

УДК 616.5-003.93:616-001.4]-089.4:004.356.2
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-145-157>

Использование трехмерной биопечати для регенерации кожи и заживления ран (обзор литературы)

Барсуک И.А.¹, Головкин К.П.^{1,2}, Александров В.Н.^{1,3}, Хасанов А.Р.¹, Эдгеев Н.И.⁴, Галиуллин Р.И.⁴

¹ Военно-медицинская академия (ВМедА) им. С.М. Кирова
Россия, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

² Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ)
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

³ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет (СПбГПМУ)
Россия, 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

⁴ Филиал № 4 1469-го военно-морского клинического госпиталя
Россия, 184310, г. Заозерск, ул. Матроса Рябина, 22

РЕЗЮМЕ

Трехмерная биопечать в настоящее время применяется в самых разных областях медицины, являясь движущей силой многих медицинских исследований. Эти исследования способствуют продвижению в область персонализированной медицины, включающих печать сложных человеческих органов для их использования в клинической практике. Одним из ведущих направлений в продвижении трехмерной биопечати является разработка биочернил определенного состава с заданными свойствами.

Цель настоящего систематического обзора состоит в анализе данных современных биомедицинских исследований, касающихся оценки эффективности использования трехмерной биопечати для регенерации кожи и заживления ран. Всеобъемлющий поиск всех релевантных оригинальных статей выполнили на основе заранее определенных критериев приемлемости. Поиск проводили с использованием платформ PubMed, Web of Science, Scopus, Medline Ovid и ScienceDirect.

В результате сужения области поиска из 2 256 статей отобрали 18, полностью соответствовавших критериям включения. Во все отобранные исследования было включено 159 животных с раневыми дефектами. В качестве биочернил чаще всего использовали коллагеновые и желатиновые гидрогели. В части клеточного компонента преобладали аллогенные фибробласты и кератиноциты. Период наблюдения колебался от 1 сут до 6 нед. В большинстве включенных исследований на животных полное закрытие раны достигалось через 2–4 нед.

Результаты как *in vitro*, так и *in vivo* показали положительное влияние напечатанных биоинженерных конструкций на ускорение заживления ран. Особый интерес представляет исследование, где биопечать выполняется непосредственно в ране *in situ*.

Проведенное исследование позволяет сделать вывод о необходимости отработки технологии биопечати тканей для лечения кожных ран на животных моделях с использованием стандартизированных параметров, чтобы открыть двери для клинических испытаний на людях.

Ключевые слова: 3D-биопринтинг, биочернила, биополимеры, заживление ран, регенерация кожи, раневые повязки

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Барсу́к Илья́ Александрович, barsuk20220@gmail.com

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Барсук И.А., Головки К.П., Александров В.Н., Хасанов А.Р., Эдгеев Н.И., Галиуллин Р.И. Использование трехмерной биопечати для регенерации кожи и заживления ран (обзор литературы). *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):145–157. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-145-157>.

The use of three-dimensional bioprinting for skin regeneration and wound healing (literature review)

Barsuk I.A.¹, Golovko K.P.^{1,2}, Alexandrov V.N.^{1,3}, Khasanov A.R.¹, Edgeev N.I.⁴, Galiullin R.I.⁴

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy

6, Akademika Lebedeva Str., Saint Petersburg, 194044, Russian Federation

² Saint Petersburg State University

7–9, Universitetskaya Embankment, Saint Petersburg, 199034, Russian Federation

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University

2, Litovskaya Str., Saint Petersburg, 194100, Russian Federation

⁴ Branch No. 4 of Naval Clinical Hospital No. 1469

22, Matrosa Ryabinina Str., Murmansk region, Zaozersk, 184310, Russian Federation

ABSTRACT

Three-dimensional (3D) bioprinting is rapidly proliferating across many medical disciplines and is making strides towards manufacturing intricate human organs for clinical application. One of the most promising areas in 3D bioprinting is development of bioinks with certain composition and designed properties.

The aim of this systematic review was to assess current biomedical research evidence regarding the efficacy of 3D bioprinting for skin regeneration and wound healing. A comprehensive search for all applicable original articles was conducted according to pre-established eligibility criteria. The study employed PubMed, Web of Science, Scopus, Medline Ovid, and ScienceDirect databases.

Of the retrieved articles, eighteen satisfied the inclusion criteria, while twenty-three were excluded. A total of 159 animals that had wound defects were considered in all animal-based research. Collagen and gelatin hydrogels were the most commonly employed bioinks. In relation to cellular composition, allogeneic fibroblasts and keratinocytes were predominant. The observation period ranged from one day to six weeks. Complete wound closure was achieved within 2–4 weeks in most animal studies. *In vitro* and *in vivo* animal studies have shown a positive effect of printed bioengineered constructs in accelerating wound healing. Notably, the research where bioprinting was performed directly in the wound *in situ* was of particular interest. Further studies are required to enhance the tissue bioprinting technique to address skin wound healing in animal models. The utilization of standardized parameters may pave the way for human clinical studies.

Keywords: 3D bioprinting, bioinks, biopolymers, wound healing, skin regeneration, wound dressings

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Barsuk I.A., Golovko K.P., Alexandrov V.N., Khasanov A.R., Edgeev N.I., Galiullin R.I. The use of three-dimensional bioprinting for skin regeneration and wound healing (literature review). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):145–157. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-145-157>.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждение тканей представляет собой серьезную медицинскую проблему, на которую ежегодно приходится около половины расходов на здравоохранение в мире [1]. Механизм заживления раны представляет собой многоэтапный процесс, направленный на защиту и регенерацию поврежденного участка ткани [2]. Дабы избежать нежелательных осложнений, течение этого процесса требует ухода за пациентом и применения подходящих перевязочных средств. Хотя традиционные раневые покрытия (например, марля, ворс, пластырь и бинты) защищают рану от загрязнений, они требуют частой смены, чтобы избежать инфицирования и мацерации соседних тканей, в дополнение к их склонности прилипать к ране, что делает замену травматичной и болезненной [3].

Технологии аддитивного производства предлагают способы быстрого заживления ран, чтобы избежать распространенных осложнений, таких как контрактуры раны и образование рубцов [4]. Трехмерная биопечать является одной из развивающихся технологий адаптивного производства, цель которой – использование биосовместимых материалов в комплексе с живыми клетками и факторами роста для имитации и восстановления внеклеточного матрикса органов человека [5]. Этот подход позволяет послойно печатать гибкие конструкции из гидрогелей путем преобразования цифровой CAD (computer-aided design) модели в сложные трехмерные структуры [6].

Характеристики продукта, полученного методом 3D-биопечати, практически полностью определяются свойствами используемых биочернил. В связи с этим биочернила являются ключевым определяющим компонентом трехмерной биопечати [7, 8].

