

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор
кандидат биологических наук, доцент

Тимашев Петр Сергеевич
Кошелева Настасья Владимировна

Официальные оппоненты:

Кудан Елизавета Валерьевна – доктор биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», научно-образовательная лаборатория тканевой инженерии и регенеративной медицины, заведующий лабораторией

Шеваль Евгений Валерьевич – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, лаборатория ультраструктуры клеточного ядра, заведующий лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «10» октября 2025г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.003.03 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2025г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.003.03
кандидат биологических наук, доцент



Шпичка Анастасия Иосифовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Технология 3D биопечати является одним из перспективных направлений тканевой инженерии и регенеративной медицины. Данный подход позволяет формировать эквиваленты тканей и органов для трансплантации в условиях недостатка донорского материала, тестирования эффективности лекарственных препаратов и фундаментальных исследований процессов регенерации. Однако остро стоит необходимость преодоления существующих технологических и биологических барьеров, таких как выбор биоматериалов, клеток, факторов роста и дифференцировки, повышение выживаемости клеток, морфогенез с формированием тканей [Murphy, Atala, 2014]. Важнейшей задачей при этом остается сохранение жизнеспособности и функциональности тканеинженерной конструкции после проведения 3D биопечати., так как в процессе биопечати клетки страдают от давления, УФ-излучения во время полимеризации и колебаний температуры [Smyth et al. 2021].

Одним из перспективных для решения этой проблемы методов является фотобиомодуляция (ФБМ). Этот метод применяют в терапии различных заболеваний, он основан на нетепловом воздействии света красной и ближней инфракрасной области спектра. Важной особенностью, определяющей неинвазивные свойства ФБМ, является окно прозрачности: 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 [Yodh and Voas 2014; Yusupov et al. 2018]. При этом биологическая реакция на ФБМ сильно зависит от параметров облучения, таких как длина волны, интенсивность и доза [Karu 2007; Teuschl et al. 2015]. Также существует большое количество мишеней ФБМ в клетке, включая каналы и рецепторы клеточной мембраны, митохондриальные белки и внеклеточные ферменты [de Freitas and Hamblin 2016; Hamblin 2018]. Каналы транзиторного рецепторного потенциала (TRP), криптохромы и опсины, обычно отвечают на свет в зеленом и синем диапазоне спектра. Антиоксидантные ферменты, а именно глутатион (GSH), супероксиддисмутаза (SOD) и каталаза (CAT), часто присутствуют во внеклеточном пространстве и могут быть активированы или ингибированы в ответ на ФБМ, что зачастую приводит к снижению воспаления [Guaraldo et al. 2016; R Hamblin 2017; Dos Santos et al. 2017]. Наиболее важным акцептором красного и ближнего инфракрасного света в клетке считается цитохром с оксидаза [de Freitas and Hamblin 2016; Karu 2008]. Этот комплекс отвечает за перенос электронов от цитохрома с к молекулярному кислороду и может модулировать окислительно-восстановительные процессы в клетке [de Freitas and Hamblin 2016].

Степень разработанности темы исследования

В литературе присутствуют 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 существенный потенциал благодаря минимальному поглощению света водой в гидрогелевых биочернилах и наличию светодиодов в экструзионных биопринтерах для фотосшивки. Данный подход открывает перспективы повышения 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 влияния ФБМ на клетки в составе сформированных вручную трехмерных гидрогелевых конструкций и сфероидов. В данной работе впервые создана тканеинженерная конструкция с клеточными сфероидными из мезенхимных стромальных клеток с использованием комбинации методов ФБМ и 3D биопечати.

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

Цель и задачи исследования

Цель: фабрикация гидрогелевых тканеинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции (ФБМ) в красном и ближнем инфракрасном диапазоне.

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

Научная новизна

В настоящей работе впервые разработано и применено сочетание фотобиомодуляции (ФБМ) с 3D экструзионной биопечатью для создания тканеинженерных конструкций. Впервые исследованы эффекты ФБМ для сфероидов из мезенхимных стромальных клеток в трехмерной среде. Впервые установлены механизмы двух различных режимов ФБМ в трехмерных условиях. Впервые установлен способ получения жизнеспособных тканеинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток с высокой метаболической и пролиферативной активностью.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данное диссертационное исследование предлагает новое решение для биопечати жизнеспособных тканеинженерных конструкций, основанное на использовании метода фотобиомодуляции. Показана нетоксичность и адгезивность биочернил на основе фибрина и желатина для МСК. Показано, что гидрогелевые конструкции, полученные методом 3D биопечати, обладают более высокой плотностью и метаболической активностью клеток. Установлено, что для корректного анализа жизнеспособности объемных тканеинженерных конструкций необходимо использовать комплекс 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 создания жизнеспособных и функциональных тканеинженерных конструкций на основе МСК. Полученные результаты могут иметь важное значение для разработки новых типов тканеинженерных конструкций, включающих в себя различные клетки, стандартизованных с использованием комплекса методов и успешно масштабируемых. На основе проведенных в рамках диссертационного исследования работ зарегистрированы три объекта интеллектуальной собственности (патенты на изобретение РФ).

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

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 паспортам научных специальностей 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, а именно: пункту 10, 11, 18, и 1.5.22. Клеточная биология, а именно: пункту 11; 12; 14; 18.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется использованием достаточного количества биологических образцов, рассчитанного при планировании эксперимента, использованием методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам, а также использованием сертифицированного научного оборудования и реактивов. Результаты диссертационной работы были представлены в виде устных докладов и в постерных сессиях на V и VII Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS) (Москва, Россия, 2021, 2023), IX съезде Российского Фотобиологического Общества (Шепси, Россия, 2021), XXV Saratov Fall Meeting 2021 (Саратов, Россия, 2021), финальном этапе Форума «Наука будущего – наука молодых» (Москва и Калининград, Россия, 2021), международной конференции International Conference Laser Optics, ICLO 2022 (Санкт-Петербург, Россия, 2022), финальном этапе Всероссийского молодежного конкурса научных проектов #ВЦЕНТРЕНАУКИ (Сочи, Россия, 2022 г), международной конференции Regenerative Medicine International Symposium; Chronic and Degenerative diseases (Тегеран, Иран, 2022), конференции Современные тренды в биофотонике 2023 (Нижний Новгород, Россия, 2023), международной конференции Royan International Hybrid Twin Congress (Тегеран, Иран, 2024), международном форуме Неделя онкоурологии в Уфе (Уфа, Россия, 2025).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовали мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделенные из десны человека, которые культивировали в стандартных условиях на адгезивных пластиковых чашках Петри. Культуры МСК пассировали при достижении 80-90% конfluence с использованием растворов трипсина и версена. Трехмерное культивирование клеток проводили в различных вариантах, включая инкапсуляцию в гидрогель и создание клеточных сфероидов на неадгезивных агарозных планшетах. Для подтверждения иммунофенотипа МСК использовали проточную цитофлуориметрию, исследуя наличие специфических маркеров. Также проводили тест на апоптоз с использованием аннексина V и йодида пропидия.

