

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-1-60-74

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ МЕТОДОМ 3D-БИОПЕЧАТИ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ХРЯЩЕВОЙ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Н.В. Аргучинская¹, Е.Е. Бекетов¹, Е.В. Исаева¹, Н.С. Сергеева^{2, 3}, П.В. Шегай⁴, С.А. Иванов¹, А.Д. Каприн⁴

¹ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Российская Федерация

² Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

3D-биопечать – динамично развивающаяся технология тканевой инженерии и регенеративной медицины. Основным преимуществом данного метода является возможность воспроизведения заданной геометрии и структуры скаффолда как в отношении формы тканеинженерной конструкции, так и распределения ее компонентов. Ключевым фактором биопечати являются биочернила – биосовместимый материал, имитирующий внеклеточный матрикс с инкорпорированными в него клетками. Для соответствия всем предъявляемым требованиям биочернила должны включать в себя не только основной компонент, но и другие составляющие, обеспечивающие пролиферацию, дифференцировку клеток и функционирование тканевой конструкции в целом. Целью обзора является анализ свойств, возможностей и ограничений в использовании наиболее распространенных материалов для биопечати скаффолдов хрящевой ткани.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия, хрящевая ткань, биоматериалы, гидрогель, 3D-биопечать, скаффолд.

MATERIALS FOR CREATING TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTS USING 3D BIOPRINTING: CARTILAGINOUS AND SOFT TISSUE RESTORATION

N.V. Arguchinskaya¹, E.E. Beketov¹, E.V. Isaeva¹, N.S. Sergeeva^{2, 3}, P.V. Shegay⁴, S.A. Ivanov¹, A.D. Kaprin⁴

¹ Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russian Federation

² Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Medical University, Moscow, Russian Federation

⁴ National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

3D Bioprinting is a dynamically developing technology for tissue engineering and regenerative medicine. The main advantage of this technique is its ability to reproduce a given scaffold geometry and structure both in terms of the shape of the tissue-engineered construct and the distribution of its components. The key factor in bioprinting is bio ink, a cell-laden biocompatible material that mimics extracellular matrix. To meet all the requirements, the bio ink must include not only the main material, but also other components ensuring cell proliferation, differentiation

Для корреспонденции: Бекетов Евгений Евгеньевич. Адрес: 249036, Калужская область, Обнинск, ул. Королева, д. 4. Тел. (960) 523-64-49. E-mail: beketov.ee@yandex.ru

Corresponding author: Evgeny Beketov. Address: 4, Koroleva str., Obninsk, 249036, Kaluga Oblast, Russian Federation. Phone: (960) 523-64-49. E-mail: beketov.ee@yandex.ru

and scaffold performance as a whole. The purpose of this review is to describe the most common materials applicable in bioprinting, consider their properties, prospects and limitations in cartilage restoration.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering, cartilage tissue, biomaterials, hydrogel, 3D bioprinting, scaffold.

ВВЕДЕНИЕ

Хрящевая ткань опорно-двигательного аппарата подвергается большим механическим нагрузкам, легко повреждается, а вследствие отсутствия в ней кровеносных и лимфатических сосудов медленно восстанавливается. Дефекты хряща часто вызваны травмами, возрастными метаболическими нарушениями, врожденными заболеваниями и рядом других факторов, в частности эндокринными патологиями и злокачественными новообразованиями. Восстановление поврежденного хряща остается серьезной медицинской проблемой, новые варианты решения которой может предоставить современная тканевая инженерия.

В последние годы в тканевой инженерии все большее распространение получает 3D-биопечать. Преимущество технологии заключается в возможности формировать тканеинженерные конструкции (скаффолды) с заданной геометрией и структурой. Среди основных методов 3D-биопринтинга выделяют экструзионный, струйный и лазерный. Наиболее используемой технологией сегодня является экструзионная 3D-биопечать. Одно из ее основных преимуществ – возможность изготовления конструкций с высокой плотностью клеток и использование при печати нескольких компонентов [1–4], которое стало возможным благодаря разработке 3D-биопридеров с несколькими печатающими головками (диспенсерами).

Для изготовления скаффолдов посредством биопринтинга используется особый класс биоматериалов – биочернила. Понятие «биочернила» впервые было использовано в 2003 году [5] и в настоящее время подразумевает под собой раствор или гидрогель с клетками [4, 6]. Компоненты биочернил классифицируют, исходя из их роли в создании скаффолда [7, 8]. Так, жертвенные (опорные) материалы необходимы для поддержки конструкции во время печати до полной полимеризации основного материала, в частности при формировании в скаффолде каналов и полостей. Другие группы компонентов – структурные (придают скаффолду дополнительную жесткость, модифицируют пористость и т. д.). И наконец функциональные составляющие, обеспечивающие условия для пролиферации, дифференциации и синтетической активности клеток.

Разработка материалов, подходящих для использования в качестве биочернил, является специальной задачей. Эти материалы должны подходить как для

процесса печати, так и последующего «созревания» скаффолда с инкорпорированными клетками. Для этих целей уже апробирован ряд природных биоматериалов, включая альгинат [9–16], желатин [17–23], коллаген [24–30], гиалуроновую кислоту (ГК) [17, 31–34], фиброин шелка [20–22], хитозан [31, 35, 36] и агарозу [37, 38]. Достаточно широко применяются и синтетические материалы, такие как поликапролактон [9, 22, 39–42] и полилактид [43–45].

Основная роль биоматериала в регенерации тканей заключается в поддержке функционирования клеток. Так, материалы для создания скаффолда должны обеспечивать транспорт газов, питательных веществ и регуляторных факторов, чтобы сделать возможным выживаемость, пролиферацию и дифференцировку клеток. Кроме того, они должны подвергаться биологической деградации с контролируемой скоростью, близкой к скорости регенерации замещаемой ткани, и быть нетоксичными и неиммуногенными. И, наконец, они должны служить не только опорной структурой для клеток, но и обеспечивать механическую прочность тканевой конструкции в целом, сделать возможным ее фиксацию в зоне имплантации.

Идеальным образцом такого материала является природный внеклеточный матрикс (ВКМ), имитировать основные свойства которого и должны скаффолды. Микросреда ВКМ обеспечивает не только физическую поддержку адгезии клеток, но и сигналы, которые регулируют жизненный цикл, метаболизм и их дифференцированное состояние. ВКМ является основным источником и проводником биохимических и биомеханических сигналов для обеспечения организации и функционирования ткани в целом [46]. ВКМ – многокомпонентная система матричных макромолекул, состав и структура которых специфичны для каждого вида ткани. Основными компонентами ВКМ являются волокнообразующие белки, такие как коллагены, эластин, фибронектин, ламинины, гликопротеины, протеогликаны и гликозаминогликаны [47]. В большинстве тканей основной фибриллообразующей составляющей ВКМ является коллаген I типа, а в хрящевой ткани – коллаген II типа [47].

В аспекте 3D-биопечати большинство природных полимеров обладают недостаточными механическими свойствами и слабой деградацией. Синтетические полимеры, напротив, имеют хорошие механические свойства, но не содержат макромолекул, обычно присутствующих в живых тканях. Поэтому перспективным является использование различных комбинаций этих материалов. Синтетические полимеры часто

добавляют в гели в виде гранул или микроволокон. В то же время многие авторы отмечают, что одно-временная печать природными и синтетическими полимерами затруднена из-за несовместимости оптимальных температур: температура печати синтетическими полимерами находится в диапазоне от 100 до 240 °С, а биогелями – от 4 до 30 °С [9, 15, 25].

Целью настоящего обзора является освещение биоматериалов и их комбинаций, используемых преимущественно для восстановления хрящевой ткани. В то же время представленные материалы могут быть использованы при восстановлении большинства мягких тканей.

1. ОСНОВНЫЕ ПРИРОДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ БИОЧЕРНИЛ

Наибольшее распространение в качестве основного компонента биочернил, ввиду определенного сходства с ВКМ, получили природные полимеры: агароза, альгинат, гиалуроновая кислота, желатин, коллаген, фиброин и хитозан.

Агароза. Это полисахарид, получаемый из красных и бурых водорослей, который состоит из чередующихся остатков β -D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо- α -L-галактопиранозы. Она широко используется в молекулярной биологии и тканевой инженерии благодаря способности к обратимому гелеобразованию. При этом температура перехода раствор–гель и гель–раствор, как и в случае большинства гидрогелей, зависит не только от концентрации исходного раствора, но и от молекулярной массы полимера [48]. К недостаткам агарозы, как основы для биочернил, можно отнести отсутствие условий для поддержания роста клеток [49, 50] и низкую скорость биодеградации [48]. Поэтому агарозу рекомендуют использовать только в качестве жертвенного материала, например, для создания микроканалов при васкуляризации скаффолдов [38].

Альгинат. Это полисахарид, получаемый из бурых водорослей. Он состоит из гиалуроновой и маннуроносовой кислот [51]. Этот полимер хорошо поддерживает рост клеток [52] и сравнительно недорог. Материал хорошо растворяется в воде и полимеризуется двухвалентными катионами, такими как кальций и барий, в результате реакций ионного обмена [10, 44]. Однако биосовместимость альгината ниже, чем у природных полимеров животного происхождения, таких, например, как желатин [53]. Альгинатные гидрогели разлагаются путем высвобождения сшивающих гель катионов или разложением основной цепи путем гидролиза гликозидных связей [54]. Основным недостатком альгината считаются его низкие биомеханические свойства, затрудняющие процесс печати [16].

