

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ БІОДРУКУ
В БІОТЕХНОЛОГІЯХ»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи ПБтм23(1,10з)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Дар'я АБРАІМОВА

Керівник: завідувачка кафедри біотехнології, д.фарм.н.,
професорка Наталя ХОХЛЕНКОВА

Рецензент: провідний науковий співробітник Інституту
проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, к.мед.н.,
с.н.с. Володимир ПРОКОПЮК

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

У роботі проведено аналіз даних наукової літератури щодо 3D-біодруку як перспективної технології у медицині та біотехнологіях. Проаналізовано світовий ринок 3D-біодруку, а також хронологію його розвитку з 1998 року. Розглянуто ключові напрямки застосування: трансплантація органів, моделі тканин для фармацевтичних досліджень, регенерація тканин, терапія раку та тканинна інженерія. Описано методи 3D-біодруку: екструзійний, лазерно-асистований і стереолітографічний.

Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи 69 сторінок, кількість таблиць 5, рисунків 12, джерел літератури 31.

Ключові слова: 3D-біодрук, біомедицина, методи 3D-біодруку, біочорнила.

ANNOTATION

The paper presents an analysis of scientific literature data on 3D bioprinting as a promising technology in medicine and biotechnology. It analyzes the global 3D bioprinting market as well as the chronology of its development since 1998. Key application areas are reviewed, including organ transplantation, tissue models for pharmaceutical research, tissue regeneration, cancer therapy, and tissue engineering. The main 3D bioprinting methods are described: extrusion-based, laser-assisted, and stereolithographic.

The work consists of an introduction, three chapters, and a conclusion. The total length is 69 pages and includes 5 tables, 12 figures, and 31 references.

Keywords: 3D bioprinting, biomedicine, 3D bioprinting methods, bioink.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Світовий ринок 3D-біодруку	8
1.2. Хронологія досліджень з біодруку	10
1.3. Аналіз застосувань біодруку	17
Висновки до розділу 1.....	35
РОЗДІЛ 2. ОБ’ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	36
2.1 Біочорнила: властивості та вимоги до них.....	36
2.2 Характеристика біоматеріалів, що використовуються у 3D-біодруці..	40
Висновки до розділу 2.....	52
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ 3D БІОПРИНТИНГУ	53
3.1 Методи 3D друку	53
3.1.1 Струменевий біодрук	55
3.1.2 Екструзійний біодрук.....	57
3.1.3 Лазерно-асистований біодрук.....	61
3.1.4 Стереолітографічний біодрук.....	63
Висновки до розділу 3.....	66
ВИСНОВКИ.....	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	69

ВСТУП

Актуальність теми. 3D-біодрук або адитивне виробництво — це новітня інноваційна технологія, яка революціонізує сферу біомедичних застосувань, поєднуючи інженерію, виробництво, мистецтво, освіту та медицину. Цей процес передбачає включення клітин до біосумісних матеріалів для створення необхідної моделі тканини або органа *in situ* для різних *in vivo* застосувань. Звичайний 3D-друк передбачає створення моделі без включення будь-яких живих компонентів, що обмежує його використання в ряді сучасних біологічних застосувань. Натомість 3D-біодрук включає додаткові біологічні складності, зокрема вибір матеріалів, типи клітин та фактори їх росту й диференціювання.

Біомедичні застосування, такі як терапія раку, тканинна інженерія, регенерація кісткової тканини та загоєння ран із використанням 3D-друку, привернули значну увагу в останні роки. Метою цієї статті є надання всебічного огляду всіх аспектів, пов'язаних із 3D-біодруком — від вибору матеріалів, технології та виготовлення до застосування в біомедичній галузі. Були зроблені спроби висвітлити кожен елемент детально разом із відповідними наявними даними з сучасної літератури. Цей огляд зосереджено на наданні єдиної платформи для застосувань 3D-біодруку в онкології та тканинній інженерії в межах біомедичної сфери.

Метою дослідження є аналіз всіх аспектів, пов'язаних із 3D-біодруком — від вибору матеріалів, технології та виготовлення до застосування в біомедичній галузі.

Завдання дослідження:

- проаналізувати наукові джерела щодо сучасного стану розвитку 3D-біодруку в біотехнології;
- охарактеризувати типи біочорнил, що застосовуються у 3D-біодруці, їх властивості та біосумісність;

- узагальнити інформацію щодо основних методів 3D-біодруку (інжекційний, лазерний, екструзійний тощо) та визначити їх переваги і недоліки;
- узагальнити приклади застосування 3D-біодруку в медицині (відновлення шкіри, судин, кісткової тканини, створення моделей пухлин);
- окреслити перспективи розвитку 3D-біодруку в контексті персоналізованої медицини та регенеративної терапії.

Предметом дослідження: є біотехнологічні процеси, пов'язані з 3D-біодруком.

Об'єктом дослідження: є біотехнологічні аспекти 3D-біодруку, включно з вибором біоматеріалів, типами біочорнил, методами біодруку та напрямками застосування у біомедичній галузі.

Методи наукових досліджень. Бібліосемантичний, описове дослідження - проаналізовано джерела наукової літератури; графічні методи - створено схеми, таблиці та діаграми.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження можуть бути використані як теоретичне підґрунтя для подальших прикладних і експериментальних робіт у галузі біотехнології та біомедичної інженерії. Узагальнені підходи до вибору біочорнил, методів біодруку та типів клітин можуть слугувати основою для розробки ефективних стратегій створення тканинних конструкцій та органомоделей.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи

Робота складається зі вступу, трьох розділів: літературний огляд, об'єкти та методи досліджень, висновку. Загальний обсяг роботи 60 сторінок, кількість таблиць 5, рисунків 12, джерел літератури 31.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Ковалевська Д. Т. 3D-біодрук: сучасні тенденції та перспективи застосування / Ковалевська Д. Т., Хохленкова Н. В. // Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: мат. V міжнар. наук.-практ. конф. (28 березня 2025 р., м. Харків). –Х. : НФаУ, 2025. – С. 212-213.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Світовий ринок 3D-біодруку

Світовий ринок 3D-біодруку у 2022 році оцінювався в 2,0 мільярда доларів США, і, за прогнозами, зростатиме з комплексним середньорічним темпом зростання (CAGR) 9,3% у період з 2023 по 2030 рік. Основними чинниками зростання є обмежена кількість донорських органів, старіння населення з хронічними респіраторними захворюваннями, а також інвестиції у дослідження та розробки, технологічний прогрес і зростаюча поширеність хронічних хвороб.



Рис.1.1 Світовий ринок 3D-біодруку

Пандемія COVID-19 стала каталізатором стрімкого розвитку 3D-біодруку, оскільки навіть високорозвинені країни стикнулися з перевантаженням систем охорони здоров'я. Біодрукарські компанії почали виготовляти життєво важливе медичне обладнання, наприклад, захисні щитки, тампони для забору зразків, респіратори та вентилятори.

Завдяки зростанню попиту та інноваціям, ринок 3D-біодруку має великі перспективи зростання, зокрема в сфері персоналізованої медицини, створення моделей органів для тренувань, регенеративної медицини, вакцинології

та тестування токсичності ліків.

Медичний сегмент займав найбільшу частку ринку - 37,6% у 2022 році, і очікується, що протягом прогнозованого періоду його зростання становитиме близько 15,0%. Широке використання медичних таблеток для лікування різних хронічних захворювань сприяє зростанню ринку 3D-біодруку. Крім того, зростаюча потреба в лікарських засобах та економічно ефективно застосування біопрепаратів з використанням цієї технології ще більше стимулює цей сегмент.

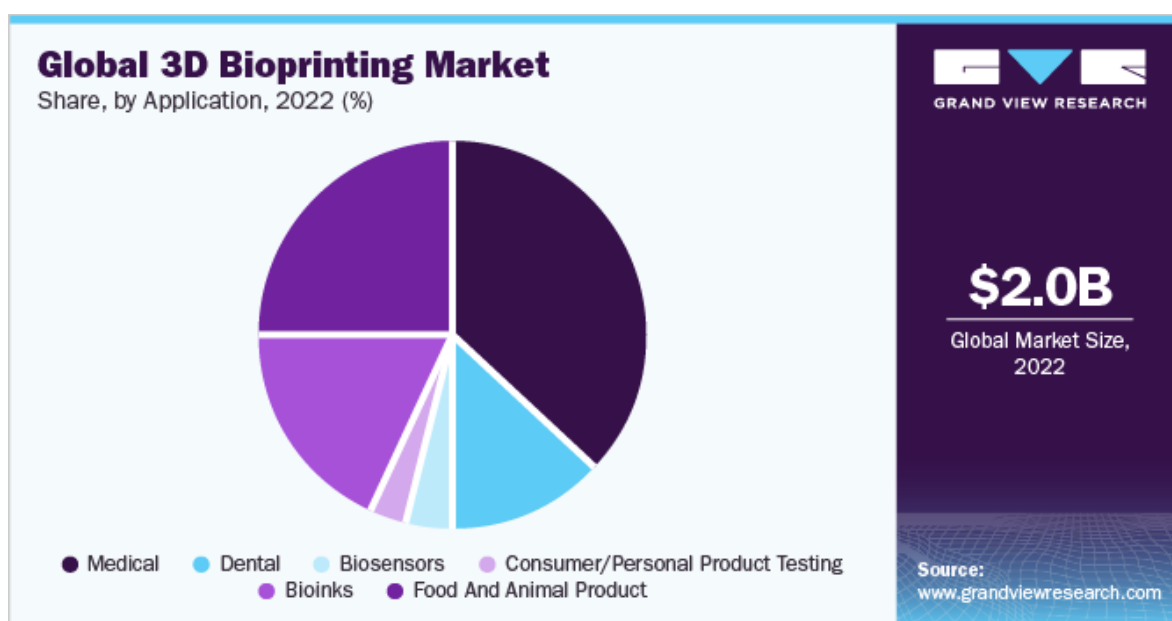


Рис. 1.2 Сегменти світового ринку 3D-біопринтингу

Попри високі витрати та суворі нормативні вимоги, 3D-біодрук має величезний потенціал у майбутньому завдяки:

- розвитку персоналізованої медицини
- потребі у регенеративних тканинах
- підтримці фармацевтичних досліджень
- Істотному попиту на альтернативи донорським органам

Таким чином, 3D-біодрук уже сьогодні є важливою ланкою між інноваціями, технологіями та потребами сучасної медицини.

1.2 Хронологія досліджень з біодруку

Початковий етап досліджень

Перші спроби забезпечити ріст клітин на заздалегідь підготовленій, біодеградуваній та придатній до життєдіяльності 3D-структурі були зроблені у 1998 році. Тоді поверхню полімерів полімолочної кислоти (PLA) модифікували з використанням поліетиленоксиду (PEO) і поліпропіленоксиду (PPO) для забезпечення адгезії клітин печінки та фібробластів до цієї поверхні.

У тому ж році було досліджено виживання та функціональність гепаточитів у новій синтетичній 3D-пористій структурі з внутрішньою мережею каналів, що забезпечувала належну дифузію кисню в умовах постійного потоку.

У 1999 році вперше почали розглядати ідею заміни пошкоджених або хворих органів штучними тканинами, створеними з комбінації живих клітин і біосумісних каркасів — завдяки міждисциплінарним зусиллям і розвитку інструментів для вивчення поведінки клітин.

У 2000 році вже розроблялися методи друку з використанням мікропозиціонування з високою точністю за допомогою шприців, які могли дозувати об'єми до нанолітрів.

У 2001 році було доведено важливість визначення просторової організації поверхні полімерів перед їх модифікацією для використання в якості каркасів. Також було досліджено вплив пористості та розміру пор на формування тканин.

Починаючи з 2002 року, почали з'являтися дослідження з побудови живих тканин клітина за клітиною із використанням лазерних імпульсів низької енергії для створення складних 3D-тканин, включаючи клітини ссавців, білки, матрикси та напівтверді матеріали для каркасів.

У 2003 році була опублікована перша стаття, що поєднувала концепцію друку клітин шар за шаром на термореверсивному гелі для формування тривимірних органів. Цей підхід розглядали як потенційне рішення кризи дефі-

циту органів. Згодом ті ж дослідники запропонували використовувати термо-чутливі 3D-гелі для створення послідовних шарів для друку клітин.

Термін "біодрук" вперше з'явився у 2004 році, коли була розроблена система з 12 п'єзоелектричних ежекторів, здатних розпилювати біологічні матеріали краплями на XY-платформу, що дозволяло друкувати будь-які бажані візерунки. У тому ж році з'явилася велика кількість публікацій, присвячених різним методам 3D-друку біологічних матеріалів. З'ясувалося, що життєздатні клітини можна друкувати навіть за допомогою звичайних струменевих принтерів, які здатні створювати довільні структури з клітин різних типів. Саме тоді біодрук став надзвичайно важливою науковою темою, настільки, що було проведено перший Міжнародний семінар з біодруку, біодизайну та біозбірки в Медичному університеті Південної Кароліни. Другий такий семінар відбувся у 2005 році.

Проводились також дослідження зі створення біосумісних каркасів для регенерації кісткової тканини. У 2006 році вперше було надруковано гідрогель з інкапсульованими печінковими клітинами для створення *in vitro* моделі для фармакокінетичних досліджень. Того ж року почала зростати потреба у створенні багатокомпонентних 3D-структур з відповідною біологічною ієрархією, що відтворюють багатоклітинні тканини та органи. З'явилися нові розробки у сфері перенесення матеріалів на мікро- та нанорівнях.

Ключовим результатом Першого щорічного симпозіуму з біодруку в Чарлстоні стало визнання біодруку перспективним рішенням проблеми нестачі органів, незважаючи на численні технічні виклики. У 2007 році з'явилися публікації, які розкривали величезний потенціал біодруку в інженерії тканин, а також проводилися нові симпозіуми на цю тему.

У 2008 році з'явилися нові дослідження, які пов'язували біодрук з регенерацією кісткової тканини, особливо завдяки використанню гідроксиапатиту в каркасах. У 2009 році було створено імплантат із ізоніазидом та рифампіцином уповільненої дії за допомогою 3D-друку для лікування кісткового туберкульозу. Того ж року струменевим друком у гель з альгінату вперше здійснили

пряме друкування живих клітин. Також було надруковано колагеновий гідрогель із фібробластами і кератиноцитами для створення шкірних трансплантів.

Було впроваджено світлочутливі чорнила, успішно надруковано мікросудинні структури, а також судинну тканину без використання каркасів. Це стало новим етапом у розвитку технології біодруку.

Перші досягнення в біодруці

У 2013 році було створено біоабсорбуючий сплінт для дихальних шляхів для лікування трахеобронхомалатії — стану, що ускладнює дихання новонароджених. Окрім того, була продемонстрована можливість виготовлення складних гетерогенних тканинних конструкцій, що містять кілька типів клітин, з використанням технологій струменевого друку.

За допомогою лазерного біодруку було успішно надруковано тривимірну клітинну конструкцію, яка згодом утворила тканину *in vivo*. Було створено тканиноподібну структуру шкіри, що складалася з різних типів клітин у складному візерунку.

Надзвичайно важливою віхою стало біодрукування гетерогенного клапана аорти з використанням гідрогелів на основі альгінату та желатину. Це довело, що складні за анатомічною структурою клапанні гідрогелеві конструкції можуть бути виготовлені за допомогою 3D-біодруку.

Реальну перспективу використання гідрогелів у біодруці продемонструвало застосування метакрильованого желатину (GelMA). Після опромінення ультрафіолетом GelMA демонструє підвищену жорсткість і здатність до набухання — властивості, що є сприятливими для біодруку.

Ще одним проривом стало відтворення людського вуха шляхом друку матриці з гідрогелю, засіяної клітинами, із вбудованою індуктивною антеною, яка забезпечує прийом радіосигналів.

Перехід до чотиривимірного (4D) біодруку

У 2015 році було показано, що тканинні конструкції з м'яких гідрогелів,

посилених мікрОВОЛОКНИСТИМИ мережами з високою пористістю, мали жорсткість і еластичність, подібні до хрящової тканини. Це стало основою для створення тканин з біологічною та механічною сумісністю. Також було розроблено біочорнило з вмістом графену, що дозволило змінювати адгезію, життєздатність, проліферацію та диференціацію мезенхімальних клітин у напрямку нервової тканини завдяки високій електропровідності графену.

Розглядалась можливість використання альгінатного біочорнила з наноцелюлозою, яка має чудові властивості зниження в'язкості при зсуві, для друку хрящової тканини. Ще одне біочорнило з поліетиленгліколю, альгінату натрію та наноглини забезпечувало високу міцність і життєздатність клітин. Значним проривом стало біодрукування первинних нейрональних клітин у структури, подібні до мозку, з використанням гелану як біочорнила. Все більшого значення набували гідрогелі з регульованими механічними властивостями, що змінюються під дією світла.

У 2016 році була створена інтегрована система органного і тканинного принтера, здатна виготовляти стабільні тканинні конструкції людського масштабу будь-якої форми за допомогою друку гідрогелів із клітинами разом із біодеградованими полімерними каркасами. Загалом удосконалювався друк складних тканин з належною васкуляризацією. Все більше досліджень присвячувалося поєднанню різних гідрогелів для оптимізації властивостей надрукованої структури.