Для подтверждения принадлежности первичных культур к популяции МСК проводили дифференцировку в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Клетки культивировали до образования монослоя и заменяли питательные среды на индукционные каждые 3 сут в течение 21 сут. Для анализа дифференцировки использовали красители: Oil Red O для адипогенной, ализариновый красный для остеогенной и альциановый синий для хондрогенной дифференцировки. Образцы фиксировали, обрабатывали соответствующими растворами и проводили цифровую съемку результатов микроскопии.

В качестве первого компонента гидрогеля для биопечати был выбран фибрин, модифицированный полиэтиленгликолем (ПЭГ) для повышения прозрачности и стабильности.

Полученный раствор инкубировали при 37°C, добавляя тромбин для полимеризации. Также использовали фибрин-желатиновый гидрогель с метакриловым ПЭГ и рибофлавином для фотополимеризации. Жидкий гидрогель смешивали с клеточным компонентом (суспензией клеток или клеточных сфероидов) перед биопечатью и охлаждали до комнатной температуры. Реологические эксперименты проводили на реометре MCR 302 с температурным контролем. Выполняли изотермические и динамические температурные измерения для определения модуля упругости и модуля потерь. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (MPP) использовали для исследования структуры гидрогеля в естественных условиях на станции EMBL P12. Для визуализации структуры гидрогеля использовали фибриноген, конъюгированный с флуоресцентным красителем, и съемку проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе с длиной волны возбуждающего лазера 488 нм.

В работе использовали экструзионные биопринтеры BioX и BioX6 для печати биочернил при температуре 23°C. Биочернила помещали в картриджи объемом 3 мл с помощью шприца. Модели конструкций конвертировали из stl-файлов в g-code с использованием программного обеспечения биопринтера. Процесс печати включал послойную фотосшивку с полимеризацией метакрилатного компонента и химическую сшивку тромбином. После отмывки конструкции инкубировали в модифицированной ростовой среде с пониженным содержанием бычьей эмбриональной сыворотки FBS и добавлением апротинина.

Была проведена оценка оптимальных температур и давлений для экструзионного биопринтера с целью улучшения печатемости чернил, при этом температуру варьировали от 17 до 37°C, а давление — от 5 до 200 кПа. Коэффициент набухания напечатанных конструкций определяли с помощью микровесов, взвешивая образцы сразу после печати, через 24 часа инкубации в PBS при 37°C и после сушки в течение 7 сут. Локальные механические характеристики измеряли с помощью наноиндентера, вычисляя модуль Юнга по модели контактной механики Герца. Механические свойства конструкции оценивали с использованием микротестера G2, проводя индентирование в растворе PBS при комнатной температуре.

Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест метаболической (AlamarBlue assay) и пролиферативной активности (Quant-iT PicoGreen kit). Аламаровый синий восстанавливается митохондриальными ферментами, и его флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре после инкубации образцов. Для определения количества ДНК клетки лизировали, а образцы с гидрогелем обрабатывали протеиназой K перед добавлением раствора PicoGreen. Нормированную метаболическую активность рассчитывали как отношение флуоресцентного сигнала к количеству ДНК, что позволяло сравнивать образцы с различным содержанием клеток. Для анализа продукции АТФ сфероиды лизировали, и концентрацию АТФ оценивали с использованием ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit.

Для визуализации жизнеспособности клеток и сфероидов использовали метод окраски Live/Dead assay с кальцеином для живых клеток и йодидом пропидия для мертвых. Напечатанные конструкции окрашивали в течение 30 мин при 37°C, после чего образцы отмывали и анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Для иммуоцитохимии конструкции фиксировали в параформальдегиде, затем инкубировали с первичными антителами и конъюгированными с флуоресцентными красителями вторичными антителами. При анализе дифференцировочного потенциала в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях дополнительно измеряли оптическую плотность после окрашивания дифференцированных образцов. Морфометрический анализ реактивации сфероидов и их поведения в трехмерных условиях осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ, включая автоматический расчет параметров миграции клеток и спраутинга.

Клетки в монослойных и трехмерных условиях облучали с помощью светодиодных излучателей СДМ-07 в красном (633 нм) и инфракрасном (840 нм) диапазонах. Облучение проводили в течение 1200 сек для красного света и 600 сек для инфракрасного, при этом изменение температуры не превышало десятых долей градуса. Перед ФБМ планшеты с клеточными культурами помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO₂. Для определения первичных мишеней ФБМ использовали ингибиторный анализ с различными ингибиторами дыхательной цепи митохондрий, применяли ротенон, азид натрия и нитропруссид натрия.

Анализ активности митохондрий проводили с помощью установки CellInsight CX7, предварительно окрашивая клетки флуоресцентными красителями Hoechst 33258 и MitoTracker Green FM. Анализ изображений проводили с использованием программного пакета SpotDetector для измерения интенсивности флуоресценции MitoTracker Green FM. Количественный анализ активности митохондрий также проводили с помощью Seahorse XF96 Analyzer, оценивали скорости потребления кислорода клетками, использовали ингибиторы АТФ-синтазы и дыхательной цепи для определения различных параметров дыхания митохондрий.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика клеточного компонента биочернил

Был проведен анализ первичных культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) с использованием одного из наиболее распространенных и принятых набора минимальных

критериев, предложенного Международным Обществом Клеточной Терапии в 2006г [Dominici et al. 2006]. 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 1А). Культура клеток при этом имела стандартную для МСК веретеновидную морфологию (Рисунок 1Б) и была способна к дифференцировке в хондро-, адипо- и остеогенном (Рисунок 1Б, В, Г) направлениях при индукции коммерческими средами в течение 21 суток.

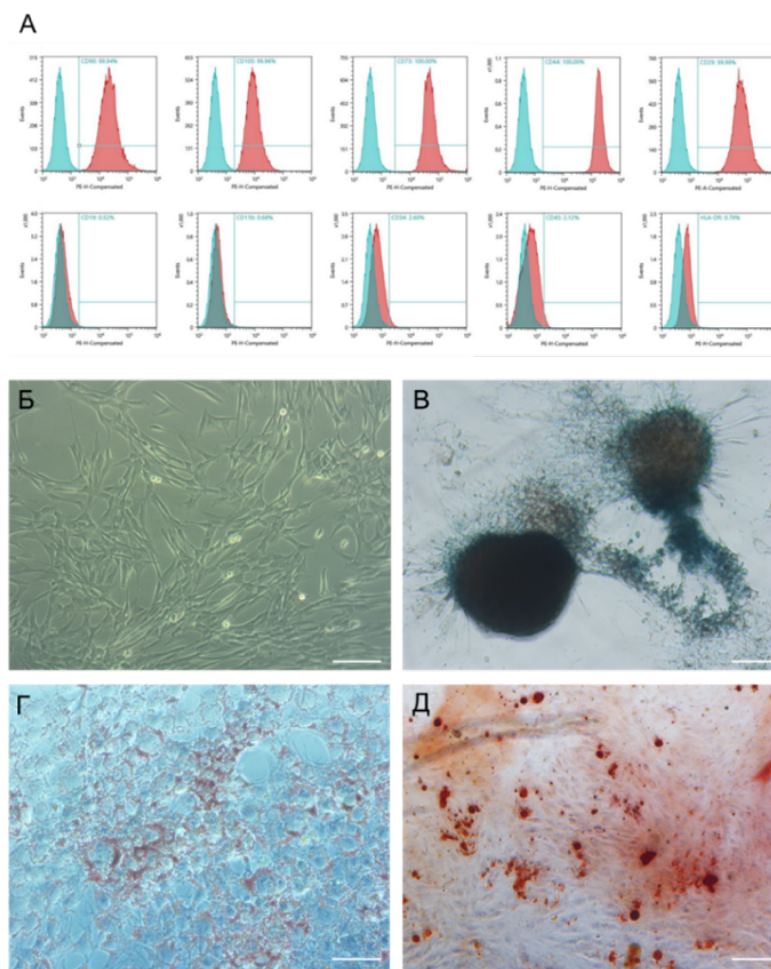


Рисунок 1 - Характеризация первичных культур МСК, выделенных из десны человека, 4-ый пассаж. А – анализ иммунофенотипа МСК, проточная цитофлуориметрия. Б – морфология МСК в монослойной культуре, световая фазово-контрастная микроскопия. В – анализ способности МСК к дифференцировке в хондрогенном направлении, Г - в адипогенном направлении, Д - в остеогенном направлении

