичного тестирования выбранной композиции. Эти данные могут ограничить область применяемых параметров, которые затем можно сравнить с пороговыми для выживаемости клеток и при необходимости скорректировать протокол. Так, средним пороговым значением давления для клеток является 80

кПа – при его превышении часто наблюдается некроз и апоптоз [60,94]. Одним из способов снижения стресса клеток, вызванного напряжением сдвига, является использование сопел или игол повышенного диаметра. Имеются сведения о сохранении жизнеспособности на уровне 40% при использовании сопла 25G (внутренний диаметр 250 мкм, как и в данном исследовании) при давлении 130 кПа [60]. При это важно принять во внимание необходимость увеличения диаметра сопла до определения оптимальной печатаемости (так как изменение сопла значительно влияет на ширину филамента).

Исследование же механических свойств напечатанных конструкций является основой для вывода о схожести полученного эквивалента с настоящей тканью. Так, жесткость конструкторов на основе выбранной композиции составила около 1 кПа, что соотносится с другими данными о гидрогелях на основе желатина и GelMA [318–320] и примерно соответствует мягким тканям – таким, как печень, легкие или кожа [112]. Кроме того, в современной литературе представлены данные о большом количестве материалов и их комбинаций, применяемых в биопечати. Предварительное исследование реологических и механических свойств позволяет, с одной стороны, отбросить заведомо нежизнеспособные варианты, а с другой – выбрать наиболее оптимальный из нескольких.

#### **4.2 Протокол 3D экструзионной биопечати**

Успешное внедрение новой технологии требует стандартизации методов и воспроизводимости результатов. На сегодняшний день практически нет данных о широко распространенных стандартных операционных процедурах для биопечати клеток или тканей, а также о стандартном наборе методов анализа, используемых для оценки качества напечатанных конструкций. Международная организация по стандартизации (ISO) лишь недавно опубликовала стандартизованную терминологию для процессов аддитивного производства (ISO/DIS 17 296-1). Уже сейчас имеется огромный спектр биочернил [321], но нет единого мнения о том, какие материалы - натуральные, синтетические или комбинированные - являются наиболее благоприятными для получения тканей и органов методом биопечати. Кроме того, выбор биочернил в значительной степени зависит от типа клеток, метода печати и желаемого размера тканеинженерной конструкции. Что касается условий печати, то они должны быть оптимизированы отдельно для типа используемых клеток. Ning и соавт. недавно показали, что одни и те же условия биопечати могут подходить для одного типа клеток, но не подходить для другого [322]. Все эти факторы делают стандартизацию протоколов биопечати нетривиальной задачей. Отдельные исследовательские группы предпринимают шаги к более консолидированному подходу, например, устанавливая стандартные операционные процедуры в

своих лабораториях и публикуя их в качестве примера: существуют такие протоколы для биопечати моделей кожи [323], технические указания по оценке печатаемости биочернил [315,324], а также критерии сравнительного анализа совместимости биочернил с клетками [325].

Кроме того, на сегодняшний день отсутствуют не только стандартные методы биопечати, но и стандартизированный набор инструментов для оценки напечатанных конструкций (например, их жизнеспособности и пролиферативной активности клеток в биоэквиваленте). Зачастую данная проблема связана не только с техническими сложностями в процессе анализа (затрудненная диффузия, непрозрачность, аутофлуоресценция, присутствие вязкого гидрогеля на этапе пробоподготовки и т.д.), но также и с интерпретацией полученных результатов. На каждом этапе создания трехмерного биоэквивалента появляются дополнительные условия, которые затем должны быть учтены в качестве контролей. Так, при классическом протоколе биопечати необходимо включение контроля не только для биоматериала (для учета влияния факторов, перечисленных выше), но и для клеток: на их жизнеспособность влияют помещение в вязкую среду, напряжение сдвига при биопечати, изменение температуры и кислотности, воздействие УФ-света и т.д. Комбинацию всех этих многочисленных факторов необходимо принимать во внимание на этапе дизайна эксперимента. Именно поэтому для проведения любого исследования с включением метода 3D биопечати становится необходимым наличие стандартизированных протоколов, алгоритмов и рекомендаций. На основе данного исследования был разработан подобный алгоритм, представленный на рисунок 51.

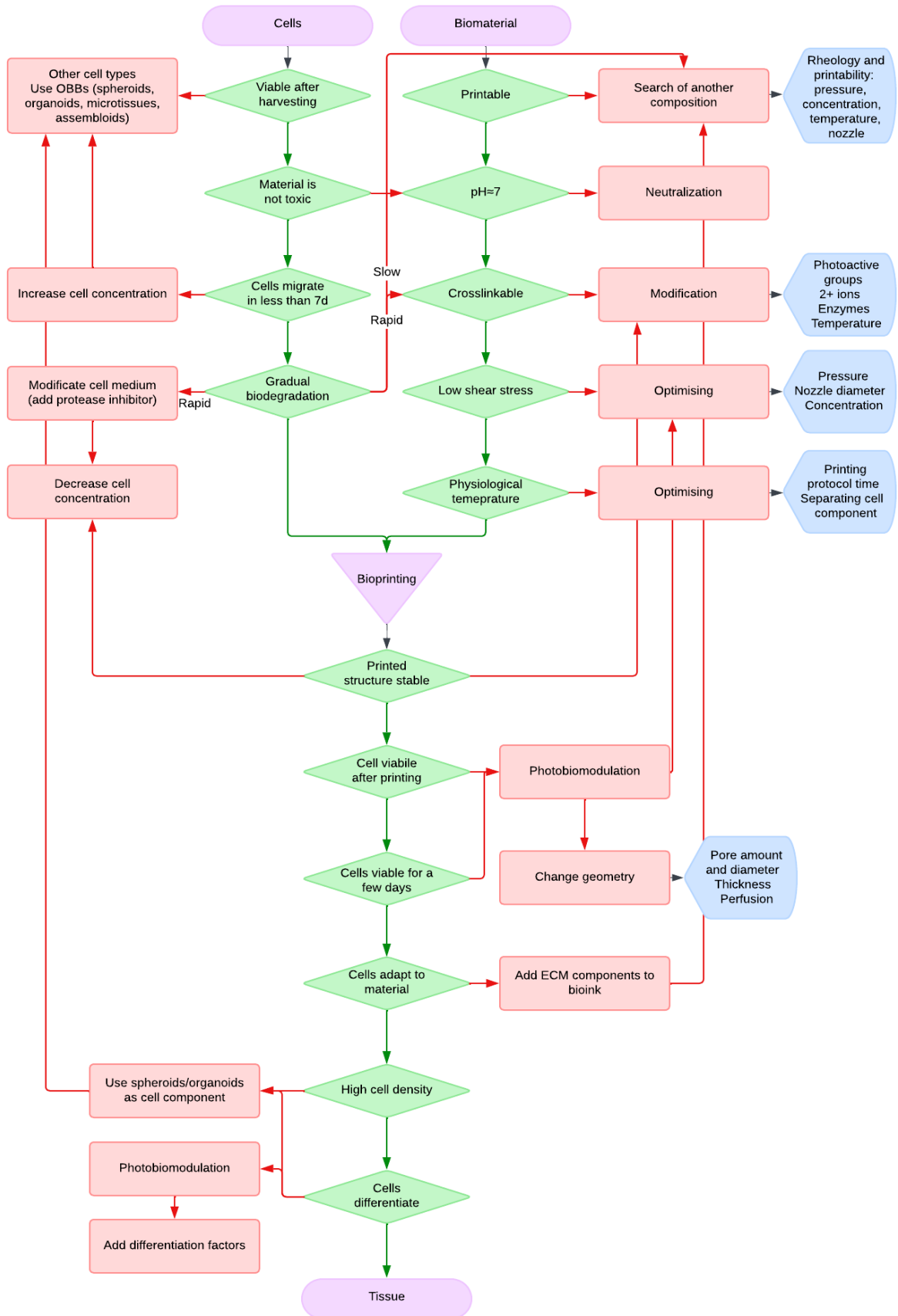


Рисунок 51 – Блок-схема процесса 3D биопечати. Фиолетовый цвет - основные стадии; зеленый цвет – успешное событие (стрелка – указание дальнейшего пути, ромбы - этап принятия решения); красный цвет – неуспешное событие (стрелка – указание дальнейшего пути, прямоугольники – процесс поиска альтернативных решений); синий цвет – дополнительные данные (информация для поиска решений)

#### 4.3 Оптимизация подходов к анализу 3D тканеинженерных конструкций

Клеточная жизнеспособность – это важнейший параметр для создания биоэквивалентов, который позволяет сделать выводы о необходимости оптимизации условий культивирования, тестирования лекарственных средств, биосовместимости материалов и т.д. Однако подавляющее большинство классических методов изначально были разработаны для монослойных культур. При переходе же в 3D условия данные методы зачастую не подходят для адекватной оценки жизнеспособности тканеинженерных конструкций. Такие факторы, как концентрация компонентов, толщина конструкции, плотность клеток влияют на жизнеспособность клеток и применимость ряда методов [326]. На данный момент для оценки повреждения клеток в результате процесса биопечати обычно используются микроскопические методы, такие как окрашивание живых клеток или окрашивание аннексином [322,327], а также биохимические методы, такие как МТТ-тест, AlamarBlue-тест и PrestoBlue-тест [323,328,329]. Пролиферация клеток контролируется путем измерения содержания ДНК в напечатанных конструкциях [322]. Кроме того, немаловажной задачей является и анализ созревания конструкторов, так как зачастую морфология и свойства напечатанных конструкций значительно отличаются непосредственно после печати и спустя время культивирования. В процессе созревания происходит деление клеток, спраутинг или слияние сфероидов, миграция и «расселение» клеток по толще гидрогеля, их дифференцировка и ремоделирование матрикса. Последний фактор особенно важен для МСК, обладающих высокой активностью ММП [330,331], так как такие свойства требуют модификации питательной среды для замедления скорости деградации полимеров.

Однако до сих пор не существует стандартизированных методов анализа для мониторинга напечатанных конструкций, особенно в режиме реального времени и неинвазивно, что позволило бы изучать одни и те же конструкции в течение длительного времени. Разработка набора стандартизированных инструментов для мониторинга и представления биологических данных в напечатанных биоэквивалентах необходимы для того, чтобы можно было сравнивать результаты исследований и делать надежные выводы.

В данном исследовании предлагается использовать комплекс из трех методов, основанных на различных свойствах клеток (метаболическая активность, пролиферация, морфология), в качестве подхода к рутинной оценке жизнеспособности тканеинженерных конструкций. Для оценки метаболической активности трехмерных конструкторов использовали тест аламаровый синий (AlamarBlue assay), принцип работы которого основан на восстановлении нефлуоресцентного резазурина, выступающего в качестве промежуточного акцептора

электронов в дыхательной цепи без вмешательства в нормальный перенос электронов, до флуоресцентного резорурфина. Данный тест отражает присутствие редокс-активных митохондрий клеток, содержащих функциональные НАДН, ФАДН, НАДН и цитохромы [332]. Так как эффективность восстановления резазурина в составе реагента AlamarBlue в случае сфероидов сильно зависит от количества плотных контактов, затрудняющих обратную диффузию восстановленного резорурфина из центральной части сфероида, это может объяснить сниженные значения метаболической активности сфероидов при видимой жизнеспособности и физиологической активности [333]. Для более корректной и точной оценки метаболизма клеток применяли модифицированный подход – определение так называемой нормированной метаболической активности, при которой полученный сигнал флуоресценции резорурфина нормировали на количество определяемой ДНК в образце [333,334].

При помещении клеток в трехмерные культуры они испытывали стресс, связанный с адаптацией к новым условиям и ограниченной диффузией кислорода и питательных веществ, которые выражались в снижении метаболизма и пролиферативной активности. Несмотря на определенный оптимум параметров трехмерной экструзионной биопечати, воздействие давлений, колебания температуры и pH в биочернилах, а также УФ свет при фотосшивке оказались слишком неблагоприятными условиями для суспензии единичных клеток. С помощью замены в биочернилах суспензии единичных клеток на более стабильные структуры – плотные клеточные сфероиды – удалось получить жизнеспособные конструкторы с активно мигрирующими в толщу гидрогелевого компонента клетками, формирующими тубулоподобные структуры. Интересно, что в напечатанных конструкторах миграция клеток из сфероида в гидрогель начиналась на 3-4 дня позже, чем в смешанных вручную гидрогелях, но при этом к 14-м суткам культивирования обнаруживалась более разветвленная сеть тубул. Повышенные значения нормированной метаболической активности сфероидов в конструкторах, полученных методом биопечати, по сравнению с конструкторами с таким же составом гидрогеля, но смешанными вручную, свидетельствуют о том, что при биопечати создаются условия, имеющие больший потенциал для развития сфероидов. Экструзионная биопечать позволяет получать равномерные по толщине гидрогеля и распределению сфероидов конструкторы с улучшенной за счет создания микроархитектуры диффузией.

Тем не менее, стрессовые условия при биопечати, сниженная выживаемость сфероидов и связанное с этим «отставание» миграции клеток на ранних сроках обуславливают риск получения нежизнеспособной тканеинженерной конструкции с низкой плотностью клеток и нерелевантным соотношением клеток и матрикса. Таким образом, проблема повышения выживаемости трехмерных конструкций при биопечати является основополагающей проблемой биофабрикации и тканевой инженерии.

#### 4.4 Влияние фотобиомодуляции на мезенхимные стромальные клетки (МСК)

На данное время существуют различные методы повышения выживаемости клеток в стрессовых условиях – создание микроканалов для перфузии, биореакторы, добавление дополнительных носителей кислорода, кокультивирование с эндотелиальными клетками, гипербарический кислород, гипоксия и прекодиционирование [335]. В качестве одного из таких методов можно рассматривать также и ФБМ, обладающую несколькими преимуществами. Оптическое окно прозрачности обеспечивает проникновение света при ФБМ в глубь обводненных тканей, скаффолдов и тканеинженерных конструкций, а неинвазивность данного метода делает его перспективным для применения в биофабрикации [335]. С развитием диодных систем стало возможным производство дешевых, стандартизованных и мобильных систем для ФБМ, технически легко встраиваемых в биопринтеры. Кроме того, наиболее выраженные эффекты ФБМ обычно детектируются на клетках, подверженных стрессу, что соответствует процессу биопечати.