Хитозан. Хитозан – природный полисахарид, получаемый из щелочного N-деацетилированного хитина членистоногих [55]. Микрофибриллы хитина – основные структурные компоненты в экзоскелете ракообразных и насекомых. Также он входит в состав клеточных стенок грибов и дрожжей [56]. Гидрофильная структура хитозана способствует адгезии и пролиферации практически всех типов клеток [57]. Скорость разложения хитозана в сравнении с природными полимерами животного происхождения, такими как коллаген, желатин и фибрин, относительно низкая [57] и зависит как от степени его деацетилирования, так и от его молекулярной массы [58]. В целом время полудеградациии в организме превышает 30 дней [59]. Известно также, что этот полимер биосовместим, обладает противомикробными свойствами, низкой токсичностью и иммуногенностью, и как следствие, представляет интерес в качестве материала для создания скаффолдов [60–62].

Гиалуроновая кислота. Гиалуроновая кислота (ГК) представляет собой несulfатированный гликозаминогликан, состоящий из повторяющихся дисахаридных фрагментов N-ацетил-d-глюкозамина и d-глюкуроновой кислоты [63], и встречается почти во всех видах соединительной ткани [64]. В организме она поддерживает ряд таких биологических процессов, как рост, миграция и дифференцировка клеток [65]. Ее получают путем экстракции из тканей животных (как правило, петушиных гребней) или биотехнологическим путем – как продукт синтеза модифицированных бактерий рода *Streptococcus* или *Pasteurella* [64]. Благодаря большому содержанию карбоксильных и гидроксильных групп ГК является высокогидрофильным соединением, поэтому способна образовывать в водных растворах гелеобразную структуру в результате межмолекулярного взаимодействия линейных макромолекул [63]. Однако как материал для 3D-печати ГК имеет ограничения из-за слабых механических свойств, медленного гелеобразования и слишком короткого периода биодеградации [66, 67]. Поэтому в биочернилах она обычно используется в сочетании с другими материалами, например, альгинатом [68], желатином [33], коллагеном [34].

Коллаген. Коллаген является основным структурным белком большинства видов соединительных тканей, обеспечивая поддержание биологической и структурной целостности ВКМ. Коллаген обладает низкой иммуногенностью, хорошей биосовместимостью, способностью к биодеградации, а также регуляторными функциями в отношении адгезии, миграции и дифференцировки клеток [69]. При 37 °С он формирует гидрогель, имеющий структуру тройной спирали [70]. Коллаген характеризуется относительно низкими механическими свойствами, однако вследствие высокой биосовместимости явля-

ется одним из наиболее часто используемых компонентов скаффолдов [26–29]. Однако большая часть коммерческих препаратов коллагена иммуногенна, что требует использования для тканевой инженерии высокоочищенных его вариантов.

Желатин. Этот белок является продуктом денатурации коллагена и не отличается от последнего по аминокислотному составу [20]. Желатин может быть получен из костей, сухожилий или кожи животных путем кислотного или основного гидролиза [71]. Несмотря на сходство с коллагеном по химическому составу, он лишен антигенных и иммуногенных свойств [72]. Время деградации *in vivo* желатина, сшитого глутаровым альдегидом, по некоторым данным, составляет около 3 недель [73]. Желатин часто используется при биопечати в качестве основного или в комбинации с другими биоматериалами [20, 22, 33]. Наибольшее распространение получили его модифицированные формы, например, желатин-метакрилат (GelMA), который достаточно быстро полимеризуется под действием УФ, позволяя в полной мере использовать возможности 3D-печати [17, 33, 37].

Фиброин шелка. Он является природным макромолекулярным белковым полимером с хорошей биосовместимостью, подходящими для печати механическими свойствами и способностью к биодеградации [74]. Белок фиброина формирует слои антипараллельных бета-листов [75]. В зависимости от источника шелка молекулярный состав и структура фиброина могут варьировать. Так, шелк, образуемый тутовым шелкопрядом, состоит из двух основных белков – серицина и фиброина. Фиброин является структурным центром шелка, а серицин – окружающий его клейкий компонент [75]. Гелеобразование

фиброина шелка можно индуцировать в водных его растворах высокой температурой, снижением pH, обработкой ультразвуком, замораживанием; описано и его электрогелеобразование с формированием конформации β -структуры, которая физически сшивает и стабилизирует гель [74]. Получена и модификация фиброина шелка метакрилатом [76]. Шелк разлагается *in vivo* протеолитическими ферментами медленно (обычно в течение года) [77] и обладает хорошими с точки зрения биопечати механическими свойствами [78].

Описанные выше материалы активно используются в биомедицинских исследованиях по всему миру, о чем свидетельствует анализ публикаций, доступных в базе данных PubMed (рис. 1). Необходимо отметить, что основной объем экспериментальных работ, касающихся скаффолдов для замещения хрящевой ткани, проведен с использованием коллагена: частота его применения была стабильно высокой в течение первых 15 лет XXI века. Однако в последние 5 лет ситуация изменилась: авторы отдают предпочтение альтернативным вариантам основного компонента тканеинженерных конструкций, в частности, хитозану и фиброину (рис. 2). Обращает на себя внимание и снижение частоты применения агарозы в последние годы, что может быть связано с ее слабыми матричными для клеток свойствами и крайне низкой скоростью биодеградации. Подобная тенденция может стать характерной и для ГК и альгината в последующие 5 лет. В целом можно отметить, что представленные на рис. 2 материалы (за исключением агарозы) в последние 5 лет используются примерно с одинаковой частотой (от 6,3 до 8,3% от всего количества исследований).

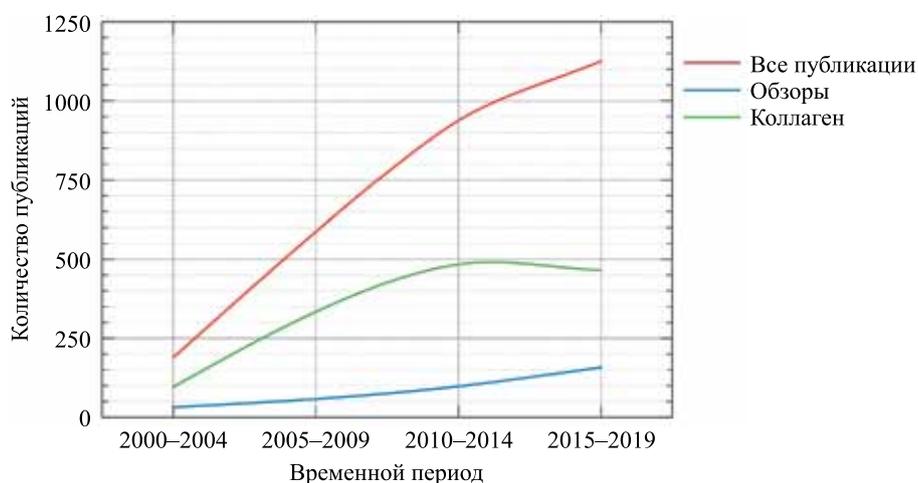


Рис. 1. Количество публикаций о создании тканеинженерных конструкций для замещения хрящевой ткани с 2000-го по 2019 г.

Fig. 1. Number of publications (from 2000 to 2019) on creation of tissue-engineered constructs for cartilage replacement

2. МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ БИОЧЕРНИЛА

Очевидно, что использование только одного материала в качестве биочернил не может обеспечить всех механических и функциональных свойств, которые необходимы для получения полноценных тканеинженерных конструкций (ТК), поэтому скаффолды в последние годы формируют с использованием комбинации нескольких материалов.

Достаточно часто используется комбинация фиброина шелка и желатина [20, 21, 22, 79]. Фиброин шелка выступает в качестве структурного материала, обеспечивающего механические свойства геля и его биodeградацию, а желатин придает необходимую для биопечати вязкость исходному раствору и упругость скаффолду после полимеризации. С точки зрения облегчения экструзии, прочности геля в сочетании с его цитосовместимостью, хорошие результаты показало следующее соотношение компонентов различных сортов шелка и желатина: Bombyx mori 1,5%, Philosophamia ricini 1,5% и желатина 7% [22]. Авторы отметили, что концентрации желатина выше 9% и шелка выше 2% создавали слишком высокую вязкость и чрезмерное давление при печати. Концентрация желатина ниже 5% обеспечивала недостаточную вязкость, а фиброина шелка – менее 1% приводила к слишком медленному гелеобразованию. Соотношение шелка и желатина 1 : 2 (6,9%) обеспечивало оптимальные механические свойства (по модулю сжатия), скорость деградации, а также микросреду для пролиферации, дифференцировки клеток и формирования хрящевой ткани [20]. Wu et al., изменяя процентное соотношение фиброина шелка в гидрогеле на основе желатина (30%) и нано-гидроксиапатита (3%), установили, что концентрация фиброина шелка

10% обеспечивает лучшие механические свойства скаффолду (модуль упругости при растяжении составил 10,6 МПа) [21]. С возрастанием содержания фиброина шелка увеличивалось количество водородных связей между молекулами, и как следствие, степень сшивания фибрилл; скорость биodeградации при этом закономерно снижалась. Необходимо отметить, что, по оценке Ke et al. [39], нативный хрящ человека имеет модуль упругости 14,7 МПа, что близко к значениям, полученным в вышеописанной работе.