При помещении суспензии клеток в неадгезивные агарозные планшеты в количестве 1000 клеток на лунку МСК формировали округлые клеточные сфероиды, компактизирующиеся через 3 суток культивирования (Рисунок 2А, Б). Была проанализирована жизнеспособность полученных сфероидов: МСК формировали плотный сфероид без признаков некротического ядра в центре (Рисунок 2В). Такие сфероиды в дальнейшем использовали для всех экспериментов.

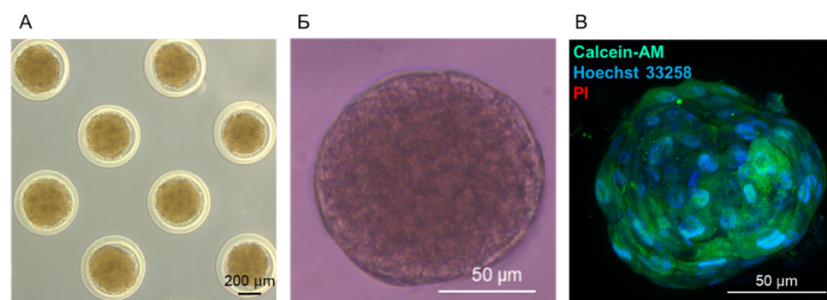


Рисунок 2 - Характеризация морфологии и жизнеспособности МСК в составе 3-дневных сфероидов (1000 клеток/сфероид). А, Б – анализ морфологии и диаметра сфероидов, фазово-контрастная световая микроскопия. В – анализ жизнеспособности сфероидов, Live/Dead тест и флуоресцентная микроскопия

Спустя 3 суток культивирования в фибрин-желатиновом гидрогеле метаболическая и пролиферативная активность клеток была выше, чем в стандартной монослойной культуре (Рисунок 3А, Б). Так же на 10 сутки культивирования был проведен анализ на живые/мертвые клетки. Клетки обладали высокой жизнеспособностью (Рисунок 3В), вытянутые клетки формировали агрегаты отдельных клеток (Рисунок 3В). Визуально клеточная плотность при этом была выше, что хорошо коррелирует с повышенной метаболической и пролиферативной активностью.

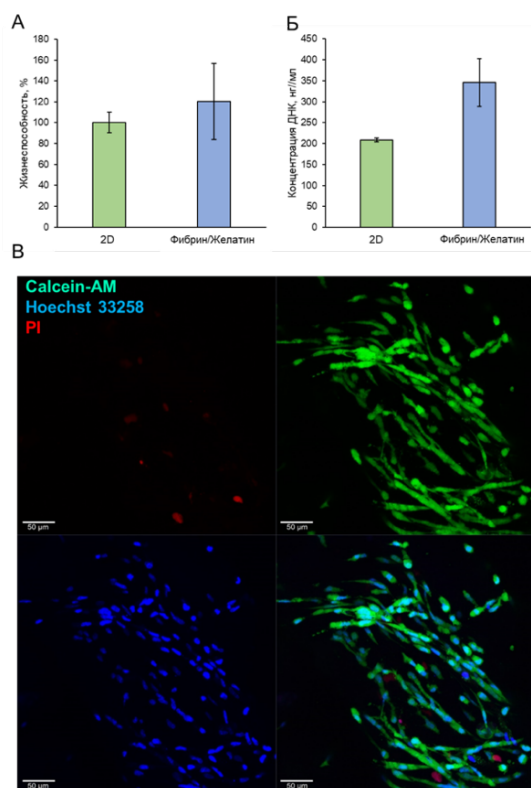


Рисунок 3 - Жизнеспособность клеток после инкапсуляции в желатин-фибриновый гидрогель. А – метаболическая активность, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия. Б – пролиферативная активность, PicoGreen тест, спектрофлуориметрия. В – анализ жизнеспособности, Live/Dead тест и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

3D экструзионная биопечать клеточными сфероидами

Для трехмерной биопечати конструкций использовали экструзионный 3D биопринтер BioX (CellInk, Швеция) (Рисунок 4А). Так как в работе использовали биочернила на основе температурозависимого желатина, было предусмотрено поддержание температуры 23°C на всех этапах биопечати. В качестве 3D модели использовали квадратную сетку размерами 10x10x4 мм (Рисунок 4Д). С одной стороны, данная модель позволяет получить объемную конструкцию 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 напечатанных конструкций, что важно для их всестороннего анализа различными методами.

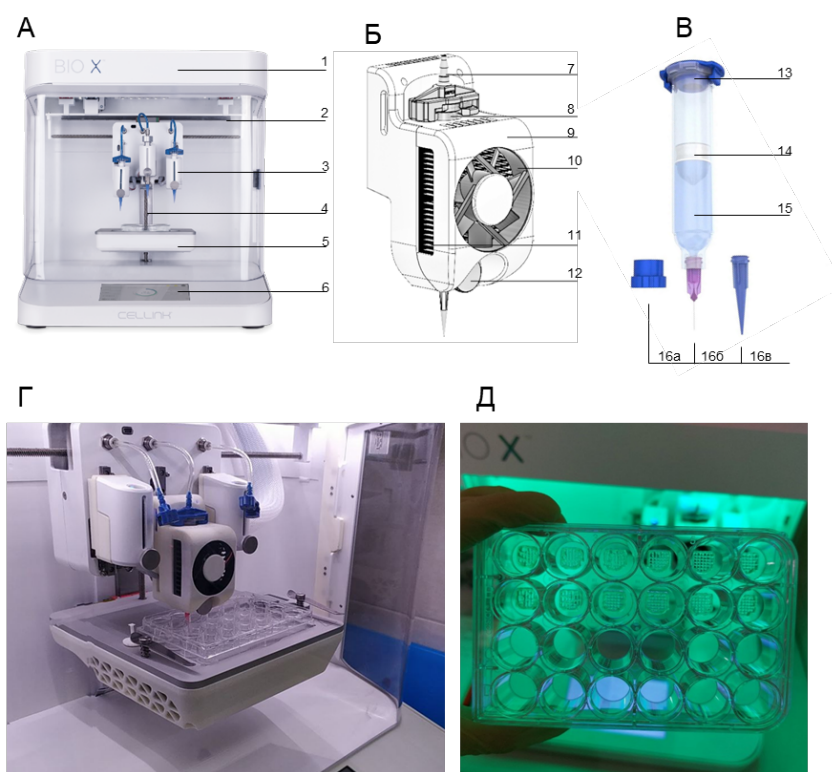


Рисунок 4 - Схема устройства стандартного экструзионного биопринтера и его составных частей. А – экструзионный биопринтер, Б – терморегулируемая печатающая головка, В – картридж для биопечати. Г – процесс 3D биопечати в 24-луночный планшет с использованием терморегулируемой головки, Д – внешний вид конструкций, напечатанных в 24-луночный планшет