В процессе обычной 3D-печати чернила подаются на формование в виде расплава при высокой температуре (пластик, керамика и сплавы), но для биопечати такие условия неприемлемы. Биочернила должны отвечать высоким требованиям биосовместимости, чтобы способствовать росту клеток, быть механически стабильными и поддерживать сохранение формы напечатанной конструкции [9]. Некоторые параметры оказывают большое влияние на определение высокой функциональной целостности биочернил, включая параметры клеточной нагрузки (например, тип клеток, плотность клеток и период их инкубации), физико-химические свойства (например, истончение при сдвиге, вязкость, степень сшивания и время гелеобразования) и параметры печати (например, температура и диаметр сопла, скорость подачи и продолжительность печати) [10, 11]. Кроме того, выбор типа клеток и их источника имеют

решающее значение для предотвращения иммунного отторжения после имплантации. Первичные клетки кожи, такие как кератиноциты, меланоциты и фибробласты, могут быть надлежащим образом выделены из донорской кожи, а затем совместно культивироваться в процессе биопечати кожи [12, 13].

В качестве основы для биочернил применяют различные природные и синтетические полимерные гидрогели [14]. Гидрогели – класс сшитых полимерных веществ, способных абсорбировать и удерживать большое количество воды. Они способны поглощать воду до 1 000 раз больше своего первоначального веса без растворения [15], что делает их идеальными для инкапсулированных клеток в связи со своей высокой проницаемостью для кислорода питательных веществ и других водорастворимых соединений. Клетки внутри гидрогеля имеют возможность мигрировать и связываться с друг с другом через пористую сеть [16]. Все эти свойства позволили гидрогелям стать одним из основных материалов для 3D-биопечати [17, 18].

Несмотря на отсутствие механической стабильности, 90% полимеров, используемых в биопечати, получены из природных источников [19]. Биополимеры на природной основе имеют различные преимущества перед синтетическими биополимерами благодаря их высокому сходству с составом внеклеточного матрикса человека, которое позволяет имитировать нативное микроокружение клеток, облегчая их прикрепление, пролиферацию, миграцию и дифференцировку [20–22].

После повсеместного внедрения 3D-биопечати в начале прошлого десятилетия возникла необходимость в поиске пригодных для печати биосовместимых полимеров для возможности использования данной технологии в медицине. Согласно отчету о цитировании, применение подхода 3D-биопечати для заживления ран и регенерации кожи началось в 2012 г. с использованием коллагеновых биочернил. Количество исследований достигло 12 в 2017 г. и 19 в 2019 г., а к середине 2020 г. число опубликованных работ составило около 70. В большинстве опубликованных исследований в качестве основного компонента биочернил использовались природные полимеры.

Использование таких природных полимеров при изготовлении средств для лечения ран было предметом споров между исследователями, и хотя многие из их недостатков были признаны решаемыми, никакого явного соглашения или решения принято не было. Основной целью настоящего систематического обзора стала оценка эффективности использования биопечати с применением биочернил на основе природных полимеров в ка-

честве заменителей кожи для регенерации тканей кожи и заживления ран. В дополнение к сообщениям о биологических свойствах, полученных в результате биопечати конструкций в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, в этом обзоре также приводятся возможные рекомендации по использованию таких конструкций на практике.

Настоящий обзор провели в соответствии с контрольным списком предпочтительных пунктов уведомления для систематических обзоров и метаанализов (PRISMA) [18]. Для сбора цифровых записей из пяти электронных баз данных (РИНЦ, PubMed, Web of Science, Scopus, и ScienceDirect) применяли всеобъемлющую стратегию поиска.

Поисковый запрос состоял из 18 терминов, включающих два набора: 1 – кожа, «регенерация кожи», «инженерия тканей кожи», «заживление ран», «рана» и «ожоги»; 2 – «3D-биопринтинг», «3D-печать», «3D-печать клеток», «трехмерная печать», «биопечать», «3D-каркас» и «3D-прототипирование». Этот запрос был направлен на выявление в качестве результатов 3D-биопечатных заменителей кожи в качестве средства для заживления ран или регенерации кожи.

Предварительно проверяли заголовки и рефераты всех выявленных записей на предмет потенциально релевантных исследований. Включенные записи проверяли дополнительно путем прочтения полного текста, чтобы убедиться в их приемлемости. Для включения статья должна была соответствовать следующим критериям: использование «природных» биочернил; фактическое исследование *in vitro* или *in vivo*;

каркас получен методом 3D-биопечати; оригинальная статья, написанная на русском или английском языке. Исключили статьи, подпадающие под следующие критерии: отдельные статьи с рассмотрением теоретической возможности использования 3D-биопечати, применение «синтетических» биочернил, хронические раны, систематические и описательные обзоры, интерпретации, серии случаев, руководства и технические отчеты.

Из включенных исследований записывали следующие данные: 1 – информация об исследовании (авторы, год публикации, дизайн исследования, база данных и название журнала); 2 – детали вмешательства (используемые биоматериалы и клетки, время гелеобразования, температура печати, сшивающие материалы и методы, а также методы печати); 3 – детали результата: реологические, механические и биологические характеристики, точность формы конструкции и время заживления раны.

Первоначально в результате поиска было найдено 4 345 статей, но после удаления дубликатов для проверки отобрали 2 566 статей. После проверки заголовков и рефератов 2 499 записей было исключено из-за несоответствия критериям включения, в результате чего осталось 18 статей. Для оценки были определены основные параметры: дизайн исследования, метод биопечати и сшивки полимера, материал основы биочернил, клеточный компонент биочернил, уровень жизнеспособности клеток после процесса печати, использованные для эксперимента животные. Сводные характеристики и результаты исследований представлены в таблице.

Таблица

Краткая характеристика и результаты отобранных исследований				
Дизайн работы	Биочернила	Используемые клетки/животные	Вывод	Ссылка
<i>In vitro</i>	Коллаген-хитозановая смесь	NIH 3T3	При печати чернилами с различными соотношениями коллаген/хитозан определена оптимальная скорость подачи чернил, составившая от 0,19 до 0,42 мкл/с	[23]
<i>In vitro</i>	CNF/GelMA	NIH 3T3	Каркасы биочернил CNF/GelMA не проявляли цитотоксичности и обладали хорошей цитосовместимостью с фибробластами мыши 3T3	[24]
<i>In vitro</i>	Сульфатированный и богатый рамнозой XRU	HDFs	При тестировании с HDFs было обнаружено, что гидрогель XRU чрезвычайно биосовместим с высокой с клетками и способствует их активной пролиферации и прикреплению	[25]
<i>In vitro</i>	Суспензия dSIS	HDFs	Каркас из dSIS, разработанный в исследовании, может быть потенциальным кандидатом для применения в лечении дефектов кожи, совмещая в себе высокую точность получаемых конструкций и высокий коэффициент набухания	[26]
<i>In vitro</i>	Нативный коллаген марки Viscoll	NIH 3T3	Усовершенствованные биочернила Viscoll позволяют создавать конструкции сложной геометрии без использования химического/фотосшивания для сохранения заданной формы	[27]
<i>In vitro</i>	Альгинат/желатин	AECs и WJMSCs	Человеческие AEC продемонстрировали превосходный фенотип эпителиальных клеток, в то время как WJMSCs показали расширенный ангиогенный и фибробластический потенциал	[28]