Було успішно створено 3D-біоміметичну модель печінки, яка імітує морфологічну організацію клітин печінки для моделювання захворювань і виявлення дії лікарських засобів. Також було розроблено метод біодрукування 3D-моделі ниркових каналців, повністю вмонтованих в матрикс із можливістю перфузії, які зберігали життєздатність понад 2 місяці.

Було досліджено використання звукових хвиль як «акустичних пінцетів» для точного й неінвазивного маніпулювання клітинами з метою створення дво- та тривимірних структур. У 2017 році розпочалося *in vivo* моніторування біодрукованих тканин із застосуванням сенсорів, наприклад, електронного

зчитування скорочувальних напружень і реакцій на лікарські засоби у кардіотканинах.

Якість друку серцевої тканини покращилась завдяки попередній васкуляризації перед імплантацією, що забезпечувало швидке формування судин після нанесення пластиру на уражену ділянку та сприяло її відновленню.

Було розроблено метод створення каркасів, морфологічно подібних до позаклітинного матриксу, за допомогою термоіндукованої агрегації нанофібрил та електропрядіння нанофібрил із ПЛА та полікапролактону. Також продемонстровано значення геометрії пор і її вплив на поведінку клітин: каркаси з кутами 30° і 60° відновлювали яєчникову тканину у стерилізованих мишей, які згодом мали потомство природним шляхом.

Можливість друку життєздатних функціональних структур з бактеріями відкрила перспективу отримання матеріалів з різними властивостями — наприклад, біочорнила з *Acetobacter xylinum* для утворення целюлози та *Pseudomonas putida* для розщеплення забруднювачів.

Окремим досягненням стало створення функціональної щитовидної залози миші, здатної нормалізувати рівень тироксину в крові після трансплантації.

Подальший розвиток 4D-біодруку

У 2018 році продовжували вдосконалювати матеріали для біодруку кісткової тканини, а також досліджували можливі комбінації гідрогелів і параметри друку з метою досягнення найкращих результатів. Також активізувалися дослідження мікросередовища пухлин і його ролі в міжклітинній комунікації при розвитку раку — з метою максимально достовірного відтворення пухлинної тканини за допомогою біодруку та створення точніших моделей для тестування терапії.

Було здійснено біодрукування повнотовстої моделі людської шкіри з використанням біочорнил на основі позаклітинного матриксу, отриманого зі шкіри. Нові дослідження застосування графену в біодруці нервової тканини

показали, що він сприяє росту аксонів та ремієлінізації після пошкодження периферичних нервів, що має великий потенціал для доклінічного та клінічного застосування.

Важливі етапи розвитку біодруку наведений на рис.1.3.

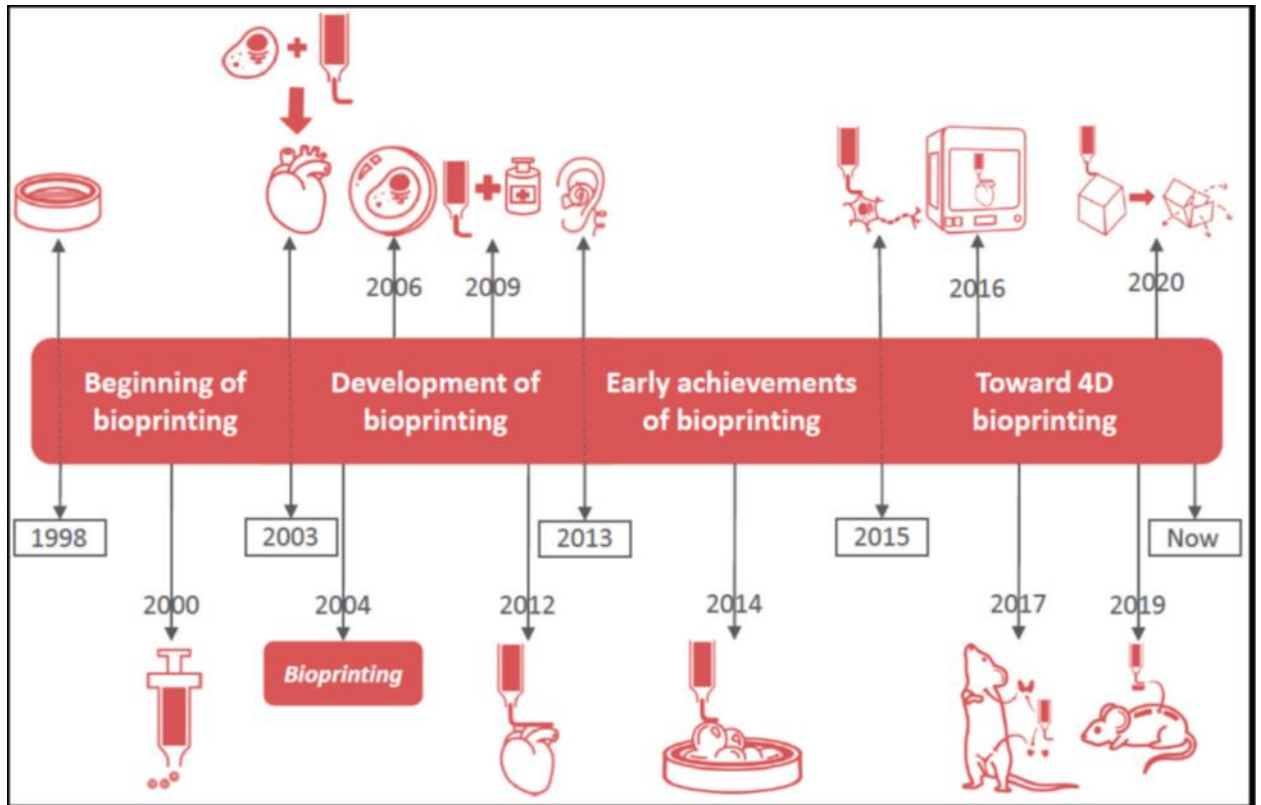


Рис 1.3. Важливі етапи розвитку біодруку.

1998: ріст клітин на заздалегідь виготовленій 3D-конструкції.

2000: методики, основані на нано-депозиціях із застосуванням шприців.

2003: підхід об'єднання клітин з гідрогелями для формування органів.

2004: поява терміну «біодрук».

2006: інкапсуляція клітин у гідрогелі.

2009: зв'язування лікарських засобів та біодрук.

2012: біодрук серцевої тканини.

2013: біодрук людського вуха з коброю (провідником).

2014: біодрук з використанням клітин HeLa для досліджень пухлин.

2015: біодрук структур, подібних до мозку, з інкапсульованими первинними нейронами.

2016: розробка інтегрованого біопринтера для органів і тканин.

2017: біодрук функціональної щитоподібної залози та яєчникової тканини у мишей.

2019: біодрук біоміметичних каркасів, що забезпечують регенерацію пошкоджених аксонів у спинному мозку мишей.

2020: початок 4D-біодруку, при якому біодруковані елементи можуть змінюватися у відповідь на вплив навколишнього середовища

Розпочалися також дослідження з отримання біодрукованих рогівкових протезів, придатних до трансплантації. Хоча ще не вдалося створити остаточної структуру, перший крок — одержання життєздатних біодрукованих кератоцитів — уже був успішно здійснений. Біодрукування олігодендроцитів разом із точно позиціонованими нейрональними прогеніторами спинного мозку відкрило перспективу реконструкції функціональних аксональних з'єднань у ділянках пошкодження центральної нервової системи.

У 2019 році виявлено, що контроль гелеутворення за рН забезпечує роздільну здатність філаментів 20 мкм, пористу мікроструктуру для швидкої інфільтрації клітин та мікроваскуляризації, а також достатню механічну міцність для формування судин і перфузії в серцевій тканині. Також було надруковано клітинні людські серця з природною архітектурою шляхом перепрограмування клітин у кардіоміоцити та ендотеліальні клітини.

Тривимірний друк структур центральної нервової системи, що є надзвичайно складним завданням, став можливим у малому масштабі завдяки безперервному мікропроекційному друку. За допомогою біоміметичних каркасів вдалося досягти регенерації пошкоджених аксонів спинного мозку мишей, які формували синапси з нейрональними клітинами, надрукованими у конструкції.

Модель "пухлина-на-чипі", у якій відтворювався гліобластома з клітин, отриманих від пацієнтів, імітувала структуру, біохімію та біофізичні властивості природної пухлини. Її можна використовувати для підбору ефективного

лікування. Також було створено *in situ*-біопринтер для шкіри, здатний наносити шари шкіри безпосередньо на пацієнта, що забезпечувало швидке загоєння, зменшення рубцювання та прискорену реепітелізацію.

Було показано, що використання каркасів із позаклітинного матриксу хряща, GelMA та екзосом мезенхімальних стовбурових клітин ефективно для лікування остеоартриту через регуляцію функцій мітохондрій і стимуляцію регенерації хряща. Крім того, було розроблено біоміметичні м'язи, створені з тканинно-специфічних клітин і біочорнил, які покращують лікування об'ємної втрати м'язової тканини.

1.3 Аналіз застосувань біодруку

3D-біодрук має широкий спектр застосувань у регенеративній медицині, фармацевтичній промисловості та харчовому секторі. Нижче наведено огляд ключових застосувань, які демонструють потенціал цієї технології.

Трансплантація органів

Дефіцит донорських органів є глобальною проблемою, яка спричиняє значну смертність серед пацієнтів, що чекають на трансплантацію. Наприклад, у США щодня помирає приблизно 17 осіб через нестачу донорських органів. 3D-біодрук пропонує інноваційне рішення шляхом створення функціональних тканин і органів *de novo*, використовуючи аутологічні клітини пацієнта, що зменшує ризик імунного відторгнення.

Останні досягнення включають створення біодруктованих конструкцій, таких як шкіра, хрящ, кістки, кровоносні судини, серцеві тканини, печінка та нирки (56–60). Наприклад, біодруктована шкіра була успішно протестована для загоєння ран у тваринних моделях, демонструючи інтеграцію з природними тканинами та формування епідермальних шарів. Біодрук серцевих тканин із використанням кардіоміоцитів і гідрогелів на основі колагену показав здатність відтворювати скоротливу функцію серця *in vitro*. Крім того, створення судинних мереж у біодруктованих тканинах залишається ключовим викликом, але прогрес у розробці багатошарових судиноподібних структур із

використанням коаксіального біодруку відкриває нові перспективи для створення васкуляризованих органів.

Хоча повноцінні функціональні органи, такі як серце чи печінка, ще не створені для клінічного використання, ці досягнення вказують на потенціал 3D-біодруку для революції в трансплантології. Однак перехід від лабораторних моделей до клінічного застосування потребує вирішення питань масштабування, регуляторних стандартів і довгострокової функціональності тканин.

Моделі тканин і органів для дослідження ліків

Фармацевтична промисловість стикається з високими витратами та низькою ефективністю традиційних методів тестування ліків, таких як моделі на тваринах, які часто не відтворюють людську фізіологію. Біодруковані тканини та органи *in vitro* пропонують фізіологічно релевантні моделі для доклінічного скринінгу ліків, оцінки токсичності та моделювання хвороб.

Наприклад, біодруковані моделі печінки, створені з гепатоцитів і гідрогелів, продемонстрували здатність імітувати метаболічні функції печінки, включаючи синтез альбуміну та метаболізм ліків, що робить їх цінними для тестування гепатотоксичності. Аналогічно, біодруковані моделі пухлин дозволяють досліджувати мікросередовище ракових клітин і оцінювати ефективність протиракових препаратів *in vitro*. Такі моделі зменшують залежність від тваринних тестів, знижують етичні проблеми та прискорюють процес розробки ліків.

Крім того, 3D-біодрук дозволяє створювати персоналізовані моделі тканин, використовуючи клітини, отримані від конкретних пацієнтів, що сприяє розвитку прецизійної медицини. Наприклад, біодруковані моделі серцевих тканин, створені з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC) пацієнтів, можуть використовуватися для оцінки кардіотоксичності ліків у контексті індивідуальних генетичних особливостей.

Безтваринне м'ясо

Технологія 3D-біодруку також знаходить застосування у харчовій промисловості, зокрема у виробництві культивованого м'яса, яке імітує смак, текстуру та поживні властивості традиційного м'яса без необхідності вирощування тварин. Біодрук дозволяє створювати складні м'ясні структури, комбінуючи клітини м'язів, жирові клітини та гідрогелі для відтворення багатошарової текстури м'яса.

Компанії, такі як Aleph Farms і NovaMeat, уже продемонстрували прототиби біодрукованих стейків, створених із клітин великої рогатої худоби, які відтворюють волокнисту структуру м'яса. Такі продукти мають потенціал зменшити екологічний вплив тваринництва, включаючи викиди парникових газів і використання земельних ресурсів, а також вирішити етичні питання, пов'язані з масовим забоєм тварин.

Основним викликом у цій галузі є масштабування виробництва та зниження витрат, щоб зробити біодруковане м'ясо конкурентоспроможним порівняно з традиційним. Крім того, регуляторні стандарти для культивованих харчових продуктів все ще розробляються, що вимагає подальших досліджень і співпраці з органами сертифікації.

ЗАСТОСУВАННЯ БІОДРУКУ У МЕДИЦИНІ

Регенерація тканин

Глобальний дефіцит донорських органів та тканин, що зумовлений високим попитом, а також необхідністю тривалого застосування імуносупресивної терапії після трансплантації, є нагальною проблемою, що потребує вирішення. Тому використання технології біодруку дедалі частіше розглядається як перспективне рішення, оскільки дозволяє створювати трансплантати на основі власних клітин пацієнта, що усуває потребу у донорських органах та знижує ризик розвитку побічних ефектів, пов'язаних з імуносупресією. Для виготовлення тканин за допомогою біодруку застосовуються три основні концепції, а саме: біоміметика, автономна самозбірка та побудова з мікротканинних блоків.

Біоміметика: передбачає створення ідентичних відтворень клітинних і позаклітинних компонентів тканини або органу.

Автономна самозбірка: базується на здатності клітин самостійно керувати гістогенезом, забезпечуючи формування композиції, локалізації, функціональних та структурних характеристик тканини.

Побудова з мікротканинних блоків. Мікротканинний блок визначається як найменша структурна та функціональна одиниця тканини. Існує дві основні стратегії: по-перше, самозібрані клітинні сфери (аналогічні мікротканинам) збираються у макротканини за біологічно натхненною організацією; по-друге, проєктуються точні, високороздільні одиниці тканини, які згодом дозволяється самостійно самоасемблюватися у функціональну макротканину. Прикладами таких підходів є самоасамблея судинних будівельних блоків для формування розгалужених судинних мереж.

Для можливості відтворення різних тканин або органів, що підлягають створенню, необхідно мати ґрунтовне розуміння організації та взаємодії їхніх компонентів. Технології медичної візуалізації надають інформацію про тривимірну структуру та функціонування на рівнях клітин, тканин, органів та організму в цілому. Це знання допомагає визначати оптимальні параметри та умови біодруку для кожного типу тканини з метою забезпечення її виживання та виконання функцій, що робить процес відтворення ідеального моделювання тканин дедалі більш ефективним і дозволяє успішно трансплантувати їх у живі організми.

Фармакокінетичні дослідження

Процес виготовлення лікарських засобів може бути тривалим, оскільки він включає численні етапи — від лабораторних досліджень до комерційного впровадження, що може затримувати вихід продукту на ринок та підвищувати його вартість. Технології 3D-друку та високопродуктивні методики можуть не лише покращити модель продукту, а й скоротити час виробництва, виробничі витрати та терміни виходу на ринок. Це досягається шляхом використання 3D-

біодруківаних моделей тканин для високопродуктивного тестування лікарських засобів. Такі 3D-біодруківані тканини забезпечують максимально точне відтворення цільового органу, на який впливають препарати, моделюючи *in vitro* реакцію на введення лікарської речовини та дозволяючи швидше оцінювати отримані результати.

Інтеграція 3D *in vitro* моделей клітинних культур з клітинними лініями, а також розвиток таких технологій, як мікрофлюїдні пристрої та «тканини та органи на чіпі», відкривають нові можливості для відтворення біологічних властивостей і функцій природних людських тканин, органів і систем кровообігу.

Вивчення інфекційних хвороб

Інфекційні захворювання традиційно лікують антибіотиками, протигрибковими та противірусними препаратами у випадках, коли імунна система господаря не здатна самотійно подолати інфекцію. Тому розуміння реакції організму-господаря на проникнення збудника, а також різноманітних взаємодій між господарем і патогеном є ключовим для успішного проектування та розробки ефективних лікарських засобів.

Зазвичай для дослідження взаємодії господар–патоген використовували двовимірні (2D) культури, однак у таких культурах клітини не зазнають тих самих умов, що в організмі, і дослідження, проведені на них, хоч і є корисними та необхідними, не відображають достовірно процеси, що відбуваються у тканинах *in vivo*. Тому тривимірні (3D) моделі можуть слугувати кращою платформою для розробки лікарських засобів і вакцин, оскільки вони краще імітують мікрооточення, яке існує в організмі, ніж 2D-культури.

Яскравим прикладом корисності біодруку у боротьбі з інфекційними хворобами є відтворення людської респіраторної тканини для вивчення інфекції SARS-CoV-2 та тестування потенційних противірусних препаратів. Використання легеневих і колоректальних органоїдів дозволило встановити, що не лише клітини дихальних шляхів, а й кілька типів клітин товстої кишки експре-

сують рецептор ACE2, що свідчить про здатність обох типів клітин до проникнення вірусу. Крім того, ці моделі допомогли протестувати та підтвердити ефективність декількох існуючих препаратів у зменшенні інфекції SARS-CoV-2 і були використані для розробки першого препарату, схваленого для лікування COVID-19.

