



ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК ЖУРНАЛА,
ПОСВЯЩЕННЫЙ
АДДИТИВНОМУ ПРОИЗВОДСТВУ,
ТОМОГРАФИИ И КОНТРОЛЮ ИЗДЕЛИЙ

№ 3 / 2021

НКД

НЕРАЗРУШАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ И ДИАГНОСТИКА

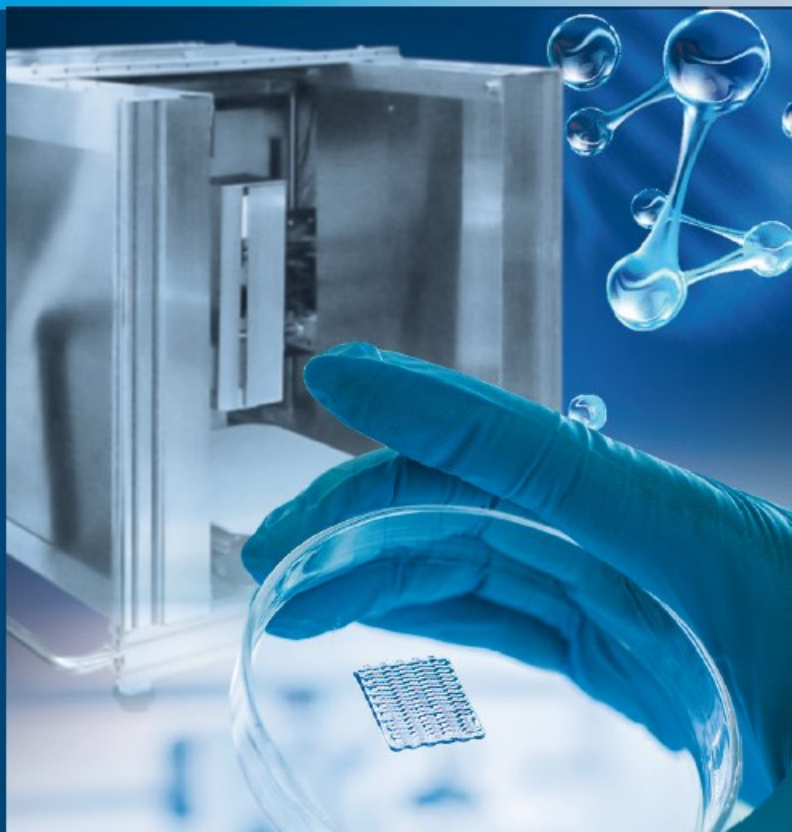
В НОМЕРЕ:

Проектирование мехатронных комплексов оборудования для аддитивного производства крупногабаритных изделий

Циклическая прочность стальных образцов, изготовленных методом селективного лазерного спекания

Динамическое индентирование для оценки качества изделий из полимерных композиционных материалов, полученных по экструзионной FDM-технологии

Биопринтинг создания конструкций с использованием живых клеток в аддитивных технологиях



Биопринтинг для создания конструкций с использованием живых клеток в аддитивных технологиях

УДК 57.086.83

Канд. биол. наук. Денисов А.А.
(Белорусский государственный университет,
Институт физиологии НАН Беларуси, Минск)

Д-р. мед. наук, проф. Губкин С.В.
(Институт физиологии НАН Беларуси, Минск)

Введение

Создание и развитие научных методов и технологий сопровождается их трансфером в биомедицинскую область и появлением принципиально новых подходов к терапии заболеваний. К современным примерам можно отнести появление и повсеместное распространение аддитивных технологий 3D-печати, которое стало возможным благодаря достижениям в области микроэлектроники и точной механики. В экспериментальной биологии и медицине аддитивные технологии создали основу для разработки методов биопринтинга, или биопечати. В литературе встречаются различные определения термина «биопринтинг». В более широком смысле он включает различные применения, связанные с 3D-печатью материалов, применяемых в биологических или медицинских приложениях – печать скаффолдов (поддерживающих конструкций) для клеточного культивирования, ортопедических имплантов и т.д. В более строгом смысле процесс биопринтинга подразумевает печать материала, содержащего живые клетки. В последнем случае для печати необходимо использование специализированного устройства – биопринтера, который обеспечивает условия, необходимые для поддержания жизнеспособности клеток во время печати [1]. При помощи биопринтера из клеточной суспензии формируется структура по заданному алгоритму, при этом могут одновременно использоваться различные типы клеток. Благодаря прогрессу в области исследования стволовых клеток становится возможным создание биоинженерных тканей, когда гетерогенные клеточные структуры создаются на основе комбинации аддитивных методов и технологий направленной дифференцировки стволовых клеток.

Идея позиционирования клеток под управлением компьютера возникла довольно давно: в 1988 году был продемонстрирован метод печати клетками при помощи коммерческого струйного принтера [2]. С тех пор для целей 3D-

биопечати были адаптированы самые различные методы 3D-печати, которые позволяли сохранить жизнеспособность клеток [3].

Среди технологий 3D-печати наиболее распространенные основаны на послойном наплавлении FDM (Fused Deposition Modeling), когда пластик плавится и слоями наносится при помощи экструдера. В области биопечати этот подход адаптирован в виде шприцевой экструзии – материал находится в шприце в виде геля на водной основе (гидрогеля) и подается поршнем, пневматической системой, клапаном или шнеком. Гелевая консистенция материала на водной основе позволяет загружать его клетками и наносить в физиологическом диапазоне температур, сохраняя их жизнеспособность.