Дизайн работы	Биочернила	Используемые клетки/животные	Заключение	Ссылка
<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	BCNFs, SF/Желатин	Фибробласты линии L929 и 12 голых мышей	Введение нановолокон из бактериальной целлюлозы мало повлияло на параметры печати композитных биочернил. Полученные данные показали, что пористая структура обладает благоприятными свойствами для снабжения питательными веществами формирующихся тканей после имплантации <i>in vivo</i>	[29]
<i>In vivo</i>	Фибриноген, тромбин и коллаген I типа	HDFs, HEK 293 и 36 самок голых мышей + 6 свиней	Трехмерная биопечать <i>in situ</i> аутологических клеток ускорила процесс заживления ран примерно на три недели по сравнению с другими методами лечения	[30]
<i>In vitro</i>	CNF	HDFs	Использование матрицы созданной с помощью 3D-печати, в отличие от 2D-каркасов, ускоряло пролиферацию клеток, что является важным фактором, необходимым для быстрого заживления ран	[31]
<i>In vitro</i>	Альгинат натрия/желатин	HDFs	EDC-CaCl ₂ показал более высокую пролиферацию клеток и был более подходящим в качестве замены дермы	[32]
<i>In vitro</i>	Коллаген	NIH 3T3, линия клеток Vero	Структура микро- и макропор фибриллярного коллагена способствовала высокому прикреплению и пролиферации клеток при температуре 37 °C	[33]
<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	S-dECM	HDFs, HEK 293 и 8 самок BALB/cA-пи голых мышей	Изготовленные биочернила S-dECM не проявляли цитотоксичности и обладали высокой биосовместимостью, подобно собственному коллагену типа I. Конструкции, напечатанные на 3D-принтере биочернилами S-dECM, ускорили закрытие ран, обеспечили неоваскуляризацию и надежный кровоток в месте имплантации	[34]
<i>In vitro</i>	Альгинат/мед	NIH 3T3	Добавление около 1–2% меда улучшило пролиферацию клеток в биопечатном альгинате без существенного снижения пригодности для печати	[35]
<i>In vitro</i>	Желатин	HDFs	В желатиновых каркасах G8–G12 скорость роста клеток HDFs была примерно на 14% выше, чем в желатиновых каркасах G6. Механические свойства сильно зависят от размера пор	[36]
<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	SS/GelMA	Фибробласты линии L929, HDFs, HaCaT и 21 самка крыс Sprague Dawley	Было показано, что включение серицина шелка (SS) в матрицы способствует росту клеток (HDFs). Исследование также показало, что SS/GelMA подходит для применения в клеточных культурах (HaCaT), поскольку даже через 7 сут дней обеспечивалась высокая жизнеспособность клеток	[37]
<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	G-SF-SO ₃ -FGF2	HDFs/36 самок крыс Sprague Dawley	Использование 100 нг/мл FGF2 привело к увеличению скорости пролиферации примерно на 40%. Каркас, покрытый сульфированным SF, способствовал адгезии, пролиферации и росту клеток. Фактор роста FGF2 усиливал резпитализацию, а также стимулировал образование кровеносных сосудов и экспрессию различных соответствующих этому процессу маркеров	[38]
<i>In vivo</i>	Желатин-альгинат	40 самок мышей	Было обнаружено, что использование желатин-альгината снижает кровотечение из раны после имплантации. Также было обнаружено, что каркас способствует созреванию грануляционной ткани и заживлению ран	[39]
<i>In vitro</i>	Коллаген	HDF и HEK 293	Исследование показало, что фибробласты и кератиноциты могут быть последовательно напечатаны, слой за слоем, в виде дермоподобного и эпидермоподобного слоя. Техника 3D-печати обеспечивает высокий контроль за формой и качеством получаемых инженерных тканей кожи	[40]

Примечание. NIH 3T3 – линия эмбриональных фибробластов мыши; CNF – нанофибриллярная целлюлоза; GelMA – метакрилат желатина; XRU – ксилорамноуроновая кислота; HDFs – кожные фибробласты человека; dSIS – суспензия децеллюляризованной подслизистой оболочки тонкой кишки; AECs – амниотические эпителиальные клетки; WJMSCs – мезенхимальные стромальные стволовые клетки, полученные из желе Уортона; BCNF – нановолокна бактериальной целлюлозы; SF – фиброин шелка; EDC – N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид; Vero – линии клеток из эпителия почки, взятой у африканской зеленой мартышки; S-dECM – внеклеточный матрикс кожного происхождения; HEK 293 – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека; SS – серицин шелка; HaCaT – клеточная линия кератиноцитов человека; G-SF-SO₃-FGF2 – желатин-сульфированный композит шелка с фактором роста фибробластов группы 2-сульфонової кислоты; CFFs – колониеобразующие фибробласты.

ДИЗАЙН ВКЛЮЧЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первичную классификацию работ проводили по дизайну исследования. Двенадцать исследований были проведены *in vitro* [23–28, 31–33, 35, 36, 40], два исследования – *in vivo* [30, 39], в четырех проводились совместно *in vitro* и *in vivo* [29, 34, 37, 38].

МЕТОДЫ БИОПЕЧАТИ И СШИВКИ ПОЛИМЕРА

В основном использовалась техника биопечати на основе экструзии, и только в двух исследованиях сообщалось об использовании метода струйной биопечати [30, 40]. Использовались различные методы сшивания, и только в шести исследованиях [27, 29, 30, 33–35] сообщалось, что сшивающий агент не применялся. Использовались следующие методы:

1. Сшивание химическим реагентом: Ca^{+2} [24, 28, 31], CaCl_2 [32, 39], 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом (EDC) [40], N-гидроксисукцинимид-1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом (EDC-NHS) [23, 32, 36, 38], распыленным бикарбонатом натрия (NaHCO_3) [26], 1,4-бутандиол диглицидиловым эфиром (BDDE) [31].

2. Сшивание физическим воздействием: ультрафиолетом [24, 25, 37] или охлаждением [28, 32].