Терапія раку

Рак є одним із провідних смертельно небезпечних захворювань у світі, спричиняючи приблизно 10 мільйонів смертей у 2020 році. Найпоширенішими типами раку, які поширюються по всьому світу, є рак легень, молочної залози, передміхурової залози та товстої кишки. Якщо не вжити серйозних заходів, до 2040 року щорічно буде реєструватися 27,4 мільйона нових випадків.

Для кращого розуміння виникнення і прогресування хвороби нам потрібні більш складні та фізіологічно релевантні моделі, які тісно імітують мікрооточення пухлини *in vivo*. Ракові клітини — це здорові клітини, які стали онкогенними під впливом ряду чинників, таких як генетичні мутації. Ці клітини після перетворення набувають властивостей, характерних для раку, включаючи інвазивну поведінку, уникнення контролю росту, уникнення загибелі клітини, пригнічення імунної відповіді та запуск аномальної ангіогенезу.

Біодрук має здатність забезпечувати висококонтрольовані моделі ракових тканин, що може суттєво прискорити дослідження раку. Пухлинні клітини контролюють своє поширення і переміщення, створюючи проангіогенні фактори (наприклад, судинний ендотеліальний фактор росту, VEGF) і сприяючи взаємодії зі стромальними клітинами та оточуючими запальними клітинами, включаючи макрофаги, нейтрофіли та тучні клітини.

Гетерогенність і складність мікрооточення пухлини можна відтворити шляхом одночасного друку біочорнил з різними типами клітин, компонентами позаклітинного матриксу (ECM) та біомолекулами. Різні моделі мікрооточення пухлин, такі як кровоносні судини, ECM, клітинні культури, органоїдні культури та «рак-на-чипі», використовуються в 3D-біодруці для терапії раку.

ЗАСТОСУВАННЯ У ТКАНИННІЙ ІНЖЕНЕРІЇ

Людське тіло складається з чотирьох різних типів тканин — сполучної, нервової, м'язової та епітеліальної, — які об'єднуються для виконання певної функції.

Функція кожної тканини залежить від її архітектури, біохімічного складу та механічних властивостей. Основна мета будь-яких біомедичних досліджень — розробка більш ефективних способів діагностики, лікування людських хвороб і кращого розуміння молекулярних основ.

Нервові розлади сягнули майже мільйона випадків у світі, включаючи черепно-мозкові травми, нейродегенеративні захворювання, пошкодження спинного мозку, аутизм, хворобу Паркінсона, хворобу Альцгеймера тощо. Потреба у регенерації тканин та заміні органів швидко зросла за останні роки, хоча кількість донорів досі є недостатньою. Класичну модель на тваринах використовували в багатьох випадках, і вона показує значущі результати. Однак недавні дослідження показали, що прояви захворювань і фенотип не є подібними у мишей та людей.

Нездатність точно імітувати молекулярні механізми, що лежать в основі людських захворювань, є очевидною і з часом лише посилюється у багатьох тварин, що є однією з причин невдач лікарських засобів досягти терапевтичної безпеки й ефективності в клінічних випробуваннях.

Серед інших недоліків — дороговартісність експериментів на тваринах, значні часові витрати та неможливість повного моніторингу процесів на клітинному рівні.

Тим часом фармацевтичні компанії зосереджуються на дослідженнях на культивованих клітинних лініях людини.

Тканинна інженерія — це галузь біомедичної інженерії, що спрямована на створення тканин і біологічних замінників поза тілом з подальшою їх імплантацією в уражену ділянку з метою відновлення, вирощування та підтримки пошкоджених органів чи тканин.

Різні типи технологій біодруку мають численні можливості для застосування в тканинній інженерії.

Шкіра

Шкіра відокремлює внутрішні органи від зовнішнього середовища; це найбільша тканина тіла, яка захищає організм від впливу ультрафіолетового випромінювання, зневоднення, регуляції тепла тощо. Людська шкіра має багатошарову структуру, яка включає епідерміс, дерму та гіподерму.

Основними причинами потреби у штучній шкірі є загоєння ран у жертв опіків, а також тестування косметики та лікарських засобів. У випадку регенерації шкіри з використанням 3D-біодруку застосовуються підходи зверху-вниз та знизу-вгору. У більшості випадків підхід зверху-вниз починається з об'ємного матеріалу — каркасу.

Деякі параметри, які контролюють властивості каркасу, включають біодеградацію, біосумісність, розмір і форму пор, механічну міцність та топографію поверхні.

У цей каркас впроваджуються біологічно активні матеріали. Інші методи, такі як пошарове біофабрикування, моделювання методом плавлення (FDM), лазерне спікання та тривимірний друк, також входять до підходу зверху-вниз.

У підході знизу-вгору мікро- або нанорозмірні молекулярні структури укладаються у макроскопічну систему.

Малими збірками можуть бути тканинні сфероїди, полімерні мікрочастинки або клітинні агрегати. Вибір матеріалів для 3D-біодруку є важливим етапом, і біополімери мають бути біосумісними та біорозкладними. Композитні біополімери мають зручні властивості для 3D-біодруку.

Інтерволоконна відстань понад 10 мкм демонструє надмірне проникнення клітин на початковому етапі, тоді як відстань 5–10 мкм забезпечує кращу організацію клітин, формування бар'єру та життєздатність клітин.

Судинна тканина

Судинні тканини транспортують кров, кисень, поживні речовини та відходи по всьому тілу. Артерії, вени та капіляри мають специфічну морфологію та функції. Відновлення судин є важливим як саме по собі, так і як складова частина інших тканинних конструкцій, оскільки кровопостачання є ключовим для життєздатності великих трансплантатів. Створення функціональних кровонесних судин за допомогою біодруку є головною метою у тканинній інженерії.

Для створення судинних структур використовуються різні біопринтери та біочорнила. Часто використовують клітини ендотелію, гладенькі м'язові клітини та фібробласти. Біочорнила зазвичай виготовляють на основі желатину, колагену, фібрину, гіалуронової кислоти або їх комбінацій.

Gao та співавт. створили тришарові кровонесні судини, що складаються з ендотеліальних клітин (внутрішній шар), гладеньких м'язових клітин (середній шар) і фібробластів (зовнішній шар). Вони використовували коаксіальний екструзійний біопринтер для формування трубчастих структур. Конструкції підтримували проліферацію клітин, а гістологія показала правильну стратифікацію та фенотипічну стабільність.

У роботі Kolesky та співавт. було надруковано васкуляризовані тканини, які включали внутрішні порожнисті канали, заселені ендотеліальними клітинами. Вони використовували багатоекструзійний біопринтер і багатокомпонентне біочорнило для формування складних архітектур. Після культивування клітини утворили ендотеліальну вистілку і зберігали життєздатність у товстих тканинах (>1 см).

Для клінічного застосування надзвичайно важливою є механічна стабільність. Zhang та співавт. створили трубчасті конструкції з механічними властивостями, схожими на природні судини. Вони використовували комбінацію PCL (полікапролактон) як каркасного матеріалу та гідрогелю з клітинами для забезпечення біосумісності.

Біодруковані судини також застосовують для моделювання захворювань. Наприклад, під час моделювання атеросклерозу біодруковані судини інкубують з окисненим ЛПНЩ для викликання запалення. Це дозволяє досліджувати динаміку захворювання та тестувати терапію.

Нервова тканина

У сфері регенерації нервової тканини 3D-біодрук має величезні перспективи. Патман і його колеги застосували мікро-SLA-технологію для виготовлення фотополімерної смоли на основі ПЕГ. Пристрій має зручні властивості у використанні та проявляє властивості автотрансплантата у мишей *thy-1-YFP-H* через 21 день після імплантації. Розрив у нервовій тканині миші становив 3 мм. Біосумісний провідник — клітинний нервовий трансплантат — був розроблений за допомогою технології біодруку і імплантований з МСК. Для створення клітинних циліндрів, оточених колагеновими трубками, були використані мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) та шваннівські клітини (ШК). Нервовий трансплантат був вставлений у модель щура на 40 тижнів, і було виміряно регенерацію аксонів.

Чжу та ін. повідомили про відновлення пошкоджень шляхом створення нанобіочорнила. Метод 3D-біодруку з використанням SLA дозволив створити нейронний каркас, що складався зі стовбурових клітин, графенових нанопластинок і GelMA. Вища концентрація сформованого гідрогелю демонструвала високий модуль пружності на стиск. Завдяки відмінній життєздатності клітин і біосумісності GelMA було створено відповідне середовище для росту стовбурових клітин.

Скелетна м'язова та хрящова тканина

Дослідники створюють скелетні м'язові тканини, використовуючи методи 3D-біодруку. Costantini та ін. повідомили про скелетні м'язові тканини, сформовані з фотополімерного кополімеру ПЕГ-фібриногену з інкапсульованими клітинами C2C12. Високий ступінь вирівнювання клітин C2C12 у напрямку біополімеру ПЕГ-фібриногену демонстрував вищу саркомерогенезу. Ім-

плантація розробленого гідрогелю в мишей SIDC показала регенерацію м'язової тканини та розвиток міотубів через 28 днів після введення. Метод SLA, що реалізується шар за шаром, був застосований для створення штучного м'яза. Було представлено фоточутливий комерційно доступний матеріал з роздільною здатністю до 37 мкм у горизонтальній площині. Вимірювання на розтяг, поведінка при навантаженні та реологічні дослідження показали великі амплітуди актуації створеного пристрою.

Choїта співавт. виготовили біочорнило, використовуючи децелюляризований матрикс скелетного м'яза (mdECM), для регенерації скелетного м'яза за допомогою технології 3D-друку клітин. Втрату м'язової маси понад 20% називають об'ємною втратою м'язів (VML) — це тип незворотного м'язового ушкодження. Використовуючи технологію 3D-друку клітин, було створено децелюляризований матрикс (dECM), який застосовували для лікування VML.

Біоінженерну імплантовану скелетну м'язову тканину було створено з первинних м'язових прогеніторних клітин людини (hMPCS) за допомогою 3D-біодруку. Створена тканина продемонструвала високорівневу багат шарову м'язову структуру, утворену вирівняними, щільно упакованими утвореннями, подібними до м'язових волокон, що забезпечило 82% функціонального відновлення у випадку дефекту переднього великогомілкового м'яза через 8 тижнів після імплантації.

Кісткова тканина

Кісткова тканина має складну структуру, що включає неорганічний мінеральний компонент (переважно гідроксиапатит), органічний матрикс (головним чином колаген типу I) і клітини (остеоцити, остеобласти, остеокласти). Біодрукована кісткова тканина повинна відтворювати механічну міцність, біохімічну мікрооточення і сприяти остеогенезу.

Гідроксиапатит (НА) є основним компонентом біочорнил для кісткової тканини, оскільки він забезпечує остеоіндуктивність і схожість з природною

кісткою. Його часто поєднують з природними полімерними гідрогелями (наприклад, желатином, альгінатом, колагеном) для забезпечення формоутворення і підтримки клітин.

Наприклад, Хи та співавт. надрукували композитні конструкції з желатину, альгінату та наногідроксиапатиту, заселені мезенхімальними стовбуровими клітинами (MSC). Після культивування в остеогенному середовищі клітини диференціювались в остеобласти і продукували кальцифікований матрикс.

Лі та співавт. використали 3D біодрук для створення макропористих структур з біочорнила на основі гіалуронової кислоти і фосфату кальцію. Конструкції демонстрували високу пористість, сприяли міграції клітин і васкуляризації. Імплантація *in vivo* показала формування нової кісткової тканини і злиття з навколишніми тканинами.

Щоб досягти необхідної механічної міцності, часто використовують комбінований підхід: PCL (полікапролактон) або інші термопластичні полімери друкують як каркасну сітку, що заповнюється клітинним біочорнилом. Такий підхід дозволяє отримати структури, які витримують навантаження і при цьому біоактивні.

Для регенерації кістки в клінічних умовах біодруковані конструкції можуть застосовуватися для заповнення дефектів, викликаних травмами, пухлинами або хірургічним видаленням. Біодрук дозволяє створити імплантати, адаптовані до форми і розміру конкретного пацієнта (пацієнт-специфічні імплантати).

Хрящ — це спеціалізована сполучна тканина, що складається переважно з хондроцитів, занурених у щільний позаклітинний матрикс, з високим вмістом колагену типу II та агрекану. Він не має кровоносних судин, тому отримує поживні речовини шляхом дифузії. Біодрук хрящової тканини потребує створення структур, які підтримують фенотип хондроцитів і сприяють формуванню хрящового матриксу.

Гідрогелі широко використовуються як біочорнила для хрящової тканини через їхню подібність до природного матриксу. Особливо перспективними є гіалуронова кислота, агароза, колаген і желатин-метакрилоїл (GelMA), які можуть бути функціоналізовані для сприяння хондрогенезу.

Наприклад, Daly та співавт. надрукували хондрогенну конструкцію з використанням GelMA і хондроцитів. Після культивування *in vitro* спостерігалося формування хрящоподібного матриксу з вираженим накопиченням глікозаміногліканів і колагену II типу (рис. 1.4).

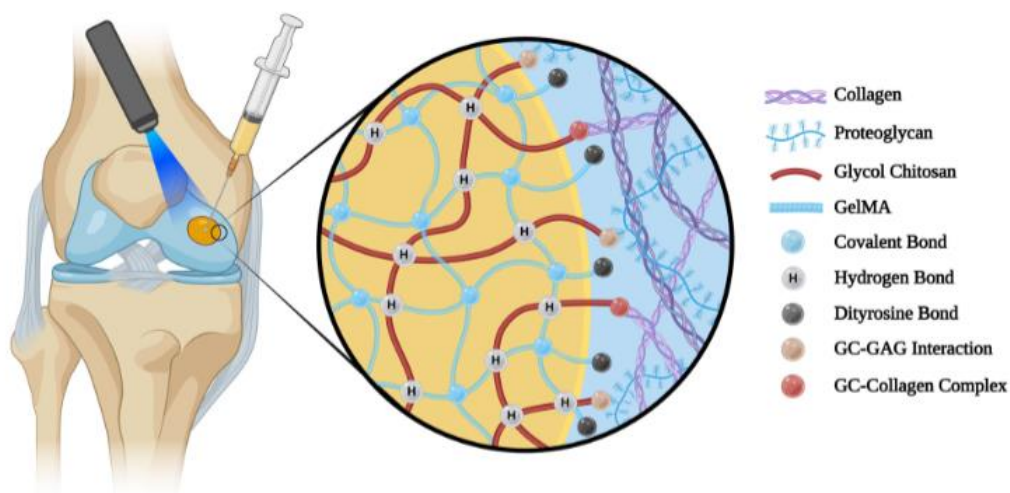


Рис. 1.4. Схематична ілюстрація механізмів адгезії зшитих гідрогелів GelMA-GC Ru/SPS з нативним хрящем.

Інший підхід передбачає використання мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), які індуковано диференціюються у хондроцити в 3D-біодруківаному середовищі. Наприклад, Markstedt та співавт. створили біочорнила на основі наноцелюлози і альгінату, які після заселення MSC і культивування в хондрогенному середовищі стимулювали формування хрящової тканини.

У клінічному контексті 3D-біодрук хряща може бути використаний для лікування суглобових ушкоджень (наприклад, у колінному або кульшовому суглобі), реконструкції вушного або носового хряща після травм або хірургічних втручань. Пацієнт-специфічні хрящові імпланти можуть бути створені на основі зображень МРТ або КТ, забезпечуючи точну відповідність анатомії.

Узагальнення інформації щодо досягнень 3D біодруку у регенеративній медицині наведена у табл.1.1.

Таблиця 1.1.

Основні дослідження біопринтингу для регенеративної медицини

Орган/тканина	Метод біодруку	Опис технології	Конкретне досягнення
1	2	3	4
Серце та кардіальний пластик	Мікроекструзійний 3D-біодрук (принтер regenHU, Швейцарія)	Клітини з біоптату сальникової тканини були перепрограмовані в плюрипотентні стовбурові клітини та диференційовані в кардіоміоцити й ендотеліальні клітини. Матрикс перетворено в гідрогель, у якому вміщені обидва типи клітин для створення тканин серця та судин.	Біочорнила з клітин пацієнта мінімізують імунну відповідь. Продемонстровано можливість друку клітинного людського серця з природною архітектурою.
Кровоносні судини (шунти)	Мікроекструзійний 3D-біодрук	Застосовано PCL, хітозан, гідрогелі (альгінат, гіалуронова кислота) і колаген I типу для створення біоактивної матриці.	Використано ендотеліальну клітинну лінію HUVEC.
	Власноруч зібраний мікроекструзійний 3D-принтер	Альгінат-желатиновий біочорнильний розчин нанесено за допомогою обертового пристрою.	Побудовано теоретичну модель, але товщину судини краще контролювати параметрами друку.
Серцеві клапани	Мікроекструзійний 3D-біодрук на платформі Fab@Home™	Гібридні гідрогелі Me-NA та Me-Gel з hAVIC-клітинами.	Клітини залишались життєздатними, зберігаючи фенотип після друку, і синтезували колаген та глікозаміноглікани.

