

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Обзорная статья

УДК 611.018.23:675.014.45:665.931.78:638.272.24:638.272.25:612.115.12:665.939.358

EDN: IKYKFL

DOI: 10.21285/achb.918



Проблемы конструирования тканеинженерных структур на основе коллагенов и некоторые подходы к их решению: обзор

И.А. Фарион✉, В.Ф. Бурдуковский

Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Российская Федерация

Аннотация. Целью проведенной работы являлся анализ современных литературных источников, посвященных исследованию проблем дизайна биочернил и тканеинженерных конструкций на основе растворимых форм коллагена, включая желатин. Выбор растворимых форм коллагена в качестве биополимерной основы для биочернил и такого типа конструкций определяется их уникальной биосовместимостью, биорезорбируемостью, наличием адгезионных мест (мотивов) для связывания клеток с последующей их пролиферацией и созреванием органов или тканей. В то же время плохие механические свойства изделий из растворимых коллагенов, быстрая биодеградация, склонность к потере растворимости высоковязких растворов при хранении или увеличении pH ограничивают их применение в тканевой инженерии. Применение более стабильных низковязких коллагеновых растворов не позволяет создать размерно-стабильные тканеинженерные конструкции. Показано, что включение в состав гидрогелей на основе растворимых коллагенов различных водорастворимых биосовместимых полимерных добавок позволяет решить вышеперечисленные проблемы, а также дает возможность настраивать требуемые характеристики биочернил и тканеинженерных конструкций. Среди добавок, улучшающих их характеристики, следует выделить биополимеры: серицин и фиброин шелка, а также альгинаты и фибриноген, способные образовывать сшивки в присутствии Ca^{2+} . Показано, что посредством такого типа сшивок можно в еще большей степени улучшить эксплуатационные характеристики данных конструкций. Все эти биополимеры доступны как коммерческие продукты. Проведен сравнительный анализ подходов к стабилизации формы, улучшению механических свойств, а также настраиванию времени биорезорбции напечатанных тканеинженерных конструкций при созревании органа или ткани.

Ключевые слова: коллаген, желатин, биочернила, биопринтинг, тканевая инженерия, регенеративная медицина

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-23-20057.

Для цитирования: Фарион И.А., Бурдуковский В.Ф. Проблемы конструирования тканеинженерных структур на основе коллагенов и некоторые подходы к их решению: обзор // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 2. С. 195–206. DOI: 10.21285/achb.918. EDN: IKYKFL.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Review article

Issues in the design of tissue-engineered collagen constructs and some approaches to their solution: A review

Ivan A. Farion✉, Vitalii F. Burdukovskii

Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract. This review article analyzes modern literature sources on the design of bioinks and tissue-engineered constructs on the basis of soluble forms of collagen, including gelatin. The choice of soluble forms of collagen as a

biopolymer basis for bioinks and this type of constructs is determined by their unique biocompatibility, bioresorbability, as well as the presence of adhesive sites (motifs) for binding cells with their subsequent proliferation and organ or tissue maturation. However, the poor mechanical properties of products derived from soluble collagens, rapid biodegradation, tendency to lose the solubility of highly viscous solutions when stored or with pH increase limit their application in tissue engineering. The use of more stable low-viscosity collagen solutions does not enable the creation of dimensionally stable tissue-engineered constructs. It is shown that the introduction of various water-soluble biocompatible polymeric additives into hydrogels on the basis of soluble collagens allows the above-mentioned problems to be solved, as well as providing a means to customize the required characteristics of bioinks and tissue-engineered constructs. The additives that improve their characteristics include biopolymers: silk sericin and fibroin, as well as alginates and fibrinogen, which can form cross-links in the presence of Ca^{2+} . This type of crosslinking is shown to further improve the performance of these constructs. All of these biopolymers are commercially available. The article comparatively analyzes approaches to stabilizing the shape, improving the mechanical properties, and adjusting the bioresorption time of 3D printed tissue-engineered constructs during organ or tissue maturation.

Keywords: collagen, gelatin, bioinks, bioprinting, tissue engineering, regenerative medicine

Funding. Russian Science Foundation supported the work, grant no. 22-23-20057.

For citation: Farion I.A., Burdukovskii V.F. Issues in the design of tissue-engineered collagen constructs and some approaches to their solution: A review. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(2):195-206. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.918. EDN: IKYKFL.

ВВЕДЕНИЕ

Коллагены являются одними из основных белков в составе тканей животных и человека [1]. Фундаментальная роль коллагенов в живых организмах – служить основным «упрочняющим строительным материалом», обеспечивающим необходимые механические характеристики различных органов и тканей. Основная функция коллагена I типа в органах и тканях, включая выполнение роли каркаса для клеток, заключается в придании структурной жесткости, обеспечивающей устойчивость к растягивающим или переменным растягивающе-сжимающим нагрузкам, а «рыхлого» коллагена II типа – к сжимающим нагрузкам. Таким образом, коллаген II типа служит в качестве демпфера внешних механических нагрузок, характерных для сухожилий, кожи и кровеносных сосудов.