МАТЕРИАЛ ОСНОВЫ БИОЧЕРНИЛ

Подавляющее большинство используемых материалов для основы биочернил представляли собой смесь гидрогелей желатина и коллагена. Хотя желатиновый гидрогель обладает оптимальными реологическими свойствами, он показал нулевую вязкость при температурах выше $27 \pm 1^\circ\text{C}$ [36], и во всех исследованиях желатина изучалось использование различных сшивающих агентов [24, 28, 29, 32, 36–39]. Напротив, в четырех исследованиях сообщалось о возможности печати коллагенового гидрогеля без необходимости использования химических сшивающих агентов [30, 33, 34, 36]. Также сообщалось об интеграции альгинатного гидрогеля с желатином [28, 32, 39] или медом [35].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

В целом в большинстве исследований *in vitro* в качестве клеточного компонента используются фибробласты. Чаще всего использовали дермальные фибробласты человека (HDF) [25, 26, 30–32, 34, 36–38, 40]. Далее по частоте использования следуют линии фибробластов мыши Т3Т [23, 24, 27, 33, 35] и L929 [29, 37]. Эпидермальные кератиноциты человека (НЕК) / клеточная линия кератиноцитов человека (HaCaT) использовали в четырех исследованиях [30,

34, 37, 40]. Еще в одном из исследований [28] использовали мультипотентные мезенхимные стромальные клетки из желе Уортона (WJMSC) и амниотические эпителиальные клетки (AECs), а также эпителиальные клетки Vero – в другом [33].

УРОВЕНЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ПОСЛЕ ПРОЦЕССА ПЕЧАТИ

Считается, что высокотехнологичные материалы на основе полимеров естественного происхождения обладают превосходными биологическими свойствами. Тринадцать из 16 исследований *in vitro* сообщили о высоких скоростях пролиферации клеток. Несмотря на то, что в трех исследованиях [23, 37, 40] существенных изменений скорости пролиферации выявлено не было, они сообщили о высокой жизнеспособности клеток. В семи исследованиях отмечена хорошая жизнеспособность клеток [25–27, 29, 33, 35, 40], в пяти сообщалось о минимальной жизнеспособности клеток, равной от 85,07 до 98% [27, 28, 33, 34, 40]; в одном описано появление мертвых клеток, что указывает на низкую жизнеспособность клеток [26].

Кроме того, в 14 исследованиях сообщалось о высоком темпе роста клеток, и только суспензия децеллюляризованной подслизистой оболочки тонкой кишки (dSIS) [26] и биочернила на основе серицина шелка/метакрилата желатина (SS/GelMA) [37] не способствовали росту клеток. Все результаты исследований *in vivo* совпадали с результатами исследований *in vitro*, за исключением SS/GelMA [37], который продемонстрировал хорошие заживляющие свойства на ранах через две недели после их лечения.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ЖИВОТНЫЕ

В исследованиях на животных суммарно использовано 159 особей, в каждом исследовании – от 8 до 40. В четырех исследованиях использовали мышей [29, 30, 34, 39], в двух – крыс [37, 4038] и в одном – свиней [30].

ОБЗОР ВКЛЮЧЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опираясь на результаты 18 исследований на клеточных культурах *in vitro* и на животных *in vivo*, настоящий систематический обзор показывает, что 3D-биопечатные конструкции из природных полимеров могут способствовать полному закрытию кожных ран. Большинство 3D-биопечатных заменителей кожи способствовали пролиферации, адгезии и дифференцировке клеток, а в большинстве исследований *in vitro* сообщалось о высокой жизнеспособности клеток. Более того, все исследования на

животных показали общее уменьшение площади ран у животных через две недели после операции. Однако учитывая технические трудности и практические проблемы оценки жизнеспособности культуры клеток *in vitro* и динамику раневого процесса в исследованиях на животных *in vivo*, необходимо признать, что исследования на животных – это только первый шаг на пути внедрения подобных технологий в клиническую практику.

Основная цель использования 3D-биопринтинга при заживлении ран – быстрое лечение непосредственно поврежденных тканей *in situ*. В одной из работ [30] была произведена биопринт с использованием биочернил из фибриногена и тромбина с коллагеном I типа, включающих клетки линии эмбриональных фибробластов мыши (HDFs) и клетки линии, полученных из эмбриональных почек человека (HEK 293), которая выполнялась непосредственно на рану в области спины у мышей и свиней. Вокруг раны наносили маркерные точки, после чего рану сканировали ручным сканером. На основании данных сканирования раны, для биопринтера формировался файл формата STL, включающий в себя информацию о планиметрии точек для движения сопла биопринтера. Это необходимо для объемного заполнения раны в процессе биопринтинга. Данный подход в рамках проведенного эксперимента позволил ускорить процесс заживления ран примерно на 3 нед по сравнению с другими методами лечения. Иммуногистохимическое исследование показало, что HDFs и HEK 293 были обнаружены вместе с эндогенными клетками в слоях дермы и эпидермиса раны через 3–6 нед после операции.

ОСНОВНОЙ МЕТОД 3D-БИОПЕЧАТИ

В рассмотренных работах, как было указано выше, основным методом трехмерной биопринтинга являлась экструзионная печать и лишь в двух исследованиях применялась струйная. Такая закономерность является логичной. Экструзионная печать является технически самой простой, позволяет печатать вязкие биочернила (30 мПа·с до 6×10^7 мПа·с) с очень высокой плотностью клеток [41, 42]. В сравнении с другими методами, очевидными недостатками экструзионной печати являются низкое разрешение (2 000–1 000 мкм), возможное засорение сопла и снижение жизнеспособности клеток при высоких скоростях печати вследствие повышения давления в экструдере, приводящее к повреждению клеточных мембран [41, 43, 44]. При использовании оптимальной скорости печати, не приводящей к повреждению клеток, и отсутствии потребности в высокой разрешающей способности вкупе с более низкой стоимо-

стью оборудования, экструзионная печать остается методом выбора при создании биоинженерных конструкций для лечения дефектов кожи.

МАТЕРИАЛЫ БИОЧЕРНИЛ

В исследованиях было использовано множество типов биочернил. Применяли как однокомпонентные биочернила, так и композитные, состоящие из нескольких компонентов. Используемые материалы в виде гидрогелей имеют необходимые физико-химические свойства, позволяющие применять их для печати, а также проявляют сходство с естественным внеклеточным матриксом кожи, что обеспечивает им высокую биосовместимость [14].

Коллаген. Коллаген в виде гидрогеля продемонстрировал требуемую биодеградацию (около 30 сут), высокую стабильность формы при 37 °С и отличную структуру микро- и макропор, которые способствуют прикреплению и пролиферации клеток [33]. Однако прямая 3D-биопринт коллагена по-прежнему ограничена, поскольку физические свойства раствора коллагена делают его плохо пригодным для печати, особенно когда в него включены клетки или тканевые сфероиды [27]. Примечательно, что, несмотря на ограниченные возможности печати чистым коллагеном, в большинстве исследований не применялось химическое сшивание. Вместо этого применялись такие методы, как смешивание с другими материалами (фибриноген и тромбин [30], хитозан [23]); использование фибриллярного коллагена [33]; применение низких концентраций коллагена (2–4%) [27]; регулирование плотности биочернил путем дозирования количества вводимых клеточных суспензий [40].