Продовження табл. 1.1

1	2	3	4
Кісткова тканина	Непрямий 3D-друк (Z-printer 310)	Використано ВСП, НА, β -ТСР для створення каркаса.	Підсадка остеобластів або ВМР-2 стимулювала формування кістки у щурів.
	Інтегрований принтер ІТОР	Гідрогелі з клітинами та біодеградуючі полімери для тканин (кістка, хрящ, м'яз).	Виготовлено тканини з мікроканалами для живлення клітин.
	Екструзійний друк з GelMA-гідрогелями	Створено градієнт васкулогенних факторів, біодрукowana структура з судинним просвітом.	Отримано тканину з функціональним судинним просвітом.
	Мікроекструзійний біодрук	Пористий гідроксиапатитний каркас з остеобластами.	Повна остеointegraція з тканинами кролика за 4–8 тижнів.
	Direct ink writing (сопло 600 мкм)	Створено скло-керамічний каркас із гексагональними порами.	Механічна міцність перевищила в 5 разів відомі значення для керамічних матеріалів.
	DLP-біодрук (цифрова лазерна обробка)	Каркас, що імітує гаверсову структуру кістки, з потенціалом для остеогенної, ангіогенної та нейрогенної диференціації <i>in vitro</i> , сприяв неоангіогенезу та формуванню нової кістки <i>in vivo</i>	Ефективна доставка остеогенних, ангіогенних і нейрогенних клітин, підтверджено остеогенез та ангіогенез

Продовження табл. 1.1

1	2	3	4
Хрящ	Модифікований струменевий принтер HP Deskjet 500 (фотополімеризація)	Поліетиленгліколь диметакрилат (PEGDMA) з хондроцитами людини для відновлення хрящових дефектів (тривимірний біопапір) пошарово	Підвищене відкладання протеогліканів на межі між біоматеріалом і природним хрящем
	Гібридна система біодруку та електропрядіння	Чергування електропрядіння PCL-волокон з біодруком хондроцитів кроля у фібрин-колагеновому гідрогелі; створено 5-шарову тканину товщиною 1 мм	80% життєздатності хондроцитів збережено протягом тижня після друку
Шкіра	8 електромеханічних дозаторів на 3-осьовій високоточній платформі	Одночасний друк кератиноцитів, фібробластів і колагену для формування епідермісу, дерми та дермального матриксу; культивування в занурених умовах з подальшою експозицією до повітря-рідина	Морфологія надрукованої шкіри максимально наближена до шкіри людини <i>in vivo</i>
	4D-біодрук (Organ Regenerator 4D)	ЕСМ, отриманий із наножиру (містить білки, фактори росту, цитокіни), надрукований у формі мембрани на рану	Повне загоєння хронічної рани протягом 2–5 тижнів

Продовження табл. 1.1

1	2	3	4
	Лазерний біодрук	Фібробласти і кератиноцити у колагені надруковані як мультиклітинні трансплантати, що імітують архітектуру тканини	Успішне формування міжклітинних з'єднань і контактів
	Пневматичний мікроекструзійний 3D-біодрук	Багатошаровий васкуляризований шкірний трансплантат: дерма з фібробластів, ендотеліальних клітин і перицитів; епідерміс з кератиноцитів	Людські судинні структури з'єдналися із судинами миші та перфузувалися через 4 тижні
	Екструзійний 3D-біодрук	Повноцінна модель людської шкіри з морфологією епідермальних гребенів, збережено архітектоніку та функції	Відтворено епідермально-дермальне з'єднання
Вухо	3D-біодрук на основі DNP (цифрова ближня ІЧ-фотополімеризація)	Нерозривна полімеризація мономерів в місці ін'єкції біочорнил для формування конструкцій in situ	Створено тканини у формі вуха з хондрогенезом і відновленням м'язової тканини
	Каркас із PCL + волокна PGA та покриття з PLA; хондроцити з мікротії	Пацієнтоспецифічний каркас, засіяний клітинами мікротії; застосовано різні хірургічні методики	Формування зрілої хрящової тканини протягом 2,5 років у 5 пацієнтів

Продовження табл. 1.1

1	2	3	4
Печінка	Індивідуально сконструйований 3D-біопринтер	Гепатоцити утворювали моношар, взаємодіючи з галактозилізованим альгінатним гелем (GA-гель) через рецептори ASGPR	Керування поляриністю клітин за допомогою галактозилізованих гідрогелів
	Мікроекструзійний 3D-біодрук	Первинні гепатоцити з МСК для підтримки функції та виживаності в 3D-структурах	Вища життєздатність клітин у 3D-моделі порівняно з 2D
Діафрагма	Біопринтер Regenova® Біо-3D з використанням лише клітин (метод Кензан)	Безкаркасні тканинні пластини, що складаються виключно з людських клітин, надруковані у 3D з високою еластичністю і міцністю. Отримані тканини вирізаються у вигляді патчів і імплантуються щурам з хірургічно створеними дефектами діафрагми	Повна інтеграція трансплантата з власною тканиною. Регенерація м'язів, неоваскуляризація та утворення нейронних мереж у відновленій діафрагмі. Щури вижили протягом 710 днів після імплантації

Висновки до розділу 1

3D-біодрук — це новітня технологія, яка стрімко розвивається завдяки постійним технічним досягненням у різних галузях.

Його універсальність дозволяє наблизитися до ще не вивчених і не вирішених медичних проблем, а тривимірна структура конструкцій є надзвичайно важливою для ефективного вирішення цих проблем.

Аналіз літератури показав широту застосування 3D-біодруку у біомедицині. Завдяки цій технології вдалося створити штучні артерії для органів, а також вона використовується як для *in vivo*, так і для *in vitro* досліджень у кількох біомедичних сферах.

Хоча масштаб і функціональні можливості 3D-друкованих конструкцій щоденно зростають, створення складних тканинних конструкцій із високими фізіологічними вимогами залишається складним завданням. Щоб подолати ці виклики, необхідно продовжувати вдосконалення з метою масштабування технології.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Біочорнила: властивості та вимоги до них

Розробка друкованих біоматеріалів, відомих як біочорнила, є ключовою для технології 3D-біодруку, але залишається складним завданням, що гальмує її прогрес. Ідеальні біочорнила повинні відповідати фізичним (в'язкість, структурна міцність, здатність до друку, деградація, функціональність) і біологічним (цитосумісність, біосумісність, біоактивність) вимогам, щоб забезпечити клітинну поведінку, подібну до *in vivo*, включаючи проліферацію, диференціацію, міграцію та дозрівання. В'язкість є критичним параметром, який потребує оптимізації для регулювання потоку біочорнила, ефективності інкапсуляції клітин і стабільності тканинної структури.

Біочорнила — це розчини біоматеріалів (наприклад, гідрогелів) або їх суміші, які інкапсулюють клітини під час друку для створення тканинних конструкцій. Вони складаються з природних (колаген, желатин, альгінат, фібрин, гіалуронова кислота), синтетичних (поліетиленгліколь, полівініловий спирт, полімолочна кислота) або гібридних матеріалів. Гідрогелі є перспективними завдяки біосумісності, низькій цитотоксичності, гідрофільності та здатності формувати мережі полімерів, подібні до позаклітинного матриксу (ECM).

Критерії вибору матеріалів

Вибір матеріалів для біодруку залежить від їхньої здатності створювати складні біологічні моделі з заданими властивостями. Традиційні технології друку (для металів, кераміки, термопластиків) використовують органічні розчинники та високі температури, непридатні для біоматеріалів і живих клітин. Біочорнила для медичних цілей включають природні (альгінат, желатин, колаген, хітозан, шовк, фібриноген, агар) і синтетичні (ABS, PLA, PGA, PLGA, поліуретани, поліаміди) полімери. Природні полімери імітують ECM і мають біоактивність, тоді як синтетичні дозволяють модифікацію для специфічних завдань, але можуть мати обмежену біосумісність і токсичні продукти розпаду.

Біочорнила повинні забезпечувати коротко- та довготривалу стабільність, підтримуючи архітектуру тканини (пори, канали, мережі) і біосумісність на всіх етапах друку. Фізико-хімічні властивості включають:

- Механічні: стійкість, еластичність.
- Біологічні: біосумісність, імітація природного середовища.
- Реологічні: в'язкість, текучість.
- Хімічні: стабільність, взаємодія з компонентами.

Ці властивості забезпечують точність форми, біоактивність, контрольоване гелеутворення, можливість хімічної модифікації та масштабне виробництво з мінімальними відхиленнями.

Придатність до друку (Printability)

Придатність до друку відображає здатність біочорнила формувати задану 3D-структуру. Вона залежить від типу принтера (струменевий, мікроекструзійний, лазерний) і властивостей матеріалу (в'язкість, поверхневий натяг). Наприклад, струменеві принтери обмежені в'язкістю, а мікроекструзія вимагає тиксотропних властивостей і зшивання. Зшивання (хімічне, фотохімічне, термічне) формує стабільний каркас, що підтримує клітинну інтеграцію. Життєздатність клітин після друку залежить від типу принтера, роздільної здатності та матеріалу, досягаючи понад 85% у лазерному та струменевому друці та 40–80% у мікроекструзії.

Біосумісність (Biocompatibility)

Біосумісний матеріал не викликає запальних, імунних чи токсичних реакцій, підтримує функціонування клітин і допускає хімічну модифікацію. Проміжні продукти деградації мають бути нетоксичними та легко виводитися. Наприклад, полі(молочна кислота) (PLA) використовується для реконструктивних операцій.

Кінетика розпаду та побічні продукти (Degradation kinetics and byproducts)

Біочорнила повинні розпадатися безпечно, узгоджуючи деградацію з фо-

рмуванням нової тканини. Клітини синтезують власний ЕСМ, а продукти розпаду мають бути біосумісними, нетоксичними та метаболізуватися. Швидкість деградації залежить від типу полімеру та умов середовища.

Структурні та механічні властивості

Матеріали повинні імітувати механічні характеристики природних тканин (пружність, міцність). Жертовні матеріали тимчасово підтримують структуру, деградує після виконання функції. Наприклад, вуглеводневе скло/еластомер використовується для друку м'яких еластомерів, а міцність на розтяг важлива для кісткових структур.

Біоміметичність матеріалів (Material Biomimicry)

Біоміметика передбачає створення конструкцій, що імітують природні тканини та органи. Це включає моделювання клітинних і позаклітинних компонентів із урахуванням анатомічної структури, наприклад, судинного дерева для нейронних систем. Точна композиція матеріалів і технологія друку впливають на реалістичність моделей.

Узагальнення властивостей біочорнил наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

Властивості біочорнил, які використовуються при 3D біодруці

Властивість	Опис	Деталі та приклади	Значення для біодруку
В'язкість	Регулює потік біочорнила, інкапсуляцію клітин і стабільність структури.	Потребує оптимізації залежно від техніки друку (струменевий, мікроекструзійний).	Забезпечує точність друку та стабільність конструкції.
Гелеутворення	Формування твердої структури після екструзії: іонне, термічне, фотозшивання, ферментативне.	Швидке, нетоксичне. Приклад: Іонне зшивання для альгілату, фотозшивання для PEG.	Підтримує роздільну здатність і життєздатність клітин.
Механічні властивості	Еластичність, зсувне розрідження, міцність впливають на клітинну поведінку.	Низький модуль пружності: нейронна дифе-	Імітують природні тканини, ре-

		ренціяція. Жорсткі матриці: остеогенна диференціяція.	гулюють морфологію та проліферацію клітин.
Біосумісність	Гідрофільність, клітинно-адгезивні сайти для виживання та проліферації клітин.	Природні матеріали (колаген, желатин) мають високу біосумісність, синтетичні потребують модифікації.	Сприяє інтеграції клітин без токсичних реакцій.
Біоактивність	Стимуляція клітинних реакцій (проліферація, диференціяція) через біоактивні молекули.	Фактори росту, пептиди, молекули ЕСМ.	Підтримує формування функціональної тканини.
Деградація	Контрольована швидкість розпаду, узгоджена з формуванням тканини.	Занадто швидка деградація: недостатня підтримка. Повільна: перешкоджає ремоделюванню.	Забезпечує безпечне заміщення каркаса новою тканиною.

Як біочорнила використовуються різноманітні природні та синтетичні біоматеріали (див. табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Характеристика полімерів, які використовуються як біочорнила

Полімер	Хімічна характеристика	Переваги	Недоліки
Желатин	Частково деградований продукт колагену	Відмінна біосумісність	Нестабільний розчин за кімнатної температури, швидка швидкість деградації, погані механічні властивості
Альгінат	Лінійний аніонний полісахаридний кополімер	Багате джерело, низька ціна, хороші гідрофільні властивості, легко формує проникні мережі	Мало сайтів прикріплення клітин і швидка швидкість деградації

Фібрин	Продукт полімеризації фібриногену	Відмінна біосумісність і біодеградація	Погана довгострокова стабільність і механічна міцність
Гіалуронові кислота	Лінійний полісахарид високої молярної маси	Не викликає алергії та запалення	Швидка швидкість деградації та погані механічні властивості
Колаген	Вид білка, що складається з трьох переплетених поліпептидних ланцюгів, з'єднаних водневими та ковалентними зв'язками	Імуногенність <i>in vivo</i> , хороша клітинна сумісність	Погані механічні властивості
Шовковий фіброїн	Природний білок від комах	Хороша біосумісність і механічні властивості	Повільна швидкість деградації
Хітозан	Отримується шляхом деацетилювання хітину	Хороша біосумісність, біодеградація, здатність до клітинної адгезії, низька вартість	Погана механічна міцність, нестабільний гелевий стан
Агароза	Лінійний полісахарид	Повільна швидкість деградації, низька вартість, хороші механічні властивості після гелеутворення	Погана клітинна сумісність

2.2 Характеристика біоматеріалів, що використовуються у 3D-біодруці

Желатин

Желатин отримують із колагену шляхом часткового гідролізу та неповного розщеплення його молекул. Водний розчин желатину є гідроколоїдом із високою температурою замерзання, високою швидкістю деградації, низькою міцністю гелю та обмеженими механічними властивостями. Як природний полімер, желатин має численні переваги для 3D-друку органів, зокрема високу біосумісність, здатність до фізичного гелеутворення та низьку вартість.

Желатин можна використовувати для друку в комбінації з іншими природними полімерами, такими як хітозан, альгінат, фібриноген і гіалуронова кислота. Для стабілізації 3D-конструкцій на основі желатину під час або після друку застосовують різні стратегії хімічного зшивання (рис. 2.1).

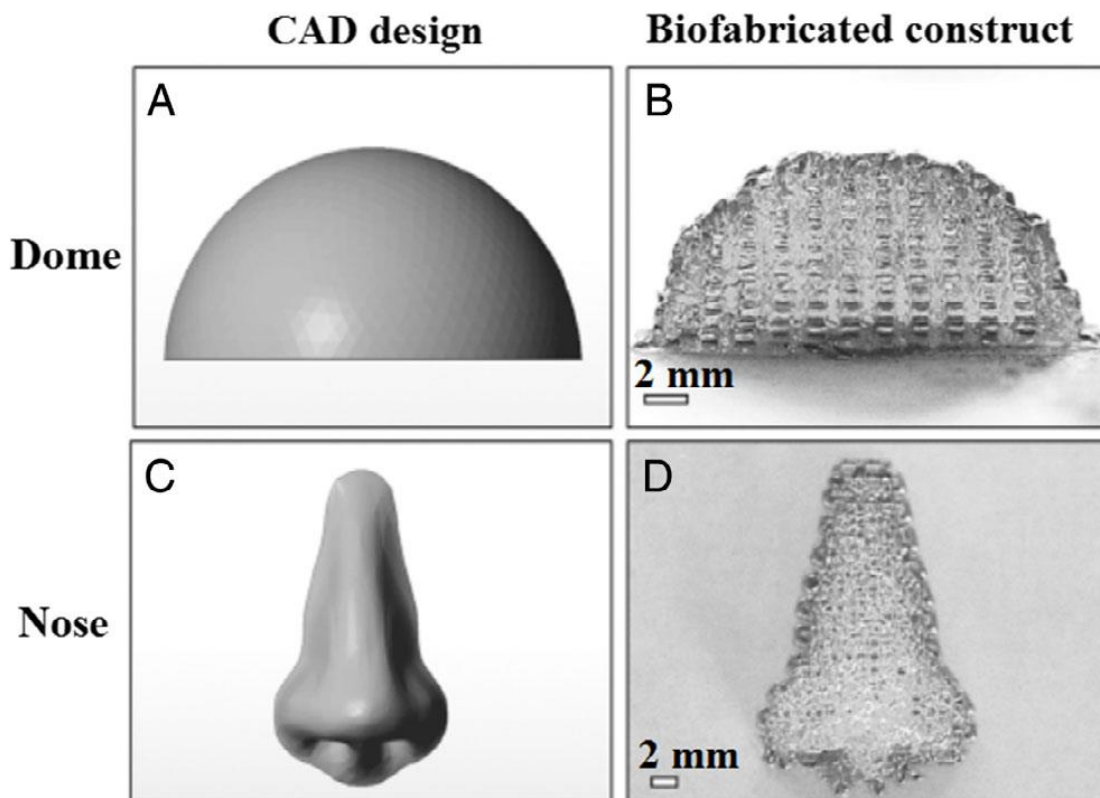


Рис. 2.1. Фотозшита біофабрикація біочорнила на основі метакрилоїлу желатину/колагену:

- А. купольна структура згідно з комп'ютерною CAD-моделлю.
- В. поперечний зріз біонадрукованої купольної структури
- С. комп'ютерна CAD-модель структури носа
- Д. біонадрукована структура носа.