Из всех коллагенов наиболее распространенными являются коллагены I, II и III типов, на долю которых приходится 80–85% общего содержания всех коллагенов в организме человека [2]. Содержание коллагена I типа в сухожилиях человека преобладает и составляет около 60–80%. Данный коллаген обеспечивает прочность и эластичность этой соединительной ткани [1, 3]. Коллаген I типа также является основным коллагеном кожи, составляя 80–90% всех коллагенов в этой ткани [1, 2, 4]. Белки внеклеточного матрикса (ВКМ) коллаген и эластин являются главными компонентами кровеносных сосудов и играют решающую роль в их механических характеристиках (прочность и эластичность) [5]. В целом коллагены I и III типов составляют 70 и 30% артериальной стенки [6]. Коллаген I типа также содержится в таких частях роговицы, как строма [7, 8] (примерно 75% от общего количества коллагенов). Содержание коллагена I типа в костной ткани составляет 90% от общего количества коллагенов [1]. В то же время коллаген II типа наиболее характерен для суставного хряща и составляет 90–95% от массы этой ткани у взрослого человека, являясь важным компонентом его ВКМ [1, 9, 10].

Коллагены – это тройные спиральные белки, которые образуются из гомотримеров или гетеротримеров полипептидных α -цепей. Первичная структура α -цепи содержит в основном повторяющуюся триаду

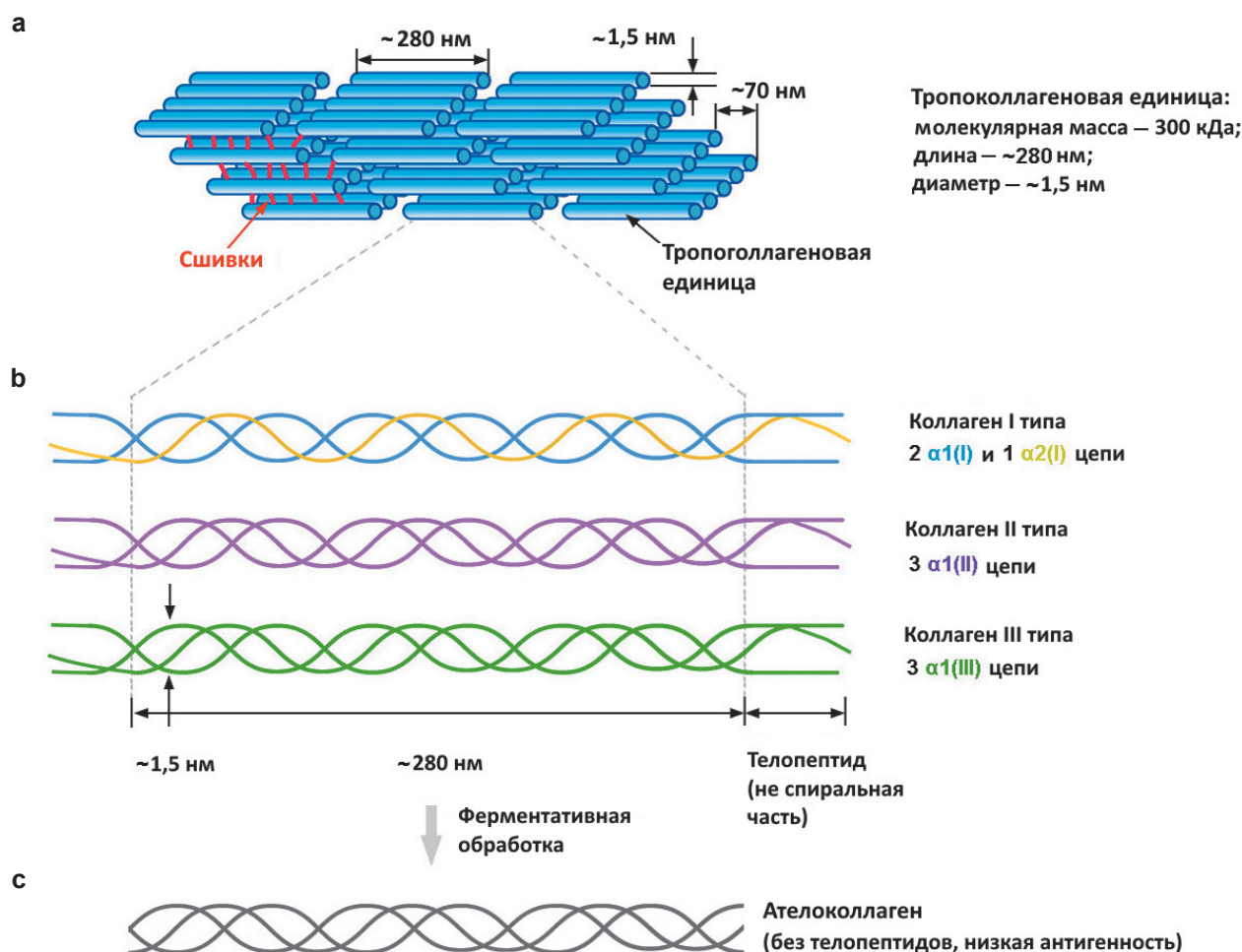
Gly-X-Y, где X обычно представляет собой пролин, а Y – 4-гидроксипролин [1, 11]. Во время биосинтеза три α -полипептидные цепи самособираются *in vivo* в единицу тропоколлагена. Тропоколлагеновая единица – это прочный белок, характеризующийся длиной 300 нм, диаметром 1,5 нм и молекулярной массой ~300 кДа. Тропоколлаген формирует сначала фибриллярные нити за счет межмолекулярных сил (в основном водородных связей). Затем в присутствии соответствующих ферментов-лизилгидроксилаз между этими нитями образуются ковалентные поперечные связи-шивки [12]. Тройная спираль коллагена I состоит из двух цепей $\alpha 1(I)$ и одной цепи $\alpha 2(I)$ [1, 13] (рисунок).