Методы струйной печати позволяют наносить клетки с высокой скоростью и точностью, но «биочернила» с клетками в данном случае обладают низкой вязкостью и поэтому для создания объемных конструкций необходимо применение дополнительных методов их фиксации после печати.

Наиболее высокой точностью обладают оптические методы печати. При использовании метода стереолитографии SLA (Stereolithography) применяется фотополимеризуемый гидрогель. Недостатком этого подхода является необходимость использования инициаторов фотополимеризации, которые часто проявляют токсическое действие по отношению к клеткам. Поиск новых типов биосовместимых инициаторов фотополимеризации является актуальнейшей задачей для развития этой технологии.

Метод лазерного трансфера относят к наиболее высокоточным, вплоть до позиционирования одиночных клеток. В данном случае клетки размещают на мембране, лазерный импульс вызывает локальный нагрев, деформацию и перенос клеток на подложку. Недостатком метода является необходимость использования сложного оборудования.

Для достижения требуемых результатов при биопечати важнейшим вопросом является оптимальный выбор клеток и композиции гидрогеля. В качестве основы для гидрогелей используется большое число природных и синтетических соединений, моделирующих внеклеточное окружение в ткани. К наиболее распространенным из них относятся альгинат, хитозан, желатин, коллаген, гиалауриновая кислота, полиэтиленгликоль [4].

В области биопринтинга наибольший интерес проявляется к печати стволовыми клеткам, которые способны под влиянием различных факторов дифференцироваться и формировать различные типы тканей [5]. При соответствующем подборе факторов возможно индуцирование процессов самоорганизации дифференцирующихся стволовых клеток в органоид, гетерогенную структуру с определенными свойствами органа [6].

Сейчас на рынке представлено большое число моделей биоприпринтеров различных компаний стоимостью от нескольких тысяч до нескольких сотен тысяч долларов США, среди которых можно отметить несколько производителей с наиболее функциональными моделями.

Первый коммерческий биоприпринтер был выпущен компанией EnvisionTec (Германия) в 2000 году под названием «3D-Bioplotter» и поставляется под этой маркой и в настоящее время. Для данного устройства указана точность

позиционирования 1 мкм, но это скорее маркетинговый прием, поскольку реальная точность размещения клетки размером порядка 10 мкм определяется минимальным диаметром экструдера, составляющим 100 мкм.

Компания REGENHU (Швейцария) предлагает настольную модель R-GEN 100 и станцию с интегрированным ламинарным шкафом R-GEN 200. Устройства оснащены шприцевыми и пневматическими диспенсерами, а также позволяют изготавливать нано- и микроволокна методом электроспиннинга. Возможности данного оборудования позволяют производить печать различными полимерными материалами для изготовления скаффолдов и вспомогательных узлов, и также осуществлять печать гидрогелями, загруженными клетками.

Компания Poietis (Франция) предлагает исследовательскую модель NGB-R и модель NGB-C для клинических приложений. Модели оснащены шприцевыми и капельными диспенсерами, а также роботизированной системой манипуляции клеточными планшетами. Особенность устройств – возможность лазерной печати клетками, когда формирование капли происходит за счет локального нагрева подложки лазерным импульсом. По заявлению компании, за счет этого достигается возможность печати одиночными клетками с высоким разрешением для высокой воспроизводимости результатов. Poietis также предлагает методику печати фрагментов кожи клетками фибробластов человека для разработки соответствующих клинических применений, занимается разработкой биопечатаемого патча для терапии повреждений миокарда. Компания продвигает свои разработки как технологии 4D биопринтинга, основывающиеся на программировании самоорганизации ткани путем создания структурных составляющих (клеток и внеклеточного матрикса), развивающихся контролируемым образом путем, например, создания градиентов факторов роста до тех пор, пока не появятся определенные биологические функции. Стоит отметить, что южнокорейская компания Rokit Healthcare также предлагает свое устройство Dr Invivo 4D как специализированный 4D-биопринтер, обосновывая это тем, что биологическая ткань после печати развивается и изменяется во времени (четвертое измерение). Но в данном случае это скорее маркетинговый прием, поскольку эта компания не предлагает специальных методов управления развитием напечатанного материала в заданном направлении.

Особенностью модели BioAssemblyBot компании Advanced Solutions (США) является наличие роботизированного манипулятора, обеспечивающего движение диспенсера с шестью степенями свободы. Это позволяет производить печать непосредственно на объектах сложной формы, отрабатывать методы биопечати на поверхности органов или конечностей.

Компания Cellink (Швеция) предлагает широкую линейку биопринтеров с различными методами печати. Модели INKREDIBLE, BIO X и BIO MDX обладают возможностями пневматической микроэкструзионной печати клетками и сфероидами с различной точностью и различным числом экструдеров. В модели LUMEN X+ используется метод оптической стереолитографии для печати фотополимеризуемыми гидрогелями, в том

числе, загруженными клетками. В модели HOLOGRAPH X+ используется передовой метод многофотонной лазерной стереолитографии, когда полимеризация материала происходит только в областях со сформированной высокой плотностью светового потока. За счет этого достигается возможность печати без механического перемещения материала (в отличие от обычной стереолитографии) и соответствующее увеличение скорости и точности.

Для широкого внедрения методов биопринтинга в прикладные медицинские области необходимо совершенствование существующих методов построения гетерогенных структур с клеточными компонентами и формирования трехмерных скаффолдов и исследование характеристик создаваемых тканеинженерных конструкций с целью приближения их свойств к функциональности биологических органов.