Джерело: K. S. Lim, B. S. Schon, N. V. Mekhileri, G. C. J. Brown, C. M. Chia, S. Prabakar, G. J. Hooper, T. B. F. Woodfield, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2016, 2, 1752

Завдяки високій біосумісності та біодеградабельності похідна желатину, відома як желатин-метакрилоїл (GelMA), широко застосовується для 3D-друку тканин серця, хряща, нервів та інших структур.

Альгінат

Альгінат зазвичай отримують із бурих водоростей (*Phaeophyceae*), зокрема ламінарії, *Ascophyllum* та *Macrocystis*. Розчин альгінату є поліаніоном і виявляє певну чутливість до рН. Зі зростанням рН підвищується гідрофільність розчину, тоді як зниження рН зменшує цю властивість. Гідрогель натрію альгінату характеризується високою біосумісністю, значною здатністю до гелеутворення, низькою токсичністю, доступною вартістю та широким розмаїттям джерел, що зумовлює його широке застосування як природного полімеру в 3D-друку органів.

Молекула натрію альгінату зазвичай складається з трьох ділянок: "М-область" (багата маннуриновою кислотою), "G-область" (багата гулуриновою кислотою) та "MG-область" (яка містить як маннуринову, так і гулуринову кислоти). Розчин альгінату має важливу особливість — здатність до хімічного зшивання за участі двовалентних катіонів, таких як кальцій (Ca^{2+}), стронцій (Sr^{2+}) та барій (Ba^{2+}). Зшиті гідрогелі знаходять застосування в численних біомедичних галузях, зокрема в загоєнні ран, доставці ліків та регенеративній медицині.

Іони Na^+ у G-блоках можуть обмінюватися на двовалентні катіони, наприклад Ca^{2+} , що призводить до значного накопичення G-блоків і формування тривимірної мережі, яка швидко перетворюється на гідрогель. Основні методи підготовки гідрогелю натрію альгінату включають фізичне, хімічне та ферментативне зшивання. Важливо зазначити, що хімічне зшивання альгінатових молекул за допомогою Ca^{2+} є оборотним. У разі занурення 3D-друкованої конструкції в рідину з низьким або відсутнім вмістом Ca^{2+} зшиті Ca^{2+} поступово розчиняються протягом приблизно одного тижня.

Як природний полімер, молекули альгінату мають обмежену кількість сайтів для прикріплення клітин, що робить їх менш придатними для росту та проліферації клітин у чистому вигляді. Тому альгінат часто комбінують із іншими природними полімерами, такими як желатин і фібрин. У 3D-друку органів властивості друкованих конструкцій зазвичай коригують, щоб відповідати

специфічним вимогам щодо вологозатримувальної здатності, швидкості деградації, стабільності та механічних характеристик (наприклад, жорсткості).

Nedunchezian зі співавторами поєднали два етапи зшивання з 3DBP для створення гібридної HA-основної конструкції з адипозопохідними стовбуровими клітинами (ADSCs) для відновлення хряща (див. рис. 2.2). Розроблена конструкція продемонструвала належну біосумісність і підвищені хондроіндуктивні властивості. Стратегія 3D-біодруку з подвійними етапами зшивання: перший етап зшивання передбачав часткове зшивання гідрогелю HA–ADH–біотин–стрептавідин (HBS), а HBS, змішаний з альгінатом натрію, використовувався як гібридні біочорнило (HBSA) для другого, іонного етапу зшивання з іонами Ca^{2+} . Після друку 3D-конструкції з HBSA занурювали в розчин CaCl_2 для досягнення іонного зшивання з утворенням гідрогелю HBSAC шляхом іонного обміну

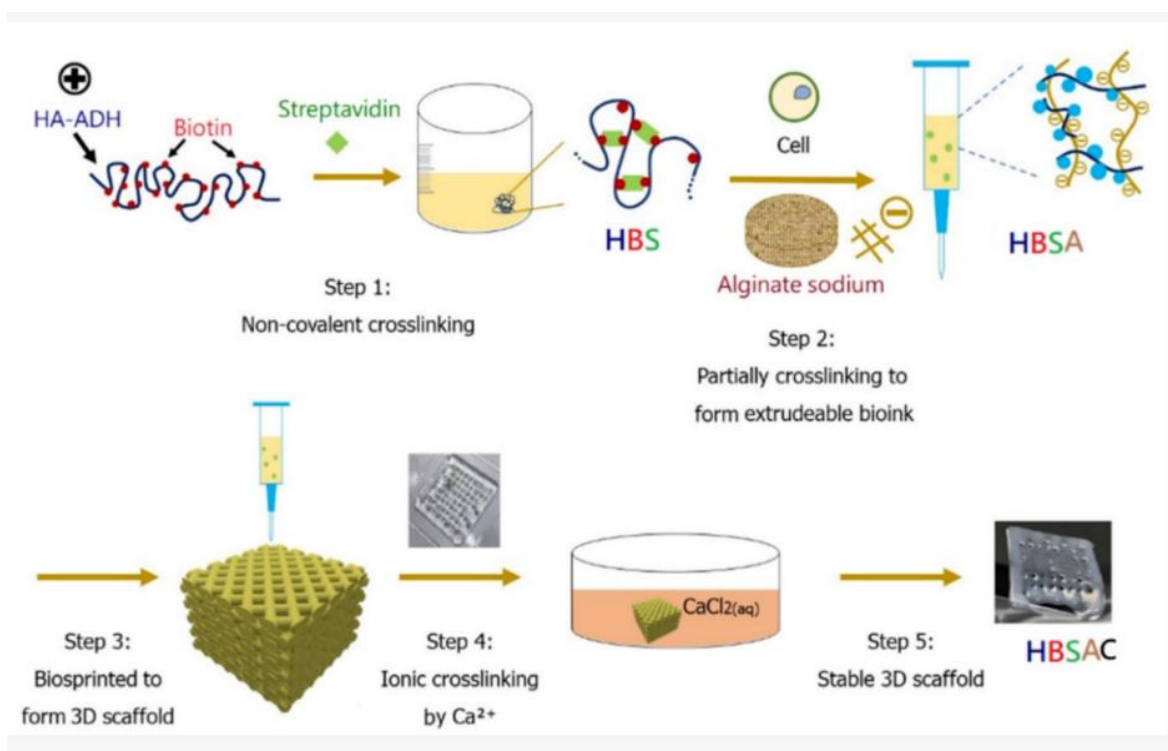


Рис. 2.2 Стратегія 3D-біодруку з подвійними етапами зшивання

Фібрин

Молекула фібриногену складається з двох наборів альфа-, бета- та гамма-ланцюгів, сполучених дисульфідними зв'язками. Кожна молекула містить два зовнішні D-домени, з'єднані з центральним E-доменом через сегмент спіральної котушки. Фібрин утворюється внаслідок відщеплення тромбіном фібринопептиду А від ланцюга А фібриногену, що запускає його полімеризацію. Фібрин характеризується винятковою біосумісністю та біодеградацією. Гель фібрину є нетоксичним і не викликає імунного відторгнення, що зумовлює його широке застосування в 3D-друку печінки та серця.

Фібрин використовували для друку органів у комбінації з іншими природними та синтетичними полімерами. Деякі дослідники застосували багаторозпилювальний 3D-принтер для створення гідрогелевих каркасів на основі желатину, альгінату та фібриногену, розробивши модель стовбурових клітин гліоми для 3D-біологічного друку. Темп виживання стовбурових клітин гліоми в каркасах становив 86,92%, а клітини демонстрували високу життєздатність і потенціал диференціації в цих гідрогелях. Одна з команд використала фібрин як біочорнила та екструзійний біологічний 3D-принтер для друку фібринових каркасів із людськими фібробластами, після чого інокулювали кератиноцити для отримання двошарового людського шкірного покриву. Гістологічні аналізи показали, що структура та функція надрукованої шкіри подібні до природної людської шкіри, що підтверджує можливість використання фібриногену для друку штучної шкіри.

Хітозан

Хітозан є похідним хітіну, отриманим шляхом деацетилювання, і його хімічна назва — поліглюкозамін (1-4)-2-аміно- β -D-глюкоза. Хітозан вирізняється помірною біосумісністю, біодеградацією та нетоксичністю щодо клітин і тканин.

Дюкре та співавтори поєднали фібрин і хітозан для розробки ін'єкційного гідрогелю, щоб оцінити вплив хітозану на властивості гідрогелю фібрину та життєздатність і проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин зубної

пульпи (DP-MSCs). Дослідження засвідчили, що гідрогель фібрин-хітозан має виражену антибактеріальну активність і сприяє регенерації тканин зубної пульпи людини, підтримуючи стерильне середовище в просторі зубної пульпи.

Фібрин уперше використали для друку великих живих тканин у 2007 році. З того часу його застосовують для друку органів у поєднанні з іншими природними та синтетичними полімерами. Деякі дослідники використали багаторозпилювальний 3D-принтер для створення гідрогелевих каркасів на основі желатину, альгінату та фібриногену, розробивши модель стовбурових клітин гліоми для 3D-біологічного друку. Темп виживання стовбурових клітин гліоми в каркасах становив 86,92%, а клітини демонстрували високу життєздатність і потенціал диференціації в цих гідрогелях. Команда використала фібрин як біочорнила та екструзійний біологічний 3D-принтер для друку фібринових каркасів із людськими фібробластами, після чого інокулювали кератиноцити для отримання двошарового людського шкірного покриву. Гістологічні аналізи показали, що структура та функція надрукованої шкіри подібні до природної людської шкіри, що підтверджує можливість використання фібриногену для друку штучної шкіри.

Агароза

Агароза є лінійним полімером, основа якого становить чергування 1,3-з'єднаних β -D-галактоз і 1,4-з'єднаних 3,6-ангідро-L-галактоз у довгих ланцюгах. Агар-пектин являє собою гетерогенні суміш, що складається з багатьох дрібних молекул. Агарозу зазвичай розчиняють у воді при нагріванні вище 90 °C, утворюючи напівтвердий гель при охолодженні до температури 35–40 °C. Ця властивість є ключовою особливістю, яка визначає її широке застосування. Як природний полісахаридний матеріал, агароза характеризується не токсичністю для клітин, повільною швидкістю деградації, низькою вартістю та хорошими механічними властивостями після гелеутворення.

Агарозу широко застосовують у каркасах для відновлення твердої тканини, пов'язках на рани, системах доставки ліків та інших галузях. Сівашанкарі та співавтори застосували технологію сублімаційної сушки для створення 3D-пористого каркаса на основі агарози, хітозану та оксиду графіну (ACGO), оцінивши його фізичні, хімічні та біологічні властивості. З'єднані пори продемонстрували високу сумісність із кров'ю та здатність підтримувати проліферацію клітин Vero, що свідчить про потенційне використання композитного каркаса ACGO в тканиновій інженерії.

Синтетичні полімери

Синтетичні полімери — це штучно створені полімери з регульованими хімічними структурами та фізичними властивостями, які виробляються шляхом хімічних реакцій. Більшість синтетичних полімерів мають кращі механічні властивості, ніж природні полімери. Однак синтетичні полімери є біологічно інертними, і процес друку зазвичай передбачає використання органічних розчинників та/або токсичних активаторів, що може зменшувати біологічні ефекти активності клітин.

Таким чином, біологічно активні інгредієнти (такі як клітини та фактори росту) не можуть бути легко поєднані з синтетичними полімерами для 3D-друку. Оскільки більшість синтетичних полімерів можуть бути розкладені мікроорганізмами або біологічними рідинами в організмі [109,110], швидкість деградації може бути відрегульована для відповідності швидкості генерації конкретних тканин і органів. Зазвичай використовувані біодеградовані синтетичні полімери в 3D-друку включають полі (молочну кислоту) (PLA), полі (гліколеву кислоту) (PGA), полімолочно-гліколеву кислоту (PLGA), поліуретан (PU) та полікапролактон (PCL). У табл. 2.3 узагальнені деякі характеристики синтетичних полімерів, які використовують для 3D-друку органів.

Оскільки вони можуть витримувати внутрішню та зовнішню напругу процесу 3D-друку та стадії імплантації в організмі і мають хорошу механічну міцність, синтетичні полімери мають пріоритет у сфері 3D-друку твердих тка-

нин і органів. Для 3D-друку органів синтетичні полімери часто використовуються разом із природними полімерами. Особливо для великомасштабних ієрархічних структур, таких як шаруваті кровоносні судини, нервові тканини та лімфатичні мережі, синтетичні полімери віддають перевагу як обгортка, що огортає зовні природні полімери, насичені клітинами.

PLA

Як лінійний термопластичний аліфатичний поліестер, PLA в основному синтезується з крохмальної сировини шляхом сахарифікації, ферментації та інших хімічних реакцій. PLA має хорошу біосумісність і біодеградацію. Він може повністю розкладатися за певних умов. Кінцеві продукти метаболізму — вуглекислий газ і вода, які можуть бути виведені з організму. PLA має багато переваг у 3D-друку органів, таких як хороша термічна стабільність, стійкість до води/розчинників/бактерій, відмінний глянець, прозорість і вогнестійкість.

Оскільки 3D-друк може контролювати загальну геометрію та внутрішню структуру 3D-конструкцій, він став ключовим процесом для виробництва замінників твердих тканин і органів, таких як кістки та хрящі. Синтетичні полімери на основі PLA, таким чином, стали основним фокусом для розробки великорозмірних кісткових і хрящових каркасів. Гібридизація PLA з природними полімерами стала перспективним методом для виготовлення складних органів. Завдяки відмінним механічним властивостям, біосумісності та деградабельності PLA, він широко використовується у відповідних дослідженнях.

PLGA

PLGA є синтетичним сополімером (поліестером), отриманим із молочної кислоти (LA) та гліколевої кислоти (GA), який вирізняється відмінними фізичними, хімічними, термічними та механічними властивостями, що забезпечує його широке застосування. PLGA привертає значну увагу в сфері 3D-біодруку завдяки високій біосумісності, контрольованій біодеградації (яка за-

лежить від молекулярної маси та співвідношення компонентів) та затвердженню Управлінням із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) для клінічного використання в людини.

Таблиця 2.3

Узагальнена характеристики синтетичних полімерів, які використовують для 3D-друку органів

Полімер	Хімічна структура	Характеристики
PLA	Лінійний термопластичний алифатичний поліестер, головним чином отриманий зі сировини на основі крохмалю шляхом цукрування, ферментації та інших хімічних реакцій	Добра біосумісність і біодеградабельність, може повністю розкладатися за певних умов
PLGA	Синтетичний кополімер молочної (LA) та гліколевої (GA) кислот, синтезований шляхом кополімеризації з відкриттям циклу циклічного димеру (1,4-діоксан-2,5-діону), гліколевої та молочної кислот	Добра біосумісність і контрольована швидкість біодеградації
PU	Набір лінійних ланок ($-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$), з'єднаних олігодіолом (тобто м'який сегмент) і органічними (твердий сегмент) одиницями через карбаматні зв'язки	Контрольована швидкість розпаду і механічні властивості; може бути модифікований для отримання термочутливих властивостей
PCL	Полімеризація капролактонового мономеру шляхом відкриття циклу з каталізом комплексом метал-аніону	Добра біосумісність і біодеградабельність
Pluronic Acid	Сполука зі структурою полі(етиленоксид)-полі(пропіленоксид)-полі(етиленоксид) (PEO-PPO-PEO)	Легка в приготуванні, хороша клітинна афінність, термочутливість

Недостатня стійкість до швів 3D-друкованих васкуляризованих тканин і органів залишається ключовою перешкодою для розвитку їхнього виробництва. Якщо антишвові властивості недостатні, природний гідрогель, насичений клітинами, не може витримувати додаткове механічне навантаження.

Тап та співавт. представили метод екструзійного 3D-біодруку та мікросітчасті пористі каркаси на основі PLGA у вигляді мікросфер з порами,

що містили клітини, інкапсульовані в композитний гідрогель на основі колагену та агарози (див. рис. 2.3).