В том же контексте гелеобразование белков матрикса, таких как коллаген, обычно инициируется контролем pH, температуры либо учитываются оба этих параметра. Так как подход справедлив только для тонких структур (менее 1 мм), то в связи с ограничением диффузии или теплопередачи в толстых структурах (от 1 до 3 мм) его использование приводит к появлению негелированных областей в структуре напечатанной конструкции. Использование высоких pH или температуры для купирования вышеописанного эффекта не всегда применимо, так как может привести к серьезному повреждению клеток, включенных в раствор [40].

Желатин. Желатин – денатурированная форма коллагенового белка [45]. При низких температурах желатиновые нити образуют спиральные структуры, приводящие к гелеобразной форме [46]. Желатин сохраняет последовательность Arg-Gly-Asp и в отличие от своего предшественника является менее им-

муногенным, способствует клеточной адгезии, дифференцировке и пролиферации [47]. Тем не менее чистые растворы желатина обладают слабой механической прочностью и низкой вязкостью при температуре выше $27 \pm 1^\circ\text{C}$, что ограничивает использование желатина в 3D-биопечати.

Достаточно часто его смешивают с другими природными биоматериалами, такими как альгинат [28, 32, 39] и фиброин шелка (SF) [29], чтобы преодолеть низкую формуемость. Более того, метакрилат желатина (GelMA) также является потенциальными ранозаживляющими биочернилами из-за его высокой термочувствительности и способности к фотосшиванию. Также известно, что GelMA обладает хорошей биосовместимостью и способствует межклеточному взаимодействию и миграции клеток. Кроме того, выгодная механическая стабильность GelMA после сшивания УФ-излучением была использована для обеспечения высокой точности формы композитных биочернил, где в качестве второго компонента использовались нановолокна целлюлозы [24] и серицин шелка [25].

Альгинат. Альгинат – это полисахарид, состоящий из β -маннуроната и его C-5 эпимера α -L-глюконата [48]. Он является популярным гидрогелем, используемым в биопечати благодаря его биосовместимости, возможности различных вариантов сшивки и простоте использования [49]. Однако альгинат имеет множество ограничений, поскольку задержка сшивания может снизить точность формы биопечатных конструкций, в то время как быстрое сшивание ограничивает взаимодействие клеток с материалом, снижая их дальнейшую жизнеспособность.

В одном из исследований [35] была предпринята попытка преодолеть эти ограничения за счет снижения вязкости альгината с помощью добавления меда. Предполагалось, что включение меда позволит повысить жизнеспособность клеток без изменения способности альгината к печати. Было обнаружено, что даже печать простыми растворами альгината имеет низкую точность формы, хотя исследователи пытались увеличить вязкость альгината или экструдировать его с помощью химических сшивающих агентов, таких как Ca^{2+} [28].

Децеллюляризованный внеклеточный матрикс кожи (S-dECM). Внеклеточный матрикс (ECM) представляет собой неклеточную часть ткани или органа и в основном представляет собой сеть микроокружения, позволяющую клеткам выполнять свои функции. Каждая ткань имеет хорошо построенный внеклеточный матрикс, состоящий из нескольких компонентов, которые поддерживают нативную структуру и стимулируют миграцию клеток. Инте-

ресно, что ECM можно получить с помощью соответствующего протокола и использовать в качестве матрицы для регенерации тканей [50].

В одном из исследований авторы успешно децеллюляризовали кожу свиньи и создали на ее основе биочернила dECM, пригодные для печати. При исследовании *in vitro* они обнаружили, что по сравнению с коллагеновыми биочернилами 3D-биопечатный эквивалент кожи с использованием биочернил на основе ECM способствует стабилизации дермального отдела, улучшает эпидермальную организацию и обеспечивает физиологически важные функции кожи. Более того, 3D-кожа на основе dECM инкапсулировала эндотелиальные прогениторные клетки (EPC), а клетки плоского эпителия (ASCs) способствовали неоваскуляризации и реэпителизации, что проявлялось в ускорении заживления ран *in vivo* [34].

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ БИОЧЕРНИЛ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК

Биосовместимость материалов для биопечати была тщательно исследована, описаны некоторые возможные факторы, которые могут повлиять на жизнеспособность клеток, адгезию, пролиферацию, миграцию и дифференцировку. В целом цитотоксичность является главным критерием, который следует оценивать при рассмотрении потенциального материала для медицинского использования. В большинстве включенных исследований проводили колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (MTT-анализ), чтобы убедиться в отсутствии цитотоксичности или воспаления, вызванных химическим взаимодействием клетки с материалом. Примечательно, что только серицин шелка/биочернила GelMA вызывал острое воспаление на 7-е сут, которое исчезло в конце периода наблюдения [37].

Важным свойством биочернил является и размер пор, формируемых в напечатанных конструкциях при сшивании гидрогеля или при лиофилизации образцов. Малые размеры пор вызывают недостаток питания и поступления кислорода к клеткам, что приводит к замедлению их миграции и низкой жизнеспособности. Было изучено влияние размера пор гидрогеля желатина на поведение клеток. В результате исследования обнаружено, что при размере пор 580 мкм скорость пролиферации кожных фибробластов человека (HDF) через 14 сут увеличилась на 14% по сравнению с порами 435 мкм [36]. Еще одним плюсом использования природных биочернил

является их подходящая межмолекулярная сеть. Например, хорошо известно, что фибриллярный коллаген имеет подходящую структуру микро- и макропор, которая, как было обнаружено, активно способствует хорошему прикреплению и пролиферации клеток, что в итоге повышает их жизнеспособность [33].

Немаловажным параметром биочернил является концентрация их основного структурообразующего компонента. Этот параметр решающим образом влияет на жизнеспособность клеток, поскольку высокие концентрации приводят к уплотнению клеток и, как следствие, снижают их жизнеспособность. Оценка влияния использования различных концентраций коллагена марки Viscoll на жизнеспособность клеток показала, что снижение концентрации коллагена с 4 до 2% привело к увеличению жизнеспособности клеток с $87,2 \pm 2,1$ до $97,2 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$) [27].

Группа авторов изучала влияние использования экстракта коллагена меньшей молекулярной массы на жизнеспособность клеток линии эмбриональных фибробластов мыши (NIH 3T3) и обнаружила, что снижение концентрации экстракта со 100 до 25% повышает жизнеспособность клеток с $85,07 \pm 6,73$ до $111,31 \pm 3,65\%$ ($p < 0,05$) [33]. Еще одно исследование было направлено на изучение влияния смешивания небольших концентраций GelMA с нанофибриллами целлюлозы (CNF) на пролиферацию клеток. Было обнаружено, что через три дня после культивирования на композитных биочернилах CNF/GelMA выявлено в два раза больше клеток по сравнению с биочернилами только из CNF [24].