Комбинации желатина с ГК были исследованы в работах Sakai et al. [17, 33]. Авторы показали, что содержание GelMA и метакрилизованной ГК определяло поведение клеток в скаффолде. Так, в скаффолдах с содержанием желатина 1 и 2% vs 3 и 5% наблюдали более выраженное подавление клеточного роста. В данных работах использовали только модифицированные варианты желатина и ГК. Добавление метакрилатных групп делало материал пригодным для быстрого сшивания и, несмотря на достаточно низкую концентрацию желатина, создавало стабильную при физиологических температурах структуру гидрогеля, по механическим свойствам приближающуюся к свойствам нативного гиалинового хряща. Сходным образом была исследована комбинация тиолированной ГК с метакрилизированным коллагеном [34]. Оптимальным для биопечати, по мнению авторов, является соотношение коллаген/ГК 3 : 1 с концентрациями 6 и 2% соответственно. Хотя и другие варианты формуляции (2 : 1 и 4 : 1) демонстрировали близкие механические свойства и были способны поддерживать жизнеспособность клеток так же, как и соотношение гелей 3 : 1. Однако при таких соотношениях компонентов у гелей выявились

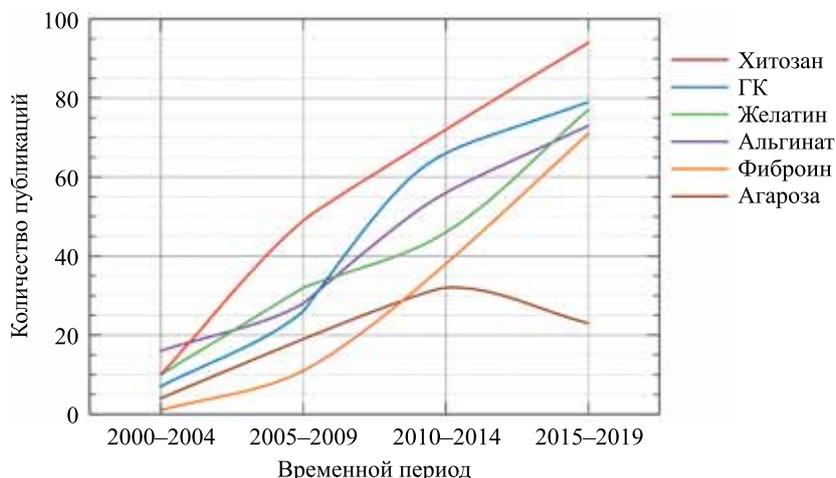


Рис. 2. Количество публикаций (только экспериментальные исследования) по использованию ряда биоматериалов для создания скаффолдов хряща с 2000-го по 2019 г.

Fig. 2. Number of publications (experimental studies only, from 2000 to 2019) on the use of a range of biomaterials for creation of cartilage scaffolds

и определенные недостатки. Так, при соотношении 4 : 1 образование коллагеновых пучков в растворе наблюдалось уже при комнатной температуре, что, по мнению авторов, связано с избыточной концентрацией коллагена. Формуляция 2 : 1, напротив, характеризовалась недостаточным количеством этого материала для взаимодействия клеток.

Часто тестируемой комбинацией материалов является пара «хитозан–коллаген» [24, 25]. Исследование *in vitro* показало биосовместимость скаффолдов на основе этих материалов: они поддерживали адгезию зрелых хондроцитов, их распространение по поверхности и внутри ТК, обеспечивая высокий уровень их жизнеспособности. Кроме того, было показано, что количество хитозана в составе скаффолда – тот параметр, который напрямую влияет на размер пор и его морфологию [24]. Включение гиалуроновой кислоты в скаффолд из хитозана усиливало продукцию ВКМ хряща, пролиферацию хондроцитов и клеточную адгезию к поверхностям каркаса [31].

Одним из наиболее доступных и изученных вариантов остаются скаффолды на основе альгината [9, 37]. Исследования Daly et al. [37] показали, что альгинатный и агарозный гидрогели поддерживали образование гиалино-подобного хряща в большей степени, чем GelMA, о чем свидетельствует выраженное окрашивание новообразованных тканей на коллаген типа II. С другой стороны, GelMA в большей мере обеспечивал образование фиброзного хряща, что подтверждается выявлением в скаффолдах более высоких количеств коллагена типа I. Высокие уровни жизнеспособности клеток (~80%) сохранялись во всех скаффолдах после печати при использовании в качестве биочернил вышеуказанных компонентов. GelMA в данной работе показал наилучшую пригодность для печати, создавая структуры с большей точностью, чем альгинатные и агарозные биочернила. В ТК на основе альгината и коллагена наблюдалось гомогенное распределение хондроцитов, повышение в них экспрессии специфичных для хряща генов, а именно *Acan*, *Sox9* и *Col2a1* и снижение экспрессии *Colla1*, что доказывало сохранение фенотипа хондроцитов [9].

В качестве компонентов биочернил возможно использование децеллюляризованного ВКМ, который обеспечивает естественное микроокружение для клеток. К преимуществам такого компонента можно отнести: наличие биохимических сигналов исходного нативного ВКМ, правильные пропорции белков, а также способность избирательно поддерживать адгезию и пролиферацию клеток конкретной ткани или органа. В недавно опубликованной работе Басок и соавт. был получен микродисперсный тканеспецифический матрикс из децеллюляризованного суставного хряща свиньи, который сохранял морфофункциональные свойства ВКМ [80, 81]. Авторы показали,

что такой матрикс способен поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток.

3. МАТЕРИАЛЫ, УСИЛИВАЮЩИЕ ЖЕСТКОСТЬ СКАФФОЛДОВ

3.1. Каркасные материалы

Каркасные материалы служат для придания жесткости конструкции. При этом они должны быть биосовместимыми или, по крайней мере, биоинертными и обладать низкими темпами деградации в организме. В качестве каркасных материалов обычно используются синтетические полимеры, такие как поликапролактон (PCL), полилактид (PLA), полигликолевая кислота (PGA), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) [39, 40, 82, 83].

Наиболее часто используемым полимером для трехмерных пористых скаффолдов является PCL. Это линейный алифатический сложный полиэфир, получаемый путем полимеризации с раскрытием кольца ϵ -капролактона [84]. Он является биоразлагаемым, но более стабильным, чем PLA, поскольку является полукристаллическим и гидрофобным [85, 86]. Pati et al. [82] использовали PCL для поддержки децеллюляризованной жировой ткани, инкрустированной мезенхимальными стволовыми клетками. Объем конструкции длительное время оставался постоянным благодаря тому, что PCL-каркас сохранял свою структуру во время процесса ремоделирования ткани. Shim et al. [87] также использовали опору из PCL при создании скаффолда с ателоколлагеном и надмолекулярной ГК для реконструкции остеохондральных дефектов в коленных суставах кроликов. PCL уже получил одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для клинического использования [88].

PLA – это термопластичный сложный полиэфир, который получают из кукурузы, сахарного тростника, пшеницы или риса, что делает его доступным и недорогим [89]. PGA – синтетический полимер гликолевой кислоты [90]. PGA обладает большей кристаллическостью в сравнении с PLA, поскольку не содержит метильной боковой цепи, однако PLA является более гидрофобным [91].

Еще одним каркасным материалом является синтетический сополимер PLGA (обычно 75% молочной кислоты и 25% гликолевой кислоты) [92]. Это также биосовместимый материал, который разлагается до нетоксичных продуктов (H_2O и CO_2 [93]). PLGA, как и PCL, уже получил одобрение FDA для клинического использования [88].

Основной недостаток описанных выше синтетических полимерных материалов в аспекте 3D-принтинга заключается в необходимости поддержания

высокой температуры при их печати (от 100 до 230 °С), что затрудняет их использование совместно с гидрогелями с клетками. Одним из вариантов создания композиционных скаффолдов является тактика двухэтапной печати: сначала пластика, а потом гидрогеля. Так, в недавно проведенном исследовании Kaue et al. [83] использовали систему с двумя дозаторами – для печати отдельно PCL и гидрогеля альгинат/коллаген с хондроцитами: печать гидрогеля осуществляли в каналы из PCL после остывания последнего. Таким образом, была получена тканевая конструкция трахеи, которую имплантировали новозеландским кроликам. Авторы показали, что такой скаффолд индуцирует образование хряща, сохраняя целостность. Необходимо отметить, что авторы отделили гидрогель с хондроцитами от просвета трахеи промежуточной мембраной. В отсутствие такого разделения наблюдалась склонность к воспалению, ограничению роста хряща и стенозу. PCL и гидрогель был использован еще в одной работе по изготовлению скаффолда трахеи [39]. Авторы получили скаффолды, которые имели механические свойства, аналогичные нативному хрящу трахеи и гладкомышечной ткани. Izadifar et al. [10] сформировали конструкции из содержащего клетки альгинатного гидрогеля в каналах, созданных между нитями PCL в каждом слое. Этот подход продемонстрировал возможность создания скаффолда с необходимой геометрией и высоким уровнем выживаемости клеток. Аналогичной по способу печати была работа Romanazzo et al. [40]. Жизнеспособность клеток в полученных скаффолдах варьировала в пределах от 70 до 90% [10, 40].