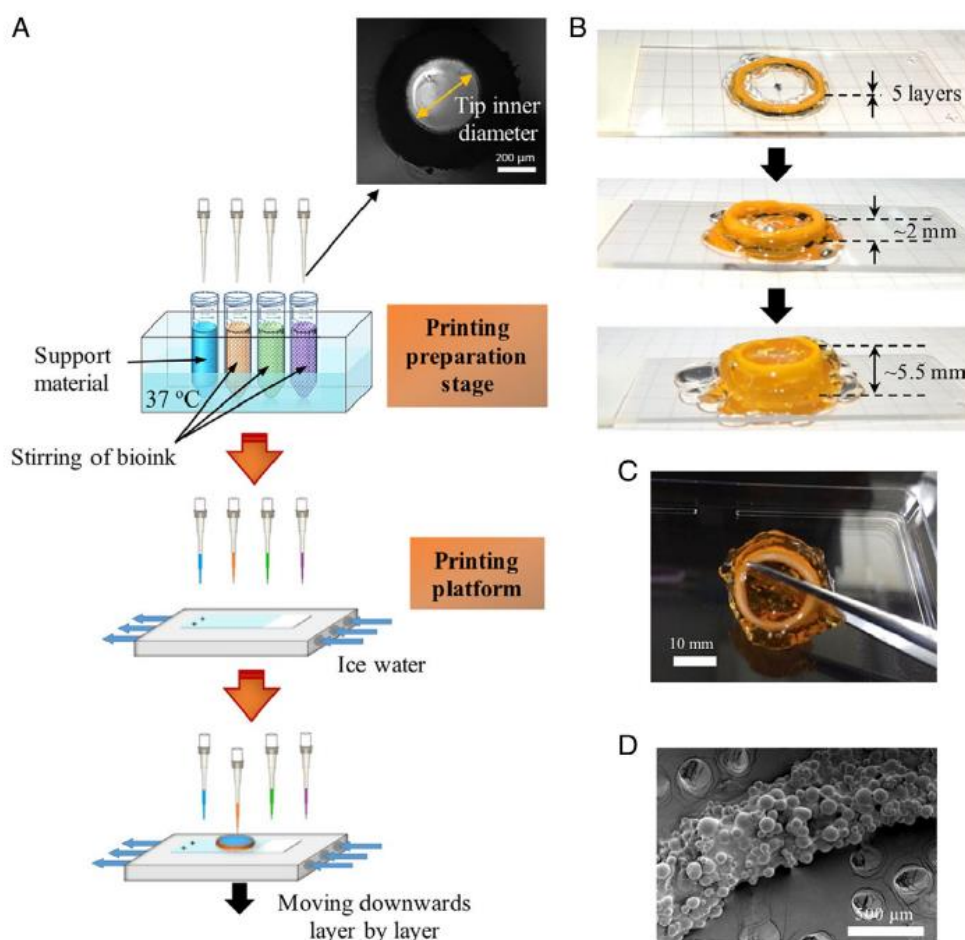


Рис. 2.3. Схематичне зображення автоматизованої системи біодруку:

A — загальна схема автоматизованої системи біодруку, яка включає:

I, II — етапи підготовки до друку з використанням нових контейнерів для мікропіпеток та біочорнил, що знаходяться в умовах постійного перемішування та контролю температури (37 °C);

III — друкована платформа з охолодженням льодяною водою;

IV — закрыта робоча камера, оснащена УФ-лампою, зволожувачем повітря та контейнером для відходів;

B, C — зображення 3D-друкованої трубчастої структури з використанням прозорого желатину як підтримуючого матеріалу;

D — зображення, отримане методом сканувальної електронної мікроскопії, яке демонструє щільно упаковані мікросфери у структурі.

До моменту друку пориста структура мікросфер забезпечувала адгезію клітин і їх проліферацію, тоді як колаген-агарозний гідрогель сприяв рівномір-

ному дозуванню мікросфер, що містять клітини, із швидкою геляцією конструкції під час процесу 3D-друку. Наявність колагенових волокон у складі композиту сприяла клітинній адгезії та розповсюдженню. У надрукованих 3D-конструкціях спостерігалася проліферація клітин, які залишалися життєздатними понад 14 діб. Було встановлено, що міцність на стиск конструкцій у 100 разів перевищувала аналогічний показник для чистого колаген-агарозного гідрогелю.

Поліуретан PU

Поліуретан (PU) належить до групи лінійних сегментних полімерів, які складаються з олігодіолів (м'яких сегментів) і органічних одиниць (жорстких сегментів), з'єднаних уретановими зв'язками ($-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$). PU може бути біодеградованим або не біодеградованим, причому дослідження деградації *in vitro* свідчать, що PU на основі поліетиленгліколю (PEG) деградує швидше, ніж на основі полікапролактону (PCL). Механічні властивості, зокрема розтяжність PU, визначаються переважно м'якими сегментами; відмінності в їхній структурі суттєво впливають на характеристики полімеру. Дослідження показали, що механічні властивості полімерів на основі PCL вищі. Акрилатні групи можуть слугувати сайтами для ультрафіолетового (UV) затвердіння, що інтегрують у термічний PU для 3D-друку клітин. Такі PU мають потенціал для широкого спектру біомедичних застосувань, зокрема виробництва органів.

Полі-ε-капролактон PCL

PCL, відомий також як полікапролактон, утворюється шляхом кільцево-відкритого полімеризації мономеру ε-капролактону під дією металевого аніонного комплексного каталізатора і є біодеградованим напівкристалічним поліестером. PCL є нетоксичним, нерозчинним у воді та легко розчинним у різних органічних розчинниках. Він характеризується високою біосумісністю та біодеградацією, що дозволяє повне розкладання протягом 6–12 місяців у природному середовищі. Окрім того, PCL має властивості пам'яті форми, які

залежать від температури: за умов нагрівання він демонструє хорошу в'язко-еластичність і реологічні характеристики, що робить його придатним для обробки технологією FDM у чотиривимірному (4D) друку.

Pluronic Acid (або Poloxamer)

Pluronic acid (полоксамер) — це триблоковий сополімер, що складається з одного гідрофобного сегмента полі(пропіленоксиду) (PPO) та двох гідрофільних сегментів полі(етиленоксиду) (PEO), розташованих у конфігурації PEO-PPO-PEO; його загальна формула: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_c\text{H}$.

Концентрований водний розчин полоксамеру утворює термореверсивні гідрогелі, які залишаються рідкими при кімнатній температурі та стають в'язкими при температурі тіла. Температура гелеутворення залежить від концентрації та структури (співвідношення PPO/PEO, довжини блоків PPO/PEO та загальної довжини полімерного ланцюга).

Pluronic acid вирізняється хорошою придатністю до друку, однак чинить негативний вплив на життєздатність клітин під час тривалих культур *in vitro*, тому його часто хімічно модифікують іншими полімерами для покращення структурних і механічних властивостей. Нещодавно дослідники поєднали поліксамер із желатином, використовуючи його відмінну реологічну поведінку під зсувним напруженням та еластичність для створення біосумісного гідрогелю для судинних каналів.

Мюллер та співавтори запропонували стратегію конструювання наноструктурованих гідрогелів Pluronic, що значно підвищує їхню біосумісність. Змішування акрилату з Pluronic F127 дозволяє зберігати придатність до друку та отримувати стабільну 3D-структуру через УФ-зшивання. Після друку неретрагований Pluronic видаляють із перехресної мережі шляхом елюції, а додавання метакрилатної гіалуронової кислоти (HAMA) покращує механічні властивості конструкцій. Деякі дослідники використовували 20% водний розчин Pluronic F127 для підготовки біофільмів [151]. Після змішування розчину

Pluronic, просоченого неоміцином, із допоміжними речовинами полівінілового спирту (PVA) (Povidon S630, PG) із відповідною концентрацією, отримана мембрана Pluronic, просочена неоміцином, пригнічувала ріст бактерій на агаровій пластинці завдяки тривалому вивільненню неоміцину. При імплантації цієї мембрани на місце опіку кролів вона діяла як матриця для вивільнення ліків із потенціалом для місцевого лікування опіків (Рис. 2.4).

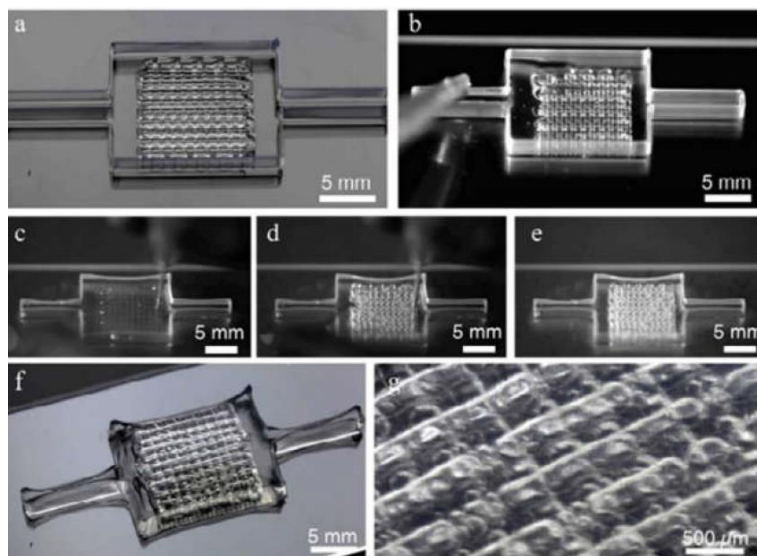


Рис. 2.4. Процес створення 3D-судинної мережі, вбудованої в матрицю GelMA:

- (a) Друк «летких» чорнил у формі 3D-судинної мережі всередині силіконових меж;
- (b) Заповнення надрукованої 3D-мережі «летких» чорнил позаклітинним матриксом (на зображенні — GelMA);
- (c–e) Процес видалення «летких» чорнил при 4 °C;
- (f, g) Зображення з вищим збільшенням евакуйованої 3D-судинної мережі

Kolesky, D.B.; Truby, R.L.; Gladman, A.S.; Busbee, T.A.; Homan, K.A.; Lewis, J.A. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. Adv. Mater. 2013, 25, 3124–3130.

РОЗДІЛ III

МЕТОДИ 3D БІОПРИНТИНГУ

3.1 Методи 3D друку

3D-біодрук — це міждисциплінарна технологія, що поєднує біоінженерію, матеріалознавство, клітинну біологію та комп'ютерне моделювання. Вона спрямована на створення тривимірних біологічних структур за допомогою пошарового друку клітин, біочорнил (bioinks), матриксів та факторів росту. На відміну від традиційних методів тканинної інженерії, 3D-біодрук дозволяє отримувати високоточні, повторювані та складні структури з точно контрольованими геометричними параметрами.

За останнє десятиліття технологія пройшла шлях від лабораторного прототипування до широкого застосування в регенеративній медицині — для створення штучної шкіри, кісткових імплантів, хрящових структур, а також у фармацевтиці — для розробки персоналізованих ліків і платформ для тестування препаратів. Водночас зростає інтерес до її використання у харчовій галузі, зокрема для виготовлення м'яса *in vitro*, молочних альтернатив і структурованих харчових продуктів.

3D-біодрук — це процес інтеграції живих клітин із біоматеріалами, що дозволяє контрольоване пошарове нанесення клітин/біочорнил із ієрархічними структурними властивостями, зберігаючи життєздатність клітин у 3D-просторі для створення складних, багатограних тканин. 3D-біодрук використовує кілька технологій, таких як тканинна інженерія, синтетична біологія, мікро/нанофабрикація та біопроцеси виробництва біоматеріалів.

In vitro клітини не можуть самостійно організуватися в 3D-структури, подібні до справжніх тканин *in vivo*. Для імітації структури та функцій живих тканин використовувалися різні техніки, такі як створення каркасів, культивування тканин, біореактори та самозбірка позаклітинного матриксу (ECM).

Однак сучасні стратегії тканинної інженерії не здатні створювати повністю функціональні тканини та відтворювати їхню гетероклітинну структуру.

3D-друк має три основні компоненти, аналогічні до традиційного друку на папері за Гутенбергом:

- 3D-модель для друку (аналог тексту),
- біочорнило (що містить клітини та інші біоактивні матеріали, аналогічно до чорнила)
- 3D-принтер, який наносить чорнило на підкладку або платформу для друку.

3D-біодрук забезпечує високий рівень контролю та точне позиціонування різних типів клітин завдяки прецизійному керуванню положенням сопла в X-Y-Z просторі, що дозволяє точно відтворювати мікроструктуру тканин/органів із високою архітектурною складністю.

Ринок 3D-біодруку швидко розширюється, і багато компаній зосереджені на цій новій технології, таких як Organovo Holdings, Inc. (США), CELLINK (Швеція), Allevi Inc. (США), Aspect Biosystems Ltd. (Канада), EnvisionTEC GmbH (Німеччина), Cyfuse Biomedical K.K. (Японія), Poietis (Франція), TeVido BioDevices (США), Nano3D Biosciences, Inc. (США), ROKIT Healthcare (Південна Корея), Digitalb, Inc. (США), regenHU (Швейцарія), GeSiM (Німеччина), Advanced Solutions Life Sciences (США), Regenovo Biotechnology Co., Ltd. (Китай), Hewlett-Packard (Пало-Альто, Каліфорнія, США), Novogen MMX Bioprinter (Organovo, Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США), 3D Bioplotter (EnvisionTEC, Гладбек, Німеччина), Oxford Performance Materials (Саут-Віндзор, Коннектикут, США) та Commercial Blood Vessel Bioprinter (Revotek, Сичуань, Китай).

Технології біодруку для створення 3D-моделей

Під поняттям технологія розуміють створення систем або механізмів, що дозволяють реалізувати певні практичні завдання на основі наукових знань. У випадку біодруку йдеться про точне розміщення клітин у матриці з біоматеріалу відповідно до заданої орієнтації за допомогою комп'ютерного управління. На вибір технології впливають такі чинники, як роздільна здатність, життєздатність клітин і характеристики біоматеріалів. Матеріал, на якому відбувається

друк, має забезпечити виживання клітин та їх адаптацію до середовища. У біомедичних застосуваннях найчастіше використовуються три основні технології 3D-біодруку: струменевий друк, лазерно-асистований друк і мікроекструзійний друк.

3.1.1 Струменевий біодрук (Inkjet Bioprinting)

Цю технологію було винайдено Ічіро Ендо в Японії у 1970-х роках. На відміну від матричних принтерів, вона ґрунтувалася на створенні мікроскопічних крапель рідини, непомітних неозброєним оком. У 1988 році Клебе описав метод цитописьма, який полягав у нанесенні клітин на субстрат із використанням білків клітинної адгезії, керованих комп'ютером, що дозволило створювати точні просторові взаємозв'язки між клітинами. Нанесення здійснювалось за допомогою графічного плотера або струменевого принтера, і використовувалося для створення двовимірних тканинних патернів на гнучкому субстраті. Згодом ці принтери були вдосконалені: введено підйомну платформу для вертикального переміщення, а чорнила замінено на біологічні матеріали — клітини, компоненти позаклітинного матриксу та інші речовини.

Сьогодні це друга за поширеністю технологія біодруку, яка активно застосовується в комерційних екструзійних біопринтерах, займаючи близько 17% ринку, що підтверджується зростанням кількості публікацій у період з 2000 до 2020 року. Це безконтактна технологія, яка забезпечує точну подачу крапель у задану точку, використовуючи тепло, акустичні хвилі або електростатичні сили як рушійну силу.

Сопла бувають термічні, п'єзоелектричні або електростатичні, і вибір залежить від властивостей матеріалу та цілей друку (рис. 3.1.).

У термічних струменевих принтерах електричні елементи нагрівають рідину до 300 °С, генеруючи повітряну бульбашку, що виштовхує краплю за допомогою електричного імпульсу, який підвищує тиск, при цьому температура середовища зростає лише на 4–10 °С, що не шкодить біологічним компонентам. Серед основних переваг — широка доступність, невисока вартість та висока швидкість друку, але серед недоліків відзначають ризик теплового стресу,

механічних пошкоджень, непостійного розміру крапель і закупорки сопел, що може знижувати ефективність друку.

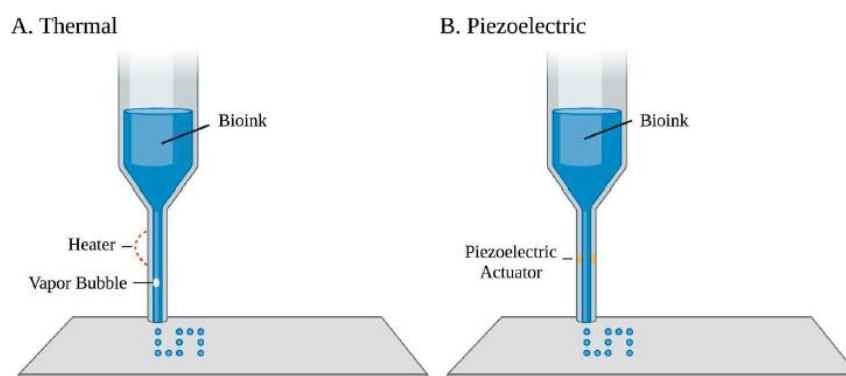


Рис. 3. 1. Два поширені підходи біодруку із застосуванням інжектора для подачі біочорнила:

(А) Біодрук на основі термічного механізму використовує локальне нагрівання для виштовхування крапель чорнила шляхом утворення парової бульбашки.

(В) Біодрук на основі п'єзоелектричного ефекту передбачає проходження електричного струму через п'єзоелектричний елемент, що створює краплі біочорнила.

Цю технологію було успішно застосовано для друку яєчникових клітин хом'яка, первинних моторних нейронів ембріональних щурів, клітин нейроглії, гіпокампу та кори головного мозку ембріональних щурів із високою життєздатністю, а також факторів росту (FGF-2, CNTF) і ембріональної сироватки (FBS), які друкувалися за допомогою модифікованого принтера Canon BJC-2100 на основі гідрогелю з поліакриламідом.

Акустичний струменевий друк, як окремий різновид, використовує п'єзоелектричні кристали, що деформуються під дією зовнішньої напруги, генеруючи акустичні хвилі всередині головки принтера на частотах 15–25 кГц, які розбивають рідину на краплі з однорідним розміром і контрольованим ви-

кидом, уникаючи теплового впливу на клітини. Раніше застосовувалися одинарні сопла для нанесення одного типу матеріалу, але сучасні багатомасивні системи з кількома акустичними емітерами дозволяють одночасно друкувати кілька типів клітин і матеріалів, скорочуючи час обробки. П'єзоелектричні матеріали потребують зовнішнього тиску для електричного ефекту, але високі частоти можуть пошкоджувати клітинні мембрани й спричиняти лізис клітин.