Плотность клеточной суспензии является еще одним критическим фактором, поскольку, как описывалось ранее, использование клеток в повышенном количестве (более 1 млн клеток на 1 мл) приводит к снижению их жизнеспособности. Существуют данные об использовании системы струйной биопечати и изучении влияния использования различных плотностей клеточной суспензии и размера капель на жизнеспособность клеток.

Исследование показало, что жизнеспособность клеток варьирует пропорционально плотности клеточной суспензии и обратно пропорциональна пространству между каплями, как для кератиноцитов, так и для фибробластов кожи. При очень низкой плотности клеточной суспензии (0,5 млн клеток/мл) и большом расстоянии между каплями (400 нм) жизнеспособность фибробластов была умеренной (84%). Вероятно, это связано с отсутствием межклеточной связи при относительно низком покрытии поверхности. Аналогичным образом при высокой плотности суспензии клеток (5 млн клеток/мл) и малом расстоянии между каплями при печати

(400 мкм) жизнеспособность кератиноцитов оказалась равной. Самые высокие показатели жизнеспособности клеток (98–99%) удалось добиться при использовании плотности клеточной суспензии равной 1–2 млн клеток/мл и расстояния между каплями 200 нм [40]. Более того, на адгезию клеток существенным образом влияет и толщина напечатанной конструкции. В образцах толщиной 3 мм наблюдался более высокий процент прикрепления клеток, чем в образцах толщиной 2 мм. Каркас большой толщины способствовал слипанию клеток [31].

Однако нельзя недооценивать факторы роста – важные морфогенетические белки, которые влияют на активность клеток и направляют восстановление и регенерацию тканей [51]. Опубликованы данные, что добавление 100 нг/мл фактора роста фибробластов (FGF2) к биочернилам значительно увеличивает скорость пролиферации (от ~40 до ~75%), улучшает морфологию конструкции, приближая по структуре к нативной ткани и ускоряя сборку собственных коллагеновых фибрилл, ответственных за формирование внеклеточного матрикса кожи [38].

СТРУКТУРА И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Материалы, используемые для биопечати, должны обладать приемлемыми механическими свойствами и не разрушаться после печати. Они также должны иметь высокий коэффициент набухания, чтобы поддерживать влаго- и воздухообмен в области раны, обмен веществ и пролиферацию клеток. По литературным данным, человеческая кожа имеет средний модуль упругости от 100 до 1 100 кПа [34]. Степень набухания имеет обратную связь со значениями модуля Юнга. Однако увеличение расстояния между волокнами суспензии децеллюляризованной подслизистой оболочки тонкой кишки (dSIS) с 500 до 700 мкм увеличивает степень набухания с 69 до 79% и снижает модуль Юнга с $26,6 \pm 3,8$ до $9,7 \pm 3,1$ кПа ($p < 0,05$) [25]. Похожие результаты были получены при использовании сшитого раствора нанофибрилл целлюлозы (CNF) [31] и сшитого раствора альгината с желатином [32].

Биочернила должны сохранять свою форму после выхода из кончика печатного сопла. В целом, правильная вязкость гидрогеля обеспечивает высокую точность формы и сводит к минимуму возможность структурного разрушения после печати [39]. Сдвиговое истончение является еще одним важным параметром. Биочернила должны обладать строго определенным тиксотропным эффектом, чтобы избежать

засорения сопла во время экструзии и обеспечить восстановление структурной консистенции после печати, а также быть готовыми к нанесению следующего слоя [23, 28, 31]. Например, коллагену требуется примерно 1 мин, чтобы обеспечить переход в гелеобразное состояние и сохранить прочную основу для печати следующего слоя [40]. Кроме того, оказалось, что жесткость напечатанных каркасов значительно влияет на пролиферацию клеток, например, по мере увеличения жесткости CNF в диапазоне 3–8 кПа пролиферация клеток ускорилась [31].

ЛЕЧЕНИЕ РАН НА ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЯХ

Высокая скорость заживления ран имеет решающее значение, чтобы избежать затягивания сроков лечения и формирования гипертрофических рубцов. Успех использования нового материала в качестве средства лечения ран в первую очередь определяется высокой биосовместимостью и отсутствием цитотоксичности *in vitro*. При дальнейшем изучении рассматриваемый материал должен стимулировать заживление ран и реэпителизацию тканей *in vivo*. Использование биопечатных конструкций с добавлением линий клеток человека позволяет добиться ускорения заживления ран (на животной модели) примерно на 3 нед по сравнению с другими методами [30].

Имплантация кожных конструкций с правильными размером и структурой пор существенно влияли на снабжение питанием и рост клеток в области раны [29]. Равномерное и как можно более раннее нанесение напечатанного покрытия позволяет максимально снизить формирование рубцовой ткани в области раны. Опубликованы данные о том, что нанесение каркаса из желатин-сульфированного композита шелка, содержащего фактор роста фибробластов (G-SF-SO₃-FGF2) на спину раненых крыс, позволило сгладить рану после операции, а результаты поперечных срезов показали полное закрытие раны в дополнение к наличию большего количества кровеносных сосудов [38]. Кроме того, при гистологическом исследовании поперечного сечения раны, обработанной SS/GelMA, через 7 сут после операции наблюдалось образование нового коллагена с высокой пролиферацией фибробластов, аналогичное здоровой ткани, с последующим полным закрытием раны на 4-й нед [37].

Нельзя забывать, что для интеграции новой ткани или органа в окружающую ткань или полость биообъекта необходима соответствующая васкуляризация. Для решения этой проблемы исследователи прибегают к различным методикам, таким как добавление ростовых факторов, стимулирующих васкуляризацию [38], печать с использованием сети

взаимосвязанных пор размером от 50 до 500 мкм и микропор диаметром менее 10 мкм [33] или путем использования децеллюляризованного внеклеточного матрикса кожи [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящий обзор демонстрирует анализ научных исследований, проведенных как *in vitro* на клеточных культурах, так и *in vivo* на животных, направленных на поиск возможности создания заменителя кожи с помощью 3D-биопечати. Прежде всего, данный обзор подтверждает значительные преимущества использования экструзионной биопечати с использованием природных биополимеров для восстановления и регенерации кожи. Большинство полученных с использованием этой технологии образцов продемонстрировали превосходную способность имитировать трехмерную структуру микроокружения нативной ткани кожи и способствовать адгезии, пролиферации и миграции клеток. Визуализация *in vivo* показала, что использование биопечатной конструкции с хорошо организованными дермальным и эпидермальным слоями обеспечивает полное закрытие раны через четыре недели после операции. Кроме того, следует отметить высокую значимость различных свойств биочернил в связи с их существенным влиянием на ускорение процесса заживления ран.