В лаборатории клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета совместно с лабораторией нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси ведутся исследования механизмов функционирования мозга с применением фрагментов нервной ткани лабораторных животных, разрабатываются методы создания модельных систем с применением культивируемых *in vitro* клеток нервной ткани. Такие модельные системы широко применяются при проведении исследований механизмов работы мозга, позволяя воссоздавать процессы функционирования нервных клеток и тканей в детально контролируемых условиях, что дает возможности для исследования биофизических механизмов работы биологических нейронных сетей, моделирования различных нейрофизиологических явлений и разработки терапевтических методов коррекции патологических состояний.

В настоящее время этот подход приобретает новые возможности благодаря интеграции методов клеточного культивирования и аддитивных технологий 3D-биопечати. Методы биопринтинга позволяют создавать упорядоченные клеточные паттерны не только на плоскости, но и в трехмерном пространстве, что важно для исследования функционирования биоинженерных нейронных сетей с топологией, соответствующей условиям *in vivo*. В связи с этим, нами разработан и апробирован ряд методов и устройств для проведения исследований с клеточными культурами и тканями с применением методов биопринтинга.

Биопринтер и формирование трехмерных клеточных паттернов

В целях реализации методик биофизических и нейрофизиологических исследований, связанных с манипуляцией клетками в трехмерном пространстве, применением методов биопечати для выполнения экспериментальной работы по культивированию клеток разработан биопринтер, представленный на рисунке 1.

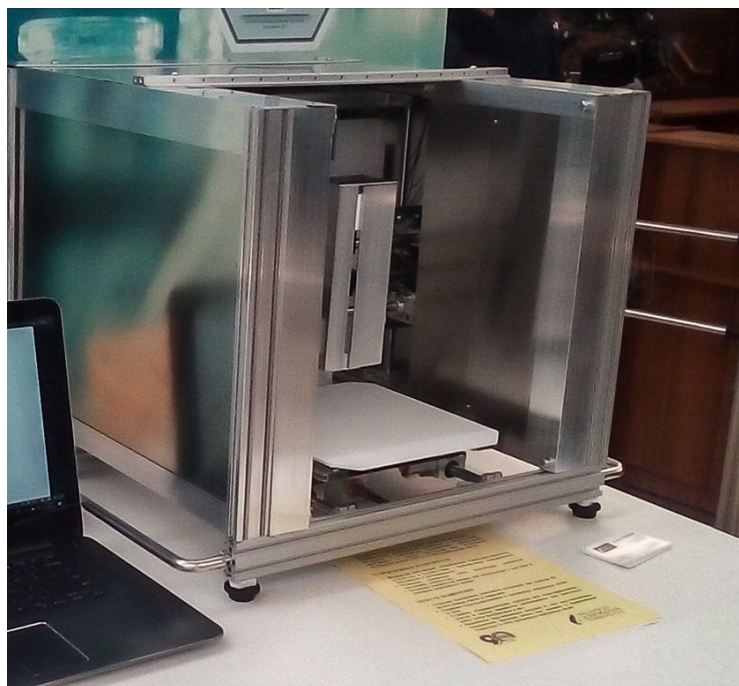


Рисунок 1 – Разработанный биопринтер

Особенностью разработки являются модульная конструкция, позволяющая переконфигурировать устройство в соответствии с требованиями определенных приложений и экспериментов. Предусмотрена установлена стерильной камеры для манипуляций с клетками в условиях чистой комнаты. Основным назначением является создание трехмерных клеточных популяций при помощи 3D-печати клеток в гидрогеле, создание структурированных и трехмерных клеточных популяций *in vitro*, формирование поддерживающих структур для культивирования клеток.

Разработанная установка основана на системе трехмерного позиционирования печатающего узла под управлением микрокомпьютера. Подача гидрогеля осуществляется при помощи шприцевого экструдера. Узел экструдера оснащен системой датчиков, позволяющих производить автоматическое позиционирование экструдера в требуемой области. Для печати гидрогель с клетками загружается в шприц, дозатор позиционируется у дна чашки Петри и происходит процесс формирования заданного паттерна в соответствии с программой (рисунок 2). Особенностью разработанного программного обеспечения является возможность печати как на основе стандартного STL-файла трехмерной модели, так и полностью алгоритмическое формирование пути печатающего узла и скорости подачи материала для отработки методик печати гидрогелем. Разработаны алгоритмы дозирования, учитывающие инерционность подачи гидрогеля при малом диаметре дозатора с учетом особенностей формируемого паттерна и стадии печати.

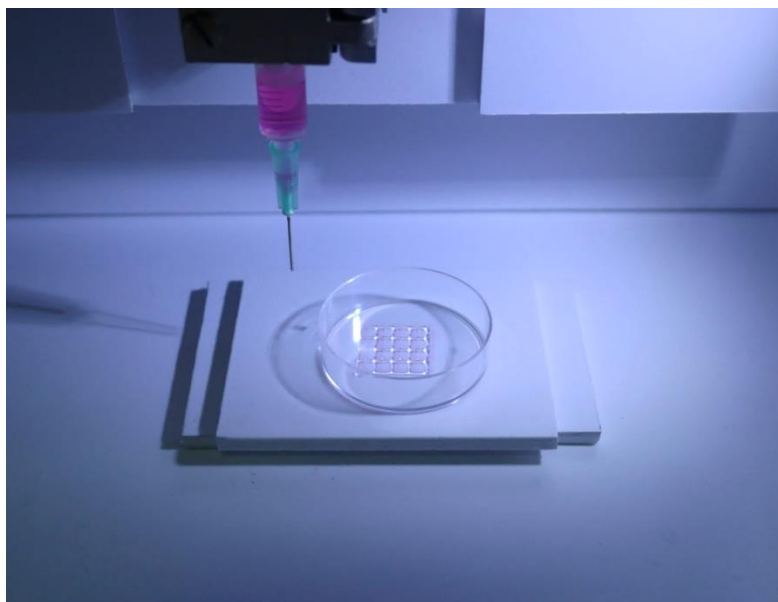


Рисунок 2 – Печатающий узел и чашка Петри с напечатанным гидрогелевым паттерном, установленная в стерильной камере биопринтера