Матеріали, що використовуються, включають альгінат, поліетиленгліколь (PEG), фібриноген/фібрин, гідроксиапатит, PCL, PVP та комерційні біочорнила, як-от Derma-matrix, із в'язкістю, як правило, нижче 10 сП, оскільки висока в'язкість приглушує акустичні хвилі, ускладнюючи викид крапель, тоді як низька в'язкість полегшує процес, але обмежує створення складних 3D-структур.

Роздільна здатність становить 5–50 мкм, життєздатність клітин висока, процес забезпечує точне позиціонування крапель на субстраті з об'ємом від 1 до 300 мкл і частотою від 1 до 10 000 крапель/с, дозволяючи змінювати розміри крапель через градієнти концентрації клітин, матеріалів або факторів росту, де одна крапля може містити одну-дві клітини з шириною близько 50 мкм.

Проте цей процес має обмеження, такі як низька в'язкість полімерів, великий розмір пристрою, низька щільність клітин (менше 10 млн/мл) і обмежена висота конструкцій. Матеріали з високою в'язкістю можуть закупорювати сопла та знижувати зсувне навантаження, тоді як при низькій в'язкості додають зшивальні агенти, які іноді зменшують ефективність друку та змінюють хімічні й структурні властивості матеріалів, а деякі з них, будучи токсичними для клітин, знижують їхню життєздатність і функціональність.

3.1.2 Екструзійний біодрук

Екструзія — це метод, при якому розплавлений полімер проштовхується через формуючий отвір (матрицю) з метою отримання компонентів із постійним поперечним перерізом, таких як стрижні, листи, трубки, плівки, дротові покриття тощо. Матеріал переміщується вперед за допомогою подаючого гвинта і проштовхується через матрицю, утворюючи безперервний полімерний

продукт. Це найпоширеніші та найдешевші небіологічні 3D-принтери, які в біодруку отримали популярність через низьку вартість та простоту використання. Цей тип друку вперше був представлений у 2001 році, але його масове поширення почалося після 2015 року з виходом комерційних біопринтерів на ринок.

Екструзійні біопринтери становлять приблизно 39% загального обсягу продажів біопринтерів на міжнародному ринку. Завдяки низькій вартості, екструзійні системи стали найбільш досліджуваними у науковій літературі та дозволили друкувати широкий спектр матеріалів. Попит на екструзійні принтери значно зріс у період з 2000 до 2020 року. Приблизно 30 000 принтерів продаються щороку по всьому світу, причому найбільше їх використовують академічні установи для досліджень у галузі тканинної та органної інженерії. Мікроекструзійні принтери, що використовуються в промисловості, зазвичай є дорогими через вищу роздільну здатність, просторовий контроль, швидкість та ширшу сумісність із різними матеріалами.

Екструзійний біодрук — це метод подачі під тиском, за якого біочорнило, що складається з розчинів полімерів із клітинами або без них, факторами росту та іншими біоактивними речовинами, виводиться через сопло. Викид або екструзія може бути пневматичною або механічною, а краплі наносяться на субстрат згідно із заданою схемою. Такий тип принтера складається з системи подачі та дозування з контролем температури, платформи, що переміщується по осях X, Y, Z, волоконно-оптичного джерела світла, яке підсвічує зону нанесення й може запускати фотополімеризацію, а також керування за допомогою програм CAD-CAM із моніторингом через відеокамеру, що рухається у трьох напрямках. Деякі системи мають кілька друкуючих головок, що дає змогу послідовно подавати різні матеріали одночасно.

Полімерні розчини тверднуть завдяки перетворенню «розчин–гель», полімеризації, зшиванню або різним ферментативним реакціям розкладання (рис.3.2). Матеріали з в'язкістю від 30 до 6×10^7 мПа·с є найбільш сумісними з цим типом принтера, де високов'язкі матеріали забезпечують структурну

підтримку, а низьков'язкі сприяють життєздатності клітин та іншим функціям. Принтери можуть мати пневматичну систему подачі, яка є простішою, але менш точною через затримку стисненого газу, або механічну подачу, яка забезпечує точніший контроль над потоком матеріалу, хоч і має складнішу конструкцію. Гвинтові системи подачі є ефективнішими для гідрогелів із високою в'язкістю, надаючи кращий контроль над просторовим розміщенням, хоча пневматичні системи іноді також застосовуються для таких матеріалів.

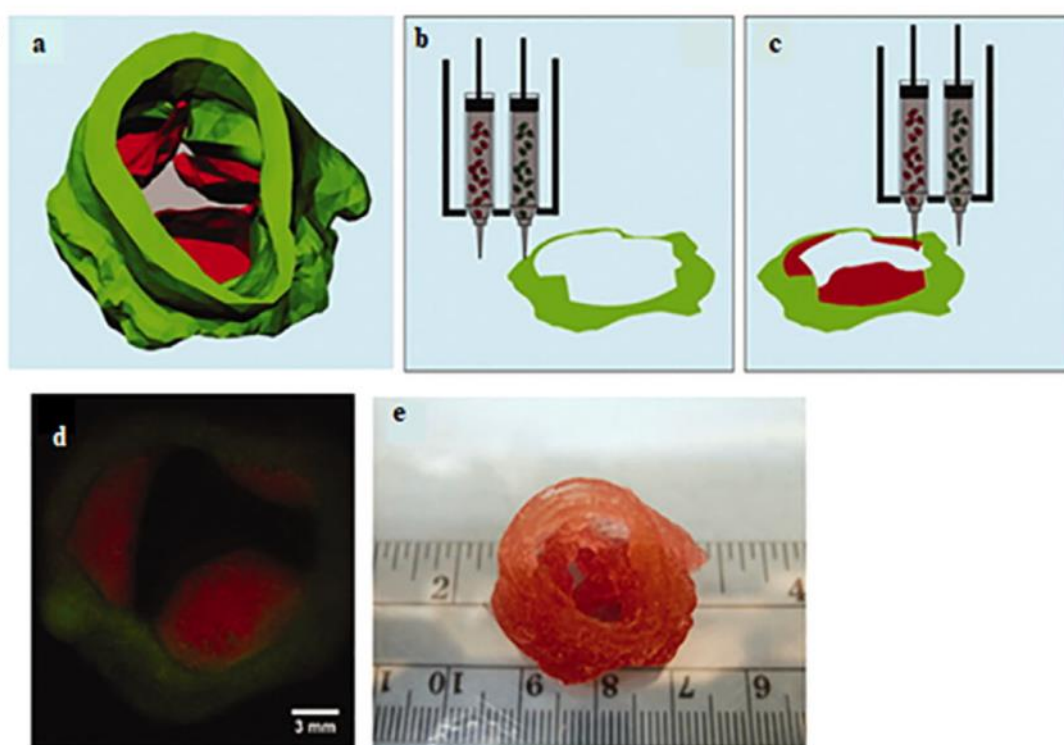


Рис.3.2 (а) Модель аортального клапана, реконструйована з мікро-КТ зображень, (b) та (c) схематичне зображення процесу біодруку з двома типами клітин і двома шприцями, (d) флуоресцентне зображення перших двох надрукованих шарів аортального клапана: гладком'язові клітини судин (SMC) для кореня клапана позначені зеленим трекером клітин, а клітини клапанних листків (VIC) позначені червоним трекером клітин, (e) надрукований провідник аортального клапана.

Джерело: Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2013;101 A(5):1255-1264.

Мікроекструзійна технологія біодруку дає змогу використовувати велику кількість матеріалів, формувати пористі конструкції та щільно осаджувати клітини у високій концентрації, контролюючи швидкість викиду, друк із кількох матеріалів, високу роздільну здатність і створення великогабаритних органів, що важче реалізувати іншими методами. Мультиклітинні сфероїди осаджували й дозволяли їм самоорганізовуватись у бажану 3D-конструкцію, діючи як гомологічна та анатомічна система до тканини ECM, прискорюючи й спрямовуючи формування складних тканин. Механічна мікроекструзія застосовувалась для створення каркасів без використання зовнішніх матриць, що має багато переваг, але є менш ефективною для складних 3D-структур.

Життєздатність клітин є одним із найважливіших параметрів у біомедичних застосуваннях і в мікроекструзійному біодруці вона нижча, ніж при струменевому друці, становлячи від 40% до 86%, при цьому знижується зі зростанням тиску екструзії та діаметра сопла. Такі чинники, як температура і розмір сопла, також впливають на життєздатність клітин у надрукованій системі, і для їхнього збереження рекомендують низький тиск і більший діаметр сопла, хоча це знижує роздільну здатність і швидкість друку. Ще однією проблемою є обмежений вибір матеріалів, але використання покращених біосумісних матеріалів може допомогти зберегти клітинні функції після друку. Зшиті гідрогелі є механічно міцними й іноді формують додаткові механічні властивості, що покращують життєздатність клітин та стійкість 3D-конструкцій. Удосконалення сопел, шприців та моторних систем керування дозволяє зменшити час друку й забезпечити одночасну подачу кількох типів матеріалів.

Ця технологія була використана для регенерації вуха, сформованого з вушного хряща та жирової тканини, де гідрогель із PCL і PEG використовувався разом із хондроцитами та стромальними клітинами, отриманими з жирової тканини, для виготовлення каркасу у формі вуха з життєздатністю клітин понад 95%. В іншій системі подібні матеріали застосовувалися для створення каркасів хряща шляхом екструзії альгінатного гідрогелю на PCL із хондроцитами, що давали життєздатність 85%, а також із мезенхімальними клітинами з

носових раковин, сприяючи підвищеному утворенню позаклітинного матриксу без серйозних ефектів після імплантації в підшкірний простір спини мишей.

3.1.3 Лазерно-асистований біодрук

LASER — це абревіатура від Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, що означає підсилення світла шляхом стимульованого випромінювання радіації. Це пристрій, який генерує монохроматичне світло через процес оптичного підсилення, заснований на стимульованому випромінюванні електромагнітного випромінювання. Лазер був вперше створений Теодором Х. Мейманом у дослідницьких лабораторіях Х'юза у 1960 році за участю Чарльза Харда Таунза і Артура Леонарда Шоула. Лазерний біодрук використовує явище лазерного індукованого форвардного переносу для нанесення дуже малої кількості біочорнила у рідкій або твердій фазі. Спочатку його розробили для нанесення металів на приймачі, але згодом успішно адаптували для біологічних сфер, таких як друк ДНК, клітин, тканин та органів.

Одде та Ренн розробили цю техніку для друку життєздатних ембріональних клітин хребта курчати. Вона складається з трьох частин: сторони донора або стрічки, лазерного імпульсу та приймача. Стрічка містить шар прозорого скла, тонкий шар металу та шар біочорнила, де транспортна стрічка слугує підтримкою для енергоабсорбуючого шару, а біочорнило у рідкому або гелеподібному стані переноситься зі сторони донора на приймач, коли металевий шар під гідрогелем випаровується лазерним імпульсом. Усі компоненти, такі як енергія лазера, частота лазера та в'язкість біоматеріалу, впливають на роздільну здатність друкованих складних структур, а поверхневий натяг, змочуваність субстрату, повітряний зазор між стрічкою і субстратом, товщина і в'язкість біологічних шарів також відіграють важливу роль (рис. 3.3).

Ця технологія не має сопел, що робить її зручною для нанесення клітин або матеріалів, які викликають засмічення сопел, і дозволяє наносити клітини з густотою до 10^8 клітин/мл із мікромасштабною роздільною здатністю — одна клітина на краплю — із частотою лазерних імпульсів 5 кГц і швидкістю

1600 мм/с. Біочорнила можна друкувати з в'язкістю до 300 мПа/с, а потужний лазерний імпульс має мінімальний вплив на життєздатність, структуру та функції клітин, хоча ультрафіолетове світло може їх пошкоджувати.

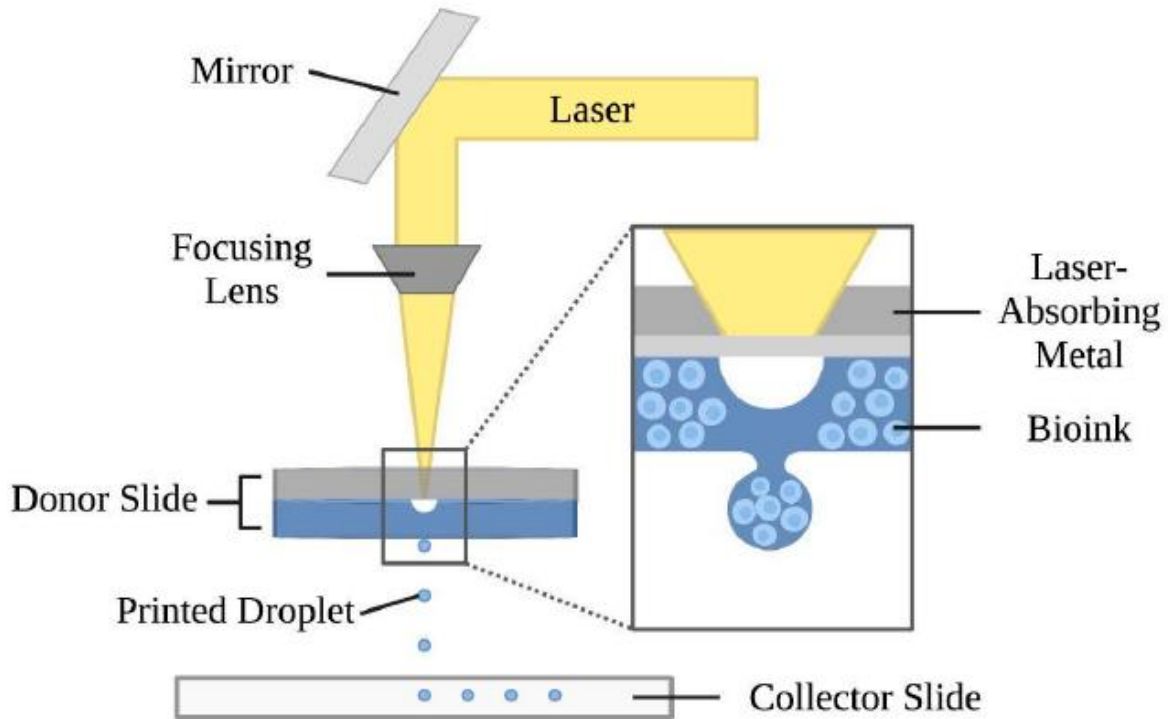


Рис. 3.3. Механізм лазерно-асистованої технології біодруку:

Лазерно-асистований біодрук має порівняно низький загальний потік через швидку кінетику геляції, необхідну для високої надійності форми, а формування стрічки є ключовим явищем при друку складних структур, хоча підготовка окремих стрічок займає багато часу й ускладнює одночасне нанесення кількох біоматеріалів і клітин. Щоб подолати цю проблему, розроблена процедура «цілься і стрілай», що використовує технологію сканування з розпізнаванням клітин, дозволяючи лазерному променю вибирати по одній клітині за імпульс, забезпечуючи визначену кількість клітин у кожній краплі. У кінцевих конструкціях можуть залишатися металеві залишки через випаровування металевого шару, але сучасні модифікації з неметалічним абсорбуючим шаром усувають цю проблему. Вартість системи вища через монохроматичні лазерні промені високої енергії, що обмежує її частку на ринку до менш ніж 4%.

Цей підхід включає лазерний промінь, фокусуючу лінзу та дві пластинки. Донорська пластинка складається з шару металу, що поглинає лазер, і

шару біочорнила. Імпульси лазера випаровують металевий шар, утворюючи краплі, які виштовхуються на приймальну пластинку, розміщену нижче.

3.1.4 Стереолітографічний біодрук (SLB)

Стереолітографічний біодрук використовує фотополімеризаційний рідкий полімер, на який спрямовується ультрафіолетове світло або лазер у заздалегідь визначеному шаблоні, що призводить до зшивання та затвердіння полімерів (рис. 3.4). У кожному циклі полімеризації створюється тонкий шар структури, і цей цикл повторюється для створення тривимірної структури пошарово. Основна перевага цієї технології полягає у високій роздільній здатності та відсутності сильного зсувного стресу порівняно з іншими техніками. Однак клітини піддаються впливу інтенсивного ультрафіолетового випромінювання для зшивання, що може спричинити пошкодження клітин.