Так как эффекты ФБМ обычно могут быть разнообразны и проявляться в различных клеточных системах, выбранные 2 режима были исследованы на разных объектах, в комбинации с рядом ингибиторов дыхательной цепи и индукторов апоптоза, в различных временных рамках. Также были выбраны различные методы анализа для определения мишеней ФБМ.

Снижение доли апоптотических клеток в популяции наблюдалось при воздействии обоих режимов ФБМ, причем не только в ингибировании ЭТЦ, но и в контроле (рисунок 43). Данный эффект может являться «неспецифическим» для ФБМ и опосредован воздействием на митохондриальный сигнальный путь апоптоза. Подтверждением того, что основной мишенью ФБМ в клетке являются митохондрии, выступает активация потребления кислорода клетками после облучения. Оба режима облучения были способны повысить метаболическую активность при ингибировании IV комплекса ЭТЦ (цитохром с-оксидазы), что согласуется с данными литературы и позволяет рассматривать этот комплекс как главную мишень ФБМ [220] (рисунок 43). При этом различались временные рамки изменения метаболической активности: оба режима инициировали «долговременное» повышение метаболической активности (через 6ч после ФБМ), а ФБМ с длиной волны – еще и «кратковременное» (через 2ч). Схожие результаты отмечены и при ингибировании I комплекса ЭТЦ ротеноном: 840 нм обуславливает только «кратковременные» изменения, а 633 нм – только «долговременные». В сочетании с данными о повышении OCR (во втором случае она повышается, а в первом – нет) можно предположить наличие дополнительного механизма воздействия ФБМ 840 нм на клетки, не задействующий напрямую активность дыхательной цепи митохондрий (рисунок 52). Таким образом, было

подтверждено, что основной мишенью ФБМ в красной области спектра у МСК является комплекс IV митохондрий, тогда как для ФБМ в ближней ИК области спектра выявляется несколько мишеней – как минимум, комплекс I и IV митохондрий. По последним данным литературы, к мишеням ближнего ИК света в клетке относят также светочувствительные ионные каналы, которые при воздействии ФБМ напрямую вызывают повышение ионов  $Ca^{2+}$  в клетке [336]. О нескольких мишенях ближнего ИК света в клетке говорит также и бифазный временной ответ на ФБМ, проявляющийся в скачках скорости потребления кислорода клетками – через 2 и 6 часов, в то время как для красного света наблюдается один пик интенсивности через 2 часа после ФБМ.

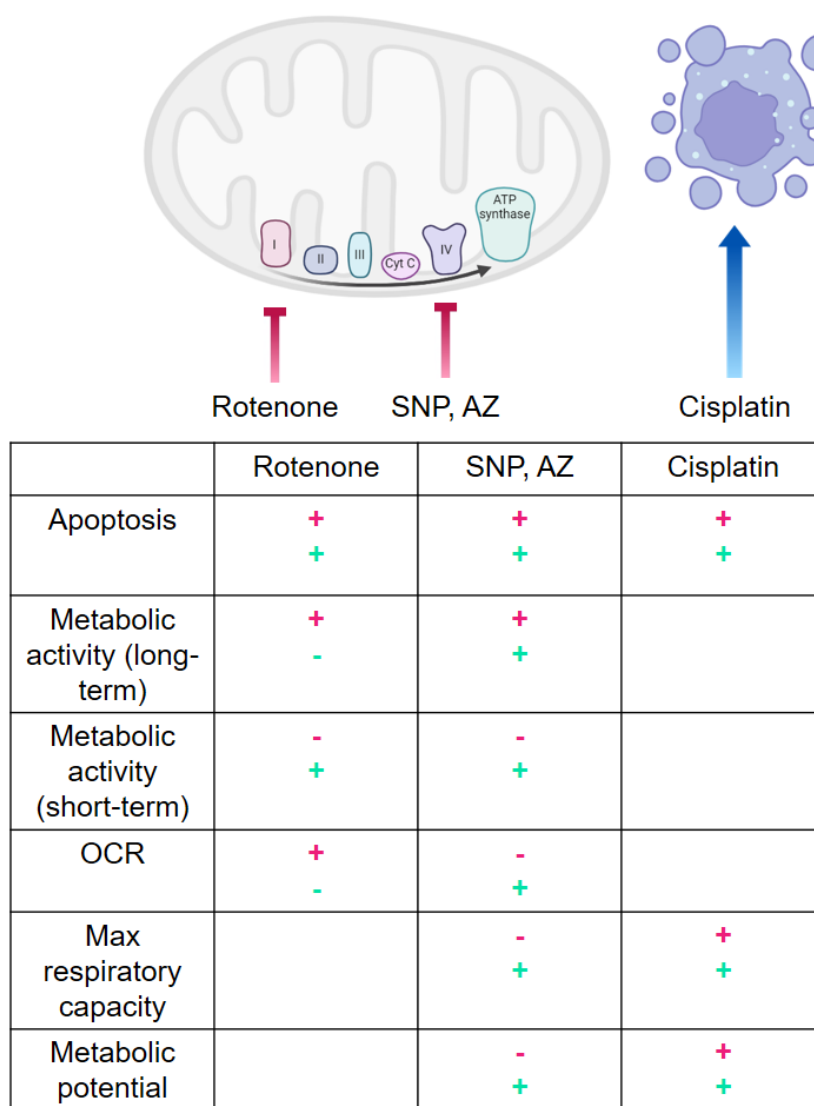


Рисунок 52 – Анализ механизмов ФБМ в клетке. Сверху - схема воздействия применяемых в исследовании ингибиторов: rotenone (ротенон) – ингибитор I комплекса, SNP (sodium nitroprusside, нитропруссид натрия) и AZ (sodium azide, азид натрия) – ингибиторы IV комплекса, Cisplatin (цисплатин) – индуктор апоптоза. Снизу – сводная таблица экспериментальных результатов ингибиторного анализа, режим ФБМ 633 нм отмечен красным цветом, 840 нм – зеленым.

Кроме того, наблюдаемые эффекты ФБМ значительно зависели от используемой клеточной системы. В отличие от монослойных, трехмерных системах наблюдали более низкие по сравнению с монослойными культурами темпы пролиферации клеток. Причиной этому может быть более долгий процесс распластывания клеток и меньшее количество доступного адгезивного субстрата для них, который представлен не плоскостью, а сайтами адгезивности на молекулах полимерной сети. ФБМ 840 нм стимулировало и метаболическую активность клеток, и их пролиферацию, в то время как ФБМ 633 нм воздействовала только на второе. При использовании в качестве объекта сфероидов в целом не было зафиксировано каких-либо значимых отличий между группами. При биопечати сфероидов, аналогично клеткам в гидрогеле, в ответ на ФБМ 840 нм происходило повышение пролиферативной активности клеток, а также метаболической активности и синтеза АТФ. Все это позволяет сделать вывод о том, что эффекты ФБМ зависят не только от вида излучения и типа клеток, но и условий, в которых эти клетки находятся – наличие внеклеточного матрикса, число контактов с другими клетками, механическое натяжение субстрата. Важно упомянуть также, что, хотя ФБМ 840 нм и проникает в гидрогели и скаффолды глубже, чем 633 нм, это не объясняет различий между двумя режимами для используемых толщин до 5 мм. Таким образом, можно предположить, что в двумерных системах ФБМ 840 нм воздействует в основном на цитохром с-оксидазу, и затем посредством АФК-зависимых сигнальных путей активирует пролиферацию. ФБМ 633 нм воздействует на ЭТЦ более обширно, главным образом стимулируя выживаемость и метаболизм клеток. При переходе в трехмерные системы ввиду появления более сложных условий среды меняется набор наблюдаемых изменений. Так, в условиях наличия гидрогеля наиболее чувствительным к ФБМ процессом становится пролиферация. Сфероиды из МСК, культивируемые в неадгезивных условиях, по видимому, не подходят для исследований ФБМ в качестве модельного объекта. Их комбинация с гидрогелевыми системами, напротив, позволяет детектировать изменения в активности метаболизма и продукции АТФ (рисунок 44). Соответственно, в зависимости от цели исследования различных вариантов ФБМ необходимо принимать во внимание наиболее подходящий тип *in vitro* модели и комплекс методов, чувствительных в рамках каждого варианта (рисунок 53). Кроме того, при исследовании эффектов ФБМ необходимо учитывать наличие диффузионных ограничений, влияние толщины и пористости конструкций, размера и плотности сфероидов, так как все эти факторы требуют введения дополнительных контролей с целью получения интерпретируемых результатов.

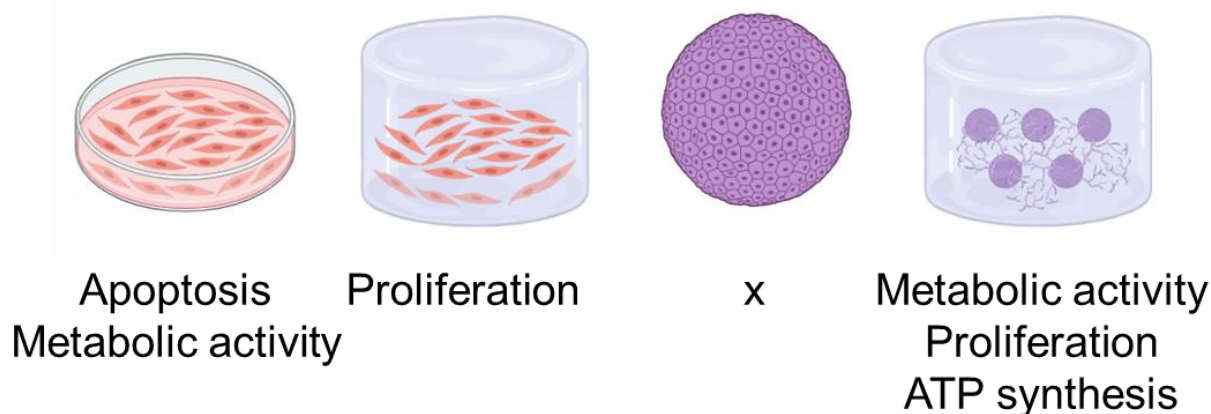


Рисунок 53 – Различные по чувствительности к ФБМ типы *in vitro* моделей и комплексы методов для исследования эффектов ФБМ.

#### **4.5 Комбинированный протокол 3D биопечати и фотобиомодуляции (ФБМ) для создания жизнеспособных и функциональных тканеинженерных конструкций**

Основной задачей биофабрикации и тканевой инженерии является создание тканей и органов, аналогичных натуральным не только по структуре и составу, но и по функциям. Однако, зачастую применение метода 3D биопечати, необходимого для создания сложных и объемных тканеинженерных конструкций, приводит к значительно сниженной выживаемости конструкций ввиду большого числа стрессовых условий, и к формированию слабовжизнеспособных структур, не воспроизводящих основные свойства ткани. Поэтому применение неинвазивного и технически удобного метода ФБМ является перспективным подходом для улучшения выживаемости и функциональности тканеинженерных конструкций. Так, в данном исследовании был показан эффект ФБМ с длиной волны 840 нм для напечатанных конструкций на основе сфероидов МСК. Использование данного подхода позволило повысить, в первую очередь, общую выживаемость тканеинженерных конструкций. На основе полученных данных можно предположить, что ФБМ при биопечати позволяет снизить долю клеток, уходящих в апоптоз, а также стимулировать дыхательную цепь митохондрий и синтез АТФ на сроках до 6 часов (рисунок 45). В течение этих 6 часов нормализуется температура, рН и другие факторы, так как напечатанные конструкторы после полимеризации помещают в стандартные условия культивирования. Далее, наступает период адаптации клеток к новым трехмерным условиям, в течение которого сохраняется способность клеток к пролиферации. Несмотря на показанное снижение активности и «отставание» в скорости адаптации к гидрогелю от конструкторов, смешанных вручную, сохраненные жизнеспособные клетки, гомогенное распределение сфероидов и улучшенные условия диффузии за счет наличия пористой структуры обеспечивают больший потенциал таких конструкций к заселению гидрогеля на сроках от 14 дней (рисунок 54).

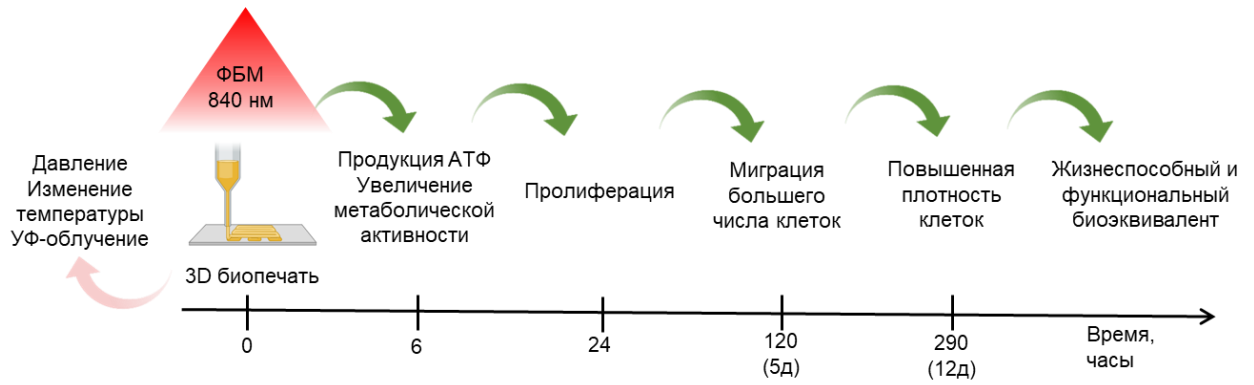


Рисунок 54 – Схема комбинированного протокола 3D биопечати и ФБМ и основных клеточных событий, происходящих впоследствии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной диссертационной работы был создан комбинированный протокол 3D экструзионной биопечати и фотобиомодуляции. Разработанный состав биочернил для биопечати на основе сфероидов из мезенхимных стромальных клеток и фибрин-желатинового гидрогеля был охарактеризован по реологическим и биологическим свойствам в соответствии с существующими рекомендациями. Была разработана методика получения трехмерных тканеинженерных конструкций на основе сфероидов из МСК, поддерживающих метаболическую активность, пролиферацию и миграцию клеток. Было показано, что ФБМ в красном и ближнем инфракрасном диапазоне повышает метаболическую и пролиферативную активность МСК за счет воздействия на комплексы дыхательной цепи митохондрий, но при этом имеет различные механизмы воздействия. Впервые в рамках работы было продемонстрировано, что ФБМ позволяет повысить выживаемость клеток при 3D биопечати. ФБМ с длинами волн 633 и 840 нм воздействует на дыхательную цепь митохондрий МСК, повышая их метаболическую активность и ингибируя апоптоз, а ФБМ 840 нм приводит к повышению не только метаболической, но и пролиферативной активности в напечатанных конструкциях.