С применением разработанного устройства отработана методика формирования трехмерных гидрогелевых структур, как показано на рисунке 3. При соответствующем подборе скорости подачи материала, скорости движения экструдера, вязкости гидрогеля и температуры происходит послойное формирование трехмерного образца, который сохраняет свою форму после завершения процесса печати.

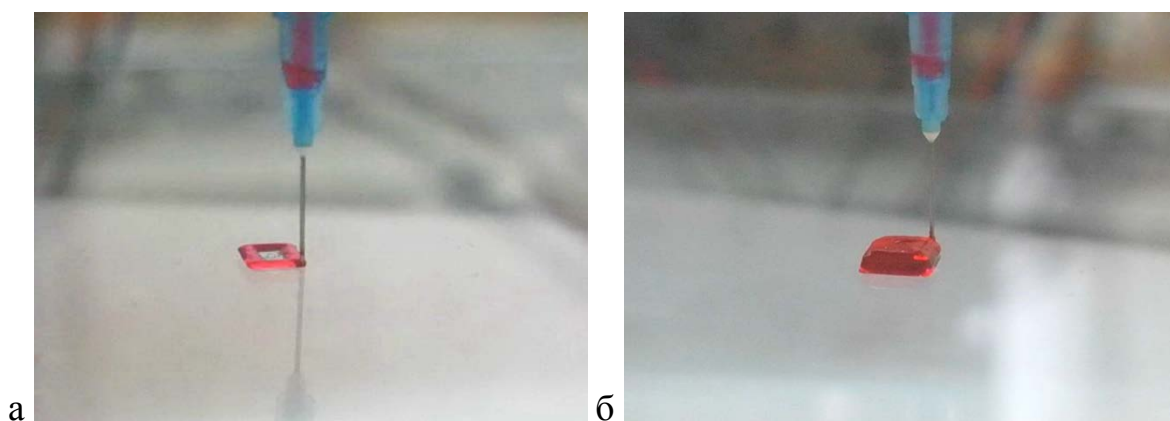


Рисунок 3 – Гидрогель на подложке в начале процесса печати (а) и сформированная трехмерная гидрогелиевая структура (б).

Также разработана методика формирования более сложных трехмерных гидрогелевых паттернов для создания упорядоченных клеточных кластеров

методами биопринтинга, как показано на рисунке 4. Формирование паттерна в виде полусфер дает возможность создания упорядоченных пулов клеток контролируемого размера. Такой подход может использоваться для исследования скорости роста, пролиферации клеточных популяций. Печать паттерна в виде решетки может применяться при отработке методов культивирования нейронных сетей *in vitro* с упорядоченной топологией. Кроме того, формирование конструкций в виде различного вида решеток используется при отработке методов создания биоинженерных тканей, поскольку решетчатая структура облегчает поступление кислорода и питательных веществ к клеткам в условиях отсутствия сосудистой системы.

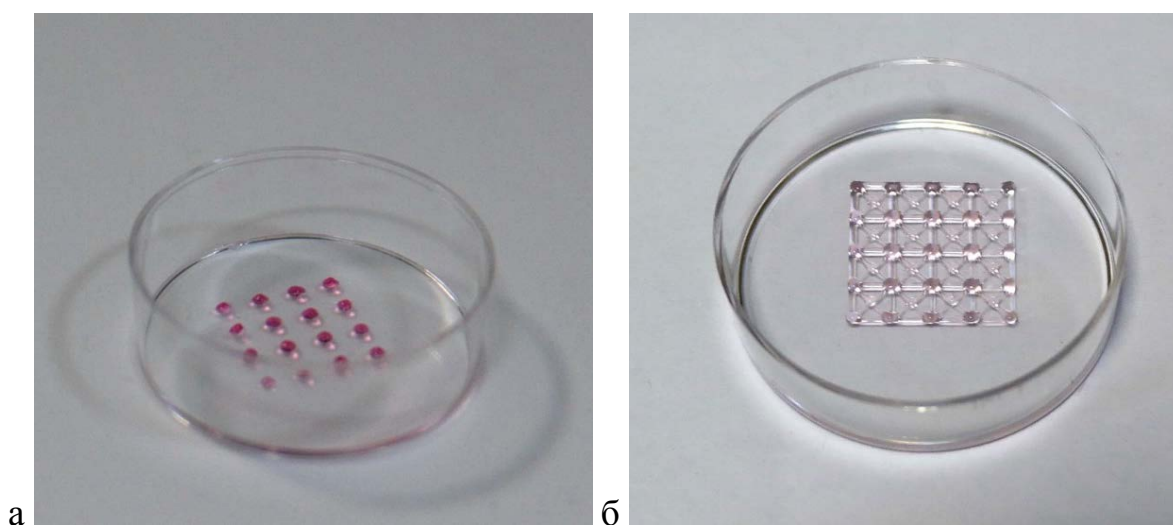


Рисунок 4 – Гидрогелевый паттерн в виде полусфер на подложке (а) и формирование паттерна в виде решетки (б).