В то же время важно отметить, что при восстановлении поврежденного суставного хряща коллаген I типа связан с фиброзно-хрящевым фенотипом хрящевой ткани, которая часто демонстрирует смешанную морфологию, содержащую коллагены I и II типов [14].

В коллагене II типа тройная спираль состоит из трех одинаковых цепей $\alpha 1(II)$, а третичная структура более «рыхлая», что и определяет его преобладание в хряще суставов [1].

Что касается «вспомогательного» коллагена III типа, то он действует как ковалентный модификатор в ответ на заживление поврежденного хряща. Здесь он временно играет роль когезионного связующего для формирующейся сети коллагена II типа [15]. Тройная спираль коллагена III типа собрана в основном из идентичных спиралей $\alpha 1(III)$.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что коллагены I, а также II и III типов являются основными биополимерами-полипептидами в жизненно важных органах и тканях человека и преобладает при этом коллаген I типа. Это послужило критериями выбора данной биополимерной матрицы в качестве базы для создания биочернил и тканеинженерных конструкций на их основе для применения в регенеративной медицине. Таким образом, целью настоящего обзора является анализ основных проблем при создании коллагеновых биочернил и тканеинженерных конструкций на их основе, а также наиболее известных подходов к их решению.



Структуры коллагенов и продуктов их расщепления [13]

Structures of collagens and their cleavage products [13]

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС – НАТУРАЛЬНЫЙ ТКАНЕВОЙ КАРКАС (СКАФФОЛД) ДЛЯ КЛЕТОК

Важно отметить, что коллагены являются основными компонентами более 30% ВКМ, особенно коллагены I, II и III типов [1]. Например, коллагены являются основным компонентом ВКМ аортального клапана, составляя примерно 60% от общего состава в пересчете на сухую массу [16].

ВКМ секретируется клетками и окружает их в тканях. Он обеспечивает структурную поддержку клеток, поскольку его характеристики определяют характеристики жизненно важных органов и тканей. ВКМ – это чрезвычайно сложный каркас, состоящий из множества биологически активных молекул, включая протеогликаны, которые строго регулируются и имеют решающее значение для определения действия и судьбы клеток, окруженных ВКМ [1, 16].

Для дизайна тканеинженерных структур ВКМ необходимо полностью освободить от чужеродных клеток (децеллюляризовать). Децеллюляризованный ВКМ (ДВКМ) представляет собой смесь природных биополимеров, получаемых из различных тканей человека и животных, например кожи и других тканей или органов [11], с сохранением структуры. Процессы децеллюляризации могут быть физическими, химическими,

биохимическими (например, ферментативными) или являться их комбинацией [11].

Хотя ДВКМ имеет значительные преимущества в сохранении специфических функций тканей и органов для использования в регенеративной медицине, ему характерны многие другие проблемы, возникающие при сложной трехмерной биопечати органов. Во-первых, трудно эффективно удалить антигенные компоненты для устранения иммунных ответов [1, 17]. Во-вторых, основными нюансами, которые нуждаются в корректировке, являются вопросы чрезвычайно плохих механических свойств, низкого разрешения конструкции, заметной усадки формы и быстрой скорости деградации [18].

Успех использования каркасов-скаффолдов для дизайна биоискусственных органов во многом зависит от того, насколько хорошо сохраняются механические свойства [1]. Например, в работах [1, 11] приводятся примеры решения проблем неудовлетворительных механических характеристик скаффолдов путем создания межмолекулярных альдиминных с использованием глutarового альдегида или пептидных сшивок с применением конденсирующих агентов: дифенилфосфорилазида, а также системы гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и *N*-гидроксисукцинимид, но при этом вопрос токсичности данных сшивающих агентов остается открытым.

Решению вышеописанных проблем, характерных для ДВКМ, а именно созданию временных биорезорбируемых искусственных матриц-скаффолдов с требуемыми характеристиками на основе растворимых форм коллагенов в сочетании с другими (био) полимерными добавками, посвящены нижеследующие разделы обзора.

РАСТВОРИМЫЙ КОЛЛАГЕН КАК БИОПОЛИМЕРНАЯ МАТРИЦА ДЛЯ ДИЗАЙНА БИОЧЕРНИЛ И ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Природный коллаген представляет собой твердый труднорастворимый или нерастворимый белок. В связи с этим для создания тканеинженерных конструкций на основе биочернил необходимо переводить коллаген I типа в растворимые формы. Другими словами, необходимо разрушитьтропоколлагеновые структуры (см. рисунок), состоящие из множества ковалентно сшитых друг с другом субъединиц триад коллагена с молекулярной массой около 300 кДа.

Коллаген часто экстрагируют из животных тканей с достаточно высоким его содержанием [11]. Основной подход к получению водорастворимых форм коллагена заключается в частичном разрушении надмолекулярных структур в присутствии различных химических реагентов, а также при низких температурах [19, 20]. В итоге получают растворимые формы коллагена, пригодные для дизайна изделий биомедицинского назначения.