На протяжении всего срока культивирования в группах с гидрогелем наблюдали тенденцию к увеличению метаболической активности и пролиферации (Рисунок 5А, 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 сут и вплоть до 21 сут культивирования нормированная метаболическая

активность была максимальна в группе «биопечать» (Рисунок 5В). Это свидетельствует о том, что на протяжении всего срока культивирования напечатанных конструкций со сфероиды из МСК клетки поддерживали активный метаболизм и пролиферировали. Нормированная метаболическая активность сфероидов МСК постепенно повышалась в соответствии со сроком культивирования (рис. 5В). Таким образом, в каждый из промежутков культивирования 3-7 и 7-14 суток фактически происходило удвоение нормированной метаболической активности. На всех сроках культивирования были обнаружены лишь единичные мертвые клетки в 3-дневных конструкциях (Рисунок 5Г). 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 5Г).

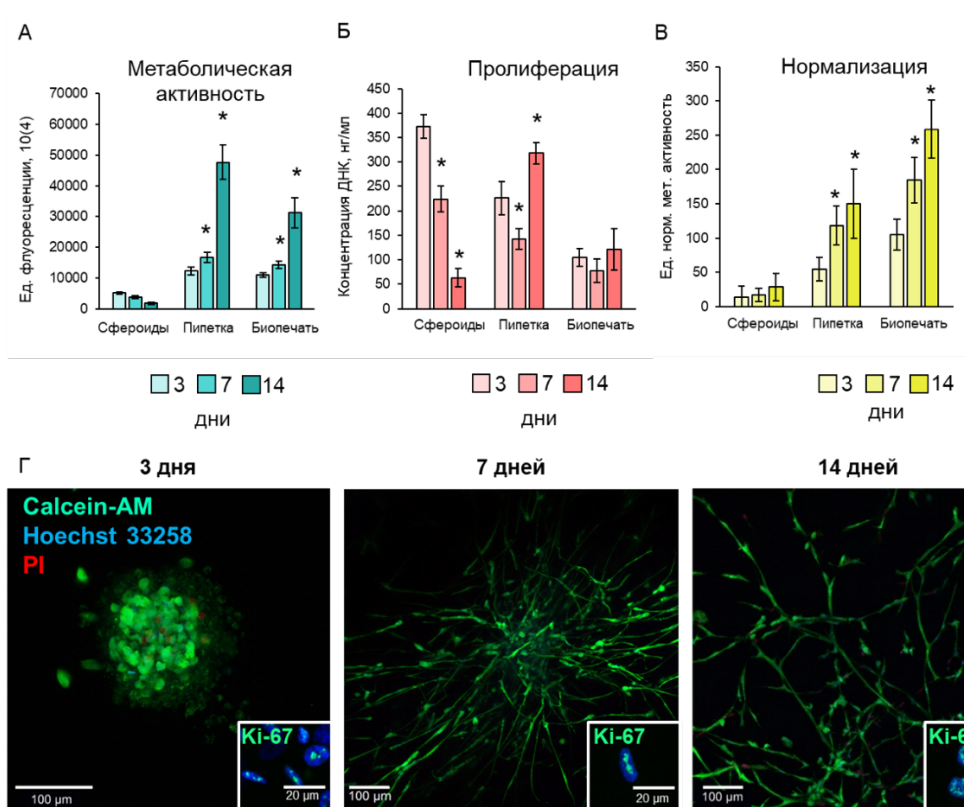


Рисунок 5 - Жизнеспособность напечатанных конструкций на различных сроках и в различных условиях. А – метаболическая активность, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия, Б - пролиферативная активность, PicoGreen тест и спектрофлуориметрия, В – нормированная метаболическая активность, полученная отношением метаболической активности к количеству ДНК, Г - жизнеспособность и морфология сфероидов через 3, 7 и 14 сут культивирования, кальцеином окрашены живые клетки, йодидом пропидия – мертвые, красителем хёхстом – ядра, Ki-67, Live/Dead тест/иммуноцитохимия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. * $p < 0.05$ относительно других образцов в группе

Дальнейшее детальное сравнение таких параметров, как количество отростков, их суммарная и средняя длина, средняя ширина, среднее количество разветвлений на отросток

между группами «Биопечать» и «Пипетка» показало разницу в динамике миграции клеток (Рисунок 6). В течение 14 суток культивирования количество отростков, их длина и количество разветвлений имели тенденцию к увеличению, в то время как ширина отростков, напротив, уменьшалась (Рисунок 6А–Д). В конструкциях, смешанных вручную, группа «Пипетка», сфероиды быстрее развивали отростки, до 10 суток они были длиннее и более разветвлены (рис. 6А–Г). На 3 сутки, в отличие от группы напечатанных конструкций, они становились значительно тоньше (Рисунок 6В). Однако при дальнейшем культивировании группа «Биопечать» достигала тех же значений, и на 14 сутки количество разветвлений на отросток в этой группе увеличивалось в 1,7 раза (Рисунок 6Г). Схема динамики спраутинга сфероидов представлена на Рисунке 6Е: сначала появляется небольшое количество утолщенных отростков, затем они удлиняются, становятся тоньше и ветвятся на протяжении всего периода культивирования.