Описаны и другие возможности оптимизации механических свойств скаффолдов, получаемых 3D-печатью. Так, добавление различных наночастиц (наносиликатов, галлуазитовых нанотрубок, наноцеллюлозы, графена) в ТК повышает их жесткость и биологическую активность [16, 94, 95, 96]. Так, добавление в гидрогель из альгината, метилцеллюлозы и галлуазитовых нанотрубок в концентрации от 20 до 40 мг/мл увеличивало прочность на растяжение пропорционально в два раза (со 164 до 381 кПа), а напряжение сжатия – в 1,5 раза (с 426 до 648 кПа) [16].

Механические свойства биочернил с различными пропорциями хитозана, желатина и гиалуроновой кислоты возрастали при добавлении графена [94, 97, 98]. Показано, что содержание графена 0,06% в наибольшей степени способствует формированию пористой структуры скаффолда, равно как и высокому значению модуля сжатия. Необходимо отметить, что зависимость механических свойств каркаса от концентрации графена оказалась нелинейной. Графен может быть использован и в форме порошка: Saouar et al. [97] показали, что добавление 0,5% графена увеличивало предел прочности при растяжении и модуль упругости метакрилизованного хитозана

более чем на 67 и 40% соответственно, а также улучшало адгезию и пролиферацию фибробластов L929. Xavier et al. изучили биочернила на основе GelMA с добавлением 2% наносиликата [98]. Наносиликат (пропорционально своей концентрации) повышал механическую прочность скаффолда, а наносиликат-лапонит (разлагается на легко выводимые организмом магний, ортокремниевую кислоту и литий) облегчал процесс выведения продуктов биодеградации скаффолда.

Часто используемым вариантом усиления жесткости скаффолда на основе биочернил являются целлюлоза и метилцеллюлоза [11–13, 95, 96, 99]. Так, Müller et al. [99] использовали коммерческие биочернила на основе альгината натрия и наноцеллюлозы для 3D-печати хряща. Добавление наноцеллюлозы улучшало качество биопечати. Однако этот компонент оказывал негативное влияние на пролиферацию клеток. Эти данные подтверждены в публикации по применению наноцеллюлозных гидрогелей для хряща ушной раковины: средняя жизнеспособность клеток после окончания биофабрикации не превышала 68,5–76,9% [95]. Добавление к гидрогелям метилцеллюлозы повышало эластичность и стабильность скаффолдов, а также их микропористость [13]. Кроме того, это оказалось одним из оптимальных подходов для достижения более высокого значения упругости гидрогеля, выходящего из печатающей иглы, что открывает возможность процесса печати многослойных конструкций большого размера [96].

Дополнительным вариантом улучшения жесткости готовых конструкций может быть добавление к гидрогелям для печати микроволокон PCL и PLA. Так, микроволокна PCL успешно использовались Daly et al. [34]. Narayanan et al. использовали биочернила с нановолокнами PLA (0,5%) при конструировании тканей мениска [44]. Можно также отметить, что гранулы PCL формируют вокруг себя кластеры из клеток, способствуя их выживаемости и пролиферации в скаффолде [100].

3.2. Жертвенные компоненты

Использование жертвенных компонентов при формировании скаффолда – одна из ключевых техник биопечати сегодня. Сочетание при печати основного гидрогеля с инкорпорированными клетками и жертвенного материала позволяет как обеспечивать временную поддержку основного гидрогеля до его полной полимеризации, так и формировать ниши и каналы, имитирующие кровеносные сосуды, ответственные за доступ газов и питательных веществ [30, 38, 101–106]. Основные требования к жертвенному материалу – полная утилизация из скаффолда в заданные сроки и отсутствие цитотоксичности продуктов его распада. В литературе описаны различные

материалы, применяемые для этой цели. Так, Lee et al. [105] использовали желатин для формирования в скаффолде из коллагена каналов просветом до 1 мм. Bertassoni et al. [38] разработали аналогичную стратегию для построения сосудистой сети, используя агарозный гель. В ряде работ в качестве жертвенного материала использован коммерческий продукт Pluronic F-127 [30, 101, 103]. В частности, с применением этого компонента удалось сформировать макропоры в скаффолде из нановолокнистого коллагена [30]. Fitzsimmons et al. обнаружили, что Pluronic F-127 имеет преимущество перед желатином в качестве жертвенного материала для создания васкуляризованных тканей благодаря однородности нити во время печати и большому модулю сжатия [101]. Описано использование в качестве жертвенного материала нитей из поливинилового спирта [102] и альгината [104]. Кроме нитей, жертвенный материал может быть в форме микросфер, обеспечивая скаффолду контролируемую макропористость [106, 107].

4. МЕХАНИЗМЫ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ МАТЕРИАЛОВ ПРИ 3D-ПЕЧАТИ

Большинство используемых для биопечати материалов исходно находятся в состоянии растворов или суспензий и для формирования в скаффолде упругого геля должны пройти этап полимеризации (сшивки, cross-linking), которую, в зависимости от дизайна эксперимента, архитектуры и геометрии скаффолда, начинают до печати, в ее процессе или после завершения формирования каждого слоя. Контролируемое сшивание разных материалов обеспечивается разными физическими и химическими воздействиями – светом, температурой, концентрацией ионов, pH и др.

Наиболее физиологичным для коллагена является «температурный» тип полимеризации, которая спонтанно происходит при повышении температуры раствора до 20 °C [30]. В этих случаях экструзию осуществляют холодным раствором (+4... +8 °C), а платформу, на которую происходит печать, подогревают до 25–35 °C [108]. Полимеризацию коллагена можно индуцировать и понижением pH раствора [109], однако это может негативно влиять на жизнеспособность клеток в сформированном скаффолде [108, 110].

Одним из новых вариантов контролируемой полимеризации коллагена с другими материалами является использование генипина [1, 24, 25, 111, 112]. Механизм сшивания генипином обусловлен несколькими реакциями нуклеофильного замещения, в которых участвуют разные сайты молекул коллагена [25]. В частности, показано, что для получения оптимальных механических, структурных и биологических свойств скаффолда для замещения хрящевых дефектов на основе коллагена и хитозана рекомендуется

концентрация генипина на уровне 1% [25]. После сшивания коллаген и хитозан образуют макропористый слой, в котором хондроциты сохраняют жизнеспособность, в основном в областях, прилегающих к порам [24]. Сшивка генипином также возможна для формирования скаффолдов на основе желатина и фиброина шелка [20]. Важно отметить, что применение генипина сопряжено со стабильным, но длительным процессом полимеризации – до 1 ч [25, 111], что в определенной мере ограничивает применение данного подхода при формировании скаффолдов большого размера. Кроме того, в отдельных исследованиях показаны отсроченные неблагоприятные эффекты генипина, в частности, при деградации основного материала скаффолда [113]. Альтернативой генипину является дубильная кислота, механизм сшивания которой обусловлен образованием многочисленных водородных связей между двумя материалами [112]. В работе Yeو et al. оптимальная концентрация дубильной кислоты для сшивания составляла 2% [112]. Однако в работе Lee et al. улучшенные механические свойства наблюдались уже при ее концентрации 0,5% [1].

Для растворов альгинатов характерна способность к ионотропному гелеобразованию под действием таких катионов, как Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , которые выступают в качестве сшивающих агентов, взаимодействуя с карбоксильными группами гулуронатных блоков молекул полисахарида; маннуронатные блоки при этом остаются свободными [14]. Чаще всего в качестве сшивающего агента в гидрогелях на основе альгината используется хлорид кальция [11, 12, 15].

В последние годы все большее распространение получают фотосшиваемые биоматериалы. Этот подход имеет несколько преимуществ перед другими методами сшивки, так как при его использовании легко осуществлять контроль печати, регулируя скорость и степень отверждения получаемой конструкции. Многие природные биоматериалы, такие как желатин [18, 19], фиброин шелка [76] и коллаген [114], под действием УФ с длиной волны 365 нм полимеризуются путем акрилирования. Drzewiecki et al. продемонстрировали использование фотоотверждения метакриламида коллагена в качестве фибриллообразующих биочернил для изготовления каркасов [114]. Фотосшивание метакрилата ГК было описано в работе Onofrillo et al. при создании скаффолда хряща [19]. Сходным образом был получен и исследован гель на основе метакрилата фиброина шелка (SiMA), который, по мнению авторов, характеризуется биосовместимостью, биоразлагаемостью и имеет подходящую биологическую и механическую прочность [76]. В отличие от полимеризации генипином, при фотоотверждении метакрилата полимеризация одного слоя завершается за 5 минут. Однако некоторые авторы отмечают, что недостатком ак-

рилирования является снижение биосовместимости скаффолдов, так как непрореагировавшие акриловые группы цитотоксичны, и кроме того, могут вызывать *in vivo* местные воспалительные реакции [115]. Этим же недостатком обладает и часто используемый фотоинициатор Irgacure 2959, являющийся источником свободных радикалов, необходимых для проведения реакции полимеризации [116]. Еще одним способом инициации образования фотосшивок являются реакции с фенольными остатками в природных биоматериалах. Так, например, механические свойства гидрогеля из модифицированных фенольными гидроксильными группами желатина и ГК можно регулировать, изменяя концентрации трис-бипиридила диоксида рутения (II) и натрий-аммония персульфата и время облучения светом [17]. В качестве фотоинициатора для коллагена также может быть использован рибофлавин, который под действием УФ вызывает образование ковалентных поперечных связей между аминокислотными группами в цепях коллагена [117]. Основным преимуществом рибофлавина является то, что обычно он присутствует в организме и в отличие от других фотоинициаторов не является цитотоксичным. Индуцированная рибофлавином фотополимеризация коллагенового гидрогеля, содержащего фиброхондроциты, не приводила к изменению формы скаффолда, повышая при этом уровни экспрессии в клетках генов коллагена II типа и агреккана [70]. Оптимальная концентрация рибофлавина, обеспечивающая увеличение модуля упругости, составила 0,01% [70]. Широкие возможности использования рибофлавина были показаны и Batchelor et al. [118]. Необходимо отметить, что применение рибофлавина позволяет проводить сравнительно быструю полимеризацию (от 10 секунд до 5 минут) под действием видимого света [70, 117].