Второй хорошо известной формой водорастворимого коллагена является желатин, который получается при частичном гидролизе коллагенсодержащего сырья в процессе более глубокого разрушения тройной коллагеновой спирали на отдельные молекулы [21]. Таким образом, желатин – это денатурированная форма коллагена, в которой происходит частичное изменение конформации молекулы коллагенового белка при сохранении порядка аминокислот и молекулярной массы отдельной α -спирали [22]. Например, «рыбный» желатин при низких температурах легко образует гидрогель-студень, который разжижается при 28–30 °C в результате конформационного перехода «глобула – фибрилла» [22]. Кроме того, желатин может сильно влиять на свойства других веществ, например молочного белка в кислой среде [23, 24].

Растворимые коллагены широко применяются в биочернилах [25] и имеют хорошую способность к адгезии, пролиферации и дифференцировке остеобластов, хондробластов, мезенхимальных и других стволовых клеток на пористых каркасах [26]. Они безопасны для клеток, имеют естественные участки связывания с ними [27], гидрофильны и подвергаются ферментативному расщеплению.

Поскольку коллаген I типа является главным компонентом ВКМ во многих тканях человека, существует сильный стимул для разработки на его основе биочернил [28, 29], которые можно использовать для печати трехмерных тканевых конструкций. К примеру, было показано, что коллаген I типа образует полезные структуры, связанные с функцией печени и моделированием органов [30, 31].

Коллагены I и II типов также используются в 3D-печати каркасов для восстановления хрящей и костей. Так, в источнике [32] описана инженерия зонального хряща

путем биопечати гидрогелевых конструкций из коллагена II с градиентной плотностью хондроцитов. В данном случае коллаген II поддерживал фенотип хондроцитов и играл важную роль в стимулировании хондрогенной дифференцировки.

Коллагеновые гидрогели также являются идеальным материалом для формирования сосудистой сети [6]. Изменение концентрации коллагена в гидрогелях, образованных путем физического сшивания, одновременно изменяет жесткость и плотность фибрилл, влияя на размеры сосудистых просветов, выстланных эндотелиальными клетками [33].

Свойства физически сшитых коллагеновых гидрогелей сильно зависят друг от друга, поэтому трудно понять влияние того или иного свойства материала на формирование кровеносных сосудов с использованием этой гелевой системы. Термическая нестабильность коллагена, усадка после смешивания с клетками, плохие механические свойства и быстрая деградация [1] ограничивают его практическое применение в васкуляризированной биоинженерии [34].

Кроме того, на свойства кислого раствора коллагена могут легко влиять pH и температура гидрогеля, что затрудняет 3D-печать раствора коллагена в условиях окружающей среды. Это связано с тем, что молекулы коллагена в нейтральной среде имеют тенденцию собираться в гидрогель и могут быстро расщепляться коллагеназами и металлопротеиназами. В результате первичного гидролитического расщепления ферментами образуются, как правило, олигомерные фрагменты исходных макромолекул коллагена [35], которые далее легко расщепляются другими энзимами до более низкомолекулярных фрагментов вплоть до аминокислот. Все это может создать проблемы при конструировании гидрогелевых биочернил на его основе.

РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ СТАБИЛЬНОСТИ КОЛЛАГЕНОВЫХ БИОЧЕРНИЛ И ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Сочетание с другими полимерными добавками. Хотя нативный коллаген сам по себе является идеальным материалом для применения в регенеративной медицине, он один не подходит для биочернил, поскольку со временем подвергается сшивке при комнатной температуре [36]. Относительно быстрое образование водородных связей между волокнами коллагена приводит к затверждению геля. Данный факт представляет проблему для биопечати, поскольку сшивание коллагена происходит непрерывно, пока он не достигнет состояния геля, а это означает, что его трудно контролировать. Все это приводит к изменению вязкости и модуля упругости на протяжении всего процесса печати, а следовательно, и к неоднородности раствора. Основная проблема заключается в том, что структурирование коллагенового раствора часто происходит до того, как начинается формирование желаемой тканеинженерной структуры.

Пригодность коллагеновых биочернил для печати также зависит от их реологических свойств до гелеобразования, когда коллаген еще находится в фазе раствора [37]. Кроме того, по сравнению с синтетическими и другими природными гидрогелями коллаген демонстрирует более медленное гелеобразование и плохие механические свойства, что создает проблемы

для биопечати [38]. Еще одним недостатком гидрогелей коллагена I типа является уменьшение их объема при культивировании клеток внутри них [39]. Отсюда – необходимость применения низковязких растворов, и, как следствие, отсутствие возможности создания стабильных тканеинженерных конструкций.

Проблема низкой вязкости большинства коллагеновых биочернил и улучшения качества печати решается путем их комбинирования с другими полимерами [40, 41].

Среди синтетических водорастворимых полимеров следует упомянуть термочувствительные водорастворимые полиэтиленгликоль [42], поли(*N*-изопропилакриламид) [43] и Pluronic® F127 [42–44], которые являются подходящими материалами для биочернил благодаря биосовместимости, обратимому термочувствительному гелеобразованию при 10–40 °C, адгезии к поверхностям и возможности в широких пределах настраивать вязкость биочернил при температурах биопечати. Тем не менее, хотя синтетические полимеры и биорезорбируются *in vivo* [45–47], мы полагаем, что более предпочтительно применять в качестве добавок биополимеры (полисахариды, полипептиды), из низкомолекулярных фрагментов которых в процессе биорезорбции скаффолда будет формироваться характерный для регенерируемого органа или ткани ВКМ.