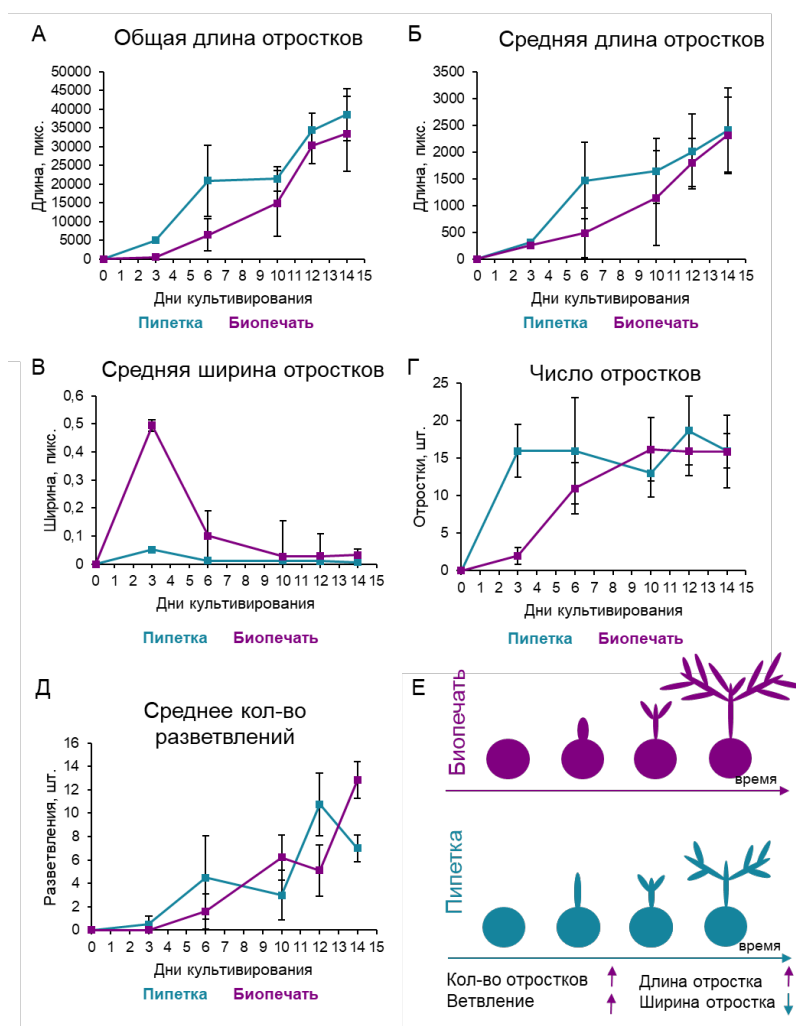


Рисунок 6 - Анализ параметров спраутинга сфероидов и миграции клеток в конструкциях в динамике на сроках культивирования от 0 до 14 сут. А – общая длина отростков, Б – средняя длина одного отростка, В – средняя ширина одного отростка, Г – число отростков, Д – среднее число соединений на поле зрения, Е – схема изменения морфологии сфероидов в смешанных вручную/напечатанных конструкциях

Фотобиомодуляция МСК в составе тканеинженерных конструкций

Клетки в монослойных и трехмерных условиях облучали с помощью немонохроматических светодиодных излучателей LDM-07 (Институт фотонных технологий РАН, Россия) (Рисунок 7А). Облучение планшетов с образцами проводили в красном (633 нм, 1200 сек, 2.2 Дж/см²) или инфракрасном диапазонах (840 нм, 600 сек, 2.2 Дж/см²) после калибровки установки (Рисунок 7Б, В). Колебания температуры в процессе облучения не превышали десятых долей градуса.

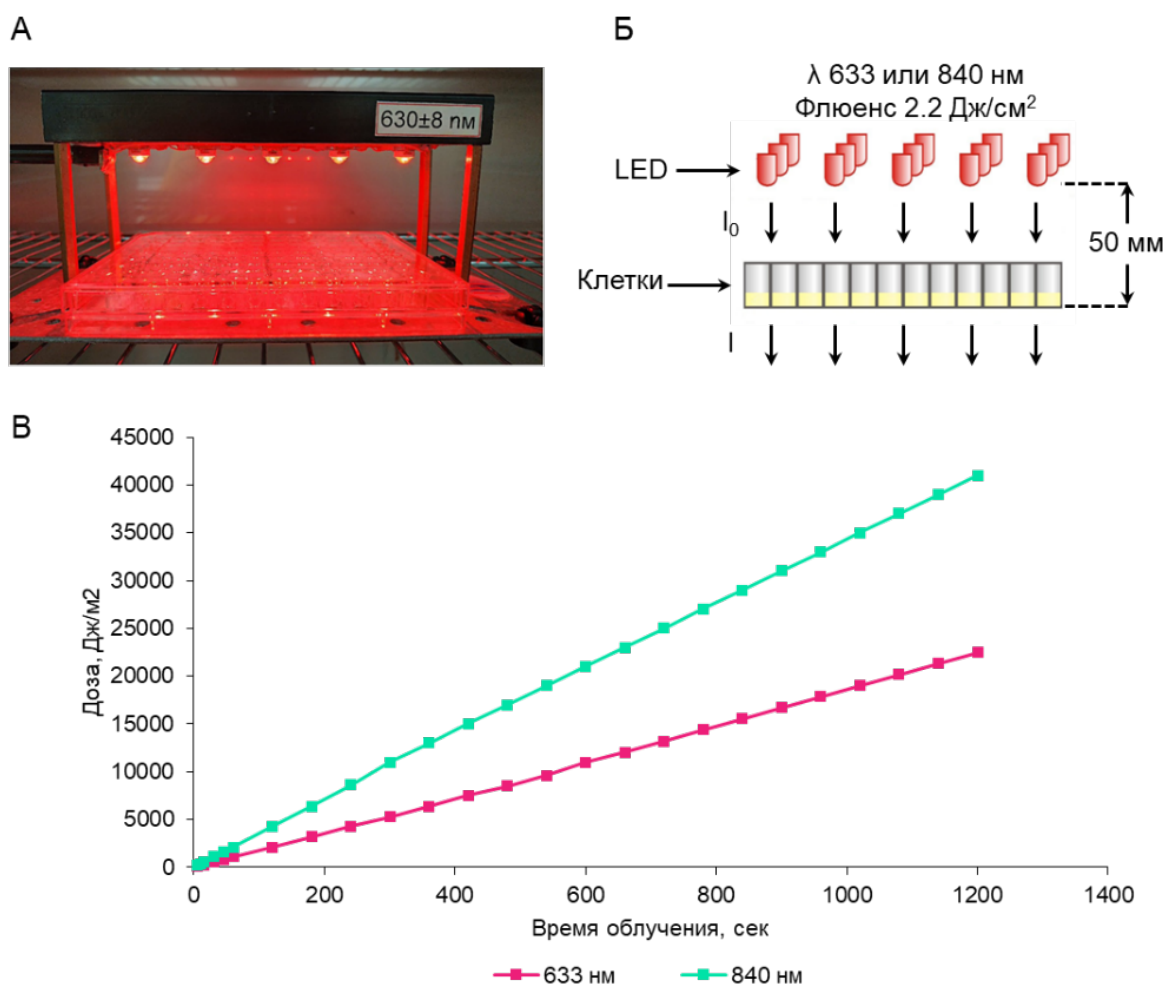


Рисунок 7 - Фотобиомодуляция с использованием установки LDM-07. А – процесс облучения планшета с клетками на установке LDM-07 при длине волны 633 нм, Б – схема матричной установки для облучения клеток, В - калибровочный график зависимости дозы от времени облучения

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. Производили оценку сразу нескольких ключевых параметров метаболизма, включая базовое дыхание, АТФ-опосредованное дыхание и резервную дыхательную способность (spare respiratory capacity, SRC). Для проведения теста после измерения в установке Seahorse в стартовых условиях происходит последовательное

добавление ингибиторов комплексов митохондрий. Разница между максимальным и АТФ-опосредованным дыханием определяет SRC (Рисунок 8А). При воздействии ФБМ на клетки в контрольных условиях (без воздействия ингибиторов) не было зафиксировано значимых различий (Рисунок 8Б). Добавление нитропруссиды не вызывало значительных изменений в общей картине, однако при воздействии более высокой концентрации отмечали повышение максимального дыхания в группе 840 нМ (Рисунок 8В, 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 8Д, Е).