Таким образом, данные диссертационного исследования показывают, что трехмерные тканеинженерные конструкции, 3D биопечать и ФБМ «дополняют» друг друга: стимулирующие длины волн ФБМ совпадают с оптическим окном прозрачности и способны проникать в глубь гидрогелей, а клетки с пониженной вследствие 3D биопечати жизнеспособностью являются подходящим объектом для ФБМ. Метод фотобиомодуляции можно использовать для повышения выживаемости и дальнейшей функциональности клеток в процессе 3D-биопечати с целью получения полноценных биоэквивалентов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан состав биочернил на основе фибрина и желатина, обеспечивающий выживание, адгезию и последующую миграцию МСК с сохранением метаболической и пролиферативной активности.
2. С использованием разработанных биочернил разработан и оптимизирован протокол 3D экструзионной биопечати, позволяющий получать стабильные жизнеспособные конструкции со сфероидами из МСК
3. Установлен комплекс методов для корректной оценки жизнеспособности объемных конструкций, полученных методом 3D биопечати, включающий в себя оценку метаболической активности, пролиферации и морфологии клеток в динамике.
4. Установлено, что для МСК слизистой альвеолярной слизистой оболочки десны человека оптимальной дозой воздействия ФБМ с длинами волн 633 нм и 840 нм является доза 2.2 кДж/см<sup>2</sup>.
5. Показано, что основной мишенью ФБМ с длиной волны 633 нм для МСК является комплекс IV митохондрий, в то время как для ФБМ 840 нм выявлено больше мишеней – комплекс I и IV митохондрий.
6. Впервые установлено влияние ФБМ на тканеинженерные конструкции, полученные методом биопечати, установлено стимулирующее воздействие ФБМ с длиной волны 840 нм на пролиферацию, метаболическую активность и продукцию АТФ в трехмерных условиях.
7. Установлен комплексный подход к получению жизнеспособных и функциональных тканеинженерных конструкций на основе методов биопечати и фотобиомодуляции.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АФК – активные формы кислорода
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ИК – инфракрасный
- ММП – матриксные металлопротеиназы
- ММП – митохондриальный мембранный потенциал
- МРР – малоугловое рассеяние рентгеновских лучей
- МСК – мезенхимные стромальные клетки
- МСК-Ж – МСК жировой ткани
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ТГА – термогравиметрический анализ
- УФ – ультрафиолет
- ФБМ – фотобиомодуляция
- ЭМТ – эпителиально-мезенхимный переход
- ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
- ВМР – bone morphogenetic protein (костный морфогенетический белок)
- САТ – catalase (каталаза)
- ССО – cytochrome c oxidase (цитохром-с-оксидаза)
- ЕСАР – extracellular acidification rate (скорость внеклеточного закисления)
- eNOS – endothelial nitric oxide synthase (эндотелиальная NO-синтаза)
- FBS – fetal bovine serum (эмбриональная телячья сыворотка)
- FDM – fused deposition modeling (моделирование методом послойного наплавления)
- FGF-2 – fibroblast growth factor 2 (фактор роста фибробластов-2)
- FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье)
- GelMA – gelatin methacryloyl (желатин-метакрилоил)
- GSH – glutathione (глутатион)
- iNOS – inducible nitric oxide synthase (индуцибельная NO-синтаза)
- OCN – osteocalcin (остеокальцин)
- OCR – oxygen consumption rate (скорость потребления кислорода)
- OPG – osteoprotegerin (остеопротегерин)
- PE – phycoerythrin (фикоэритрин)
- PBS – phosphate buffer saline (фосфатно-солевой буфер)

RGD – arginylglycylaspartic acid (аргинилглициласпарагиновая кислота)

SOD – superoxide dismutase (супероксиддисмутаза)

SRC – spare respiratory capacity (запасная дыхательная емкость)

TGF- $\beta$  – transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста-бета)

TRPC – transient receptor potential channels (каналы транзиторного рецепторного потенциала)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Multifunctional heteropolysaccharide hydrogel under photobiomodulation for accelerated wound regeneration / K. Shanmugapriya, H. Kim, H. Kang, [et al.] // *Ceram. Int.* – 2019. – Vol. 7. – № 3. – P. 4907–4918.
2. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4–loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering / I.M.A. Diniz, A.C. Carreira, C. Sipert, [et al.] // *J. Cell. Physiol.* Wiley–Liss Inc. – 2018. – Vol. 233. – № 6. – P. 4907–4918.
3. Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in–vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model / R. Winter, P. Dungal, F. M. J. Reischies, [et al.] // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 17080.
4. Red light accelerates the formation of a human dermal equivalent / A.C.B. Oliveira, T. F. Morais, C. Bernal, [et al.] // *J. Biomater. Appl.* SAGE Publications Ltd. – 2018. – Vol. 32. – № 9. – P. 1265–1275.
5. Photobiomodulation therapy improves multilineage differentiation of dental pulp stem cells in three–dimensional culture model / I.M. Zaccara, L. B. Mestieri, [et al.] // *J. Biomed. Opt.* – 2018. – Vol. 23. – № 09. – P. 1.
6. Park, I.S. Adipose–derived stem cell spheroid treated with low–level light irradiation accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia / I.S. Park, P.S. Chung, J.C. Ahn // *Cytherapy.* Elsevier B.V. – 2017. – Vol. 19. – № 9. – P. 1070–1078.
7. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm / V.Mironov, T. Trusk, V. Kasyanov, [et al.] // *Biofabrication.* Biofabrication. – 2009. – Vol. 1. – № 2.
8. An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical Application / S. Vanaei, M. S. Parizi, S. Vanaei, [et al.] // *Eng. Regen.* Elsevier. – 2021. – Vol. 2. – P. 1–18.
9. Commercial 3D Bioprinters / F.D.A.S. Pereira, V. Parfenov, Yu. D. Khesuani, [et al.] // *3D Print. Biofabrication.* Springer, Cham. – 2018. – P. 535–549.
10. Organ printing: computer–aided jet–based 3D tissue engineering / V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, [et al.] // *Trends Biotechnol.* Elsevier Current Trends. – 2003. – Vol. 21. – № 4. – P. 157–161.
11. Mironov, V. Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line / V. Mironov, V. Kasyanov, R.R. Markwald // *Curr. Opin. Biotechnol.* Elsevier Current Trends. – 2011. – Vol. 22. – № 5. – P. 667–673.
12. Tuning the Phenotype of Cartilage Tissue Mimics by Varying Spheroid Maturation and Methacrylamide–Modified Gelatin Hydrogel Characteristics / L. De Moor, M. Minne, L. Tytgat,

- [et al.] // *Macromol. Biosci.* John Wiley & Sons, Ltd. – 2021. – Vol. 21. – № 5. – P. 2000401.
13. Engineering a Model to Study Viral Infections: Bioprinting, Microfluidics, and Organoids to Defeat Coronavirus Disease 2019 (COVID–19) / A. I. Shpichka, P. Yu. Bikmulina, M. A. Peshkova, [et al.] // *Int J Bioprint.* – 2020. – Vol. 6. – № 4.
  14. Guillemot, F. Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09) / F. Guillemot, V. Mironov, M. Nakamura // *Biofabrication.* Institute of Physics Publishing. – 2010. – Vol. 2. – № 1.
  15. Ng, W.L. Print Me An Organ! Why We Are Not There Yet / W.L. Ng, C.K. Chua, Y.F. Shen // *Progress in Polymer Science.* Elsevier Ltd. – 2019. – Vol. 97. – P. 101145.
  16. Murphy, S. V. 3D bioprinting of tissues and organs / S. V. Murphy, A. Atala // *Nature Biotechnology.* Nature Publishing Group. – 2014. – Vol. 32. – № 8. – P. 773–785.
  17. Ozbolat, I.T. Current advances and future perspectives in extrusion–based bioprinting / I.T. Ozbolat, M. Hospodiuk // *Biomaterials.* Elsevier Ltd. – 2016. – Vol. 76. – P. 321–343.
  18. Guillotin, B. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication / B. Guillotin, F. Guillemot // *Trends in Biotechnology.* Trends Biotechnol. – 2011. – Vol. 29. – № 4. – P. 183–190.
  19. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications / A.S. Hoffman // *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier. – 2012. – Vol. 64. – P.18–23.
  20. Photocrosslinking–based bioprinting: Examining crosslinking schemes / S. Knowlton, B. Yenilmez, S. Anand, [et al.] // *Bioprinting.* Elsevier B.V. – 2017. – Vol. 5. – P. 10–18.
  21. Fundamentals and Applications of Photo–Cross–Linking in Bioprinting / K.S. Lim, J. H. Galarraga, X. Cui, [et al.] // *Chemical Reviews.* American Chemical Society. – 2020. – Vol. 120. – № 19. – P. 10662–10694.
  22. Taking cell–matrix adhesions to the third dimension / E. Cukierman, P. Pankov, D. R. Stevens, [et al.] // *Science.* Science. – 2001. – Vol. 294. – № 5547. – P. 1708–1712.
  23. Innovative Human Three–Dimensional Tissue–Engineered Models as an Alternative to Animal Testing / P. Bédard, S. Gauvin, K. Ferland, [et al.] // *Bioengineering.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). – 2020. Vol. 7. – № 3. – P. 1–40.
  24. Could 3D models of cancer enhance drug screening? / V. Brancato, J. M. Oliverira, V. M. Correlo, [et al.] // *Biomaterials.* Elsevier. – 2020. – Vol. 232. – P. 119744.
  25. Lancaster, M.A. Disease modelling in human organoids / M.A. Lancaster, M. Huch // *Dis. Model. Mech.* Company of Biologists. – 2019. – Vol. 12. – № 7.
  26. Yoo, S. Spheroid–Hydrogel Integrated Biomimetic System (SHIBS): A New Frontier in Advanced 3D Cell Culture Technology / S. Yoo, H.J. Lee // *Cells. Tissues. Organs.* Cells Tissues Organs. – 2024. – P. 1–30.

27. Bioprinting Pattern–Dependent Electrical/Mechanical Behavior of Cardiac Alginate Implants: Characterization and Ex Vivo Phase–Contrast Microtomography Assessment / M. Izadifar, P. Babyn, M. E. Kelly, [et al.] // *Tissue Eng. Part C. Methods. Tissue Eng Part C Methods.* – 2017. – Vol. 23. – № 9. – P. 548–564.
28. Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids / K.C. Murphy, J. Whitehead, D. Zhou, [et al.] // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.* – 2017. – Vol. 64. – P. 176–186.
29. The Structural Features of Native Fibrin and Its Conjugates with Polyethylene Glycol and Vascular Endothelial Growth Factor according to Small–Angle X–Ray Scattering / P. V. Konarev, V. A. Grigoriev, P. Yu. Bikmulina, [et al.] // *Rev. Adv. Chem. Pleiades Publishing Ltd.* – 2020. – Vol. 10. – № 3–4. – P. 158–163.
30. Fuss, C. Fibrinogen: Structure, function, and surface interactions / C. Fuss, J.C. Palmaz, E.A. Sprague // *Journal of Vascular and Interventional Radiology. Lippincott Williams and Wilkins.* – 2001. – Vol. 12. – № 6. – P. 677–682.
31. Mosesson, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions / M.W. Mosesson // *Journal of Thrombosis and Haemostasis. J Thromb Haemost.* – 2005. – Vol. 3. – № 8. – P. 1894–1904.
32. Fibrin–based Bioinks: New Tricks from an Old Dog / A. I. Shpichka, D. Osipova, Yu. M. Efremov, [et al.] // *Int. J. Bioprinting. Whioce.* – 2020. – Vol. 6. – № 3. – P. 27–40.
33. Doolittle, R.F. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion / R.F. Doolittle // *Adv. Protein Chem. Academic Press.* – 1973. – Vol. 27. – № C. – P. 1–109.
34. Weisel, J.W. Fibrinogen and fibrin / J. Weisel // *Adv. Protein Chem. Academic Press Inc.* – 2005. – Vol. 70. – P. 247–299.
35. Kattula, S. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis / S. Kattula, J.R. Byrnes, A.S. Wolberg // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Lippincott Williams and Wilkins.* – 2017. – Vol. 37. – № 3. – P. e13–e21.
36. Yang, Z. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides / Z. Yang, I. Mochalkin, R.F. Doolittle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97. – № 26. – P. 14156–14161.
37. Bayless, K.J. RGD–dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three–dimensional fibrin matrices involves the  $\alpha(v)\beta3$  and  $\alpha5\beta1$  integrins / K.J. Bayless, R. Salazar, G.E. Davis // *Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology Inc.* – 2000. – Vol. 156. – № 5. – P. 1673–1683.
38. Hall, H. Molecular properties of fibrin–based matrices for promotion of angiogenesis in vitro / H. Hall, T. Baechi, J.A. Hubbell // *Microvasc. Res. Academic Press Inc.* – 2001. – Vol. 62. – № 3. – P. 315–326.

39. Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the  $\beta 15-42$  sequence of fibrin / T.L. Bach, C. Barsigian, C. H. Yaen, [et al.] // *J. Biol. Chem. Elsevier*. – 1998. – Vol. 273. – № 46. – P. 30719–30728.
40. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis via their  $\alpha 6\beta 1$  integrin receptor / B. Carrion, Y. P. Kong, D. Kaigler, [et al.] // *Exp. Cell Res. Academic Press Inc.* – 2013. – Vol. 319. – № 19. – P. 2964–2976.
41. Sprouting angiogenesis induces significant mechanical heterogeneities and ECM stiffening across length scales in fibrin hydrogels / B.A. Juliar, M. T. Keating, Y. P. Kong, [et al.] // *Biomaterials. Elsevier Ltd.* – 2018. – Vol. 162. – P. 99–108.
42. Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity / Y. Funahashi, C. J. Shwaber, A. Sharma, [et al.] // *Vasc. Cell*. – 2011. – Vol. 3. – № 1. – P. 2.
43. Bone marrow stromal cells stimulate an angiogenic program that requires endothelial MT1–MMP / S. Kachgal, B. Carroin, I. A. Janson, [et al.] // *J. Cell. Physiol. John Wiley & Sons, Ltd.* – 2012. – Vol. 227. – № 11. – P. 3546–3555.
44. Hydrogel-based microfluidics for vascular tissue engineering / A. V. Koroleva, A. Deiwick, A. Nguyen, [et al.] // *BioNanoMaterials. Walter de Gruyter GmbH*. – 2016. – Vol. 17. – № 1–2. – P. 19–32.
45. Evaluation of the Vasculogenic Potential of Hydrogels Based on Modified Fibrin / A.I. Shpichka, A. V. Koroleva, A. Deiwick, [et al.] // *Cell tissue biol. Maik Nauka–Interperiodica Publishing*. – 2017. – Vol. 11. – № 1. – P. 81–87.
46. Dikovsky, D. The effect of structural alterations of PEG–fibrinogen hydrogel scaffolds on 3–D cellular morphology and cellular migration / D. Dikovsky, H. Bianco–Peled, D. Seliktar // *Biomaterials. Elsevier*. – 2006. – Vol. 27. – № 8. – P. 1496–1506.
47. Сравнительное исследование ангиогенного потенциала сфероидов ммск пк и скжт в фибриновом геле / А.А. Горкун, И.М. Зурина, А.И. Шпичка, А.В. Королева, Н.В. Кошелева, П.С. Тимашев, Д.В. Бутнару, В.С. Репин, И.Н. Сабурин // *Гены и клетки*. – 2017. – Т. 12. – № 3. – С. 73.
48. Angiogenic potential of spheroids from umbilical cord and adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells within fibrin gel / A.A. Gorkun, A. I. Shpichka, I. M. Zurina, [et al.] // *Biomed. Mater. Institute of Physics Publishing*. – 2018. – Vol. 13. – № 4. – P. 044108.
49. Panwar, A. Current status of bioinks for micro–extrusion–based 3D bioprinting / A. Panwar, L.P. Tan // *Molecules. MDPI AG*. – 2016. – Vol. 21. – № 6.
50. Three–dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro / Y. Zhao, R. Yao, L. Ouyang, [et al.] // *Biofabrication. Institute of Physics Publishing*. – 2014. – Vol. 6. – № 3.
51. Rapid Prototyping Three–Dimensional Cell/Gelatin/Fibrinogen Constructs for Medical

- Regeneration / X. Wei, X. Wang, Y. Yan, [et al.] // *J. Bioact. Compat. Polym.* Sage Publications Sage UK: London, England. – 2007. – Vol. 22. – № 4. – P. 363–377.
52. Interpenetrating fibrin–alginate matrices for in vitro ovarian follicle development / A. Shikanov, M. Xu, T. Woodruff, [et al.] // *Biomaterials.* Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. – № 29. – P. 5476–5485.
  53. Mechanical behavior of collagen–fibrin co–gels reflects transition from series to parallel interactions with increasing collagen content / V.K. Lai, S. P. Lake, C. R. Frey, [et al.] // *J. Biomech. Eng. J Biomech Eng.* – 2012. – Vol. 134. – № 1.
  54. Bioprinted fibrin–factor XIII–hyaluronate hydrogel scaffolds with encapsulated Schwann cells and their in vitro characterization for use in nerve regeneration / S. England, A. Rajaram, D. J. Schreyer, [et al.] // *Bioprinting.* Elsevier B.V. – 2017. – Vol. 5. – P. 1–9.
  55. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review / M.C. Gomez–Guillen, B. Gimenez, M. E. Lopez-Caballero, [et al.] // *Food Hydrocolloids.* – 2011. – Vol. 25. – № 8. – P. 1813–1827.
  56. Comparison of micro– vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein–2 and alkaline phosphatase / H. Wang, O. C. Boerman, K. Sariibrahimoglu, [et al.] // *Biomaterials.* Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – № 33. – P. 8695–8703.
  57. An open–source bioink database for microextrusion 3D printing / B. Mahadik, R. Margolis, S. McLoughlin, [et al.] // *Biofabrication.* Biofabrication – 2022. – Vol. 15. – № 1.
  58. Study of the process–induced cell damage in forced extrusion bioprinting / S. Han, C/ M/ Kim, S. Jim, [et al.] // *Biofabrication.* IOP Publishing. – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. 035048.
  59. Mesenchymal stem cell printing and process regulated cell properties / J. Snyder, A. R. Son, Q. Hamid, [et al.] // *Biofabrication.* IOP Publishing. – 2015. – Vol. 7. – № 4. – P. 044106.
  60. Characterization of cell viability during bioprinting processes / K. Nair, M. Gandhi, S. Khalil, [et al.] // *Biotechnol. J. Biotechnol J.* – 2009. – Vol. 4. – № 8. – P. 1168–1177.
  61. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances / S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, [et al.] // *Bioact. Mater.* Elsevier. – 2018. – Vol. 3. № 2. P. 144–156.
  62. Hybrid Bioprinting of Chondrogenically Induced Human Mesenchymal Stem Cell Spheroids / L. De Moor, S. Fernandez, C. Vercruyse, [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* Frontiers Media S.A. – 2020. – Vol.8. – P. 484.
  63. Additive manufacturing of photo–crosslinked gelatin scaffolds for adipose tissue engineering / L. Tytgat, L. V. Damme, J. V. Hoorick, [et al.] // *Acta Biomater.* Acta Biomater. – 2019. – Vol.94. – P. 340–350.

64. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004–2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? / M. Kabat, I. Bobkov, S. Kumar, [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* John Wiley and Sons Ltd. – 2020. – Vol.9. – № 1. – P. 17–27.
65. Heterotopic transplants of bone marrow / A.J. Friedenstein, K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, [et al.] // *Transplantation.* 1968. – Vol.6. – № 2. – P. 230–247.
66. Owen, M. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors / M. Owen, A.J. Friedenstein // *Ciba Foundation symposium.* Ciba Found Symp. – 1988. – Vol.136. – P. 42–60.
67. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells / A.I. Caplan // *J. Ortho– P. Res. J Orthop Res.* – 1991. – Vol.9. – № 5. – P. 641–650.
68. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, [et al.] // *Cytotherapy.* Cytotherapy. – 2006. – Vol.8. – № 4. – P. 315–317.
69. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A.I. Caplan, J.E. Dennis // *Journal of Cellular Biochemistry.* *J Cell Biochem.* – 2006. – Vol.98. – № 5. – P. 1076–1084.
70. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells / L. da Silva Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas, [et al.] // *Cytokine and Growth Factor Reviews.* *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol.20. – № 5–6. – P. 419–427.
71. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! / A.I. Caplan // *Stem Cells Transl. Med.* AlphaMed Press. – 2017. – Vol.6 – № 6. – P. 1445–1451.
72. Klimczak, A. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: Their role in tissue homeostasis / A. Klimczak, U. Kozłowska // *Stem Cells International.* Hindawi Publishing Corporation. – 2016. – Vol.2016.
73. Caplan, A.I. What's in a Name? / A.I. Caplan // *Tissue Engineering – Part A.* Mary Ann Liebert Inc. – 2010. – Vol.16. – № 8. – P. 2415–2417.
74. Hay, E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it / E.D. Hay // *Developmental Dynamics.* John Wiley & Sons, Ltd. – 2005. – Vol.233 – № 3. – P. 706–720.
75. Scadden, D.T. The stem-cell niche as an entity of action / D.T. Scadden // *Nature.* Nature Publishing Group. – 2006. – Vol.441 – № 7097. – P. 1075–1079.
76. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin / J.J.H. Chong, V. Chandrakanthan, M. Xaymardan, [et al.] // *Cell Stem Cell.* *Cell Stem Cell.* – 2011. – Vol.9 – № 6. – P. 527–540.
77. A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells / M. Tavazoie, L. Van der Veken, V. Silva-Vargas, [et al.] // *Cell Stem Cell.* *Cell Stem Cell.* – 2008. – Vol.3 – № 3. – P. 279–288.
78. Chai, Y. Recent advances in craniofacial morphogenesis / Y. Chai, R.E. Maxson // *Developmental*

- Dynamics. *Dev Dyn.* – 2006. – Vol.235 – № 9. – P. 2353–2375.
79. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest / S. Morikawa, Y. Mabuchi, K. Niibe, [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – Vol.379 – № 4. – P. 1114–1119.
80. Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation / Y. Takashima, T. Era, K. Nakao, [et al.] // *Cell. Elsevier B.V.* – 2007. – Vol.129. – № 7. – P. 1377–1388.
81. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system / N. Kaukua, M. Khatibi Shahidi, C. Konstantinidou, [et al.] // *Nature. Nature Publishing Group.* – 2014. – Vol.513 – № 7519. – P. 551–554.
82. Gingivae contain neural–crest– and mesoderm–derived mesenchymal stem cells / X. Xu, C. Chen, K. Akiyama, [et al.] // *J Dent Res.* – 2013. – Vol.92 – № 9. – P. 825–832.
83. Nasal Turbinate Mesenchymal Stromal Cells Preserve Characteristics of Their Neural Crest Origin and Exert Distinct Paracrine Activity / H.–J. Kim, S. Shin, S. Y. Jeong, [et al.] // *J. Clin. Med. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).* – 2021. – Vol.10 – № 8. – P. 1792.
84. Li, C. Mesenchymal stem/stromal cells: Developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics / C. Li, H. Zhao, B. Wang // *Translational Oncology. Neoplasia Press, Inc.* – 2021. – Vol.14 – № 1. – P. 100948.
85. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population / K. Marynka–Kalmani, S. Treves, M. Yafee, [et al.] // *Stem Cells. Stem Cells.* – 2010. – Vol.28. – № 5. – P. 984–995.
86. Harrell, C.R. The cross–talk between mesenchymal stem cells and immune cells in tissue repair and regeneration / C.R. Harrell, V. Djonov, V. Volarevic // *International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG.* – 2021. – Vol.22. – № 5. – P. 1–13.
87. Suppression of Neutrophil–Mediated Tissue Damage—A Novel Skill of Mesenchymal Stem Cells / D. Jiang, J. Muschhammer, Y. Qi, [et al.] // *Stem Cells. Wiley–Blackwell.* – 2016. – Vol.34. – № 9. – P. 2393–2406.
88. Negi, N. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance / Negi N., Griffin M.D. // *Stem Cells. Wiley–Blackwell.* – 2020. – Vol.38. – № 5. – P. 596–605.
89. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications / H. Tao, Z. Han, Z. C. Han, [et al.] // *Stem Cells International. Hindawi Publishing Corporation.* – 2016. – Vol.2016.
90. Deo, D. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Organ Transplantation / D. Deo, M. Marchioni, P. Rao // *Pharmaceutics. Pharmaceutics.* – 2022. – Vol.14. – № 4.
91. Garcia–Garcia, L.A. Uncovering 3D bioprinting research trends: A keyword network mapping

- analysis / L.A. Garcia–Garcia, M. Rodriguez–Salvador // *Int. J. bioprinting. Int J Bioprint.* – 2018. – Vol.4. – № 2.
92. Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral–coated nanofibers and human adipose–derived stem cells / T. Ahmad, H. Jun Shin, J. Lee, [et al.] // *Acta Biomaterialia.* – 2018. – Vol.74. – P. 464–477.
  93. Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration / F. Pati, D. H. Ha, J. Jang, [et al.] // *Biomaterials. Elsevier.* – 2015. – Vol.62. – P. 164–175.
  94. Laschke, M.W. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering / M.W. Laschke, M.D. Menger // *Trends in Biotechnology. Trends Biotechnol.* – 2017. – Vol.35. – № 2. – P. 133–144.
  95. High-throughput fabrication of vascularized adipose microtissues for 3D bioprinting / L. Benmeridja, L. De Moor, E. De Maere, [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med. John Wiley and Sons Ltd.* – 2020. – Vol.14. – № 6. – P. 840–854.
  96. Bio–ink development for three–dimensional bioprinting of hetero–cellular cartilage constructs / V.H.M. Mouser, R. Levato, A. Mensinga, [et al.] // *Connect. Tissue Res. Connect Tissue Res.* – 2020. – Vol.61. – № 2. – P. 137–151.
  97. A review on cell damage, viability, and functionality during 3D bioprinting / H.Q. Xu, J. C. Li, Z. Y. Zhang, [et al.] // *Military Medical Research. BioMed Central.* – 2022. – Vol.9. – № 1. – P. 1–15.
  98. The Duo of Osteogenic and Angiogenic Differentiation in ADSC–Derived Spheroids / A.A. Gorkun, D. P. Revokatova, I. M. Zurina, [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol. Frontiers Media S.A.* – 2021. – Vol.9. – P. 572727.
  99. Venkatesh, D. Gingival mesenchymal stem cells / D. Venkatesh, K.P.M. Kumar, J.B. Alur // *J. Oral Maxillofac. Pathol. J Oral Maxillofac Pathol.* – 2017. – Vol.21. – № 2. – P. 296–298.
  100. Dental Tissue–Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application / L. Gan, Y. Liu, D. Cui, [et al.] // *Stem Cells Int. Stem Cells Int.* – 2020. – Vol.2020.
  101. Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells From the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties / K. Otabe, T. Muneta, N. Kawashima, [et al.] // *Cell Med. Cell Med.* – 2012. – Vol.4. – № 1. – P. 13–22.
  102. Oral Cavity as a Source of Mesenchymal Stem Cells Useful for Regenerative Medicine in Dentistry / I. Roato, G. Chinigo, T. Genova, [et al.] // *Biomedicines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).* – 2021. – Vol.9. – № 9.
  103. Characterization of different sources of human MSCs expanded in serum–free conditions with quantification of chondrogenic induction in 3D / H. Fabre, M. Ducret, O. Degoul, [et al.] // *Stem Cells Int. Stem Cells Int.* – 2019. – Vol.2019.

104. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine / G.B. Tomar, R. K. Srivastava, [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – Vol.393. – № 3. – P. 377–383.
105. Different wound healing properties of dermis, adipose, and gingiva mesenchymal stromal cells / M.A. Boink, L. J. Van den Broek, S. Roffel, [et al.] // *Wound Repair Regen. Wound Repair Regen.* – 2016. – Vol.24. – № 1. – P. 100–109.
106. Influence of Mesenchymal Stem Cell Sources on Their Regenerative Capacities on Different Surfaces / A. Mucientes, E. Herranz, E. Moro, [et al.] // *Cells. Cells.* – 2021. – Vol.10. – № 2. – P. 1–19.
107. Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cells / V.L. Zorin, A. A. Pulin, I. I. Eremin, [et al.] // *Cell Cycle. Taylor and Francis Inc.* – 2017. – Vol.16. – № 6. – P. 545–555.
108. Mollentze, J. An In Vitro and In Vivo Comparison of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells / J. Mollentze, C. Durandt, M.S. Pepper // *Stem Cells Int. Hindawi Limited.* – 2021. – Vol.2021.
109. Engineering microvasculature by 3D bioprinting of prevascularized spheroids in photo-crosslinkable gelatin / L. De Moor, J. Smet, M. Plovyt, [et al.] // *Biofabrication. IOP Publishing.* – 2021. – Vol.13. – № 4. – P. 045021.
110. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks / V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, [et al.] // *Biomaterials. Elsevier.* – 2009. – Vol.30. – № 12. – P. 2164–2174.
111. Bioprinting Using Organ Building Blocks: Spheroids, Organoids, and Assembloids / L.S. Baptista, V. Mironov, E. Koudan, [et al.] // *Tissue Eng. Part A. Tissue Eng Part A.* – 2024. – Vol.30. – № 13–14. – P. 377–386.
112. Mechanical properties of cell sheets and spheroids: the link between single cells and complex tissues / Y.M. Efremov, I. M. Zurina, V. S. Presniakova, [et al.] // *Biophys. Rev.* 2021 134. Springer. – 2021. – Vol.13. – № 4. – P. 541–561.
113. Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach / I.M. Zurina, V. S. Presniakova, D. V. Butnaru, [et al.] // *Acta Biomater. Elsevier.* – 2020. – Vol.113. – P. 63–83.
114. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance / J.C. Fontoura, C. Viezzer, F. G. Dos Santos, [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2020. – Vol.107.
115. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro / I.M. Zurina, A. I. Shpichka, I. N. Saburina, [et al.] // *Biomed Mater. IOP Publishing.* – 2018. – Vol.13. – № 5. – P. 054104.

116. Mimicking the liver function in micro-patterned units: Challenges and perspectives in 3D bioprinting / Z. Heydari, P. Pooyan, P. Yu. Bikmulina, [et al.] // *Bioprinting*. Elsevier B.V. – 2022. – Vol.27. – P. e00208.
117. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells / S.H. Bhang, S. W. Cho, W. G. La, [et al.] // *Biomaterials*. Elsevier. – 2011. – Vol.32. – № 11. – P. 2734–2747.
118. Lu, S. Towards spheroid-omics / S. Lu, D. Fürth, J. Gillis // *Nat. Methods* 2021 1811. Nature Publishing Group. – 2021. – Vol.18. – № 11. – P. 1283–1285.
119. MISpheroID: a knowledgebase and transparency tool for minimum information in spheroid identity / A. Peirsman, E. Blondeel, T. Ahmes., [et al.] // *Nat. Methods*. *Nat Methods*. – 2021. – Vol.18. – № 11. – P. 1294–1303.
120. Baraniak, P.R. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential / P.R. Baraniak, T.C. McDevitt // *Cell Tissue Res*. Springer Verlag. – 2012. – Vol.347. – № 3. – P. 701–711.
121. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres / C. Dromard, P. Bourin, M. Andre, [et al.] // *Ex-P. Cell Res*. Academic Press Inc. – 2011. – Vol.317. – № 6. – P. 770–780.
122. Specificity of 3D MSC Spheroids Microenvironment: Impact on MSC Behavior and Properties / A. Jauković, D. Abadjaeva, D. Trivanovic, [et al.] // *Stem Cell Reviews and Reports*. Springer. – 2020. – Vol.16. – № 5. – P. 853–875.
123. Aspiration-assisted freeform bioprinting of pre-fabricated tissue spheroids in a yield-stress gel / B. Ayan, N. Celik, Z. Zhang, [et al.] // *Commun. Phys*. 2020 31. Nature Publishing Group. – 2020. – Vol.3. – № 1. – P. 1–14.
124. Daly, A.C. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels / A.C. Daly, M.D. Davidson, J.A. Burdick // *Nat. Commun*. *Nat Commun*. – 2021. – Vol.12. – № 1.
125. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting / J.A. Brassard, M. Nikolaev, T. Hubscher, [et al.] // *Nat. Mater*. *Nat Mater*. – 2021. – Vol.20. – № 1. – P. 22–29.
126. Mesenchymal Niches for Digestive Organ Development, Homeostasis, and Disease / A.K.H. Loe, A. Rao-Bhatia, J. E. Kim, [et al.] // *Trends Cell Biol*. *Trends Cell Biol*. – 2021. – Vol.31. – № 3. – P. 152–165.
127. Murphy, K.C. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing / K.C. Murphy, S.Y. Fang, J.K. Leach // *Cell Tissue Res*. *Cell Tissue Res*. – 2014. – Vol.357. – № 1. – P. 91–99.
128. Spatially arranged encapsulation of stem cell spheroids within hydrogels for the regulation of

- spheroid fusion and cell migration / K. Se-Jeong, H. Byun, S. Lee, [et al.] // *Acta Biomater.* Elsevier. – 2022. – Vol.142. – P. 60–72.
129. Effects of mechanical properties of gelatin methacryloyl hydrogels on encapsulated stem cell spheroids for 3D tissue engineering / E.M. Kim, G. Min Lee, S. Lee, [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol. Int J Biol Macromol.* – 2022. – Vol.194. – P. 903–913.
130. Impact of Hydrogel Stiffness on Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cell Microspheroids / S. Zigon-Branc, M. Markovic, J. Van Hooricj, [et al.] // *Tissue Eng. Part A. Tissue Eng Part A.* – 2019. – Vol.25. – № 19–20. – P. 1369–1380.
131. Heo, D.N. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering / D.N. Heo, M. Hospodiuk, I.T. Ozbolat // *Acta Biomater. Acta Biomater.* – 2019. – Vol.95. – P. 348–356.
132. Scaffold and scaffold-free self-assembled systems in regenerative medicine / D. Thomas, D. Gaspar, A. Sorushanova, [et al.] // *Biotechnol. Bioeng. Biotechnol Bioeng.* – 2016. – Vol.113. – № 6. – P. 1155–1163.
133. Baker, B.M. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues / B.M. Baker, C.S. Chen // *Journal of Cell Science.* – 2012. – Vol.125. – № 13. – P. 3015–3024.
134. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture / K. Duval, H. Grover, L. H. Han, [et al.] // *Physiology. American Physiological Society.* – 2017. – Vol.32. – № 4. – P. 266–277.
135. Tibbitt, M.W. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture / M.W. Tibbitt, K.S. Anseth // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2009. – Vol.103. – № 4. – P. 655–663.
136. Muse cell spheroids have therapeutic effect on corneal scarring wound in mice and tree shrews / Y. Guo, Y. Xue, P. Wang, [et al.] // *Sci. Transl. Med. Sci Transl Med.* – 2020. – Vol.12. – № 562.
137. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine / M.E. Sakalem, M. T. De Sibio, F. A. da Silva da Costa, [et al.] // *Biotechnol. J. Biotechnol J.* – 2021. – Vol.16. – № 5.
138. Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures / C.M. Nelson, M. M. Vanduijn, J. L. Inman, [et al.] // *Science. Science.* – 2006. – Vol.314. – № 5797. – P. 298–300.
139. The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability / M. Domingos, F. Intranuovo, T. Russo, [et al.] // *Biofabrication. Biofabrication.* – 2013. – Vol.5. – № 4.
140. Khajehmohammadi, M. Effect of porosity on mechanical and biological properties of bioprinted scaffolds / M. Khajehmohammadi, R. Azizi Tafti, H. Nikukar // *J. Biomed. Mater. Res. A. J*

- Biomed Mater Res A. – 2023. – Vol.111. – № 2.
141. Di Caprio, N. Engineered biomaterials to guide spheroid formation, function, and fabrication into 3D tissue constructs / N. Di Caprio, J.A. Burdick // *Acta Biomater.* Acta Biomater. – 2023. – Vol.165. – P. 4–18.
  142. Tissue geometry drives deterministic organoid patterning / N. Gjorevski, M. Nikolaev, T. E. Brown, [et al.] // *Science.* Science. – 2022. – Vol.375. – № 6576.
  143. Aspiration–assisted freeform bioprinting of mesenchymal stem cell spheroids within alginate microgels / M.H. Kim, D. Banerjee, N. Celik, [et al.] // *Biofabrication.* IOP Publishing. – 2022. – Vol.14. – № 2. – P. 024103.
  144. Jeon, E.Y. Biomaterials and bioengineering to guide tissue morphogenesis in epithelial organoids / E.Y. Jeon, L. Sorrells, H.E. Abaci // *Front. Bioeng. Biotechnol.* Front Bioeng Biotechnol. – 2022. – Vol.10.
  145. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model / N. V. Kosheleva, Yu. M. Efremov, B. S. Shavkuta, [et al.] // *Sci. Re– P.* Nature Publishing Group. – 2020. – Vol.10. – № 1. – P. 1–15.
  146. Building a tissue: Mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro– and nanoscale / N. V. Kosheleva , Yu. M. Efremov, P. I. Koteneva, [et al.] // *Acta Biomater.* Elsevier. – 2023. – Vol.165. – P. 140–152.
  147. Mathematical and computational models in spheroid–based biofabrication / S. Arjoca, A. Robu, M. Neagu, [et al.] // *Acta Biomater.* Elsevier. – 2022.
  148. Bioprinting functional tissues / A.N. Leberfinger, S. Dinda, Y. Wu, [et al.] // *Acta Biomater.* Elsevier. – 2019. – Vol.95. – P. 32–49.
  149. Tissue spheroid fusion–based in vitro screening assays for analysis of tissue maturation / Z. Hajdu, V. Mironov, A. N. Mehesz, [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* NIH Public Access. – 2010. – Vol.4 – № 8. – P. 659.
  150. Malda, J. The Roles of Hypoxia in the In Vitro Engineering of Tissues / J. Malda, T.J. Klein, Z. Upton // *Tissue Eng.* – 2007. – Vol.13. – № 9. – P. 2153–2162.
  151. Oxygen gradients in tissue–engineered Pegt/Pbt cartilaginous constructs: Measurement and modeling / J. Riesle, L. Rouwkema, D. E. Martens, [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004. – Vol.86. – № 1. – P. 9–18.
  152. Assessing glucose and oxygen diffusion in hydrogels for the rational design of 3D stem cell scaffolds in regenerative medicine / L. Figueiredo, R. Pace, C. D. Arros, [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* John Wiley and Sons Ltd. – 2018. – Vol.12. – № 5. – P. 1238–1246.
  153. Vidotto, M. Effective Diffusion and Tortuosity in Brain White Matter / M. Vidotto, D. Dini, E. De Momi // *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS.* Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. –

2018. – P. 4901–4904.
154. Diffusion profile of macromolecules within and between human skin layers for (trans)dermal drug delivery / A.M. Römgens, D. L. Bader, J. A. Bouwstra, [et al.] // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* Elsevier Ltd. – 2015. – Vol.50. – P. 215–222.
155. McMurtrey, R.J. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three–Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids / R.J. McMurtrey // *Tissue Eng. Part C Methods.* – 2016. – Vol.22. – № 3. – P. 221–249.
156. Dorvee, J.R. Rediscovering hydrogel–based double–diffusion systems for studying biomineralization / J.R. Dorvee, A.L. Boskey, L.A. Estroff // *CrystEngComm.* – 2012. – Vol.14. – № 18. – P. 5681–5700.
157. Diffusion and convection in collagen gels: Implications for transport in the tumor interstitium / S. Ramanujan, A. Pluen, T. D. McKee, [et al.] // *Biophys. J.* Elsevier. – 2002. – Vol.83. – № 3. – P. 1650–1660.
158. Collagen networks determine viscoelastic properties of connective tissues yet do not hinder diffusion of the aqueous solvent / F. Sauer, L. Oswald, A. A. de Schellenberger, [et al.] // *Soft Matter.* Royal Society of Chemistry. – 2019. – Vol.15. – № 14. – P. 3055–3064.
159. Oxygen mapping: Probing a novel seeding strategy for bone tissue engineering / I. Westphal, C. Jedelhauser, G. Liebsch, [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* John Wiley and Sons Inc.. – 2017. – Vol.114. – № 4. – P. 894–902.
160. The Role of Dissolved Oxygen Levels on Human Mesenchymal Stem Cell Culture Success, Regulatory Compliance, and Therapeutic Potential / S. Bahsoun, K. Coopman, N. R. Forsyth, [et al.] // *Stem Cells and Development.* Mary Ann Liebert Inc. – 2018. – Vol.27. – № 19. – P. 1303–1321.
161. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells / C. Holzwarth, M. Vaegler, F. Gieseke, [et al.] // *BMC Cell Biol.* BioMed Central. – 2010. – Vol.11. – № 1. – P. 1–11.
162. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose–derived stem cells / J.R. Choi, B. Pingguan-Murphy, W. A. B. W. Abas, [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Academic Press Inc. – 2014. – Vol.448. – № 2. – P. 218–224.
163. Quantifying the correlation between spatially defined oxygen gradients and cell fate in an engineered three–dimensional culture model / A.G. Ardakani, U. Cheema, R. A. Brown, [et al.] // *J. R. Soc. Interface.* Royal Society of London. – 2014. – Vol.11. – № 98.
164. Estimating oxygen distribution from vasculature in three–dimensional tumour tissue / D.R. Grimes, P. Kannan, D. R. Warren, [et al.] // *J. R. Soc. Interface.* Royal Society of London. – 2016.