Из полисахаридных добавок, улучшающих качество биочернил при биопечати, следует отметить часто используемые альгинаты [48, 49]. Среди полипептидных добавок необходимо выделить натуральный шелк [50], в том числе шелк пауков [51], и фибрин [52, 53] – волокнистый неглобулярный белок, участвующий в свертывании крови, который образуется в результате действия протеазы тромбина на фибриноген, что вызывает его полимеризацию.

Одной из наиболее подходящих добавок для улучшения характеристик коллаген-гидрогелевых биочернил является природный шелк тутового шелкопряда *Bombyx Mori*. Этот шелк перспективен как биоматериал для тканевой инженерии благодаря своей высокой биосовместимости [54–58]. Он является волокнистым белком, состоящим из фиброина и серицина. В большинстве исследований тканевой инженерии использовался фиброин [56]. В то же время более поздние исследования отдают предпочтения также серицину [55, 57]. Кроме того, некоторые исследования представляют серицин как очень интересный биоматериал, главным образом из-за его положительного воздействия на клетки-фибробласты [58].

Комбинация водорастворимого коллагена I типа с другими полимерными биосовместимыми добавками позволяет варьировать, а также оптимизировать и в какой-то степени улучшать реологические свойства составных гидрогелевых биочернил. В то же время напечатанным тканеинженерным конструкциям в большинстве случаев требуется сохранять заданную форму, необходимые жесткость и время биорезорбции в процессе длительного созревания культур засеянных стволовых клеток [59]. Распространенным подходом к приданию этих характеристик каркасам на основе гидрогелей коллагена помимо самосборки белковых молекул [60] является создание сшитых полимерных сеток, например ферментативное сшивание растворимого фибрина в фибриноген [52]. Подобные подходы к стабилизации

3D-структур были широко адаптированы по всему миру, дублированы и применены исследователями [61, 62]. Этим подходам к стабилизации 3D-структур посредством сшивок и будет посвящен следующий раздел.

Решение проблемы стабильности формы и свойств каркасов посредством ферментативной и ионной сшивок. Из предыдущего раздела можно сделать вывод, что гидрогели на основе растворимых коллагена и желатина имеют два заметных недостатка при 3D-печати органов: одним из них является низкая механическая прочность, другим – структурная нестабильность в физиологических условиях (например, при 37 °C). При температуре выше 28 °C физические сшивающие связи в растворимых формах коллагена дезорганизуются, что приводит к нарушению целостности трехмерных структур. В связи с этим 3D-печатные структуры на их основе необходимо дополнительно укреплять для достижения стабильной структуры посредством сшивки 3D-печатных структур.

Кроме решения проблемы стабильности тканеинженерных конструкций после биопечати, биосовместимость многих процессов ферментативной сшивки [52] дополнительно решает вопросы цитотоксичности процессов фотосшивки [63], при которой воздействие ультрафиолетового излучения и свободных радикалов может быть вредным для жизнеспособности клеток.

Наглядный подход к реализации ферментативного сшивания для придания стабильности напечатанным тканеинженерным структурам был реализован в источнике [64]. Он одновременно решает проблему быстрого ферментативного сшивания с потерей текучести биочернил еще до формирования тканеинженерной структуры. Исследователи, опубликовавшие данный материал, разработали биопринтер с двумя печатающими соплами. Суть подхода заключается в том, что одна из головок насадки формирует микрокапли, содержащие стволовые клетки остеобластов высокой плотности, в гелевой среде, содержащей помимо полимерного матрикса коллагена еще и фибриноген. Вторая печатающая головка-сопло формирует капли, содержащие тромбин и CaCl_2 в качестве фермента-«отвердителя», при этом фибриноген образует сначала фибрин-мономер, а затем фибриновую трехмерную сетку – фибрин-полимер, аналогично процессам, описанным в работе [65], в результате чего в присутствии коллагена образуется устойчивая трехмерная структура. В процессе переноса этих микрокапель на субстрат они «прилипают» друг к другу, иницируя процесс сшивания, что позволяет образовывать микрокапли с более плотной и механически прочной консистенцией гидрогеля, а также формировать каркас, механические свойства которого наиболее похожи на нативную ткань.

Необходимо упомянуть и другие коллагеновые гидрогели, сшитые путем конъюгации коллагена с фибрином и с (фибрин)тромбином [52, 66, 67]. В числе прочего имеются примеры применения этого подхода для получения биоматериалов и трансплантации [68], а также для стабилизации 3D-биопечати кожи [69, 70].

Что касается способности к поглощению глюкозы, биodeградации и механических характеристик, то авторы источника [69] определили, что гидрогель на основе желатина и фибрина с одинаковым массовым соотношением этих компонентов является оптимальным с точки зрения данных характеристик и скорости биорезорбции.