Для скаффолдов из смеси шелка и желатина физическое сшивание может проводиться под действием ультразвука [119], который индуцирует «кристаллизацию» β -структур фиброина в результате усиления молекулярной вибрации, гидратации гидрофобных доменов и кратковременного повышения локальной температуры. «Сшивание» фиброина (и желатина) может достигаться и путем самосборки при использовании фиброина двух разных типов [22].

Одним из вариантов сохранения баланса между способностью к печати и жесткостью получаемой конструкции является использование двойной полимеризации материала. На первом этапе проводится подбор вязкости биочернил (в пограничном состоянии «гель–раствор»), подходящей для процесса печати, а на втором – увеличение жесткости/упругости (переход в состояние геля), необходимое для сохранения геометрии сразу после окончания печати каждого слоя. Такой подход был подробно описан A. Skardal et al. для полимеризации акрилатов

и алкинов в случае создания скаффолдов на основе коллагена, ГК и желатина [120]. Kajave et al. уделили внимание решению вопросов, связанных с недостаточными механическими свойствами и быстрой деградацией получаемых таким образом скаффолдов, что присуще всем ТК, полученным с использованием низких концентраций коллагена [26]. Авторы показали, что последовательное применение УФ и генипина (0,5 мМ) значительно улучшает упругость скаффолдов и увеличивает время их деградации в организме как с инкорпорированными клетками, так и в бесклеточных вариантах.

5. КОММЕРЧЕСКИЕ ЧЕРНИЛА ДЛЯ 3D-ПЕЧАТИ

В последние годы на биотехнологическом рынке появились коммерческие препараты биочернил. Так, компания CELLINK (Швеция) разработала биочернила на основе альгината, коллагена, желатина и хитозана – серии GelX CELLINK на основе метакрилизованного желатина и CELLINK Bioink на основе нановолокнистой целлюлозы и альгината, которые могут иметь модификации с пептидами RGD, трикальцийфосфатом, ламининами и фибриногеном [121]. Их пригодность для биопечати была продемонстрирована в ряде недавних исследований [11, 12, 95, 99]. Израильская компания CollPlant химически модифицировала рекомбинантный человеческий коллаген для создания биочернил (rhCollagen BioInk), пригодных для различных технологий печати, включая экструзионную, струйную печать, лазерный индуцированный прямой перенос и стереолитографию. Advanced BioMatrix (США) разработали биочернила LifeInk 200 и LifeInk 240 для экструзионной печати на основе коллагена, метакрилизованные коллаген, желатин и ГК, а также тиолированную ГК [122]. Biogelx выпустили синтетические биочернила, которые образуют нановолокнистую сеть, имитирующую внеклеточный матрикс, могут поддерживать рост и пролиферацию клеток, передачу сигналов и имеют реологические свойства, подходящие для биопечати [123]. Стоит отметить, что стоимость таких биочернил достаточно высока.

Кроме материалов, адаптированных для 3D-биопечати в настоящее время, целый спектр коммерческих продуктов для восстановления хрящевой ткани находятся в фазе клинических испытаний. Они представляют собой либо готовые скаффолды, либо гидрогели, быстро полимеризующиеся в месте имплантации. Среди них: NOVOCART 3D, RevaFlex и MACI. RevaFlex представляет собой тканеинженерный хрящевой имплантат для восстановления и регенерации коленного хряща, содержащий аллогенные ювенильные хондроциты [124]. NOVOCART 3D позиционируется как персонализированный имплантат, созданный на основе хондроцитов, полученных от пациента, которые культивируют на коллагеновых

каркасах [125]. Сходным является МАСІ, который содержит аутологичные хондроциты, культивируемые на свиной коллагеновой мембране, и предназначен для восстановления повреждения коленного хряща [126].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ литературы последних 5 лет, посвященной применению различных биоматериалов при 3D-биопечати хрящевой и мягких тканей. Рассмотрены достоинства и недостатки базовых компонентов скаффолдов, подходы к их полимеризации, включая типы и особенности использования сшивающих агентов; обсуждены пути улучшения свойств биочернил, в частности, за счет применения дополнительных компонентов, отвечающих за жесткость, пористость и другие базовые свойства скаффолдов. Проанализированы тенденции к изменению частот использования ряда материалов. В целом, несмотря на большое разнообразие базовых биоматериалов, спектра дополнительных компонентов, применяемых при создании ТК для замещения дефектов хрящевой и мягких тканей, поиск новых вариантов полноценной замены ВКМ продолжается.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lee J, Yeo M, Kim W, Koo Y, Kim GH. Development of a tannic acid cross-linking process for obtaining 3D porous cell-laden collagen structure. *Int J Biol Macromol*. 2018; 110: 497–503. doi: 10.1016/j.ijbiomac.201710.105. PMID: 29054525.
2. Diamantides N, Dugopolski C, Blahut E, Kennedy S, Bonassar LJ. High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks. *Biofabrication*. 2019; 11 (4): 045016. doi: 10.1088/1758-5090/ab3524. PMID: 31342915.
3. Rhee S, Puetzer JL, Mason BN, Reinhart-King CA, Bonassar LJ. 3D bioprinting of spatially heterogeneous collagen constructs for cartilage tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016; 2 (10): 1800–05. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00288.
4. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. 2020; 226: 119536. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536. PMID 31648135.
5. Groll J, Burdick JA, Cho DW, Derby B, Gelinsky M, Heilshorn SC et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*. 2018; 11 (1): 013001. doi: 10.1088/1758-5090/aaec52. PMID: 30468151.
6. Whitford WG, Hoying JB. A bioink by any other name: terms, concepts and constructions related to 3D bioprinting. *FUTURE SCIENCE*. 2016; 3 (2). doi: 10.4155/fsoa-2016-0044.
7. Williams D, Thayer P, Martinez H, Gatenholm E, Khademhosseini A. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting. *Bioprinting*. 2018; 9: 19–36. doi: 10.1016/j.bprint.2018.02.003.
8. Бекетов ЕЕ, Исаева ЕВ, Шегай ПВ, Иванов СА, Каприн АД. Современное состояние тканевой инженерии для восстановления хрящевой ткани. *Гены и клетки*. 2019; 2: 12–20. Beketov EE, Isayeva EV, Shegay PV, Ivanov SA, Kaprin AD. Sovremennoye sostoyaniye tkanevoy inzhenerii dlya vosstanovleniya khryashchevoy tkani. *Geny i kletki*. 2019; 2: 12–20.
9. Yang X, Lu Z, Wu H, Li W, Zheng L, Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018; 83: 195–201. doi: 10.1016/j.msec.2017.09.002. PMID: 29208279.
10. Izadifar Z, Chang T, Kulyk W, Chen X, Eames BF. Analyzing Biological Performance of 3D-Printed, Cell-Impregnated Hybrid Constructs for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; 22 (3): 173–188. doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0307. PMID: 26592915.
11. Apeltgren P, Amoroso M, Lindahl A, Brantsing C, Rotter N, Gatenholm P et al. Chondrocytes and stem cells in 3D-bioprinted structures create human cartilage *in vivo*. *PLoS One*. 2017; 12 (12): e0189428. doi: 10.1371/journal.pone.0189428. PMID: 29236765.
12. Moller T, Amoroso M, Hagg D, Brantsing C, Rotter N, Apeltgren P et al. *In vivo* Chondrogenesis in 3D Bioprinted Human Cell-laden Hydrogel Constructs. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017; 5 (2). doi: 10.1097/GOX.0000000000001227. PMID: 28280669.
13. Schütz K, Placht A-M, Paul B, Brüggemeier S, Gelinsky M, Lode A. Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11: 1574–1587. doi: 10.1097/GOX.0000000000001227. PMID: 28280669.
14. Гусев ИВ. Разработка высокоструктурированных гидрогелевых депо-материалов для направленной доставки лекарственных препаратов: Дис. ... канд. тех. наук. М., 2015. 182. Gusev IV. Razrabotka vysokostrukturnirovannykh gidrogelevykh depo-materialov dlya napravlennoy dostavki lekarstvennykh preparatov. [Dissertation]. М., 2015. 182.
15. Giuseppe MD, Law N, Webb B, Macrae RA, Liew LJ, Sercombe TB et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018; 79: 150–7. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.12.018. PMID: 29304429.
16. Roushangar ZB, Shabgard MR, Roushangar L. Mechanical and biological performance of printed alginate/methylcellulose/halloysite nanotube/polyvinylidene fluoride bio-scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*.