- Vol.13. – № 116.
165. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone / E. Volkmer, I. Drosse, S. Otto, [et al.] // *Tissue Eng. – Part A*. Mary Ann Liebert Inc. – 2008. – Vol.14. – № 8. – P. 1331–1340.
  166. Functional consequences of glucose and oxygen deprivation on engineered mesenchymal stem cell-based cartilage constructs / M.J. Farrell, J. I. Shin, L. J. Smith, [et al.] // *Osteoarthr. Cartil.* W.B. Saunders Ltd. – 2015. – Vol.23. – № 1. – P. 134–142.
  167. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: Microvessel populations with distinctive structural and functional properties / K.E. Schlageter, P. Molnar, G. D. Lapin, [et al.] // *Microvasc. Res.* Academic Press Inc. – 1999. – Vol.58. – № 3. – P. 312–328.
  168. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions / D. Wendt, S. Stroebel, M. Jakob, [et al.] // *Biorheology.* – 2006. – Vol.43. – № 3–4. – P. 481–488.
  169. Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension / M.C. Lewis, B. D. Macarthur, J. Malsa, [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2005. – Vol.91. – № 5. – P. 607–615.
  170. Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers / M. Radisic, W. Deen, R. Langer, [et al.] // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* – 2005. – Vol.288. – № 3. – P. H1278–H1289.
  171. Permeability mapping of gelatin methacryloyl hydrogels / A.K. Miri, H. G. Hosseinabadi, B. Cecen, [et al.] // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.* – 2018. – Vol.77. – P. 38–47.
  172. Hypoxic Preconditioning Enhances Survival and Proangiogenic Capacity of Human First Trimester Chorionic Villus-Derived Mesenchymal Stem Cells for Fetal Tissue Engineering / D. Hao, C. He, B. Ma, [et al.] // *Stem Cells Int.* 2019.
  173. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: Graft cell death and anti-death strategies / M. Zhang, D. Methot, V. Poppa, [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* Academic Press. – 2001. – Vol.33. – № 5. – P. 907–921.
  174. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing / H.T. Whelan, R. L. Smits Jr, E. V. Buchman, [et al.] // *J. Clin. Laser Med. Surg. J Clin Laser Med Surg.* – 2001. – Vol.19. – № 6. – P. 305–314.
  175. Yue, L. Monte Carlo analysis of the enhanced transcranial penetration using distributed near-infrared emitter array / L. Yue, M.S. Humayun // *Journal of Biomedical Optics. SPIE.* – 2015. – Vol.20. – № 8. – P. 088001.
  176. Henderson, T.A. Near-infrared photonic energy penetration: Can infrared phototherapy effectively reach the human brain? / T.A. Henderson, L.D. Morris // *Neuropsychiatric Disease*

- and Treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat.* – 2015. – Vol.11. – P. 2191–2208.
177. Debruyne, A.C. Balance between the cell viability and death in 3D / A.C. Debruyne, I.A. Okkelman, R.I. Dmitriev // *Semin. Cell Dev. Biol. Academic Press.* – 2023. – Vol.144. – P. 55–66.
  178. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior / E. Mancha Sánchez, J. C. Gomez-blanco, E. Lopez Nieto, [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers Media S.A.* – 2020. – Vol.8. – P. 541593.
  179. Anders, J.J. Low–Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy / J.J. Anders, R.J. Lanzafame, P.R. Arany // *Photomed. Laser Surg.* – 2015. – Vol.33. – № 4. – P. 183–184.
  180. Hamblin, M.R. Non–mammalian Hosts and Photobiomodulation: Do All Life–forms Respond to Light? / M.R. Hamblin, Y.–Y. Huang, V. Heiskanen // *Photochem. Photobiol.* – 2019. – Vol.95. – № 1. – P. 126–139.
  181. Burditt, A.K. Irradiation / A.K. Burditt // *Quar. Treat. Pests Food Plants. CRC Press.* – 2019. – P. 101–117.
  182. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells / R. Fekrazad, S. Asefi, M. Allahdadi, [et al.] // *Photomed Laser Surg. Mary Ann Liebert, Inc.* – 2016. – Vol.34. – № 11. – P. 533–542.
  183. Light based anti–infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond / R. Yin, T. Dai, P. Avci, [et al.] // *Curr. Opin. Pharmacol. Elsevier.* – 2013. – Vol.13. – № 5. – P. 731–762.
  184. Mester, A. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903–1984) / A. Mester, A. Mester // *Photomedicine and Laser Surgery. Mary Ann Liebert, Inc.* – 2017. – Vol.35. – № 8. – P. 393–394.
  185. Effect of laser rays on wound healing / E. Mester, T. Spiry, B. Szende, [et al.] // *Am. J. Surg. Am J Surg.* – 1971. – Vol.122. – № 4. – P. 532–535.
  186. Laser photobiomodulation for cartilage defect in animal models of knee osteoarthritis: a systematic review and meta–analysis / A. Xiang, H. Deng, K. Cheng, [et al.] // *Lasers in Medical Science. Springer.* – 2019.
  187. Photobiomodulation Therapy (PBMT) Applied in Bone Reconstructive Surgery Using Bovine Bone Grafts: A Systematic Review / M.– P. de O. Rosso, D. V. Buchaim, K. T. Pomini, [et al.] // *Mater. (Basel, Switzerland).* – 2019. – Vol.12. – № 24.
  188. Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review / F. Salehpour, J. Mahmoudi, F. Kamari, [et al.] // *Molecular Neurobiology. Humana Press Inc.* – 2018. – Vol.55. – № 8. – P. 6601–6636.
  189. Pain management using photobiomodulation: Mechanisms, location, and repeatability quantified by pain threshold and neural biomarkers in mice / M.V.– P. de Sousa, M. Kawakubo, C. Ferraresi, [et al.] // *J. Biophotonics.* – 2018. – Vol.11. – № 7. – P. e201700370.

190. The effect of red-to-near-infrared (R/NIR) irradiation on inflammatory processes / T. Walski, K. Dąbrowska, A. Drohomirecka, [et al.] // *International Journal of Radiation Biology*. Taylor and Francis Ltd. – 2019. – Vol.95. – № 9. – P. 1326–1336.
191. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats / A. Lamaro-Cardoso, m. M. Bachion, J. M. Morais, [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* Elsevier B.V. – 2019. – Vol.194. – P. 174–182.
192. Brignardello-Petersen, R. Uncertainty about usefulness of low-level laser therapy for improving implant outcomes / R. Brignardello-Petersen // *J. Am. Dent. Assoc. J Am Dent Assoc.* – 2018. – Vol.149. – № 3. – P. e55.
193. Shedding light on the FDA's 510(k) approvals process: low-level laser therapy devices used in the treatment of androgenetic alopecia / S. Wang, D. Seth, H. Ezaldein, [et al.] // *J. Dermatolog. Treat. J Dermatolog Treat.* – 2019. – Vol.30. – № 5. – P. 489–491.
194. Effects of the Lexington LaserComb on hair regrowth in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata / T. C. Wikramanayake, R. Rodriguez, S. Choundhary, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* Springer. – 2012. – Vol.27. – № 2. – P. 431–436.
195. Karu, T.I. Ten lectures on basic science of laser phototherapy / T.I. Karu // *Prima Books.* – 2007. – P. 414.
196. de Freitas, L.F. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy / L.F. de Freitas, M.R. Hamblin // *Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.* – 2016. – Vol.22. – № 3. – P. 348–364.
197. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells / K. Yin, R. Zhu, S. Wang, [et al.] // *Stem Cells Dev.* Mary Ann Liebert Inc. – 2017. – Vol.26. – № 10. – P. 762–775.
198. Yodh, A.G. Functional imaging with diffusing light / A.G. Yodh, D.A. Boas // *Biomedical Photonics Handbook.* CRC Press. – 2014. – P. 311–356.
199. The Regulatory Effect of Low-Intensity Radiation in the Near-Infrared Region on the Early Development of Zebrafish (*Danio rerio*) / V.I. Yusupov, N. B. Simonova, G. M. Chuiko, [et al.] // *Biophysics (Oxf).* – 2018. – Vol.63. – № 1. – P. 109–115.
200. Erratum to: Titanium scaffold osteogenesis in healthy and osteoporotic rats is improved by the use of low-level laser therapy (GaAlAs) / L.M.R. de Vasconcellos, M. A. Moreira Barbara, E. da Silva Rovai, [et al.] // *Lasers Med. Sci. Lasers in Medical Science.* – 2017. – Vol.32. – № 3. – P. 733.
201. Photobiomodulation preconditioning prevents cognitive impairment in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia / L. Yang, Y. Dong, C. Wu, Y. Li, [et al.] // *J. Biophotonics.* – 2019. – Vol.12. – № 6. – P. e201800359.

202. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: Light before the storm / T. Agrawal, G. K. Gupta, V. Rai, [et al.]// Dose-Response. University of Massachusetts. – 2014. – Vol.12. – № 4. – P. 619–649.
203. Photobiomodulation enhances mitochondrial respiration in an in vitro rotenone model of Parkinson's disease / P.Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka, [et al.] // Opt. Eng. SPIE-Intl Soc Optical Eng. – 2020. – Vol.59. – № 06. – P. 1.
204. Hamblin, M.R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation / M.R. Hamblin // Photochem. Photobiol. – 2018. – Vol.94. – № 2. – P. 199–212.
205. Optical fields in porous polylactide matrices / A. P. Sviridov, V. S. Zhigarkov, A. G. Shubnyi, [et al.] // Quantum Electron. IOP Publishing. – 2020. – Vol.50. – № 1. – P. 81–86.
206. Phototherapy with LED light modulates healing processes in an in vitro scratch-wound model using 3 different cell types / A. Teuschl, E. Rosado Balmayor, H. Redl, [et al.] // Dermatologic Surg. Lippincott Williams and Wilkins. – 2015. – Vol.41. – № 2. – P. 261–268.
207. Karu, T.I. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy / T.I. Karu, S.F. Kolyakov // Photomed. Laser Surg. – 2005. – Vol.23. – № 4. – P. 355–361.
208. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast-like cells cultured on porous hydroxyapatite scaffolds / S.I. Parenti, S. Panseri, A. Gracco, [et al.] // Ann. Ist. Super. Sanita. – 2013. – Vol.49. – № 3. – P. 255–260.
209. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: Lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system / A. P. Sommer, A. L. Pinheiro, A. R. Mester, [et al.] // J. Clin. Laser Med. Surg. – 2001. – Vol.19. – № 1. – P. 29–33.
210. Cytotoxic Effect of Low-Intensity Infrared Laser Irradiation on Human Melanoma Cells / N. V. Andreeva, K. V. Zotov, Y. Y. Yegorov, [et al.] // Mol. Biol. Pleiades Publishing. – 2018. – Vol.52. – № 6. – P. 878–890.
211. The effect of infrared laser irradiation on the growth of human melanoma cells in culture / Andreeva, K. V. Zotov, Y. Y. Yegorov, [et al.] // Biophysics. Maik Nauka-Interperiodica Publishing. – 2016. – Vol.61. – № 6. – P. 979–984.
212. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy / H. Chung, T. Dai, S. Sharma, [et al.] // Ann. Biomed. Eng. – 2012. – Vol.40. – № 2. – P. 516–533.
213. Karu, T.I. Molecular mechanisms of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation / T.I. Karu // Lasers life Sci. – 1988. – Vol.2. – № 1. – P. 53–74.
214. Heiskanen, V. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? / V. Heiskanen, M.R. Hamblin // Photochem. Photobiol. Sci. – 2018. – Vol.17. – № 8. – P. 1003–1017.
215. Hamblin, M.R. How to Write a Good Photobiomodulation Article / M.R. Hamblin // Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg. – 2019. – Vol.37. – № 6. – P. 325–326.

216. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise / S.A. Guaraldo, A. J. Serra, E. M. Amadio, [et al.] // *Lasers Med. Sci. Lasers Med Sci.* – 2016. – Vol.31. – № 5. – P. 833–840.
217. Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review / S.A. Dos Santos, A. J. Serra, T. G. Stancker, [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* Hindawi Limited. – 2017. – Vol.2017.
218. Hamblin, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation / M. R. Hamblin // *AIMS Biophys.* – 2017. – Vol.4. – № 3. – P. 337–361.
219. Karu, T.I. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation / T.I. Karu // *Photochem. Photobiol.* – 2008. – Vol.84. – № 5. – P. 1091–1099.
220. Osipov, A.N. Biological activity of hemoprotein nitrosyl complexes / A.N. Osipov, G.G. Borisenko, Y.A. Vladimirov // *Biochem.* – 2007. – Vol.72. – № 13. – P. 1491–1504.
221. Mason M.G. Re-evaluation of the near infrared spectra of mitochondrial cytochrome c oxidase: Implications for non invasive in vivo monitoring of tissues / M.G. Mason, P. Nicholls, C.E. Cooper // *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* Elsevier. – 2014. – Vol.1837. – № 11. – P. 1882–1891.
222. Karu, T.I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation / T.I. Karu // *IUBMB Life.* John Wiley & Sons, Ltd. – 2010. – Vol.62. – № 8. – P. 607–610.
223. Stuehr, D.J. Mammalian nitric oxide synthases / D.J. Stuehr // *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics.* Elsevier. – 1999. – Vol.1411. – № 2–3. – P. 217–230.
224. Mechanisms of the Antioxidant Effects of Nitric Oxide / D.A. Wink, K. M. Miranda, M. G. Esprey, [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2001. – Vol.3. – № 2. – P. 203–213.
225. Brown, G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase / G.C. Brown // *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics.* Elsevier. – 2001. – Vol.1504. – № 1. – P. 46–57.
226. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases / M.W.J. Cleeter, J. M. Cooper, V. M. Darley-Usmar, [et al.] // *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd. – 1994. – Vol.345. – № 1. – P. 50–54.
227. Effects of laser and LED radiation on mitochondrial respiration in experimental endotoxic shock / E.A. Buravlev, T. V. Zhidkova, Y. A. Vladimirov, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* Springer-Verlag. – 2013. – Vol.28. – № 3. – P. 785–790.
228. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells / Y. Wang, Y. Y.

- Huang, Y. Wang, [et al.] // *Sci. Re– P.* – 2017. – Vol.7. – № 1. – P. 7781.
229. George, S. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts / S. George, M.R. Hamblin, H. Abrahamse // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2018. – Vol.188. – P. 60–68.
230. Low–energy laser irradiation promotes cellular redox activity / R. Lubart, M. Eichler, R. Lavi, [et al.] // *Photomedicine and Laser Surgery.* Mary Ann Liebert, Inc. – 2005. – Vol.23. – № 1. – P. 3–9.
231. ROS and ROS–Mediated Cellular Signaling / J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* Hindawi Limited. – 2016. – Vol.2016.
232. A possible explanation of laser–induced stimulation and damage of cell cultures / H. Friedmann, R. Lubart, I. Laulich, [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* – 1991. – Vol.11, – № 1. – P. 87–91.
233. Red and near–infrared light evokes Ca<sup>2+</sup> influx, endoplasmic reticulum release and membrane depolarization in neurons and cancer cells / I. Golovynska, S. Golovinskyi, Y. Stepanov, [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol. J Photochem Photobiol B.* – 2021. – Vol.214.
234. Munaron, L. Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? / L. Munaron, S. Antoniotti, D. Lovisolo // *J. Cell. Mol. Med.* John Wiley & Sons, Ltd. – 2004. – Vol.8. – № 2. – P. 161–168.
235. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light / Y. Zhang, S. Song, C. C. Fong, [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2003. – Vol.120. – № 5. – P. 849–857.
236. Gilmore, T.D. Introduction to NF–κB: players, pathways, perspectives / T.D. Gilmore // *Oncogene* 2006 2551. Nature Publishing Group. – 2006. – Vol.25. – № 51. – P. 6680–6684.
237. Photobiomodulation therapy modulates epigenetic events and NF–κB expression in oral epithelial wound healing / A. de Farias Gabriel, V. P. Wagner, C. Correa, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* Springer London. – 2019. – Vol.34. – № 7. – P. 1465–1472.
238. Redox Regulation of Cell Survival / D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, [et al.] // *Antioxid Redox Sign.* Mary Ann Liebert, Inc. – 2010. – Vol.10. – № 8. – P. 1343–1374.
239. Borzabadi–Farahani, A. Effect of low–level laser irradiation on proliferation of human dental mesenchymal stem cells; a systemic review / A. Borzabadi–Farahani // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2016. – Vol.162. – P. 577–582.
240. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: Effects and mechanisms of action / M. Giannelli, F. Chellini, C. Sassoli [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2013. – Vol.228. – № 1. – P. 172–181.
241. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser

- irradiation / X. Gao, T. Chen, D. Xing, [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2006. – Vol.206. – № 2. – P. 441–448.
242. Photobiomodulation with single and combination laser wavelengths on bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation and differentiation to bone or cartilage / R. Fekrazad, S. Asefi, M. B. Eslaminejad [et al.] // *Lasers Med. Sci.* Springer London. – 2019. – Vol.34. – № 1. – P. 115–126.
243. Photostimulation of osteogenic differentiation on silk scaffolds by plasma arc light source / A.S. Çakmak, S. Çakmak, H. S. Vatansever, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* – 2018. – Vol.33. – № 4. – P. 785–794.
244. Duda, D.G. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells / D.G. Duda, D. Fukumura, R.K. Jain // *Trends Mol. Med.* – 2004. – Vol.10. – № 4. – P. 143–145.
245. Photobiomodulation can prevent apoptosis in cells from mouse periodontal ligament / L.V. Faria, I. N. Andrade, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* *Lasers Med Sci.* – 2020. – Vol.35. – № 8. – P. 1841–1848.
246. Photobiomodulation therapy reduces apoptotic factors and increases glutathione levels in a neuropathic pain model / A. Janzadeh, F. Nasirinezhad, M. Masoumipoor, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* 2016 319. Springer. – 2016. – Vol.31. – № 9. – P. 1863–1869.
247. Gomes, L.C. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability / L.C. Gomes, G. Di Benedetto, L. Scorrano // *Nat. Cell Biol.* – 2011. – Vol.13. – № 5. – P. 589–598.
248. Labbé K. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior / K. Labbé, A. Murley, J. Nunnari // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2014. – Vol.30. – № 1. – P. 357–391.
249. Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED) / J. C. Tatmatsu-Rocha, C. R. Tim, L. Avo, [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2018. – Vol.187. – P. 41–47.
250. Photobiomodulation with 630 plus 810 nm wavelengths induce more in vitro cell viability of human adipose stem cells than human bone marrow-derived stem cells / F. Zare, A. Moradi, S. Fallahnezhad, S. K. Ghoreishi, [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* Elsevier B.V. – 2019. – Vol.201.
251. Engel, K.W. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy / K.W. Engel, I. Khan, P.R. Arany // *J. Biophotonics.* – 2016. – Vol.9. – № 11–12. – P. 1148–1156.
252. Karu, T. Photochemical Effects Upon the Cornea, Skin and Other Tissues / T. Karu // *Photobiol. Low-power Laser Eff.* – 1986. – Vol.56. – № 5. – P. 1–20.
253. Digging deeper: Structural background of PEGylated fibrin gels in cell migration and

- lumenogenesis / A. I. Shpichka, P. V. Konarev, Yu. M. Efremov, [et al.] // RSC Adv. Royal Society of Chemistry. – 2020. – Vol.10. – № 8. – P. 4190–4200.
254. Evaluation of the vasculogenic potential of hydrogels based on modified fibrin / A. I. Shpichka, A. V. Koroleva, A. Deiwick, [et al.] // Cell tissue biol. – 2017. – Vol.11. – № 1. – P. 81–87.
255. Mineralization Content Alters Osteogenic Responses of Bone Marrow Stromal Cells on Hydroxyapatite/Polycaprolactone Composite Nanofiber Scaffolds / T. Ruckh, D. A. Carroll, J. R. Weaver, [et al.] // J. Funct. Biomater. J Funct Biomater. – 2012. – Vol.3. – № 4. – P. 776–798.
256. Chitosan–g–oligo(L,L–lactide) Copolymer Hydrogel Potential for Neural Stem Cell Differentiation / V.A. Revkova, E. A. Grebenik, V. A. Kalsin, [et al.] // Tissue Eng. – Part A. Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA. – 2020. – Vol.26. – № 17–18. – P. 953–963.
257. Pre–conditioning with Remote Photobiomodulation Modulates the Brain Transcriptome and Protects Against MPTP Insult in Mice / V. Ganeshan, N. V. Skladnev, J. Y. Kim, [et al.] // Neuroscience. Elsevier Ltd. – 2019. – Vol.400. – P. 85–97.
258. Effects of low–level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth / A. P. Fernandes, M. A. Junqueira, N. C. T. Marques, [et al.] // J. Appl. Oral Sci. Faculdade de Odontologia de Bauru. – 2016. – Vol.24. – № 4. – P. 332–337.
259. Low–intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency / C. Moura–Netto, L. S. Ferreira, C. M. Maranduba, [et al.] // Braz. Oral Res. 2016. – Vol.30. – № 1.
260. Effect of Low–Level Laser Irradiation on Proliferative Activity of Wharton’s Jelly Mesenchymal Stromal Cells / I. V. Vakhrushev, V. I. yusupov, O. S. Raeva, [et al.] // Bull. Ex– P. Biol. Med. Springer New York LLC. – 2019. – Vol.167. – № 1. – P. 136–139.
261. Activation of Bone Marrow Multipotent Stromal Cells by Laser and EHF Radiation and Their Combined Impacts / R.K. Chailakhyan, Yu. V. Gerasimov, V. I. Yusupov, [et al.] // Sovrem. Tehnol. v Med. – 2017. – Vol.9. – № 1. – P. 28.
262. Effect of 830–nm laser phototherapy on olfactory neuronal ensheathing cells grown in vitro on novel bioscaffolds / A.C.M. Renno, P. A. McDonnell, M. C. Crovace, [et al.] // J. Appl. Biomater. Funct. Mater. Wichtig Publishing Srl. – 2015. – Vol.13. – № 3. – P. e234–e240.
263. Proliferating Cells versus Differentiated Cells in Tissue Engineering / R. Strehl, K. Schumacher, U. de Vries, [et al.] // Tissue Eng. – 2002. – Vol.8. – № 1. – P. 37–42.
264. Odontogenic differentiation and biomineralization potential of dental pulp stem cells inside Mg–based bioceramic scaffolds under low–level laser treatment / A. Theocharidou, A. Bakopou;ou, E. Kontonasaki, [et al.] // Lasers Med. Sci. Lasers in Medical Science. – 2017. – Vol.32. – № 1. – P. 201–210.

265. The effect of photobiomodulation therapy on the differentiation, proliferation, and migration of the mesenchymal stem cell: A review / B. Ahrabi, M. R. Tavirani, M. S. Khoramgah, [et al.] // *Journal of Lasers in Medical Sciences. Laser Application in Medical Sciences Research Center.* – 2019. – Vol.10. – № 4. – P. S96–S103.
266. Effects of photobiomodulation on the redox state of healthy and cancer cells / C.M.G. de Faria, H. Ciol, V. S. Bagnato, [et al.] // *Biomed. Opt. Express*, – Vol.12, Issue 7, p– P. 3902–3916. Optica Publishing Group. – 2021. – Vol.12. – № 7. – P. 3902–3916.
267. Photobiomodulation at multiple wavelengths differentially modulates oxidative stress in vitro and in vivo / K. Rupel, L. Zupin, A. Colliva, [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* Hindawi Limited. – 2018. – Vol.2018.
268. Differential responses of myoblasts and myotubes to photobiomodulation are associated with mitochondrial number / H.J. Serrage, S. Joannis, P. R. Cooper, [et al.] // *J. Biophotonics.* – 2019. – Vol.12. – № 6. – P. e201800411.
269. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix / K. Choi, B. J. Kang, H. Kim, [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater.* – 2013. – Vol.101 B. – № 6. – P. 919–928.
270. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts / F.G. Basso, D. G. Soares, C. A. de Souza Costa, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* Springer London. – 2016. – Vol.31. – № 5. – P. 973–978.
271. Beyond 2D: effects of photobiomodulation in 3D tissue-like systems / P.Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka, [et al.] // *J. Biomed. Opt. SPIE–Intl Soc Optical Eng.* – 2020. – Vol.25. – № 04. – P. 1.
272. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects / R. Fekrazad, M. S. Ghuchani, M. B. Eslaminejad, [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* Elsevier B.V. – 2015. – Vol.151. – P. 180–185.
273. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant / J.B. de Oliveira Gonçalves, D. V. Buchaim, C. R. de Souza Bueno, [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* Elsevier B.V. – 2016. – Vol.162. – P. 663–668.
274. Photobiomodulation Therapy Associated with Heterologous Fibrin Biopolymer and Bovine Bone Matrix Helps to Reconstruct Long Bones / M. P. D. O. Rosso, A. T. Oyadomari, K. Y. Pomini, [et al.] // *Biomolecules.* NLM (Medline). – 2020. – Vol.10. – № 3. – P. 383.
275. Low-level laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF- $\beta$ , FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression / L.S. de S. de Oliveira, A. A. de Araujo, R. F. de Araujo Jr, [et al.] // *Int. J. Ex–P. Pathol.* Blackwell Publishing Ltd. – 2017. – Vol.98. – № 2. – P. 75–85.