Также в статье [71] отмечено, что композиты желатин и фибриноген, сшитые в присутствии CaCl_2 , делают возможным созревание фибробластов кожи человека в течение 26 дней, хотя и желатин, и фибрин являются биорезорбируемыми. В то же время напечатанные конструкции демонстрировали значительную усадку в процессе созревания ткани и теряли первоначальную форму [53]. В данном случае было показано, что использование фибриногена в качестве сшивающего агента для коллагена не подходит для создания нерастворимых гидрогелевых каркасов, используемых, например, в стоматологических пломбировочных материалах.

Известно, что биочернила, содержащие карбоксилсодержащие альгинаты, можно ионно сшивать с помощью Ca^{2+} [72] аналогично биочернилам, содержащим фибриноген. В связи с этим логично было бы создать гидрогелевые биочернила, содержащие как альгинаты, так и фибриноген, в которых эти два процесса сшивки могут одновременно происходить под воздействием Ca^{2+} .

К примеру, в сложных гибридных полимерных биочернилах, состоящих из комбинаций: коллаген + альгинат + фибриноген [72] или желатин + фибриноген + альгинат [73, 74], с успехом был реализован процесс комбинированной ионной сшивки, инициируемой Ca^{2+} , с минимальной усадкой. Так, благодаря присутствию как альгината, так и фибриногена композитный гидрогель из желатина, альгината и фибриногена может быть дважды усилен путем полимеризации молекул фибриногена с использованием тромбина и сшивания молекул альгината при воздействии CaCl_2 . После двойного химического сшивания гидрогель из желатина, альгината и фибрина обладает исключительными механическими свойствами, превосходной цитосовместимостью и исключительными физиологическими функциями. Выдающееся свойство сшитого гидрогеля из желатина, альгината и фибрина заключается в том, что все клетки и биологически активные вещества могут быть включены и напечатаны на 3D-принтере без ущерба их биологической активности.

Помимо прочего, важно отметить, что ковалентные и/или ионные сшивки в достаточной степени устраняют негативную способность желатиновых гидрогелей быстро биodeградироваться. Например, сшитые

подобным образом структуры с засеянными клетками стабильны до тех пор, пока орган или ткань полностью не созреют [75, 76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышеописанное, можно сделать основной вывод о том, что процесс создания биочернил является достаточно сложным и многоэтапным. Каждый компонент в отдельности не в полной мере удовлетворяет требованиям, предъявляемым как к биочернилам, так и к тканеинженерным структурам на их основе.

Включение в состав гидрогелевых (водорастворимых) биочернил других добавок на основе (био)полимеров и агентов, образующих трехмерные сетчатые структуры, помимо основных водорастворимых биополимерных коллагеновых и/или желатиновых матриц позволяет создать гидрогелевую композицию, оптимальную с точки зрения биопечати и свойств конечных тканеинженерных структур, вполне удовлетворяющих требованиям процесса регенерации конкретного органа или ткани.

Из водорастворимых полисахаридных добавок рекомендуется использовать альгинаты, поскольку они являются коммерчески доступными и широко используемыми в регенеративной медицине биополимерами. Главным преимуществом этих добавок является их способность образовывать ионные поперечные сшивки при действии Ca^{2+} .

Из полипептидных белковых добавок в коллагеновые и желатиновые биочернила основное предпочтение следует отдавать белкам в составе шелка – серицину и фиброину, а также фибриногену, который под действием фермента тромбина в присутствии Ca^{2+} образует сшитое волокнистое производное – фибрин, улучшая физико-механические характеристики тканеинженерных конструкций и продлевая время их биорезорбции.

Дополнительно за счет создания комбинированных биочернил, содержащих в разных соотношениях с коллагеновыми и/или желатиновыми полимерными матрицами фибриноген, а также альгинаты, оба из которых сшиваются под действием Ca^{2+} , можно очень широко варьировать физико-механические свойства и скорость биорезорбции как биочернил, так и тканеинженерных конструкций на их основе.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Amirrah I.N., Lokanathan Y., Zulkiflee I., Wee M.F.M.R., Motta A., Fauzi M.B. A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: from biosynthesis to bioscaffold // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10. P. 2307. DOI: 10.3390/biomedicines10092307.
2. Campos L.D., de Almeida Santos Junior V., Pimentel J.D., Carregã G.L.F., Cazarin C.B.B. Collagen supplementation in skin and orthopedic diseases: a review of the literature // *Heliyon*. 2023. Vol. 9, no. 4. P. e14961. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14961.
3. Hudson D.M., Archer M., Rai J., Weis M., Fernandes R.J., Eyre D.R. Age-related type I collagen modifications reveal tissue-defining differences between ligament and tendon // *Matrix Biology Plus*. 2021. Vol. 12. P. 100070. DOI: 10.1016/j.mbpplus.2021.100070.
4. Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H.-O., Rodemann H.P. Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering // *Cells Tissues Organs*. 2008. Vol. 187, no. 3. P. 165–176. DOI: 10.1159/000111805.
5. Trębacz H., Barzycka A. Mechanical properties and functions of elastin: an Overview // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, no. 3. P. 574. DOI: 10.3390/biom13030574.
6. Holzapfel G.A. Collagen in arterial walls: biomechanical aspects // *Collagen. Structure and mechanics* / ed. P. Fratzl. New York: Springer, 2008. P. 285–324. DOI: 10.1007/978-0-387-73906-9_11.
7. Song Y., Overmass M., Fan J., Hodge C., Sutton G., Lovicu F.J., You J. Application of collagen I and IV in bioengineering transparent ocular tissues // *Frontiers of Surgery*. 2021. Vol. 8. P. 639500. DOI: 10.3389/fsurg.2021.639500.
8. Balters L., Reichl S. 3D bioprinting of corneal models: a review of the current state and future outlook // *Journal of Tissue Engineering*. 2023. Vol. 14. DOI: 10.1177/20417314231197793.
9. Kelly D.J., Crawford A., Dickinson S.C., Sims T.J., Mundy J., Hollander A.P., et al. Biochemical markers of

the mechanical quality of engineered hyaline cartilage // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007. Vol. 18. P. 273–281. DOI: 10.1007/s10856-006-0689-2.