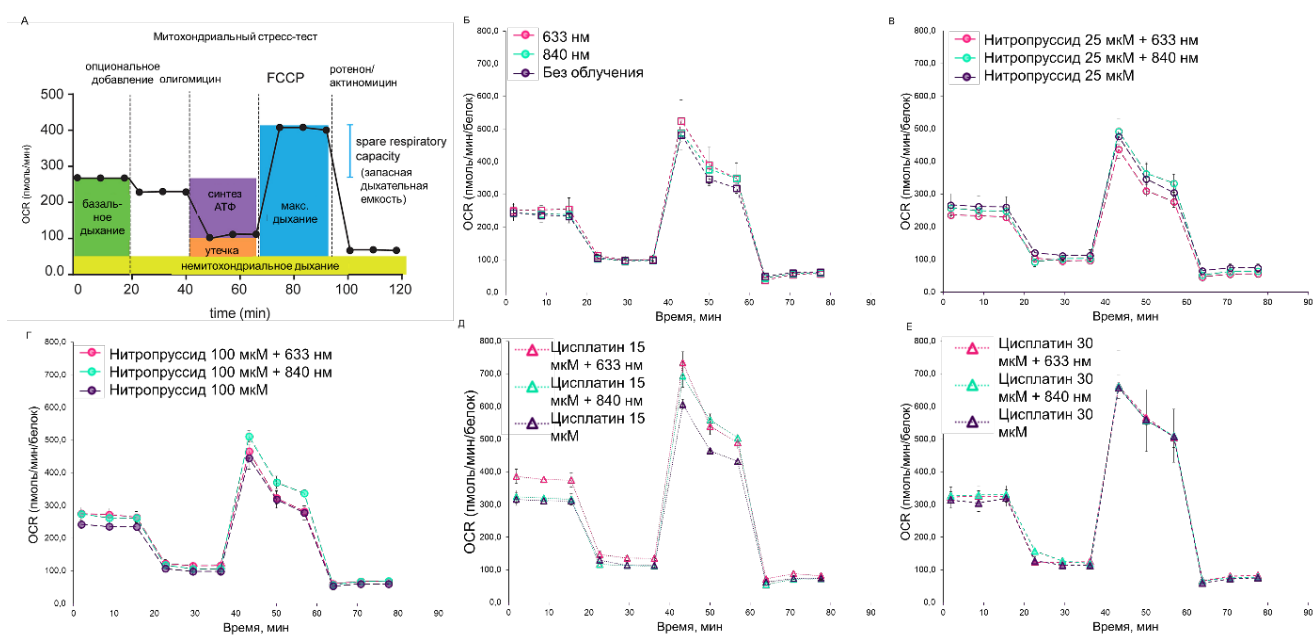


Рисунок 8 - Профиль стресс-теста митохондрий, полученный на Agilent Seahorse XF, показывающий ключевые параметры функции митохондрий. А – общая схема характеристики метаболического потенциала, Б – метаболический потенциал контрольной группы (только ФБМ), В-Е – метаболический потенциал при воздействии 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 9А). Метаболический потенциал отражает то, на сколько клетка способна адаптироваться к условиям повышенной необходимости в энергии путем дыхания и гликолиза. В соответствии с ожидаемыми результатами, при проведении теста наблюдали переход клеток в более энергетическое состояние, сопровождающееся повышением ECAR и OCAR (Рисунок 9Б). При воздействии нитропруссиды значения ECAR в среднем были немного выше по сравнению с контролем, а группа 840 нМ в стрессовом состоянии в случаях обеих концентраций оказывалась в более «энергетическом» положении (Рисунок 9В, Г). Интересно, что для цисплатина наблюдали

другие эффекты: добавление этого агента вызывало значительное увеличение OCR, при 15 мкМ и группа 633 нм, и группа 840 нм обеспечивали более высокий метаболический потенциал (Рисунок 9Д, Е).

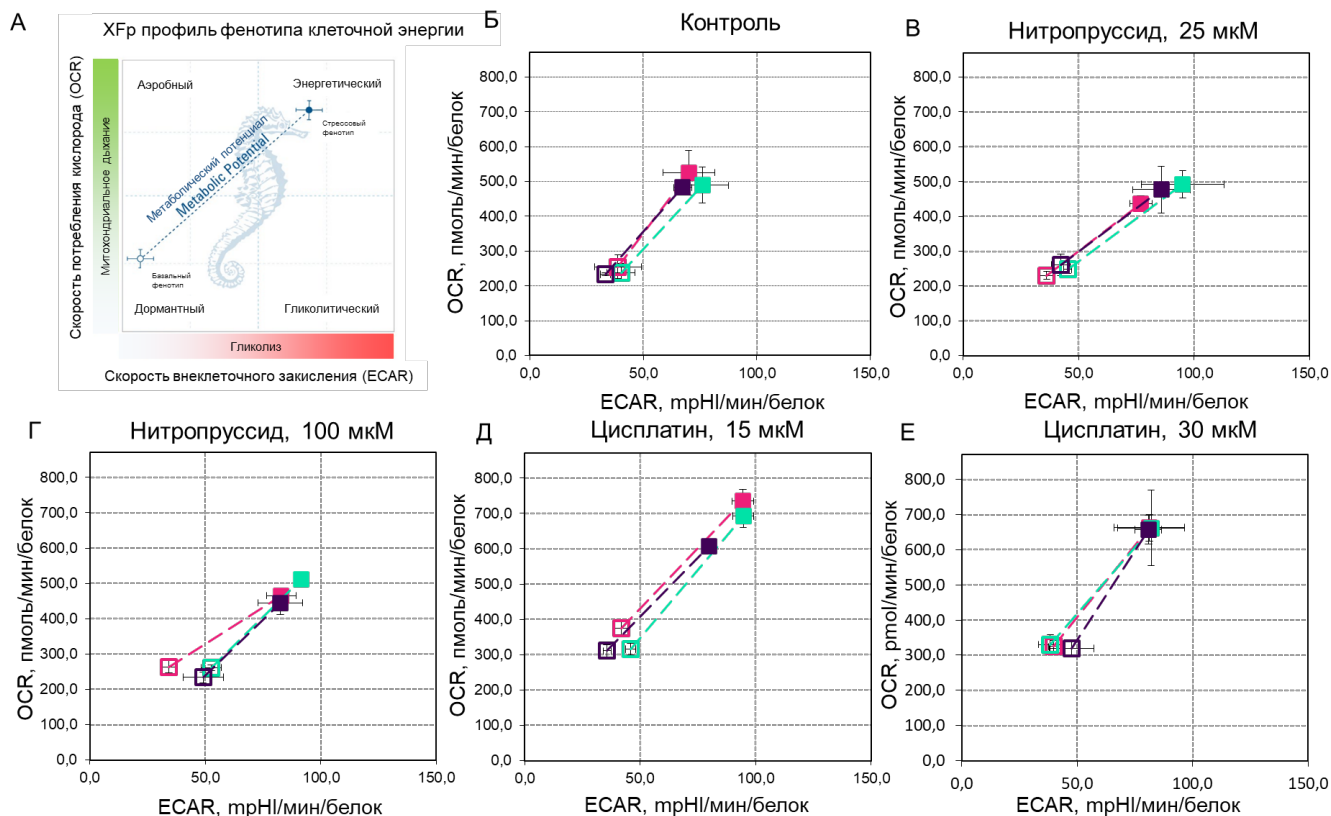


Рисунок 9 - Профиль фенотипа энергии клеток, полученный на Agilent Seahorse XF. А – общая схема характеристики метаболического потенциала, Б – метаболический потенциал контрольной группы (только ФБМ), В-Е – метаболический потенциал при воздействии токсических агентов