Несмотря на ограниченное количество проведенных исследований, биопечать *in situ* является одним из наиболее многообещающих достижений в инженерии тканей кожи, которое может быть использовано хирургами для эффективной и быстрой печати сложных органов. Тем не менее основная проблема заключается в сложности точного построения деталей ткани, что требует для своего решения интеграции различных областей науки, включая не только медицину и биологию, но и инженерию, химию и даже IT-технологии. Кроме того, некоторые новые методы сшивки полимеров, такие как двухфотонная сшивка и направленное на кончик сопла УФ-излучение, могут способствовать повышению скорости и точности печати уже существующими биочернилами. Подготовленные к васкуляризации каркасы представляют особый интерес, поскольку после печати сохраняют свою предваскуляризованную микроструктуру и даже при использовании их без клеток быстро заселяются аутологичными клетками благодаря стимуляции регенеративных процессов реципиента.

К сожалению, использование 3D-биопечати для заживления ран все еще изучается на животных, метаанализ доступной литературы не обнаружил рандомизированных клинических испытаний на людях.

Еще одной важной проблемой является то, что время наблюдения и измерения, линии использованных клеток, вид и количество использованных животных, тяжесть и площадь нанесенных ран, метод их нанесения различаются в разных исследованиях, что приводит к высокой неоднородности результатов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sen C.K. Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. *Adv. Wound Care*. 2019;8(2):39–48. DOI: 10.1089/wound.2019.0946.
2. Beldon P. Basic science of wound healing. *Surgery*. 2010;28(9):409–412. DOI: 10.1016/j.mpsur.2010.05.007
3. Dhivya S., Padma V.V., Santhini E. Wound dressings – a review. *BioMedicine*. 2015;5(4):22. DOI: 10.7603/s40681-015-0022-9.
4. Chouhan D., Dey N., Bhardwaj N., Mandal B.B. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: status and advances. *Biomaterials*. 2019;216:119267. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119267.
5. Ferry P.W. Melchels, Marco A.N. Domingos, Travis J. Klein, Jos Malda, Paulo J. Bartolo, Dietmar W. Hutmacher. Additive manufacturing of tissues and organs. *Prog. Polym. Sci.* 2012;37(8):1079–1104. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007.
6. He P., Zhao J., Zhang J., Li B., Gou Z., Gou M., Li X. Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burn. Trauma*. 2018;6:5. DOI: 10.1186/s41038-017-0104-x.
7. Groll J., Burdick J.A., Cho D.W., Derby B. Gelinsky M., Heilshorn S.C., Jüngst T. et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*. 2019;11(1):013001. DOI: 10.1088/1758-5090/aacc52.
8. Cui H., Nowicki M., Fisher J.P., Zhang L.G. 3D bioprinting for organ regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;6(1):1601118. DOI: 10.1002/adhm.201601118.
9. Gopinathan J., Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater. Res*. 2018;22:1–15. DOI: 10.1186/s40824-018-0122-1.
10. Panwar A., Tan L.P. Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting. *Molecules*. 2016;21(6):685. DOI: 10.3390/molecules21060685.
11. Xia Z., Jin S., Ye K. Tissue and organ 3D bioprinting. *SLAS Technol*. 2018;23(4):301–314. DOI: 10.1177/2472630318760515.
12. Ng W.L., Wang S., Yeong W.Y., Naing M.W. Skin bioprinting: impending reality or fantasy? *Trends Biotechnol*. 2016;34(9):689–699. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.04.006.
13. Kumar A., Starly B. Large scale industrialized cell expansion: Producing the critical raw material for biofabrication processes. *Biofabrication*. 2015;7(4):44103. DOI: 10.1088/1758-5090/7/4/044103.
14. Griffith L.G., Swartz M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(3):211–224. DOI: 10.1038/nrm1858.
15. Ahmed E.M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res*. 2015;6(2):105–121. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
16. Yamamoto M., James D., Li H., Butler J., Raffi S., Rabbany S. Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. *Tissue Engineering. Part A*. 2010;16(1):299–308. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0010.
17. Thomas B.H., Craig Fryman J., Liu K., Mason J. Hydrophilic-hydrophobic hydrogels for cartilage replacement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2009;2(6):588–595. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2008.08.001.
18. Zhu J., Marchant R.E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*. 2011;8(5):607–626. DOI: 10.1586/erd.11.27.
19. Montero F.E., Rezende R.A., da Silva J.V., Sabino M.A. Development of a smart bioink for bioprinting applications. *Front. Mech. Eng*. 2019;5(56):1–12. DOI: 10.3389/fmech.2019.00056.
20. Valot L., Martinez J., Mehdi A., Subra G. Chemical insights into bioinks for 3D printing. *Chem. Soc. Rev*. 2019;48(15):4049–4086. DOI: 10.1039/C7CS00718C.
21. Kim J.E., Kim S.H., Jung Y. Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration. *Tissue Eng. Regen. Med*. 2016;13(6):636–646. DOI: 10.1007/s13770-016-0125-8.
22. Liberati A., Altman D.G., Tetzlaff J., Mulrow C., Gøtzsche P.C., Ioannidis J.P. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *J. Clin. Epidemiol*. 2009;62(10):e1–34. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2009.06.006.
23. Heidenreich A.C., Pérez-Recalde M., González Wusener A., Hermida É.B. Collagen and chitosan blends for 3D bioprinting: A rheological and printability approach. *Polym. Test*. 2020;82:106297. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.106297.
24. Xu W., Molino B.Z., Cheng F., Molino P.J., Yue Z., Su D. et al. On low-concentration inks formulated by nanocellulose assisted with gelatin methacrylate (GelMA) for 3D printing toward wound healing application. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019;11(9):8838–8848. DOI: 10.1021/acsami.8b21268.
25. Chen X., Yue Z., Winberg P.C., Dinoro J.N., Hayes P., Beirne S., Wallace G.G. Development of rhamnose-rich hydrogels based on sulfated xylorhamno-uronic acid toward wound healing applications. *Biomater. Sci*. 2019;7(8):3497–3509. DOI: 10.1039/C9BM00480G.
26. Shi L., Hu Y., Ullah M.W., Ullah I., Ou H., Zhang W. et al. Cryogenic free-form extrusion bioprinting of decellularized small intestinal submucosa for potential applications in skin tissue engineering. *Biofabrication*. 2019;11(3):035023. DOI: 10.1088/1758-5090/ab15a9.
27. Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S., Parfenov V.A., Sivogrivov D.E., Pereira F.D.A.S. et al. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2019;30(3):31. DOI: 10.1007/s10856-019-6233-y.
28. Liu P., Shen H., Zhi Y., Si J., Shi J., Guo L. et al. 3D bioprinting and in vitro study of bilayered membranous construct with human cells-laden alginate/gelatin composite hydrogels. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;181:1026–1034. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.069.
29. Huang L., Du X., Fan S., Yang G., Shao H., Li D. et al.