10. Ouyang Z., Dong L., Yao F., Wang K., Chen Y., Li S., et al. Cartilage-related collagens in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: from pathogenesis to therapeutics // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 12. P. 9841. DOI: 10.3390/ijms24129841.

11. Zheng M., Wang X., Chen Y., Yue O., Bai Z., Cui B., et al. A review of recent progress on collagen-based biomaterials // *Advanced Healthcare Materials*. 2023. Vol. 12, no. 16. P. 2202042. DOI: 10.1002/adhm.202202042.

12. Gulevsky A.K., Shcheniavsky I.I. Collagen: structure, metabolism, production and industrial application // *Biotechnologia Acta*. 2020. Vol. 13, no. 5. P. 42–61. DOI: 10.15407/biotech13.05.042.

13. Gao L., Orth P., Cucchiari M., Madry H. Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on *in vitro* and *in vivo* chondrogenesis of mesenchymal stem cells // *Expert Review of Medical Devices*. 2017. Vol. 14, no. 9. P. 717–732. DOI: 10.1080/17434440.2017.1368386.

14. Roberts S., Menage J., Sandell L.J., Evans E.H., Richardson J.B. Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation // *The Knee*. 2009. Vol. 16, no. 5. P. 398–404. DOI: 10.1016/j.knee.2009.02.004.

15. Wu J.-J., Weis M.A., Kim L.S., Eyre D.R. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage // *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285, no. 24. P. 18537–18544. DOI: 10.1074/jbc.M110.112904.

16. LeBar K., Wang Z. Extracellular matrix in cardiac tissue mechanics and physiology: role of collagen accumulation // *Extracellular matrix – developments and therapeutics* / eds R. Sashank Madhurapantula, P.R.O.J. Orgel, Z. Loewy. IntechOpen, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.96585.

17. Tan J., Zhang Q.-Y., Huang L.-P., Huang K., Xie H.-Q. Decellularized scaffold and its elicited immune response towards the host: the underlying mechanism and means of immunomodulatory modification // *Biomaterials Science*. 2021. Vol. 9. P. 4803–4820. DOI: 10.1039/d1bm00470k.

18. Hu Y., Liu L., Dan W., Dan N., Gu Z., Yu X. Synergistic effect of carbodiimide and dehydrothermal crosslinking on acellular dermal matrix // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013. Vol. 55. P. 221–230. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.009.

19. Blidi O.E., Omari N.E., Balahbib A., Ghchime R., El Menyiy N., Ibrahim A., et al. Extraction methods, characterization and biomedical applications of collagen: a review // *Bio-interface Research in Applied Chemistry*. 2021. Vol. 11, no. 5. P. 13587–13613. DOI: 10.33263/BRIAC115.1358713613.

20. Oslan S.N.H., Li C.X., Shapawi R., Mokhtar R.A.M., Noordin W.N.M., Huda N. Extraction and characterization of bioactive fish by-product collagen as promising for potential wound healing agent in pharmaceutical applications: current trend and future perspective // *International Journal of Food Science*. 2022. P. 9437878. DOI: 10.1155/2022/9437878.

21. Alipal J., Mohd Pu'ad N.A.S., Lee T.C., Nayan N.H.M., Sahari N., Basri H., et al. A review of gelatin: properties, sources, process, applications, and commercialization // *Materials Today: Proceedings*. 2021. Vol. 42, no. 1. P. 240–250. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.12.922.

22. Якубова О.С., Бекешева А.А. Научное обоснование физических свойств рыбного желатина // *Вестник*

Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2018. N 3. С. 132–140. DOI: 10.24143/2073-5529-2017-3-132-140. EDN: XYZDKH.

23. Pang Z., Deeth H., Sharma R., Bansal N. Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels // *Food Hydrocolloids*. 2015. Vol. 43. P. 340–351. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.06.005.

24. Pang Z., Luo Y., Ma P., Chen C., Liu X. Fundamental understanding of the role of gelatin in stabilizing milk protein systems during acidification // *LWT*. 2022. Vol. 172. P. 114187. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114187.

25. Nagel T., Kelly D.J. The composition of engineered cartilage at the time of implantation determines the likelihood of regenerating tissue with a normal collagen architecture // *Tissue Engineering. Part A*. 2013. Vol. 19, no. 7-8. P. 824–833. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0363.

26. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T.C. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization // *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. 2010. Vol. 368. P. 2123–2139. DOI: 10.1098/rsta.2010.0015.