Далее схожие методы анализа были применены для напечатанных конструкций, содержащих сфероиды из МСК. На протяжении первых 3 суток культивирования как контроль, так и группы, подверженные ФБМ, были малоактивны, что согласуется с предыдущими данными. Метаболическая активность, концентрация АТФ и ДНК, площадь покрытия клетками оставались примерно на одном уровне от 1 до 3 суток культивирования (Рисунок 10). Однако стоит отметить, что концентрация АТФ уже спустя 24ч после биопечати оказалась выше примерно на 50% по сравнению с контролем (Рисунок 10). При дальнейшем культивировании все эти параметры возрастали, причем во всех случаях более выраженные эффекты наблюдали для группы ФБМ с длиной волны 840 нм. Были отмечены повышение метаболической активности на 20% (Рисунок 10А), АТФ на 60% (Рисунок 10Б), концентрации ДНК на 70% (Рисунок 10В) и миграционной активности на 50% (Рисунок 10В) по сравнению с контрольной группой через 14 суток культивирования.

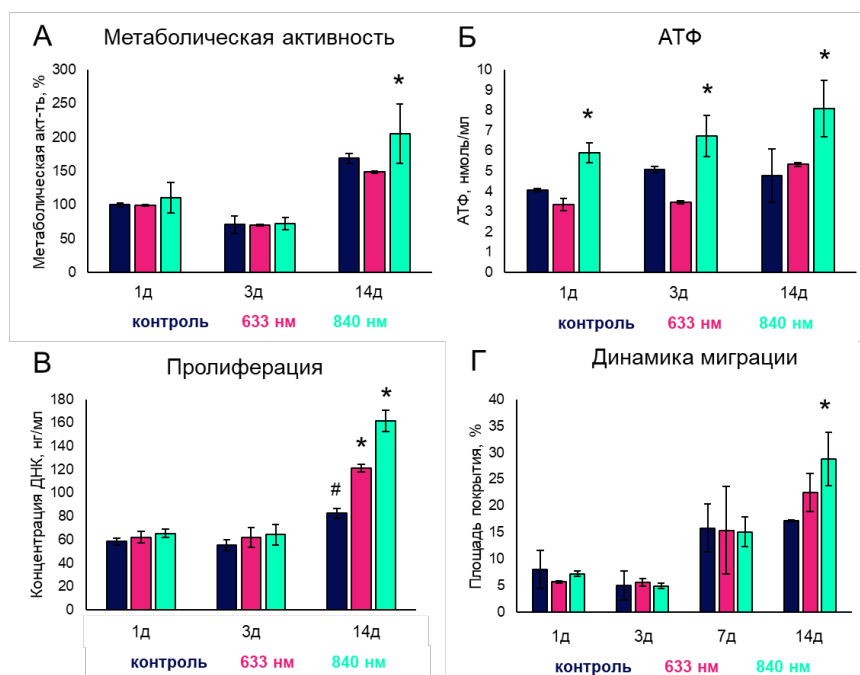


Рисунок 10 - Оценка воздействия ФБМ на напечатанные конструкции. А – оценка метаболической активности (AlamarBlue тест), Б – оценка концентрации АТФ (АТР тест), В – оценка концентрации ДНК (PicoGreen тест), Г – оценка динамики реактивации сфероидов и миграции клеток. Контроль – контроль (без воздействия ФБМ), 633 нм – ФБМ с длиной волны 633 нм, 840 нм – ФБМ с длиной волны 840 нм

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 11).

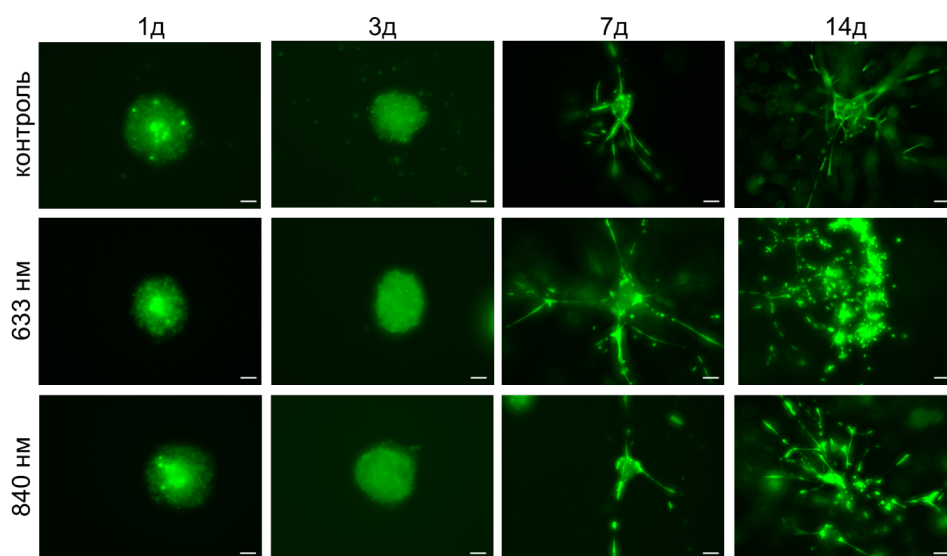


Рисунок 11 - Динамика реактивации сфероидов и миграции клеток в напечатанных конструкциях (1, 3, 7 и 14 сут). Контроль – контроль (без воздействия ФБМ), 633 нм – ФБМ с длиной волны 633 нм, 840 нм – ФБМ с длиной волны 840 нм. Live/Dead тест, флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок = 50 мкм

Данные диссертационного исследования показывают, что при формировании трехмерных тканеинженерных конструкций 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/см².
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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Beyond 2D: effects of photobiomodulation in 3D tissue-like systems / **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva, A.I. Shpichka, Y.M. Efremov, V.I. Yusupov, P.S. Timashev, Y.A. Rochev // **Journal of Biomedical Optics**. – 2020. – Vol. 25. - №4. – P.1-16. doi: 10.1117/1.JBO.25.4.048001. PMID: 32351077; PMCID: PMC7189416. [Scopus, Web of Science]