Разработанные методики формирования гидрогелевых паттернов использовались для отработки методов биопечати с применением клеток глиомы крысы С6 – клеточной линии, широко используемой при моделировании опухолевых процессов в мозге. Гидрогель готовили на основе желатин-альгинатного состава с концентрацией альгината 0,5% и концентрацией желатина 4%.

На рисунке 5 приведены изображения клеток при стандартном культивировании в чашке Петри и в гидрогеле после 72 часов культивирования.

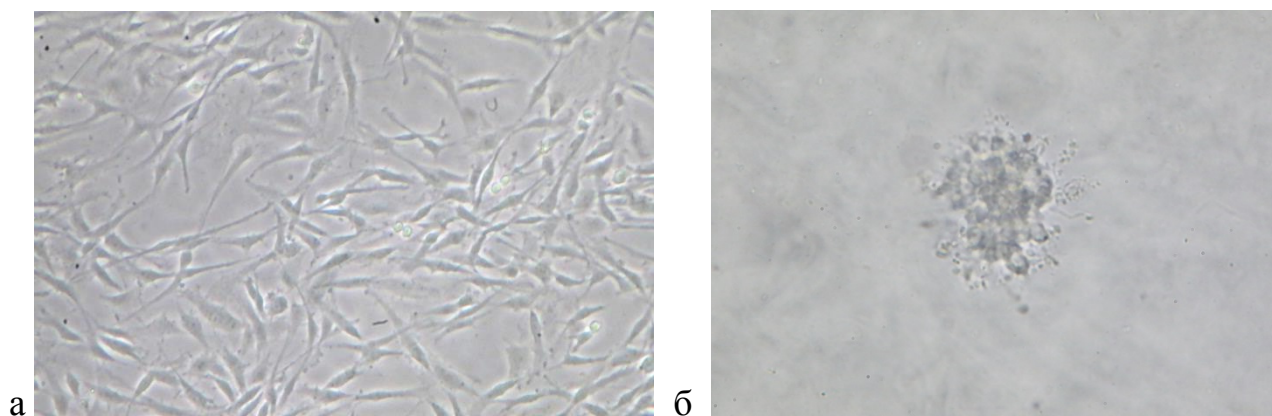


Рисунок 5 – Клетки глиомы С6 при культивировании на дне чашки Петри (а) и в гидрогеле (б)

При росте на плоской поверхности преимущественно формируются характерные вытянутые клетки с двумя отростками. При развитии в трехмерном пространстве культура обладает существенно иной морфологией – в гидрогеле формируются плотные кластеры клеток с тонкими отростками.

Представленная трехмерная кластерная морфология создает существенно отличающиеся условия функционирования клеток, чем в случае культивирования на плоскости. Распластанная на дне клетка имеет высокую площадь соприкосновения с внеклеточным раствором, поэтому любые изменения состава раствора имеют непосредственное влияние на нее. Вырабатываемые клетками факторы так же сразу распределяются по объему внеклеточного раствора. В трехмерном же кластере внутренние слои клеток отделены от внеклеточного пространства внешними слоями и обладают большей «автономностью» – внутри кластера будет выше концентрация вырабатываемых факторов и ниже концентрация веществ, поступающих во внеклеточный раствор.

Данный подход апробирован также при культивировании нейронов коры мозга крысы на поверхности планарного микроэлектродного массива. Культивируемые диссоциированные нейроны, образующие связи *in vitro* на поверхности микроэлектродного датчика, являются распространенной системой для изучения развития и функционирования нервной ткани. В настоящее время разрабатываются методы трехмерного культивирования

нейронов на микроэлектродных сенсорах для создания пространственной нейронной сети с целью улучшения ее функциональных свойств [7].

На рисунке 6 показаны нейроны, культивируемые на планарном микроэлектродном сенсоре в коллагеновом гидрогеле. Сенсор состоит из стеклянной подложки с прозрачными электродами из оксида индий-олово и полимерной полидиметилсилоксановой изоляцией, рабочая область микроэлектрода дополнительно содержит непрозрачное полимерное электропроводящее покрытие на основе полиэтилендиоксифена, снижающее импеданс. Как следует из представленных данных, нейроны образуют отростки не только на поверхности сенсора, но и в объеме гидрогеля, создавая основу для трехмерной нейронной сети.