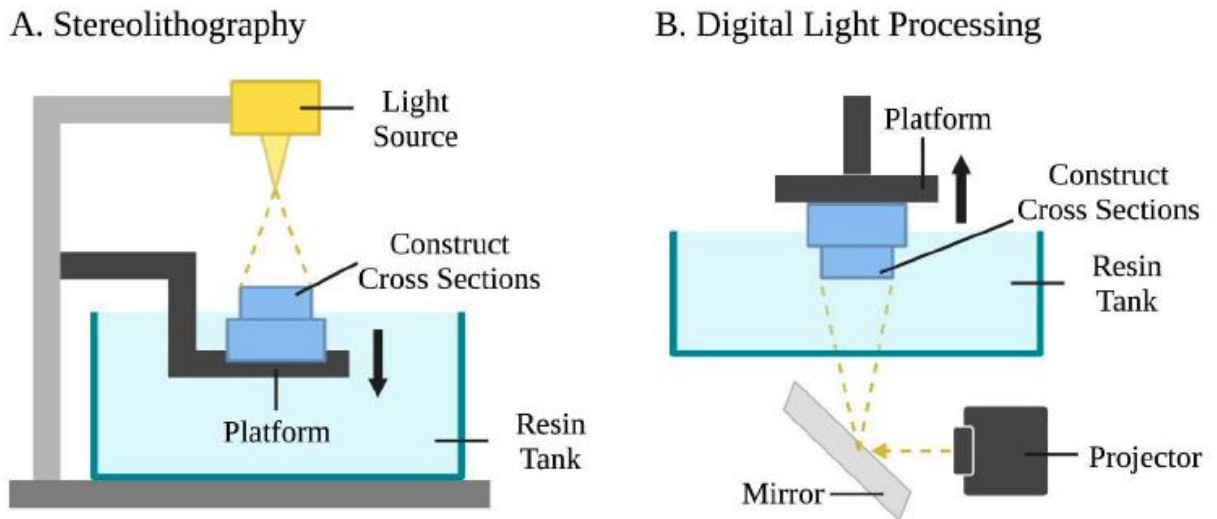


Рис. 3.4. Схематичне зображення біодруку методом стереолітографії та цифрової світлової проєкції:

(A) Стереолітографія використовує джерело світла, резервуар з фотополімерною смолою та рухому платформу. Лазер послідовно відтворює поперечні перерізи конструкції, після чого платформа опускається для надходження нового шару смоли під уже сформовану частину. Процес повторюється пошарово.

(В) Цифрова світлова проєкція (DLP) використовує світловий проєктор і систему дзеркал, які відбивають вхідне світло. Цілі шари біочорнила вибірково полімеризуються одночасно, у той час як платформа рухається у вертикальному напрямку.

Узагальнена інформація про методи 3D-біодруку наведена у табл.3.1.

Таблиця 3.1

Основні техніки 3D-біодруку

Техніка біодруку	Опис	Переваги	Недоліки
Мікроекструзійний 3D-біодрук (Поршневий, Пневматичний, Гвинтовий)	Біочорнило, що містить клітини, видавлюється через сопло за допомогою пневматичного або механічного тиску (поршневого чи гвинтового) і осідає на підкладці для створення тривимірної структури.	• Можливість друку біочорнил із високою в'язкістю шляхом регулювання тиску приводу. • Можливість друку тканин із дуже високою щільністю клітин і безскелетних біочорнил. • Забезпечує високу структурну цілісність завдяки безперервному осадженню матеріалів. • Придатний до масштабування для створення тканин і органів.	• Тисковий механізм видавлювання спричиняє високий зсувний стрес на клітини, що значно впливає на їхню життєздатність. • Обмежена роздільна здатність; неможливість створення мікросудинної мережі.
Струменевий 3D-біодрук	Краплі біочорнила, що містять клітини (кожна містить 10,000–30,000 клі-	• Неконтактний метод, що знижує ризик контамінації.	• Нерівномірний розмір крапель. • Вимагає біочорнил

	тин), формуються шляхом нагрівання або п'єзоелектричного впливу через неконтактне сопло.	• Можливість інтеграції кількох друкувальних голівок для створення гетерогенних тканинних структур. • Забезпечує створення судиноподібних структур. • Висока швидкість друку та придатність до високопродуктивного друку.	із низькою в'язкістю ($<0,1 \text{ Па}\cdot\text{с}$), що ускладнює осадження високов'язких гідрогелевих компонентів позаклітинного матриксу.
Лазерно-асистований 3D-біодрук	Сфокусований лазерний імпульс створює бульбашку та ударні хвилі, які змушують клітини переноситися на приймальну підкладку. Процес повторюється для створення заздалегідь визначених тривимірних структур.	• Висока точність і роздільна здатність надрукованих структур, що дозволяє біодрук мікроструктурованих пептидів, ДНК і клітин із роздільною здатністю на рівні однієї клітини. • Можливість друку тканин із дуже високою щільністю клітин. • Відсутність обмежень щодо в'язкості.	• Тепло, що генерується лазерною енергією, може впливати на життєздатність клітин.
Стереолітографічний 3D-біодрук	Ультрафіолетове світло або лазер спрямовується	• Висока роздільна здатність.	• Потребує інтенсивного випромінювання

	за шаблоном на фотополімеризаційний полімер або біочорнило, що призводить до зшивання полімерів у затвердлий шар, формуючи тривимірний об'єкт/тканину.	Відсутність за-смічення під час процесу друку.	для зшивання. Повільний процес.
--	--	--	---

Висновок до розділу 3

Загалом, 3D-біодрук використовує різноманітні технології біодруку з застосуванням різних складів біофарбників для створення функціональних моделей та тканинних конструкцій. Методи біодруку, що базуються на крапельній технології, лазерній асистенції, стереолітографії та цифровій обробці світла, а також екструзійному біодруку, мають свої переваги та недоліки, які варіюються від характеристик сопла екструзії до швидкості друку та роздільної здатності конструкції. Останні застосування у сфері інженерії серцевої тканини — від створення тканинних моделей до цілих органів — мають важливе значення для розуміння регенеративної медицини та клінічних досліджень. 3D-біодрук відкриває вагомі перспективи в інженерії серцевої тканини, хоча обмеження цієї технології потребують значного подальшого вдосконалення. Загалом, інженерія серцевої тканини має суттєве значення у клінічній медицині для відновлення, регенерації та заміщення ураженої серцевої тканини та органу в цілому. Подальші інновації, спрямовані на подолання існуючих обмежень, відкривають потенціал для перспективних застосувань у регенеративній медицині та клінічній трансляції.

ВИСНОВКИ

Аналіз даних наукової літератури продемонстрував, що біодрук розвивається експоненційно, і щодня з'являються нові значущі відкриття. Вперше про нього заговорили у 1998 році, коли самого терміна ще не існувало, і лише поодинокі статті стосувалися цієї теми. Проте з плином часу інтерес наукової спільноти зростає, і зараз кількість публікацій щороку перевищує тисячу. Очікується, що найближчими роками біодрук перейде на новий рівень розвитку — з реальними клінічними застосуваннями.

Великі успіхи, досягнуті за останні роки, доводять практичну перспективність технології:

- внутрішньотканинна реконструкція шкіри у пацієнтів, яка продемонструвала високі результати;
- відновлення функціональної яєчникової тканини, що дозволила стерилізованим мишам виносити потомство природним шляхом;
- створення щитоподібної залози, здатної нормалізувати рівень тироксину в крові;
- регенерація пошкоджених спинномозкових аксонів, яка довела можливість формування функціональних нервових з'єднань.

Ці приклади свідчать про те, що технологія біодруку — це потужний рушій революції в сучасній медицині. Вона відкриває нові горизонти у лікуванні, діагностиці, розробці ліків та персоналізованій терапії. Надалі вона допоможе створювати повноцінні органи для аутологічних трансплантацій і відкриє шлях до лікування раніше невиліковних захворювань.

Попри значні досягнення, технологія стикається з низкою серйозних викликів, які обмежують її масштабування та клінічне застосування. Однією з головних проблем є відсутність ефективних методів створення повноцінної васкулярної сітки в межах біодрукованих структур, що критично необхідно для живлення тканин з високим рівнем метаболізму. Обмеження роздільної здатності сучасних біопринтерів ускладнює формування мікросудин, а наявні біочернила поки не здатні повністю імітувати складну архітектуру

позаклітинного матриксу.

Серйозними викликами також залишаються джерела отримання великої кількості життєздатних клітин, низька продуктивність процесу, складність автоматизації, висока вартість витратних матеріалів (зокрема факторів росту) та обмеженість існуючих біоматеріалів, які поєднують принтованість, біосумісність і механічну стабільність.

Перспективи подальшого розвитку біопринтингу пов'язані з інтеграцією кількох ключових напрямів: удосконалення біочернил, розробка високоточної апаратури для багатокomпонентного друку, розвиток біореакторних систем та орган-на-чипі платформ. Особливо важливим є міждисциплінарний підхід, що об'єднує інженерів, біологів, медиків і фармацевтів з метою створення стандартизованих процесів і забезпечення масштабованого, автоматизованого виробництва тканинних конструкцій.

Таким чином, 3D-біопринтинг є складною, але надзвичайно перспективною технологією, що здатна трансформувати парадигму лікування хвороб, тестування лікарських засобів та створення органів на замовлення. Подальші дослідження та ефективна наукова співпраця мають ключове значення для перетворення лабораторних прототипів у реальні клінічні рішення..

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Balasubramanian S., Aubin-Tam M.-E., Meyer A. S. 3D printing for the fabrication of biofilm-based functional living materials. *ACS Synth Biol.* 2019. Vol. 8(7). P. 1564–1567. DOI: 10.1021/acssynbio.9b00192.
2. 3D bioprinting of living materials for structure-dependent production of hyaluronic acid / Z. Cui et al. *ACS Macro Lett.* 2022. Vol. 11(4). P. 452–459.
3. Current and Future Trends. *Advanced Healthcare Materials.* 2020. Vol. 9(15). P. 2000203.
4. A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage / A. C. Daly et al. *Biofabrication.* 2016. Vol. 8(4). P. 045002.
5. 3D bioprinting of microorganisms: principles and applications / J. Herzog et al. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2024. Vol. 47(4). P. 443-461. DOI: 10.1007/s00449-023-02965-3.
6. Ho C. M. B., Ng S. H., Yoon Y. J. A review on 3D printed bioimplants. *Int J Precis Eng Manuf.* 2015. Vol. 16(5). P. 1035-1046.
7. Ishack S., Lipner S. R. A Review of 3-Dimensional Skin Bioprinting Techniques: Applications, Approaches, and Trends. *Dermatol Surg.* 2020. Vol. 46(12). P. 1500-1505. DOI: 10.1097/DSS.0000000000002378.
8. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects / Ž. P. Kačarević et al. *Materials (Basel).* 2018. Vol. 11(11). P. 2199. DOI: 10.3390/ma11112199.
9. Lehner B. A. E., Schmieden D. T., Meyer A. S. A straightforward approach for 3D bacterial printing. *ACS Synth Biol.* 2017. Vol. 6. P. 1124–1130. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00395.
10. Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects / J. Li et al. *J. Transl. Med.* 2016. Vol. 14. P. 1–15.
11. Evolution of bioprinting and current applications / L. Mendoza-Cerezo et al. *Int J Bioprint.* 2023. Vol. 9(4). P. 742. DOI:10.18063/ijb.742.
12. Biomaterials For 3D Printing. URL: <https://www.biomatdb.eu/2024/09/04/biomaterials-for-3d-printing/> (Date of access: 23.04.2025).

13. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology / L. Moroni et al. *Trends Biotechnol.* 2018. Vol. 36. P. 384–402.
14. Murphy S. V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 2014. Vol. 32. P. 773–785.
15. The application of three-dimensional printing techniques in the field of oral and maxillofacial surgery / F. Obregon et al. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2015. Vol. 41. P. 169–170.
16. 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication / T. G. Papaioannou et al. *Acta Cardiol Sin.* 2019. Vol. 35(3). P. 284-289.
17. 3D skin bioprinting: future potential for skin regeneration / A. Pasierb et al. *Postepy Dermatol Alergol.* 2022. Vol. 39(5). P. 845-851. DOI: 10.5114/ada.2021.109692.
18. Ramadan Q., Zourob M. 3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries. *Front. Med. Technol.* 2021. Vol. 2. P. 607648. DOI: 10.3389/fmedt.2020.607648.
19. Additive Manufacturing for Guided Bone Regeneration: A Perspective for Alveolar Ridge Augmentation / P. Rider et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 3308.
20. Bioprinting of tissue engineering scaffolds / P. Rider et al. *J. Tissue Eng.* 2018. Vol. 9. DOI: 10.1177/2041731418802090.
21. Printing of patterned, engineered E. coli Biofilms with a lowcost 3D printer / D. T. Schmieden et al. *ACS Synth Biol.* 2018. Vol. 7. P. 1328–1337. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00424.
22. Tappa K., Jammalamadaka U. Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *J. Funct. Biomater.* 2018. Vol. 9. P. 17.
23. 3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications / S. Tripathi et al. *MedComm.* 2022. Vol. 4(1). P. e194. DOI: 10.1002/mco2.194.

24. An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical Application / S. Vanaei et al. *Engineered Regeneration*. 2021. Vol. 2. P. 1–18.
25. Advances in 3D Bioprinting / F. Yongcong et al. *Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers*. 2022. Vol. 1(1). P. 100011.
26. Bioprinting 3D microfibrous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip / Y. S. Zhang et al. *Biomaterials*. 2016. Vol. 110. P. 45–59.
27. 3D-біопринтинг і розвиток класифікацій дентальної імплантації / С. М. Злепко та ін. *Наукові праці ВНТУ*. 2020. Вип. 3. С. 1-6.
28. Кулявець В. Р., Беспалова О. Я. Види біопринтерів для друку органів. *Біомедична інженерія*. 2020. Вип. 3. С. 68–73.
29. Маслянчук С., Луценко Т. Біоінженерний потенціал 3D-біодруку для створення функціональних моделей печінки. *Біомедична інженерія і технології*. 2024. № 16(4). С. 40-46.
30. Сокольников А. О., Аврунін О. Г. Огляд застосування підходів тривимірного біодруку, перспективи та виклики. *Сучасний стан та перспективи біомедичної інженерії* : матеріали Міжнар. наук.-прак. конф., присвяч. 125-річному ювілею Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», м. Київ, 13-14 груд. 2023 р. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. С. 203-205.
31. Тирпак А. Інновації 3D-друку в медицині. *Політ. Сучасні проблеми науки* : тези доповідей XXIII Міжнар. наук.-практ. конф. здобувачів вищої освіти і молодих учених. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. С. 203-205.

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи



симбіотичної дії лактобацил, біфідобактерій та дріжджів для профілактики та лікування дисбіозів бджіл, спричинених ентеробактеріями.

Крім покращення імунітету та захисту від бактерій різні пробіотики допомагають бджолам пережити зиму і відновитись після зимівлі, сприяють збільшенню виробництва меду та воску, підвищують тривалість життя. При цьому, на відміну від антибіотиків, вони не мають негативного впливу на мікрофлору кишківника бджіл.

Основними загрозами для життя бджіл є хімічна інтоксикація внаслідок отруєння пестицидами, гербіцидами чи інсектицидами, ослаблення після зимівлі, кліщі, захворювання, з яких особливо небезпечні дисбіози (ентеробактеріози), бо вони найменше вивчені.

Отже, враховуючи поширення хвороб бджолосімей та зниження популяції бджіл в Україні останніми роками, зараз дослідження шляхів лікування, подовження життя бджіл та збільшення обсягів виробництва меду є дуже актуальними. Особливо ефективними в цьому напрямку показали себе пробіотичні препарати. Наразі створення нових пробіотиків є перспективним як в екологічному, так і в економічному плані.

3D-біодрук: сучасні тенденції та перспективи застосування

Ковалевська Д. Т., Хохленкова Н. В.

Кафедра біотехнології Національного фармацевтичного університету, м. Харків, Україна
hohnatal@gmail.com

Біодрук – це передова технологія, яка дозволяє створювати тривимірні структури з використанням біологічних матеріалів. Вона є міждисциплінарним напрямом, що поєднує біотехнологію, матеріалознавство та інженерію. Ця технологія базується на створенні тривимірних біоструктур шляхом друку клітинних культур у поєднанні з біосумісними матеріалами, що відкриває нові можливості для регенеративної медицини, тканинної інженерії, фармацевтики та інших біотехнологічних напрямів.

За останні роки значну увагу привернув 3D-біодрук мікроорганізмів, що відкриває перспективи для створення біологічно активних матеріалів, біоремедіації, виробництва біополімерів та фармацевтичних препаратів.

Унікальні характеристики бактерій, зокрема наявність клітинних стінок та здатність утворювати спори, забезпечують більшу адаптивність та сумісність з різними технологіями друку. Однією з ключових переваг бактеріального біодруку є стійкість мікроорганізмів до екстремальних умов, таких як високі температури, заморожування, окислення, високий тиск, рентгенівське та ультрафіолетове випромінювання, що розширює можливості для їхнього застосування. Швидкий ріст та розмноження бактерій знижують вимоги до процесу біодруку.

Очікується, що подальші дослідження у сфері 3D-біодруку мікроорганізмів сприятимуть розвитку персоналізованих біотехнологічних рішень, оптимізації промислових процесів та створенню нових біологічних матеріалів.

Завдяки поєднанню 3D-друку, синтетичної біології та інженерних рішень відкриваються унікальні можливості для проєктування функціональних мікробних екосистем, що змінять підходи до виробництва біоматеріалів.

Пектиназопродукуючі мікроміцети: сучасний стан досліджень

Коваленко Я. П., Зубик П. Р.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, м. Київ, Україна

kovalenkojacob@gmail.com

Пектинази – це група ферментів, які каталізують процес розщеплення пектину, переважно гідролітичної природи. Їх активно використовують у різних галузях промисловості: харчовій, легкій, целюлозно-паперовій, фармацевтичній, у виробництві миючих засобів, у попередній обробці стічних вод та боротьбі з хворобами рослин (Rodrigues A. G., 2016). У зв'язку з цим вони належать до одних з найбільш затребуваних ферментів для виробництва,