276. Effects of biosilicate® scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing / K.N.Z. Pinto, C. Tim, M. C. Crovace, [et al.] // *Photomed. Laser Surg.* – 2013. – Vol.31. – № 6. – P. 252–260.
277. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with wire osteosynthesis: a comparative laser fluorescence and Raman spectral study on rabbits / A.L.B. Pinheiro, N. R. S. Santos, P. C. Oliveira, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* – 2013. – Vol.28. – № 3. – P. 815–822.
278. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix / L. Abramovitch-Gottlieb, T. Gross, D. Naveh, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* – 2005. – Vol.20. – № 3–4. – P. 138–146.
279. Low power laser irradiation and human adipose-derived stem cell treatments promote bone regeneration in critical-sized calvarial defects in rats / Y.H. Wang, J. Y. Wu, S. C. Kong, [et al.] // *PLoS One. Public Library of Science.* – 2018. – Vol.13. – № 4.
280. Effect of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement into bone-grafted alveolar defects / K.A. Kim, E. K. Choi, J. Y. Ohe, [et al.] // *Am. J. Orthod. Dentofac. Ortho*– P. Mosby Inc. – 2015. – Vol.148. – № 4. – P. 608–617.
281. Increase of neuronal sprouting and migration using 780 nm laser phototherapy as procedure for cell therapy / S. Rochkind, D. El-Ani, A. Shahar, [et al.] // *Lasers Surg. Med.* – 2009. – Vol.41. – № 4. – P. 277–281.
282. 3D printing scaffold coupled with low level light therapy for neural tissue regeneration / W. Zhu, J. K. George, V. J. Sorger, [et al.] // *Biofabrication. Institute of Physics Publishing.* – 2017. – Vol.9. – № 2. – P. 025002.
283. Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy / C.C. Shen, Y. C. Yang, T. B. Huang, [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. – Part A.* – 2013. – Vol.101. – № 10. – P. 2763–2777.
284. The effect of laser preexposure on seeding endothelial cells to a biomaterial surface / S.H. Hsu, K. Y. Fu, T. B. Huang, [et al.] // *Photomed. Laser Surg.* – 2010. – Vol.28. – № 2.
285. Low-level laser therapy affects dentinogenesis and angiogenesis of in vitro 3D cultures of dentin-pulp complex / H. El Nawam, R. E. Backly, A. Zaky, [et al.] // *Lasers Med. Sci. Springer London.* – 2019. – Vol.34. – № 8. – P. 1689–1698.
286. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds / A. Gupta, G. K. Keshri, A. Yadav, [et al.] // *J. Biophotonics. Wiley-VCH Verlag.* – 2015. – Vol.8. – № 6. – P. 489–501.
287. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation without impairing lung function / V. Cury, T. M. de Lima, C. M. Prado, [et al.] // *J. Biophotonics. Wiley-VCH Verlag.* – 2016. – Vol.9.

- № 11–12. – P. 1199–1207.
288. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation / J.L. Costa Carvalho, A. A. de Brito, A. P. L. de Oliveira, [et al.] // *J. Biophotonics*. Wiley–VCH Verlag. –2016. – Vol.9. – № 11–12. – P. 1208–1221.
289. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice / R.A. Brochetti, M. P. Leal, R. Rodriguez, [et al.] // *Lasers Med. Sci.* Springer London. – 2017. – Vol.32. – № 8. – P. 1825–1834.
290. Pre-conditioning with near infrared photobiomodulation reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative stress in cochlear hair cells / A. Bartos, Y. Grondin, M. E. Bortoni, [et al.] // *J. Biophotonics*. Wiley–VCH Verlag. – 2016. – Vol.9. – № 11–12. – P. 1125–1135.
291. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair / N.H.C. Souza, R. A. Mesquita-Ferrari, M. F. S. D. Rodriguez, [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* Blackwell Publishing Inc. – 2018. – Vol.22. – № 10. – P. 4922–4934.
292. Photobiomodulation Elicits a Differential Cytokine Response in a Cultured Analogue of Human Skin / N.J. Prindeze, J. G. Ardanuy, B. C. Carney, [et al.] // *Eplasty*. – 2019. – Vol.19. – P. e3.
293. Effect of 830 nm Laser Phototherapy on Osteoblasts Grown In Vitro on Biosilicate® Scaffolds / A.C.M. Renno, P. A. McDonnell, M. C. Crovace, [et al.] // *Photomed. Laser Surg.* – 2010. – Vol.28. – № 1. – P. 131–133.
294. Effects of Photobiomodulation and Mesenchymal Stem Cells on Articular Cartilage Defects in a Rabbit Model / R. Fekrazad, M. B. Eslaminejad, A. M. Shayan, [et al.] // *Photomed. Laser Surg.* Mary Ann Liebert Inc. – 2016. – Vol.34. – № 11. – P. 543–549.
295. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки десны как новый источник аутологичных миобластов / Н.В. Кошелева, И.Н. Сабурин, И.М. Зурина, А.А. Горкун, И.И. Еремин, А.А. Пулин, В.Л. Зорин, П.Б. Копнин // *Гены и клетки*. – 2019. – Vol.14, – № 5. – P. 124.
296. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY) / C.E. Blanchet, A. Spilotros, F. Schwemmer, [et al.] // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography. – 2015. – Vol.48. – № 2. – P. 431–443.
297. Svergun, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing / D.I. Svergun // *Biophys. J.* Biophysical Society. – 1999. – Vol.76. – № 6. – P. 2879–2886.
298. Modeling and investigation of the swelling kinetics of acrylamide–sodium acrylate hydrogel / A.S. Kipcak, O. Ismail, I. Doymaz, [et al.] // *J. Chem.* Hindawi Publishing Corporation. – 2014. – Vol.2014.

299. Патент RU2744301C1 Российская Федерация, МПК C12N1/00 (2006–01–01). Способ получения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из пупочного канатика новорожденного : RU2744301C1 : заявл. 21.07.2020 : опубл. 05.03.2021 / Свистунов А.А., Бутнару Д.В., Тимашев П.С., Кошелева Н.В., Бикмулина П.Ю., Пешкова М.А., Шпичка А.И. // Патентон.ру: электрон. справочник патентов URL: <https://patenton.ru/patent/RU2744301C1>
300. Патент RU2779742C1 Российская Федерация, МПК C12N5/02(2006–01–01). Способ получения суспензии единичных жизнеспособных клеток из клеточных сфероидов : RU2785136C1 : заявл. 10.08.2021 : опубл. 13.09.2022 / Свистунов А.А., Бутнару Д.В., Тимашев П.С., Кошелева Н.В., Бикмулина П.Ю., Пешкова М.А., Шпичка А.И. // Патентон.ру: электрон. справочник патентов URL: <https://patenton.ru/patent/RU2779742C1>
301. Патент RU2785136C1 Российская Федерация, МПК C12N5/02(2006–01–01). Способ получения матрикс–связанных везикул из монослойных культур клеток и клеточных сфероидов : RU2785136C1 : заявл. 12.11.2021 : опубл. 05.12.2022 / Бутнару Д.В., Тимашев П.С., Пешкова М.А., Кошелева Н.В., Власова И.И., Бикмулина П.Ю., Шпичка А.И. // Патентон.ру: электрон. справочник патентов URL: <https://patenton.ru/patent/RU2785136C1>
302. LIFT of cell spheroids: Proof of concept / A.A. Antoshin, E. V. Minaeva, P. I. Koteneva, [et al.] // *Bioprinting. Elsevier.* – 2023. – Vol.34. – P. e00297.
303. Design of tissue equivalents: MSC spheroids as building blocks in 3D bioprinting / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // Сборник тезисов V Международного биомедицинского саммита им. Сеченова (SIBS–2021). – 2021. – С. 3.
304. 3D bioprinted fibrin–gelatin–based structures preserve the functionality of MSC spheroids / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // Сборник тезисов международной конференции XXV Saratov Fall Meeting. – 2021. – P. 54.
305. 3D биопечать функциональных трехмерных конструкторов на основе сфероидов из мезенхимных стромальных клеток / Бикмулина П.Ю., Кошелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С. // Сборник тезисов Национального Конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки. – т. 17. – 2022. – С. 37.
307. Red and near–infrared photobiomodulation of MSCs metabolism in 3D conditions / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // 2022 Int. Conf. Laser Opt. ICLO 2022 – Proceedings. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. – 2022.
308. The stimulating effect of low–intensity LED irradiation on the in vitro model of Parkinson’s disease / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // 3<sup>rd</sup> book of Abstracts, MEPhi. – 2018. – P. 80–81.
309. Фотобиомодуляция метаболизма мезенхимальных стромальных клеток в трехмерных

- тканеинженерных конструктах / П.Ю. Бикмулина, Н.В. Кошелева, А.И. Шпичка, В.И. Юсупов, Ю.А. Рочев, П.С. Тимашев // IX Съезд Российского фотобиологического общества. – 2019. – С. 117.
310. Фотобиомодуляция метаболизма клеток в 3D–системах / П.Ю. Бикмулина, Н.В. Кошелева, А.И. Шпичка, В.И. Юсупов, Ю.А. Рочев, П.С. Тимашев // Гены и Клетки. – 2019. – С. 37–38.
311. Low–Intensity LED Irradiation Improves Cell Viability in 3D Scaffolds / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // TERMIS EU 2019 Book of Abstracts. – 2019. – P. 1260.
312. Photobiomodulation of cell metabolism within 3D tissue–engineered structures / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // VII Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика». – 2020. – с. 179–180.
313. Биофабрикация трехмерных тканеинженерных конструкций с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции / П.Ю. Бикмулина, Н.В. Кошелева, А.И. Шпичка, Ю.М. Ефремов, П.С. Тимашев // Сборник тезисов семинара «Современные тренды в биофотонике 2023». – 2023. – С. 36.
314. Photobiomodulation stimulates the survivability of 3D bioprinted MSC–based spheroids / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka [et al.] // Book of abstracts Royan International Hybrid Twin Congress 2024. – 2024. – P. 135.
315. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion–based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability / N. Paxton, W. Smolan, T. Bock, [et al.] // Biofabrication. IOP Publishing. – 2017. – Vol.9. – № 4. – P. 044107.
316. Gelatin Nanoparticle–Injectable Platelet–Rich Fibrin Double Network Hydrogels with Local Adaptability and Bioactivity for Enhanced Osteogenesis / Z. Mu, K. Chen, S. Yuan, Y. Li, [et al.] // Adv. Healthc. Mater. Wiley–VCH Verlag. – 2020. – Vol.9. – № 5. – P. 1901469.
317. Scaffold for liver tissue engineering: Exploring the potential of fibrin incorporated alginate dialdehyde–gelatin hydrogel / R. Rajalekshmi, A. K. Shaji, R. Joseph, [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V. – 2021. – Vol.166. – P. 999–1008.
318. Gelatin–Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting / I. Pepelanova, K. Kruppa, T. Scheper, [et al.] // Bioeng. 2018, – Vol.5, Page 55. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2018. – Vol.5. – № 3. – P. 55.
319. Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels / Y.C. Chen, R. Z. Lin, H. Qi, [et al.] // Adv. Funct. Mater. Adv Funct Mater. – 2012. – Vol.22. – № 10. – P. 2027–2039.
320. 3D–bioprinted, phototunable hydrogel models for studying adventitial fibroblast activation in

- pulmonary arterial hypertension / D. Davis–Hall, E. Thomas, B. Pena, [et al.] // *Biofabrication*. *Biofabrication*. – 2022. – Vol.15. – № 1. – P. 015017.
321. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials / M. Hospodiuk, M. Dey, D. Sosnoski, [et al.] // *Biotechnol. Adv. England*. – 2017. – Vol.35. – № 2. – P. 217–239.
322. Characterization of Cell Damage and Proliferative Ability during and after Bioprinting / L. Ning, N. Betancourt, D. J. Schreyer, [et al.] // *ACS Biomater. Sci. Eng. United States*. – 2018. – Vol.4. – № 11. – P. 3906–3918.
323. Standardized 3D Bioprinting of Soft Tissue Models with Human Primary Cells / M. Rimann, E. Bono, H. Annaheim, [et al.] // *J. Lab. Autom. United States*. – 2016. – Vol.21. – № 4. – P. 496–509.
324. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting / A. Ribeiro, M. M. Blokzjl, R. Levato, [et al.] // *Biofabrication*. *England*. – 2017. – Vol.10. – № 1. – P. 14102.
325. Dubbin, K. Quantitative criteria to benchmark new and existing bio–inks for cell compatibility / Dubbin K., Tabet A., Heilshorn S.C. // *Biofabrication*. *England*. – 2017. – Vol.9. – № 4. – P. 44102.
326. 3D or not 3D: a guide to assess cell viability in 3D cell systems / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, Yu. M. Efremov, [et al.] // *Soft Matter*. *The Royal Society of Chemistry*. – 2022. – Vol.18. – № 11. – P. 2222–2233.
327. Flow–enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro / K.A. Homan, N. Gupta, K. T. Kroll, [et al.] // *Nat Methods*. – 2019. – Vol.16. – № 3. – P. 255–262.
328. A 3D bioprinting system to produce human–scale tissue constructs with structural integrity / H.W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, [et al.] // *Nat. Biotechnol*. *Nature Publishing Group*. – 2016. – Vol.34. – № 3. – P. 312–319.
329. Functional 3D Neural Mini–Tissues from Printed Gel–Based Bioink and Human Neural Stem Cells / Q. Gu, E. Tomaskovic–Crook, R. Lozano, [et al.] // *Adv. Healthc. Mater. Germany*. – 2016. – Vol.5. – № 12. – P. 1429–1438.
330. Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue / F.A. Dabrowski, A. Burdzinska, A. Kulesza, [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Res*. *Blackwell Publishing*. – 2017. – Vol.43. – № 11. – P. 1758–1768.
331. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach / H. Zhang, B. Zhang, Y. Tao, [et al.] // *Cell Biochem. Funct*. *Cell Biochem Funct*. – 2012. – Vol.30. – № 8. – P. 643–649.
332. Rampersad, S.N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays / S.N. Rampersad // *Sensors (Switzerland)*. *Molecular Diversity Preservation International*. – 2012. – Vol.12. – № 9. – P. 12347–12360.

333. Li, X. Metallothionein Protects Islets from Hypoxia and Extends Islet Graft Survival by Scavenging Most Kinds of Reactive Oxygen Species / X. Li, H. Chen, P.N. Epstein // *J. Biol. Chem. Elsevier.* – 2004. – Vol.279. – № 1. – P. 765–771.
334. O'Brien, P. In vitro cytotoxicity assessment / P. O'Brien, J.R. Haskins // *Methods Mol. Biol. Humana Press.* – 2007. – Vol.356. – P. 415–425.
335. Photobiomodulation in 3D tissue engineering / P. Y. Bikmulina, N. V. Kosheleva, A. I. Shpichka, [et al.] // *J. Biomed. Opt. Society of Photo–Optical Instrumentation Engineers.* – 2022. – Vol.27. – № 9. – P. 90901–90902.
336. Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications / C. Dompe, L. Moncrieff, J. Matys, [et al.] // *J. Clin. Med. MDPI AG.* – 2020. – Vol.9. – № 6. – P. 1724.