- 2018; 92: 779–789. doi: 10.1016/j.msec.2018.07.035. PMID: 30184807.
17. Sakai S, Ohi H, Hotta T, Kamei H, Taya M. Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatin-based bioink through microextrusion and visible light-initiated crosslinking. *Biopolymers*. 2018; 109 (2): e23080. doi: 10.1002/bip.23080. PMID: 29139103.
18. Liu W, Heinrich MA, Zhou Y, Akpek A, Hu N, Liu X et al. Extrusion bioprinting of shear-thinning gelatin methacryloyl bioinks. *Adv Healthc Mater*. 2017; 6 (12): 1601451. doi: 10.1002/adhm.201601451. PMID: 28464555.
19. Onofrillo C, Duchi S, O'Connell CD, Blanchard R, O'Connor AJ, Scott M et al. Biofabrication of human articular cartilage: A path towards the development of a clinical treatment. *Biofabrication*. 2018; 10 (4): 045006. doi: 10.1088/1758-5090/aad8d9. PMID: 30088479.
20. Shi W, Sun M, Hu X, Ren B, Cheng J, Li C et al. Structurally and Functionally Optimized Silk-Fibroin-Gelatin Scaffold Using 3D Printing to Repair Cartilage Injury *in vitro* and *in vivo*. *Adv Mater*. 2017; 29 (29). doi: 10.1002/adma.201701089. PMID: 28585319.
21. Wu X, Chen K, Zhang D, Xu L, Yang X. Study on the technology and properties of 3D bioprinting SF/GT/n-HA composite scaffolds. *Materials Letters*. 2019; 238: 89–92. doi: 10.1016/j.matlet.2018.11.151.
22. Singh YP, Bandyopadhyay A, Mandal BB. 3D Bioprinting Using Cross-Linker-Free Silk-Gelatin Bioink for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019; 11 (37): 33684–33696. doi: 10.1021/acsami.9b11644. PMID: 31453678.
23. Hiller T, Berg J, Elomaa L, Röhrs V, Ullah I, Schaar K et al. Generation of a 3D Liver Model Comprising Human Extracellular Matrix in an Alginate/Gelatin-Based Bioink by Extrusion Bioprinting for Infection and Transduction Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (10): 3129. doi: 10.3390/ijms19103129.
24. Yan LP, Wang YJ, Ren L, Wu G, Caridade SG, Fan JB et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95 (2): 465–475. doi: 10.1002/jbm.a.32869. PMID: 20648541.
25. Bi L, Cao Z, Hu Y, Song Y, Yu L, Yang B et al. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22 (1): 51–62. doi: 10.1007/s10856-010-4177-3. PMID: 21052794.
26. Kajave NS, Schmitt T, Nguyen TU, Kishore V. Dual crosslinking strategy to generate mechanically viable cell-laden printable constructs using methacrylated collagen bioinks. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020; 107: 110290. doi: 10.1016/j.msec.2019.110290. PMID: 31761199.
27. Diamantides N, Dugopolski C, Blahut E, Kennedy S, Bonassar LJ. High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks. *Biofabrication*. 2019; 11 (4): 045016. doi: 10.1088/1758-5090/ab3524. PMID: 31342915.
28. Ren X, Wang F, Chen C, Gong X, Yin L, Yang L. Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 301. doi: 10.1186/s12891-016-1130-8. PMID: 27439428.
29. Mazzocchi A, Devarasetty M, Huntwork R, Soker S, Skardal A. Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver microenvironments. *Biofabrication*. 2018; 11 (1): 015003. doi: 10.1088/1758-5090/aae543. PMID: 30270846.
30. Lee J, Kim G. Three-Dimensional Hierarchical Nanofibrous Collagen Scaffold Fabricated Using Fibrillated Collagen and Pluronic F-127 for Regenerating Bone Tissue. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018; 10 (42): 35801–35811. doi: 10.1021/acsami.8b14088. PMID: 30260631.
31. Correia CR, Moreira-Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, van Blitterswijk CA, Karperien M et al. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011; 17 (7): 717–730. doi: 10.1089/ten.tec.2010.0467.
32. Stichler S, Böck T, Paxton N, Bertlein S, Levato R, Schill V et al. Double printing of hyaluronic acid/poly(glycidol) hybrid hydrogels with poly(ϵ -caprolactone) for MSC chondrogenesis. *Biofabrication*. 2017; 9 (4): 044108. doi: 10.1088/1758-5090/aa8cb7. PMID: 28906257.
33. Sakai S, Ohi H, Taya M. Gelatin/Hyaluronic Acid Content in Hydrogels Obtained through Blue Light-Induced Gelation Affects Hydrogel Properties and Adipose Stem Cell Behaviors. *Biomolecules*. 2019; 9 (8): 342. doi: 10.3390/biom9080342. PMID: 31387235.
34. Mazzocchi A, Devarasetty M, Huntwork RC, Soker S, Skardal A. Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver microenvironments. *Biofabrication*. 2018; 11 (1), 015003. doi: 10.1088/1758-5090/aae543. PMID: 30270846.
35. Intini C, Elviri L, Cabral J, Mros S, Bergonzi C, Bianchera A et al. 3D-printed chitosan-based scaffolds: An *in vitro* study of human skin cell growth and an *in vivo* wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. *Carbohydr Polym*. 2018; 199: 593–602. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.057. PMID: 30143167.
36. Elviri L, Foresti R, Bergonzi C, Zimetti F, Marchi C, Bianchera A et al. Highly defined 3D printed chitosan scaffolds featuring improved cell growth. *Biomed Mater*. 2017; 12 (4): 045009. doi: 10.1088/1748-605X/aa7692. PMID: 30143167.
37. Daly AC, Critchley SE, Rencsok EM, Kelly DJ. A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage. *Biofabrication*. 2016; 8 (4): 045002. doi: 10.1088/1758-5090/8/4/045002. PMID: 27716628.
38. Bertassoni LE, Cecconi M, Manoharan V, Nikkhah M, Hjortnaes J, Cristino AL et al. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip*. 2014; 14 (13): 2202–2211. doi: 10.1039/c4lc00030g. PMID 24860845.

39. Ke D, Yi H, Est-Witte S, George SK, Kengla CV, Atala A et al. Bioprinted trachea constructs with patient matched design, mechanical and biological properties. *Biofabrication*. 2019; 12 (1). doi: 10.1088/1758-5090/ab5354. PMID: 31671417.
40. Romanazzo S, Vedicherla S, Moran C, Kelly DJ. Meniscus BKM-functionalised hydrogels containing infrapatellar fat pad-derived stem cells for bioprinting of regionally defined meniscal tissue. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018; 12: e1826–e1835. doi: 10.1002/term.2602. PMID: 29105354.
41. Kaye R, Goldstein T, Grande DA, Zeltsman D, Smith LP. A 3-dimensional Bioprinted Tracheal Segment Implant Pilot Study: Rabbit Tracheal Resection With Graft Implantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019; 117: 175–178. doi: 10.1016/j.ijporl.2018.11.010. PMID: 30579077.
42. Пузаков КК, Матюшкина ОЛ, Капризова МВ, Карпов МЕ, Зуева АВ, Турапина АА и др. Влияние скаффолдов на основе поликапролактона на регенерацию гиалинового хряща при индуцированном повреждении. *Евразийское научное объединение*. 2018; 12-3 (46): 181–183. Puzakov KK, Matyushkina OL, Kaprizova MV, Karpov ME, Zuyeva AV, Turapina AA i dr. Vliyaniye skaffoldov na osnove polikaprolaktona na regeneratsiyu gialinovogo khryashcha pri indutsirovannom povrezhdenii. *Yevraziyskoye nauchnoye ob'yedineniye*. 2018; 12-3 (46): 181–183.
43. Li R, Chen KL, Wang Y, Liu YS, Zhou YS, Sun YC. Establishment of a 3D Printing System for Bone Tissue Engineering Scaffold Fabrication and the Evaluation of Its Controllability Over Macro and Micro Structure Precision. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2019; 51 (1): 115–119. doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2019.01.021. PMID: 30773555.
44. Narayanan LK, Huebner P, Fisher MB, Spang JT, Starly B, Shirwaiker RA. 3D-bioprinting of polylactic acid (PLA) nanofiber-alginate hydrogel bioink containing human adipose-derived stem cells. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016; 2 (10): 1732–1742.
45. Копелев ПВ, Нащечкина ЮА, Александрова СА. Оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах, предназначенных для тканевой инженерии хрящевой ткани. *Бюллетень инновационных технологий*. 2017; 1. 2 (2): 31–35. Kopelev PV, Nashchekina YuA, Aleksandrova SA. Otsenka zhiznesposobnosti khondrotsitov krolika pri kul'tivirovaniy na polilaktidnykh skaffoldakh, prednaznachennykh dlya tkanevoy inzhenerii khryashchevoy tkani. *Byulleten' innovatsionnykh tekhnologiy*. 2017; 1. 2 (2): 31–35.
46. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest*. 2018; 128 (1): 45–53. doi: 10.1172/JCI93557. PMID: 29293088.
47. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 97: 4–27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001. PMID 26562801.
48. Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface*. 2014; 11 (100): 20140817. doi: 10.1098/rsif.2014.0817. PMID 25232055.
49. López-Marcial GR, Zeng AY, Osuna C, Dennis J, García JM, O'Connell GD. Agarose-based hydrogels as suitable bioprinting materials for tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018; 4 (10): 3610–3616. doi: 10.1021/acsbomaterials.8b00903.
50. Amoabediny Gh, Salehi-Nik N, Heli B. The role of biodegradable engineered scaffold in tissue engineering. *Biomaterials Science and Engineering*. Ed. by Pignatello R. InTech; 2011; 153–172.
51. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*. 2012; 33: 3279–3305. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.007. PMID 22281421.
52. Axpe E, Oyen ML. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (12). doi: 10.3390/ijms17121976. PMID 27898010.
53. Wang X. Advanced Polymers for Three-Dimensional (3D) Organ Bioprinting. *Micromachines* (Basel). 2019; 10 (12): 814. doi: 10.3390/mi10120814.
54. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012; 37 (1): 106–126.
55. Bradić B, Bajec D, Pohar A, Novak U, Likozar B. A reaction-diffusion kinetic model for the heterogeneous N-deacetylation step in chitin material conversion to chitosan in catalytic alkaline solutions. *Reaction Chemistry & Engineering*. 2018; 6.
56. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015; 13 (3): 1133–1174. doi: 10.3390/md13031133. PMID 25738328.
57. Li S, Tian X, Fan J, Tong H, Ao Q, Wang X. Chitosans for Tissue Repair and Organ Three-Dimensional (3D) Bioprinting. *Micromachines* (Basel). 2019; 10 (11). doi: 10.3390/mi10110765.
58. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62 (1): 3–11. doi: 10.1016/j.addr.2009.09.004.
59. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*. 1997; 34: 21–28.
60. Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nurt Res*. 2005; 49: 93–135.
61. Khor E, Lm LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003; 24 (13): 2339–2349.
62. Sahariah P, Måsson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules*. 2017; 18: 3846–3868.
63. Chircov C, Grumezescu AM, Bejenaru LE. Hyaluronic Acid-Based Scaffolds for Tissue Engineering. *Rom J Morphol Embryol*. 2018; 59 (1): 71–76. PMID: 29940614.
64. Sze JH, Brownlie JC, Love CA. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*.