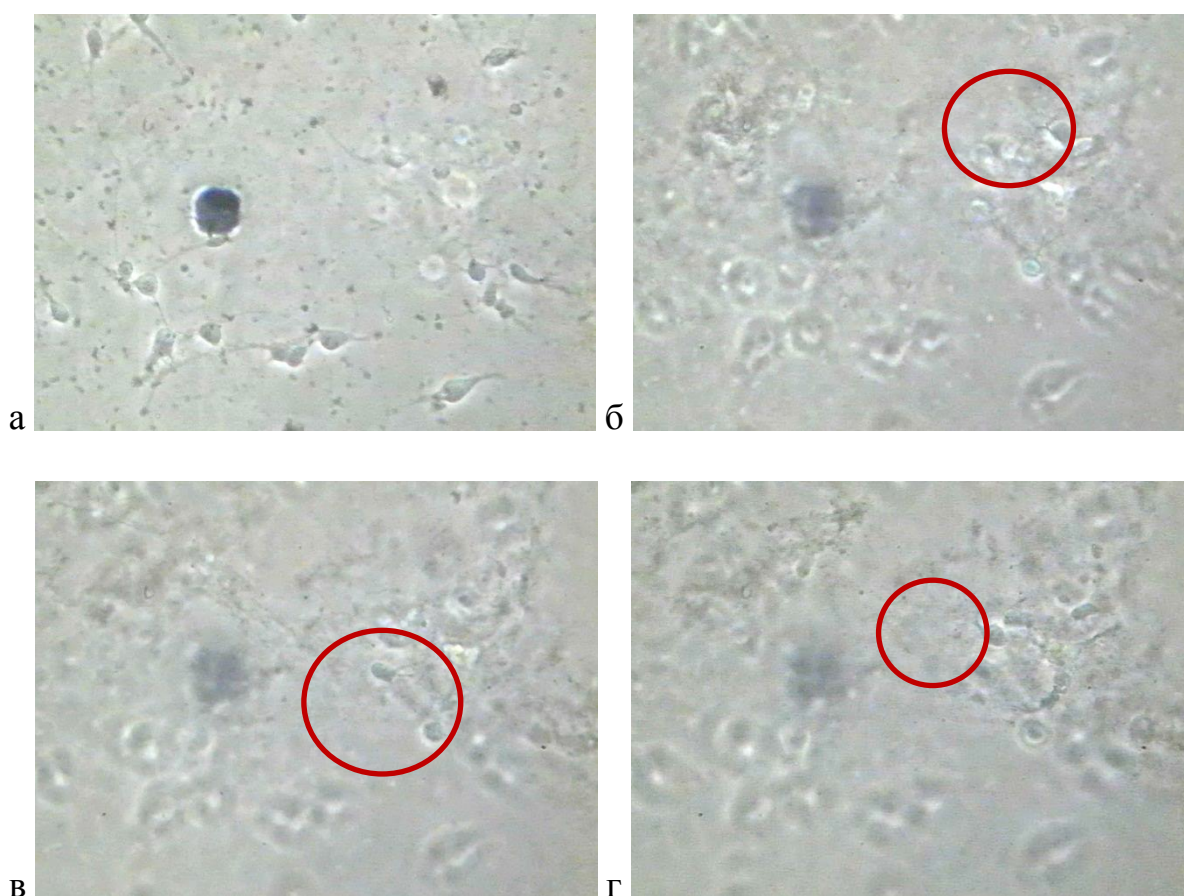


Рисунок 6 – Нейроны при культивировании на планарном сенсоре с применением коллагенового гидрогеля – на поверхности (а) и при увеличении высоты фокусировки (б, в, г). Темная область – микроэлектрод, красным цветом отмечены нейроны с отростками

Таким образом, разработанные методики позволяет создавать условия для культуры клеток, более соответствующие условиям *in vivo*, чем традиционные подходы по культивированию на плоскости. В зависимости от требований эксперимента, состав гидрогеля можно варьировать, изменяя как его механические свойства, так и биохимический состав

Применение методов 3D-печати при создании условий функционирования нервной ткани *in vitro*

При выполнении задания ГНТП «Эталоны и научные приборы» нами разработан научно-учебный комплекс для исследования синаптических и нейросетевых механизмов когнитивных процессов, который позволяет с применением методик микроэлектродной стимуляции и регистрации электрической активности нейронов исследовать базовые биофизические и нейрофизиологические явления, ответственные за процессы обучения и памяти, тестировать действие разрабатываемых фармакологических препаратов в контролируемых условиях с использованием фрагментов мозга крысы *in vitro*.

При разработке комплекса стояла задача создания условий для жизнедеятельности клеток мозга вне организма, для чего были разработаны и изготовлены преинкубатор и проточная регистрационная камера с применением методов 3D-печати.

При выполнении экспериментов со срезами головного мозга лабораторных животных необходимо обеспечить сохранение функциональных свойств нервных клеток в препаратах на весь период проведения экспериментальной работы (около восьми часов). Для этого был изготовлен преинкубатор, предназначенный для поддержания жизнеспособности срезов нервной ткани перед проведением экспериментов путем их размещения в циркулирующем оксигенированном растворе искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦСЖ). Преинкубатор состоит из изготовленной методом FDM циркуляционной камеры с отсеком для расположения препаратов нервной ткани, как представлено на рисунке 7. Камера изготовлена из биосовместимого пластика (полилактид).

При помощи блока оксигенации осуществляется подача газовой смеси кислорода и диоксида углерода через регулятор скорости потока газа в вертикальный отсек циркуляционной камеры в виде мелких пузырьков, благодаря всплытию которых вверх раствор приводится в движение с одновременным насыщением его кислородом. Срезы размещаются в цилиндрической вставке, к дну которой приклеена нейлоновая сетка. Движение омывающего раствора прижимает срезы к сетке, за счет чего обеспечивается фиксация срезов с постоянным поступлением насыщенной кислородом ИЦСЖ.