- Bacterial cellulose nanofibers promote stress and fidelity of 3D-printed silk based hydrogel scaffold with hierarchical pores. *Carbohydr. Polym.* 2019;221:146–156. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.080.
30. Albanna M., Binder K.W., Murphy S.V., Kim J., Qasem S.A., Zhao W. et al. *In situ* bioprinting of autologous skin cells accelerates wound healing of extensive excisional full-thickness wounds. *Sci. Rep.* 2019;9(1):1–15. DOI: 10.1038/s41598-018-38366-w.
 31. Xu C., Zhang Molino B., Wang X., Cheng F., Xu W., Molino P. et al. 3D printing of nanocellulose hydrogel scaffolds with tunable mechanical strength towards wound healing application. *J. Mater. Chem. B.* 2018;6(43):7066–7075. DOI: 10.1039/C8TB01757C.
 32. Shi L., Xiong L., Hu Y., Li W., Chen Z.C., Liu K. et al. Three-dimensional printing alginate/gelatin scaffolds as dermal substitutes for skin tissue engineering. *Polym. Eng. Sci.* 2018;58(10):1782–1790. DOI: 10.1002/pen.24779.
 33. Nocera A.D., Comín R., Salvatierra N.A., Cid M.P. Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomed. Microdevices.* 2018;20(2):1–13. DOI: 10.1007/s10544-018-0270-z.
 34. Kim B.S., Kwon Y.W., Kong J.S., Park G.T., Gao G., Han W. et al. 3D cell printing of *in vitro* stabilized skin model and *in vivo* pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2018;168:38–53. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.040.
 35. Datta S., Sarkar R., Vyas V., Bhutoria S., Barui A., Chowdhury A.R. et al. Alginate-honey bioinks with improved cell responses for applications as bioprinted tissue engineered constructs. *J. Mater. Res.* 2018;33:2029–2039. DOI: 10.1557/jmr.2018.202.
 36. Dong J.C., Sang J.P., Bon K.G., Young-Jin K., Seok C., Chun-Ho K. Effect of the pore size in a 3D bioprinted gelatin scaffold on fibroblast proliferation. *J. Ind. Eng. Chem.* 2018;67:388–395. DOI: 10.1016/j.jiec.2018.07.013.
 37. Chen C.S., Zeng F., Xiao X., Wang Z., Li X.L., Tan R.W. et al. Three-dimensionally printed silk-sericin-based hydrogel scaffold: a promising visualized dressing material for real-time monitoring of wounds. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018;10(40):33879–33890. DOI: 10.1021/acsami.8b10072.
 38. Xiong S., Zhang X., Lu P., Wu Y., Wang Q., Sun H. et al. A Gelatin-sulfonated silk composite scaffold based on 3D printing technology enhances skin regeneration by stimulating epidermal growth and dermal neovascularization. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-017-04149-y.
 39. Liu J., Chi J., Wang K., Liu X., Gu F. Full-thickness wound healing using 3D bioprinted gelatin-alginate scaffolds in mice: A histopathological study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2016;9:11197–11205.
 40. Lee V., Singh G., Trasatti J.P., Bjornsson C., Xu X., Tran T.N. et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2014;20(6):473–484. DOI: 10.1089/ten.tec.2013.0335.
 41. Guillemot F., Mironov V., Nakamura M. Bioprinting is coming of age: report from the international conference on bio printing and bio fabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication.* 2010;2(1):010201. DOI: 10.1088/1758-5082/2/1/010201.
 42. Peltola S.M., Melchels F.P., Grijpma D.W., Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann. Med.* 2008;40(4):268–280. DOI: 10.1080/07853890701881788.
 43. Malda J., Visser J., Melchels F.P., Jüngst T., Hennink W.E., Dhert W.J. et al. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.).* 2013;25(36):5011–5028. DOI: 10.1002/adma.201302042.
 44. Chang R., Nam J., Sun W. Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Eng. Part A.* 2008;14(1):41–48. DOI: 10.1089/ten.a.2007.0004.
 45. Gaspar-Pintilie A., Stefan L.M., Anton E.D., Berger D., Matei C., Negreanu-Pirjol T. et al. Physicochemical and biological properties of gelatin extracted from marine snail *Rapana venosa*. *Marine Drugs.* 2019;17(10):589. DOI: 10.3390/md17100589.
 46. Chiou B., Avena-Bustillos R.D., Bechtel P.J., Jafri H., Narayan R., Imama S.H. et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *European Polymer Journal.* 2008;44(11):3748–3753. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2008.08.011.
 47. Sakai S., Hirose K., Taguchi K., Ogushi Y., Kawakami K. An injectable, *in situ* enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30(20):3371–3377. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.030.
 48. Jung H., Pena-Francesch A., Saadat A., Sebastian A., Kim D.H., Hamilton R.F. et al. Molecular tandem repeat strategy for elucidating mechanical properties of high-strength proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2016;113(23):6478–6483. DOI: 10.1073/pnas.1521645113.
 49. Ozbolat I.T., Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials.* 2016;76:321–343. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.
 50. Dzobo K., Motaung K.S.C.M., Adesida A. Recent trends in decellularized extracellular matrix bioinks for 3D printing: An updated review. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(18):4628. DOI: 10.3390/ijms20184628.
 51. Mitchell A.C., Briquez P.S., Hubbell J.A., Cochran J.R. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater.* 2016;30:1–12. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.11.007.

Вклад авторов

Все авторы приняли участие в разработке концепции и дизайна исследования; первичном поиске, анализе и интерпретации данных, проверке критически важного интеллектуального содержания и окончательном утверждении для публикации рукописи.

Информация об авторах

Барсук Илья Александрович – адъюнкт при научно-исследовательском отделе (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра ВМедА им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, barsuk20220@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3728-9966>

Головко Константин Петрович – д-р мед. наук, доцент, начальник научно-исследовательского центра, ВМедА им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, labws@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1584-1748>

Александров Виктор Николаевич – д-р мед. наук, профессор, начальник научно-исследовательской лаборатории (тканевой инженерии) научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра ВМедА им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, vnaleks9@yandex.ru, <http://orcid.org/0009-0001-9229-5293>

Хасанов Артур Ришатович – адъюнкт при научно-исследовательском отделе (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра ВМедА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, khasartrish@yandex.ru, <http://orcid.org/0009-0003-0763-7194>.

Эдгеев Наран Игоревич – начальник хирургического отделения филиала № 4 1469-го военно-морского клинического госпиталя, г. Заозерск, luxomjashok@mail.ru, <http://orcid.org/0009-0006-4989-2523>

Галиуллин Ринат Ильмирович – старший ординатор хирургического отделения филиала № 4 1469-го военно-морского клинического госпиталя, г. Заозерск, rinat061989@list.ru, <http://orcid.org/0009-0008-6079-956X>

(✉) **Барсук Илья Александрович**, barsuk20220@gmail.com

Поступила в редакцию 07.11.2023;
одобрена после рецензирования 25.03.2024;
принята к публикации 14.05.2024