- 2016; 6 (1). doi: 10.1007/s13205-016-0379-9. PMID: 28330137.
65. Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, Sherman LS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016; 86: 917–919. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.032. PMID: 26893053.
 66. Poldervaart MT, Goversen B, de Ruijter M, Abdessa A, Ferry PWM, Öner FC et al. 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity. *PLoS One*. 2017; 12 (6): e0177628. doi: 10.1371/journal.pone.0177628. PMID: 28586346.
 67. Choi YJ, Yi HG, Kim SW, Cho DW. 3D Cell Printed Tissue Analogues: A New Platform for Theranostics. *Theranostics*. 2017; 7 (12): 3118–3137. doi: 10.7150/thno.19396. PMID: 28839468.
 68. Antich C, Vicente J, Jiménez G, Chocarro C, Carrillo E, Montañez E et al. Bio-inspired Hydrogel Composed of Hyaluronic Acid and Alginate as a Potential Bioink for 3D Bioprinting of Articular Cartilage Engineering Constructs. *Acta Biomater*. 2020. doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.046. PMID: 32027992.
 69. Dong C, Lv Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*. 2016; 8 (2): 42. doi: 10.3390/polym8020042. PMID: 30979136.
 70. Heo J, Koh RH, Shim W, Kim HD, Yim HG, Hwang NS. Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv Translational Res*. 2016; 6: 148–158. doi: 10.1007/s13346-015-0224-4. PMID: 25809935.
 71. Khoirunnisa DH, Rukmana TI. Isolation and characteristics of bovine skin gelatin and analysis of glycine, proline, and hydroxyproline by high-performance liquid chromatography-fluorescence. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2018; 10 (1): 269. doi: 10.22159/ijap.2018.v10s1.60.
 72. Setayeshmehr M, Esfandiari E, Rafieinia M, Hashemibeni B, Taheri-Kafrani A, Samadikuchaksaraei A et al. Hybrid and Composite Scaffolds Based on Extracellular Matrices for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019; 25 (3): 202–224. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0245. PMID: 30648478.
 73. Яценко АА, Кушнарев ВА, Леонов ДВ, Устинов ЕМ, Целуйко СС. Изучение морфологических и биодegradируемых свойств пористого скаффолда желатина для использования в тканевой инженерии легких. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2019; 72: 66–72. Yatsenko AA, Kushnarev VA, Leonov DV, Ustinov YeM, Tseluyko SS. Izucheniye morfologicheskikh i biodegradiruyemykh svoystv poristogo skaffolda zhelatina dlya ispol'zovaniya v tkanevoy inzhenerii legkikh. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2019; 72: 66–72.
 74. Melke J, Midha S, Ghosh S, Ito K, Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2016; 31: 1–16. doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.005. PMID 26360593.
 75. Meng Z, Zheng X, Tang K, Liu J, Qin S. Dissolution of natural polymers in ionic liquids: A review. *e-Polymers*. 2012; 12 (1). doi: 10.1515/epoly.2012.12.1.317.
 76. Kim SH, Yeon YK, Lee JM, Chao JR, Lee YJ, Seo YB et al. Publisher Correction: Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 2350. doi: 10.1038/s41467-018-04517-w. PMID: 29891952.
 77. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci*. 2009; 10 (4): 1514–1524. doi: 10.3390/ijms10041514. PMID: 19468322.
 78. Correia C, Bhumiratana S, Yan LP, Oliveira AL, Gimble JM, Rockwood D et al. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater*. 2012; 8 (7): 2483–2492.
 79. Багров ДВ, Жуйков ВА, Чудинова ЮВ, Ярышева АЮ, Котлярова МС, Архипова АЮ и др. Механические свойства пленок и трехмерных матриксов из фиброина шелка и желатина. *Биофизика*. 2017; 62 (1): 23–30. Bagrov DV, Zhuykov VA, Chudinova Yu V, Yarysheva AYU, Kotlyarova MS, Arkhipova AYU i dr. Mekhanicheskiye svoystva plenok i trekhmernykh matriksov iz fibroina shelka i zhelatina. *Biofizika*. 2017; 62 (1): 23–30.
 80. Басок ЮБ, Кириллова АД, Григорьев АМ, Курсанова АД, Немец ЕА, Севастьянов ВИ. Получение микродисперсного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса из суставного хряща свиньи. *Перспективные материалы*. 2020; 5: 51–60. Vasok YuB, Kirillova AD, Grigor'yev AM, Kirsanova AD, Nemets YeA, Sevast'yanov VI. Polucheniye mikrodispersnogo tkanespetsificheskogo detsellyulyarizovannogo matriksa iz sustavnogo khryashcha svin'i. *Perspektivnyye materialy*. 2020; 5: 51–60.
 81. Немец ЕА, Лажко АЭ, Басок ЮБ, Курсанова ЛА, Кириллова АД, Севастьянов ВИ. Особенности получения тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи. Сверхкритические флюиды. *Теория и практика*. 2020; 15 (2): 3–13. Nemets EA, Lazhko AE, Basok Yu B., Kirsanova LA, Kirillova AD, Sevast'yanov VI. Osobennosti polucheniya tkanespetsificheskogo matriksa iz detsellyulyarizovannogo khryashcha svin'i. Sverkhkriticheskiye flyuidy. *Teoriya i praktika*. 2020; 15 (2): 3–13.
 82. Pati F, Ha DH, Jang J, Han HH, Rhie JW, Cho DW. Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration. *Biomaterials*. 2015; 62: 164–175. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.043.
 83. Kaye R, Goldstein T, Grande DA, Zeltsman D, Smith LP. A 3-dimensional bioprinted tracheal segment implant pilot study: rabbit tracheal resection with graft implantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019; 117: 175–178. doi: 10.1016/j.ijporl.2018.11.010. PMID: 30579077.
 84. Joo YS, Cha JR, Gong MS. Biodegradable shape-memory polymers using polycaprolactone and isosorbide based polyurethane blends. *Mat Sci Eng*. 2018; 91: 426–435. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.063.