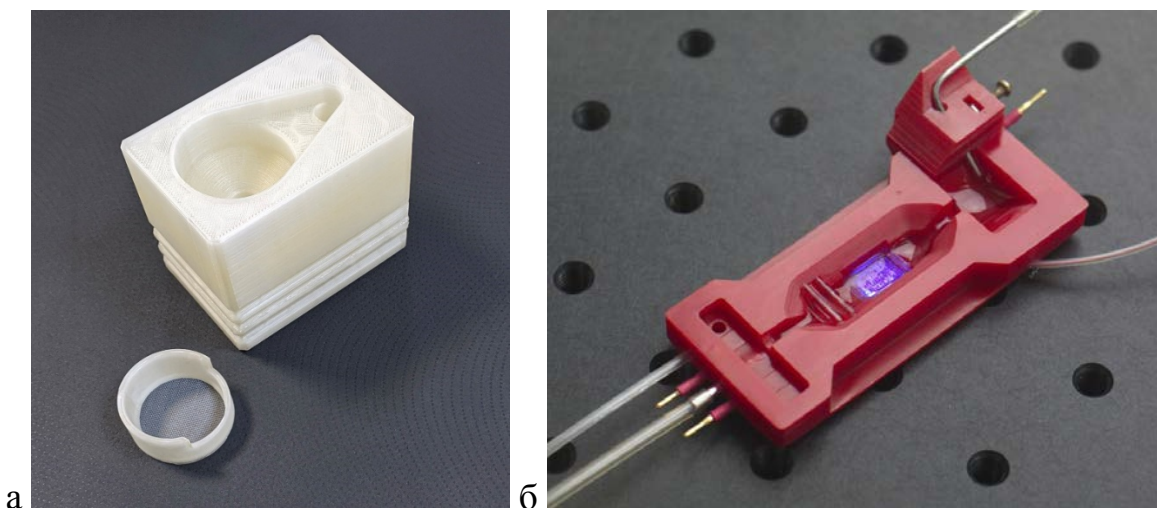


Рисунок 7 – Блок преинкубации со вставкой для размещения срезов (а) и проточная регистрационная камера (б)

Регистрационная камера предназначена для подвода к срезу нервной ткани насыщенного кислородом раствора искусственной спинномозговой жидкости в процессе микроэлектродной регистрации активности нейронов. Камера разработана в виде цифровой трехмерной модели и выполнена из фотополимера с применением метода SLA, поскольку в данном случае требовалась более высокая точность изготовления, чем для преинкубатора.

Камера снабжена системой регулировки уровня перфузионной среды, а также системой резервного отвода раствора в случае сбоя в основном выходном канале перфузии для исключения пролива. Входной блок снабжен сепаратором пузырьков газа, демпфирующим колебания раствора при попадании пузырьков в камеру и минимизирующим их влияние на процесс регистрации. Конструкция камеры предусматривает возможность подключения отдельных референтных электродов систем усиления и стимуляции, а также общего электрода заземления раствора. Для стабилизации температуры раствора камера имеет порт для подключения термопары.

С применением методов 3D-печати также разработан и изготовлен мини-инкубатор для культивирования клеток нервной ткани на поверхности планарных сенсоров электрической активности. Устройство состоит из камеры с крышкой, в которой размещаются два сенсора с культуральными емкостями и содержит резервуары для увлажнения атмосферы, а также прозрачные вставки для наблюдения клеток в проходящем свете. Мини-инкубатор обеспечивает снижение скорости испарения культурального раствора, что стабилизирует условия культивирования клеток. Разработка позволяет повысить эффективность экспериментальных работ, связанных с культивированием нервных клеток.

Разработка методов восстановления функций органов с применением аддитивных технологий

В настоящее время происходит интенсивное развитие регенеративной медицины, сочетающей различные терапевтические и хирургические методы с клеточными технологиями для восстановления функций поврежденных органов и тканей. В области регенеративной медицины выделяют два основных направления: клеточная терапия – основанная на стимулировании процессов регенерации с помощью трансплантации стволовых клеток и тканевая инженерия – с использованием клеток, их носителя (матрикса или скаффолда) и биоактивных факторов, стимулирующих процессы регенерации [8]. Актуальность данного подхода в кардиологии не вызывает сомнений, поскольку, например, при инфаркте миокарда происходит гибель клеток и возникает проблема восстановления соответствующих участков ткани сердца. Применение клеточной терапии в виде инъекцией стволовых клеток в случае инфаркта миокарда не оправдало ожиданий, поскольку имеет слабый терапевтический эффект [9]. Более перспективным в данном случае считается применение элементов тканеинженерных подходов, с трансплантацией непосредственно стволовых клеток в гидрогелевом скаффолде или с их предварительной дифференцировкой в кардиомиоциты и культивированиям плоского слоя ткани [10]. Такой фрагмент, называемый патчем (cardiac patch) [11], предназначен для хирургической фиксации непосредственно на поврежденном участке сердца.

Вместе с тем, с применением методов 3D-биопринтинга возможно создание и персонализированного, трехмерного патча, печатаемого для конкретного пациента на основе трехмерной модели сердца, получаемой методами томографии. Нами разработан программный алгоритм создания трехмерной модели такого патча.

Реализованный алгоритм принимает входные данные модели сердца в виде файла формата STL и выдает трехмерную модель патча в виде гексагональной сетки с ячейками задаваемого размера, огибающей участок сердца, как показано на рисунке 8. Ячеистая структура предназначена для улучшения условий снабжения клеток в случае патча относительно большой толщины.