2. Photobiomodulation enhances mitochondrial respiration in an in vitro rotenone model of Parkinson's disease / **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva NV, A.I. Shpichka, P.S. Timashev, V.I. Yusupov, P.V. Maximchik, V.G. Gogvadze, Y.A. Rochev // **Optical Engineering**. – 2020. - Vol. 59. - №6. doi: [10.1117/1.OE.59.6.061620](https://doi.org/10.1117/1.OE.59.6.061620). [**Scopus**]
3. Engineering a Model to Study Viral Infections: Bioprinting, Microfluidics, and Organoids to Defeat Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) / A.I. Shpichka, **P.Y. Bikmulina**, M.A. Peshkova, N.V. Kosheleva, I.M. Zurina, E. Zahmatkesh, N. Khoshdel-Rad, M.M. Lipina, E.N. Golubeva, D.V. Butnaru, A.A. Svistunov, M. Vosough, P.S. Timashev // **International Journal of Bioprinting**. - 2020. – Vol.6. - №4. doi: 10.18063/ijb.v6i4.302. PMID: 33089000; PMCID: PMC7557357. [**Scopus, Web of Science**]
4. 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. Grigorev, **P.Y. Bikmulina**, V.S. Presnyakova, A.E. Kryukova, V.V. Volkov, A.I. Shpichka, V.E. Asadchikov, P.S. Timashev // **Reviews and Advances in Chemistry**. – 2020. – Vol. 10, - P. 158–163. doi: [10.1134/S2079978020030036](https://doi.org/10.1134/S2079978020030036). [**Springer**]
5. 3D or not 3D: a guide to assess cell viability in 3D cell systems / **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva, Y.M. Efremov Y, A.A. Antoshin, Z. Heydari, V. Kapustina, V. Royuk, V. Mikhaylov, V. Fomin, M. Vosough, P.S. Timashev, Y.A. Rochev, A.I. Shpichka // **Soft Matter**. – 2022. – Vol.18. - №11. – P. 2222-2233. doi: 10.1039/d2sm00018k. PMID: 35229856. [**Scopus**]
6. Building a tissue: Mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro- and nanoscale / N.V. Kosheleva, Y. M. Efremov, P.I. Koteneva, I.V. Ilina, I.M. Zurina, **P.Y. Bikmulina**, A.I. Shpichka, P.S. Timashev // **Acta Biomaterialia**. – 2023. – Vol.15. - №165. – P.140-152. doi: 10.1016/j.actbio.2022.09.051. PMID: 36167239. [**Scopus, Web of Science**]
7. Building a tissue: gingiva- and adipose-derived mesenchymal cell spheroids' survivability and functionality after 3D extrusion bioprinting / **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva, Yu. M. Efremov Yu., A.A. Bakulina, A.S. Kuryanova, N.A. Aksenova, B.S. Shavkuta, S.L. Kotova, A.I. Shpichka, P.S. Timashev // **Bioprinting**. – 2023. - Vol. 32. doi:10.1016/j.bprint.2023.e00279. [**Scopus, Web of Science**]
8. Photobiomodulation in 3D tissue engineering / **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva, A.I. Shpichka, V.I. Yusupov, V.G. Gogvadze, Y.A. Rochev, P.S. Timashev // **Journal of Biomedical Optics**. – 2022. – Vol. 27. - №9. doi: 10.1117/1.JBO.27.9.090901. PMID: 36104833; PMCID: PMC9473299. [**Scopus, Web of Science**] (обзорная статья)
9. Fibrin-based Bioinks: New Tricks from an Old Dog / A.I. Shpichka, D.A. Osipova, Yu. M. Efremov, **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva, M.M. Lipina, E.A. Bezrukov, R.B. Sukhanov, A.B. Solovieva, M/ Vosough, P.S. Timashev // **International Journal of Bioprinting**. – 2020. – Vol.6. - №3.

doi: 10.18063/ijb.v6i3.269. PMID: 33088984; PMCID: PMC7557349. [Scopus, Web of Science] (обзорная статья)

10. LIFT of cell spheroids: Proof of concept / A.A. Antoshin, E.M. Minaeva, P.I. Koteneva P., M.A. Peshkova, **P.Y. Bikmulina**, N.V. Kosheleva, Y.M. Efremov, A.I. Shpichka, V.I. Yusupov, N.M. Minaev, P.S. Timashev // **Bioprinting**. – 2023. – Vol. 34. doi: [10.1016/j.bprint.2023.e00297](https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00297). [Scopus, Web of Science] (короткое сообщение)

11. **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>

12. **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>

13. **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>

14. **Bikmulina P.Y.**, Butnaru D.V., Shpichka A.I., [et al.], The stimulating effect of low-intensity LED irradiation on the in vitro model of Parkinson's disease // Physics, engineering and technologies for biomedicine. The 3rd International Symposium. Book of abstracts. - 2018. - P. 80-81. <https://elibrary.ru/item.asp?id=42836712>.

15. **Бикмулина П.Ю.**, Кошелева Н.В., Шпичка А.И., [и др.], Фотобиомодуляция метаболизма клеток в 3D-системах // Гены и Клетки. – 2019. - с. 37-38. <https://doi.org/10.23868/gc122216>.

16. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., Rochev Y.A., Low Intensity LED Irradiation Improves Cell Viability in 3D Scaffolds // Сборник материалов TERMIS European Chapter Meeting – 2019. – P. 1260.

17. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., Rochev Y.A., Photobiomodulation enhances mitochondrial respiration in an in vitro rotenone model of Parkinson's disease // Сборник тезисов III Международного биомедицинского саммита им. Сеченова (SIBS-2019). Biomed Hub. – 2019. - p. 6-7. <https://doi.org/10.1159/000502594>.

18. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., [et al.], Photobiomodulation of cell metabolism within 3D tissue-engineered structures // Медицинская физика (ТКМФ-7) Сборник тезисов VII Троицкой конференции с международным участием. – 2020. - с. 179-180. <https://elibrary.ru/item.asp?id=44712754>.
19. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., [et al.], Design of tissue equivalents: MSC spheroids as building blocks in 3D bioprinting // Сборник тезисов V Международного биомедицинского саммита им. Сеченова (SIBS-2021). – 2021. - р. 3.
20. **Бикмулина П.Ю.**, Кошелева Н.В., Шпичка А.И., [и др.], Фотобиомодуляция метаболизма мезенхимальных стромальных клеток в трехмерных тканеинженерных конструктах // Сборник тезисов IX съезда Российского Фотобиологического Общества. – 2019. - с. 117.
21. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., [et al.], 3D bioprinted fibrin-gelatin-based structures preserve the functionality of MSC spheroids // Сборник тезисов международной конференции XXV Saratov Fall Meeting. - 2021. - P. 54.
22. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., [et al.], Red and near-infrared photobiomodulation of MSCs metabolism in 3D conditions // 2022 International Conference Laser Optics (ICLO), Saint Petersburg, Russian Federation. – 2022. - р. 1. doi: 10.1109/ICLO54117.2022.9839807.
23. **Бикмулина П.Ю.**, Кошелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С., 3D биопечать функциональных трехмерных конструктов на основе сфероидов из мезенхимных стромальных клеток // Сборник тезисов Национального Конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки. - 2022. <https://genescells.ru/2313-1829/article/view/122017>.
24. **Бикмулина П.Ю.**, Кошелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С., Биофабрикация трехмерных тканеинженерных конструкций с использованием методов 3D биопечати и фотобиомодуляции // Сборник тезисов семинара «Современные тренды в биофотонике 2023». – 2023. - С. 36.
25. **Bikmulina P.Y.**, Kosheleva N.V., Shpichka A.I., Timashev P.S., Photobiomodulation stimulates the survivability of 3D bioprinted MSC-based spheroids // Сборник материалов Roayan International Hybrid Twin Congress 2024. p. 135.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
ВКМ – внеклеточный матрикс
ИК – инфракрасный
МСК – мезенхимные стромальные клетки
ПЭГ – полиэтиленгликоль

УФ – ультрафиолет

ФБМ – фотобиомодуляция

ECAR – extracellular acidification rate (скорость внеклеточного закисления)

OCR – oxygen consumption rate (скорость потребления кислорода)

SRC – spare respiratory capacity (запасная дыхательная емкость)