85. *Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N.* PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 2017; 29 (7–9): 863–893. doi: 10.1080/09205063.2017.1394711. PMID: 29053081.
86. *Li X, Cui R, Sun L, Aifantis KE, Fan Y, Feng Q et al.* 3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application. *International Journal of Polymer Science.* 2014; 2014: 1–13. doi: 10.1155/2014/829145.
87. *Shim JH, Jang KM, Hahn SK, Park JY, Jung H, Oh K et al.* Three-dimensional bioprinting of multilayered constructs containing human mesenchymal stromal cells for osteochondral tissue regeneration in the rabbit knee joint. *Biofabrication.* 2016; 8 (1): 014102. doi: 10.1088/1758-5090/8/1/014102. PMID: 26844597.
88. *Griffith LG.* Polymeric biomaterials. *Acta Materialia.* 2000; 48 (1): 263–277. doi: 10.1016/s1359-6454(99)00299-2.
89. *Farah S, Anderson DG, Langer R.* Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications – A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016; 107: 367–392. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.012. PMID: 27356150.
90. *Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M.* Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials (Basel).* 2015; 8 (9): 5744–5794. doi: 10.3390/ma8095273. PMID: 28793533.
91. *Mir M, Ahmed N, Rehman A.* Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017; 159: 217–231. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.038. PMID: 28797972.
92. *Casalini T, Rossi F, Castrovinci A, Perale G.* A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 259. doi: 10.3389/fbioe.2019.00259. PMID: 31681741.
93. *Rezvantalab S, Keshavarz Moraveji M.* Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems. *RSC Advances.* 2019; 9 (4): 2055–2072. doi: 10.1039/c8ra08972h.
94. *Hu X, Man Y, Li W, Li L, Xu J, Parungao R et al.* 3D Bio-Printing of CS/Gel/HA/Gr Hybrid Osteochondral Scaffolds. *Polymers (Basel).* 2019; 11 (10). doi: 10.3390/polym11101601. PMID: 31574999.
95. *Ávila HM, Schwarzc S, Rotter N, Gatenholma P.* 3D bioprinting of human chondrocyte-laden nanocellulose hydrogels for patient-specific auricular cartilage regeneration. *Bioprinting.* 2016; 1–2: 22–35. doi: 10.1016/j.bprint.2016.08.003.
96. *Law N, Doney B, Glover H, Qin Y, Aman ZM, Sercombe TB et al.* Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2018; 77: 389–399. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.09.031. PMID: 29017117.
97. *Sayyar S, Gambhir S, Chung J, Officer DL, Wallace GG.* 3D printable conducting hydrogels containing chemically converted graphene. *Nanoscale.* 2017; 9 (5): 2038–2050. doi: 10.1039/c6nr07516a. PMID: 28112762.
98. *Xavier JR, Thakur T, Desai P, Jaiswal MK, Sears N, Cosgriff-Hernandez E et al.* Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS Nano.* 2015; 9 (3): 3109–3118. doi: 10.1021/nn507488s. PMID: 25674809.
99. *Müller M, Öztürk E, Arlov Ø, Gatenholm P, Zenobi-Wong M.* Alginate Sulfate–Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications. *Ann Biomed Eng.* 2016; 45: 210–223. doi: 10.1007/s10439-016-1704-5. PMID: 27503606.
100. *Gao M, Zhang H, Dong W, Bai J, Gao B, Xia D et al.* Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair. *Scientific Reports.* 2017; 7.
101. *Fitzsimmons R, Aquilino MS, Quigley J, Chebotarev O, Tarlan F, Simmons CA.* Generating vascular channels within hydrogel constructs using an economical open-source 3D bioprinter and thermoreversible gels. *Bioprinting.* 2018; 9: 7–18. doi: 10.1016/j.bprint.2018.02.001.
102. *Li S, Liu YY, Liu LJ, Hu QX.* A Versatile Method for Fabricating Tissue Engineering Scaffolds with a Three-Dimensional Channel for Prevasculature Networks. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8 (38): 25096–25103. doi: 10.1021/acsami.6b07725.
103. *Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA.* 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater.* 2014; 26 (19): 3124–3130. doi: 10.1002/adma.201305506. PMID: 24550124.
104. *Ortega I, Dew L, Kelly AG, Chong CK, MacNeil S, Claeysens F.* Fabrication of biodegradable synthetic perfusable vascular networks via a combination of electrospinning and robocasting. *Biomater Sci.* 2015; 3 (4): 592–596. doi: 10.1039/c4bm00418c.
105. *Lee VK, Lanzi AM, Haygan N, Yoo SS, Vincent PA, Dai G.* Generation of Multi-Scale Vascular Network System within 3D Hydrogel using 3D Bio-Printing Technology. *Cell Mol Bioeng.* 2014; 7 (3): 460–472. doi: 10.1007/s12195-014-0340-0. PMID: 25484989.
106. *Fan C, Wang DA.* Effects of Permeability and Living Space on Cell Fate and Neo-Tissue Development in Hydrogel-Based Scaffolds: A Study With Cartilaginous Model. *Macromol Biosci.* 2015; 15 (4): 535–545. doi: 10.1002/mabi.201400453. PMID: 25557976.
107. *Leong W, Kremer A, Wang DA.* Development of size-customized hepatocarcinoma spheroids as a potential drug testing platform using a sacrificial gelatin microsphere system. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 63: 644–649. doi: 10.1016/j.msec.2016.03.046. PMID: 27040260.
108. *Sung KE, Su G, Pehlke C, Trier SM, Eliceiri KW, Keeley PJ et al.* Control of 3-dimensional Collagen Matrix Polymerization for Reproducible Human Mammary Fibroblast Cell Culture in Microfluidic Devices. *Biomaterials.* 2009; 30 (27): 4833–4841. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.043. PMID: 19540580.

109. Doyle AD. Generation of 3D Collagen Gels With Controlled Diverse Architectures. *Curr Protoc Cell Biol.* 2016; 72. doi: 10.1002/cpcb.9. PMID: 27580704.
110. Naciri M, Kuystermans D, Al-Rubeai M. Monitoring pH and Dissolved Oxygen in Mammalian Cell Culture Using Optical Sensors. *Cytotechnology.* 2008; 57 (3): 245–250. doi: 10.1007/s10616-008-9160-1. PMID: 19003181.
111. Kim YB, Lee H, Kim GH. Strategy to achieve highly porous/biocompatible macroscale cell blocks, using a collagen/genipin-bioink and an optimal 3D printing. *Process ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8 (47): 32230–40. doi: 10.1021/acsami.6b11669. PMID: 27933843.
112. Yeo MG, Kim GH. A cell-printing approach for obtaining hASC-laden scaffolds by using a collagen/polyphenol bioink. *Biofabrication.* 2017; 9 (2): 025004. doi: 10.1088/1758-5090/aa6997. PMID: 28402968.
113. Dimida S, Barca A, Cancelli N, De Benedictis V, Raucici MG, Demitri C. Effects of Genipin Concentration on Cross-Linked Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Structural Characterization and Evidence of Biocompatibility Features. *International Journal of Polymer Science.* 2017; 2017. doi: 10.1155/2017/8410750.
114. Drzewiecki KE, Malavade JN, Ahmed I, Lowe CJ, Shreiber DI. A thermoreversible, photocrosslinkable collagen bio-ink for free-form fabrication of scaffolds for regenerative medicine. *Technology (Singap World Sci).* 2017; 5 (4): 185–195. doi: 10.1142/S2339547817500091. PMID: 29541655.
115. Parak A, Pradeep P, du Toit L, Kumar P, Choonara Y, Pillay V. Functionalizing bioinks for 3D bioprinting applications. *Drug Discov Today.* 2019; 24 (1): 198–205. doi: 10.1016/j.drudis.2018.09.012.
116. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003; 24 (24): 4385–4415. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00343-0.
117. Diamantides N, Wang L, Pruiksma T, Siemiatkoski J, Dugopolski C, Shortkroff S et al. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication.* 2017; 9 (3): 034102. doi: 10.1088/1758-5090/aa780f. PMID: 28677597.
118. Batchelor R, Kwandou G, Spicer P, Stenzel M. Riboflavin (vitamin B2) and flavin mononucleotide as visible light photo initiators in the thiol–ene polymerisation of PEG-based hydrogels. *Polym Chem.* 2017; 8 (6): 980–984. doi: 10.1039/c6py02034h.
119. Das S, Pati F, Choi YJ, Rijal G, Shim JH, Kim SW et al. Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. *Acta Biomater.* 2015; 11: 233–246. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.023. PMID: 25242654.
120. Skardal A, Devarasetty M, Kang HW, Mead I, Bishop C, Shupe T et al. A Hydrogel Bioink Toolkit for Mimicking Native Tissue Biochemical and Mechanical Properties in Bioprinted Tissue Constructs. *Acta Biomater.* 2015; 25: 24–34. doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.030. PMID: 26210285.
121. Cellink.com [Internet]. CELLINK series [updated 2020 March 18; cited 2020 March 18]. Available from: <http://cellink.com/global/bioinks/cellink-series/>.
122. Advanced BioMatrix [Internet]. Innovative 3D Matrices for Breakthrough Research. [updated 2020 March 18; cited 2020 March 18]. Available from: <https://advanced-biomatrix.com/>.
123. Biogelx [Internet]. BIOMIMETIC PEPTIDE BIOINKS [updated 2020 February 28; cited 2020 February 28]. Available from: <https://www.biogelx.com/3d-bioprinting-organs-2/>.
124. ISTO Technologies Inc [Internet]. RevaFlex™ Regenerative Cartilage Technology. [updated 2020 April 5; cited 2020 April 5]. Available from: <http://istotechnologiesinc.com/revaflex>.
125. Aesculap Biologics LLC [Internet]. NOVOCART 3D. [updated 2020 April 5; cited 2020 April 5]. Available from: <https://www.aesculapbiologics.com/en/patients/novocart-3d.html>.
126. MACI [Internet]. MACI® (autologous cultured chondrocytes on porcine collagen membrane). [updated 2020 April 5; cited 2020 April 5]. Available from: <https://www.maci.com/patients>.

Статья поступила в редакцию 9.09.2020 г.
The article was submitted to the journal on 9.09.2020