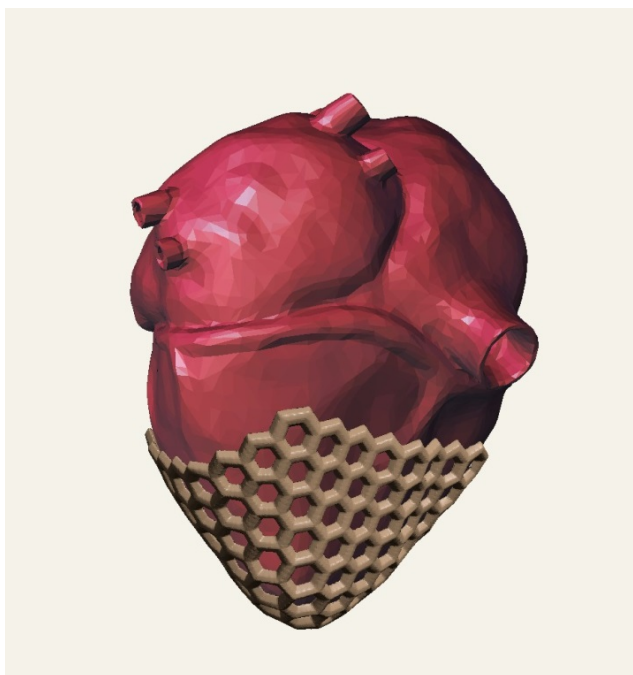


Рисунок 8 – Трехмерная модель сердца и сгенерированный трехмерный патч.

Создание такой модели стандартными средствами CAD является трудоемкой задачей, требующей значительных затрат времени. Разработка автоматизированных средств создания трехмерных моделей для биопечати является важным этапом на пути внедрения аддитивных технологий в медицинскую практику.

Заключение

Основной целью развития методов биопринтинга является создание функциональных органов, которые можно было бы применять в трансплантологии вместо донорских. Для достижения этой цели, по различным оценкам, может потребоваться от 10 до 50 лет. Вместе с тем, эти методы уже применяются для создания тканеинженерных конструкций, при разработке различных модельных систем для изучения свойств создаваемых трехмерных клеточных популяций. Одним из важнейших аспектов, которые необходимо учитывать для создания функциональной ткани, является необходимость создания сети сосудов. В организме человека сосудистая сеть необходима для преодоления пределов диффузионного переноса кислорода, на расстояния, превышающие 100–200 мкм [12]. Без формирования сосудистой сети сконструированные ткани также будут иметь ограничения по доставке питательных веществ, вызывая образование незрелой ткани и некроз [13].

Несовершенство существующих технологий биопринтинга сосудов является одним из факторов, ограничивающих текущие возможности по созданию биоинженерных органов.

Разработанный биопринтер является недорогим лабораторным устройством и позволяет формировать упорядоченные паттерны гидрогеля, загруженного клетками. Биопринтер применяется для отработки методов создания упорядоченных пулов клеток нервной ткани. Использование данного подхода открывает возможности для создания *in vitro* трехмерных структур из биологических нейронов с топологией, подобной нейронным сетям *in vivo*. Подобная трехмерная сеть *in vitro* имеет более продолжительный и сложный ответ на внешнюю стимуляцию по сравнению с двумерной и открывает новые возможности для исследования процессов обработки информации в нейронных сетях.

Использование аддитивных технологий для создания элементов, контактирующих с клетками, подразумевает решение вопросов биосовместимости используемых материалов. В частности, фотополимеры, применяемые при SLA-печати, могут выделять фотоактиватор, оказывающий негативное влияние на клетки и ткани. Использование процедур экстракции после печати позволяет минимизировать данный эффект.

Отработанные методики создания трехмерных клеточных популяций создают основу для расширения спектра экспериментальных исследований с клеточными культурами *in vitro*. Нами проводятся исследования по использованию в данных приложениях наноразмерных углеродных материалов, обладающих электропроводностью и биосовместимостью и являющихся перспективными компонентами при создании трехмерных тканеинженерных и интерфейсных конструкций с использованием электровозбудимых клеток – нейронов и кардиомиоцитов [14]. Развитие результатов работы послужит как базисом для создания новых биоинженерных модельных систем, так и для отработки методов трехмерной биопечати для новых биомедицинских приложений.

Литература

1. Ozbolat I.T., Moncal K.K., Gudapati H. Evaluation of bioprinter technologies // *Addit. Manuf.* – 2017. – Vol. 13. – P. 179–200.
2. Klebe R.J. Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues // *Exp. Cell Res.* – 1988. – V. 179. № 2. – P. 362–373.
3. Gu Z. et al. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications // *Asian J. Pharm. Sci.* – 2020. – Vol. 15, № 5. – P. 529–557.

4. Unagolla J.M., Jayasuriya A.C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives // *Applied Materials Today*. – 2020. – Vol. 18. – P. 100479.
5. Ong C.S. et al. 3D bioprinting using stem cells // *Pediatric Research*. Nature Publishing Group – 2018. – Vol. 83, № 1–2. – P. 223–231.
6. Rawal P. et al. Prospects for 3D bioprinting of organoids // *Bio-Design and Manufacturing*. – 2021. – Vol. 4, № 3. – P. 627–640.
7. Frega M. et al. Network dynamics of 3D engineered neuronal cultures: a new experimental model for in-vitro electrophysiology // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – P. 5489.
8. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2014. – Т.16, № 3. – С. 93–108.
9. Агладзе К.И. Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития // *Альманах клинической медицины*. – 2019. – Т. 47, № 7. – P. 623–629.
10. Mancuso A. et al. Cardiac Stem Cell-Loaded Delivery Systems: A New Challenge for Myocardial Tissue Regeneration // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 20. – P. 7701.
11. Mei X., Cheng K. Recent Development in Therapeutic Cardiac Patches // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2020. – P. 294.
12. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. // *Nature*. – 2000. – V. 407. – P. 249–57.
13. Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, Kooy FK, Martens DE, Tramper J, et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs // *Biomaterials*. –2004. V. 25. P. 5773–80.
14. Bei H.P. et al. Graphene-based nanocomposites for neural tissue engineering // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 4. – P. 658.