27. Drzewiecki K.E., Malavade J.N., Ahmed I., Lowe C.J., Shreiber D.I. A thermoreversible, photocrosslinkable collagen bio-ink for free-form fabrication of scaffolds for regenerative medicine // *Technology*. 2017. Vol. 5, no. 4. P. 185–195. DOI: 10.1142/S2339547817500091.

28. Li Z., Ruan C., Niu X. Collagen-based bioinks for regenerative medicine: fabrication, application and prospective // *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2023. Vol. 17. P. 100211. DOI: 10.1016/j.medtd.2023.100211.

29. Marques C.F., Diogo G.S., Pina S., Oliveira J.M., Silva T.H., Reis R.L. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 2019. Vol. 30. P. 32. DOI: 10.1007/s10856-019-6234-x.

30. No D.Y., Lee K.-H., Lee J., Lee S.-H. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip // *Lab on a Chip*. 2015. Vol. 15. P. 3822–3837. DOI: 10.1039/c5lc00611b.

31. Ren X., Wang F., Chen C., Gong X., Yin L., Yang L. Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient // *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016. Vol. 17. P. 301. DOI: 10.1186/s12891-016-1130-8.

32. McCoy M.G., Seo B.R., Choi S., Fischbach C. Collagen I hydrogel microstructure and composition conjointly regulate vascular network formation // *Acta Biomaterialia*. 2016. Vol. 44. P. 200–208. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.08.028.

33. Mauney J.R., Nguyen T., Gillen K., Kirker-Head C., Gimble J.M., Kaplan D.L. Engineering adipose-like tissue *in vitro* and *in vivo* utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28, no. 35. P. 5280–5290. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.017.

34. Skardal A., Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting // *Annals of Biomedical Engineering*. 2015. Vol. 43, no. 3. P. 730–746. DOI: 10.1007/s10439-014-1207-1.

35. Shingleton W.D., Cawston T.E., Hodges D.J., Brick P. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover // *Biochemistry and Cell Biology*. 1996. Vol. 74, no. 6. P. 759–775. DOI: 10.1139/o96-083.

36. Diamantides N., Wang L., Pruiksma T., Siemiatkoski J., Dugopolski C., Shortkroff S., et al. Correlating rheological

properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH // *Biofabrication*. 2017. Vol. 9, no. 3. P. 034102. DOI: 10.1088/1758-5090/aa780f.

37. Murphy S.V., Skardal A., Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2013. Vol. 101A. P. 272–284. DOI: 10.1002/jbm.a.34326.

38. Helary C., Bataille I., Abed A., Illoul C., Anglo A., Louedec L., et al. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, no. 3. P. 481–490. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.073.

39. Yang X., Lu Z., Wu H., Li W., Zheng L., Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering // *Materials Science & Engineering: C*. 2018. Vol. 83. P. 195–201. DOI: 10.1016/j.msec.2017.09.002.

40. Kreimendahl F., Köpf M., Thiebes A.L., Duarte Campos D.F., Blaeser A., Schmitz-Rode T., et al. Three-dimensional printing and angiogenesis: tailored agarose-type I collagen blends comprise three-dimensional printability and angiogenesis potential for tissue-engineered substitutes // *Tissue Engineering. Part C: Methods*. 2017. Vol. 23, no. 10. P. 604–615. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0234.

41. Blaeser A., Heilshorn S.C., Duarte Campos D.F. Smart bioinks as *de novo* building blocks to bioengineer living tissues // *Gels*. 2019. Vol. 5, no. 2. P. 29. DOI: 10.3390/gels5020029.

42. Montero F.E., Rezende R.A., da Silva J.V.L., Sabino M.A. Development of a smart bioink for bioprinting applications // *Frontiers in Mechanical Engineering*. 2019. Vol. 5. P. 56. DOI: 10.3389/fmech.2019.00056.

43. Chang C.C., Boland E.D., Williams S.K., Hoying J.B. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials*. 2011. Vol. 98B, no. 1. P. 160–170. DOI: 10.1002/jbm.b.31831.

44. Martelli A., Bellucci D., Cannillo V. Additive manufacturing of polymer/bioactive glass scaffolds for regenerative medicine: a review // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 11. P. 2473. DOI: 10.3390/polym15112473.

45. Rodriguez-Rivera G.J., Green M., Shah V., Leyendecker K., Cosgriff-Hernandez E. A user's guide to degradation testing of polyethylene glycol-based hydrogels: From *in vitro* to *in vivo* studies // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2023. P. 1–13. DOI: 10.1002/jbm.a.37609.

46. Cui Z., Lee B.H., Pauken C., Vernon B.L. Degradation, cytotoxicity, and biocompatibility of NIPAAm-based thermosensitive, injectable, and bioresorbable polymer hydrogels // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2011. Vol. 98A, no. 2. P. 159–166. DOI: 10.1002/jbm.a.33093.

47. Diniz I.M.A., Chen C., Xu X., Ansari S., Zadeh H.H., Marques M.M., et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2015. Vol. 26. P. 153. DOI: 10.1007/s10856-015-5493-4.

48. Cheng L., Yao B., Hu T., Cui X., Shu X., Tang S., et al. Properties of an alginate-gelatin-based bioink and its potential impact on cell migration, proliferation, and differentiation // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 135. P. 1107–1113. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.017.

49. Liu C., Lewin Mejia D., Chiang B., Luker K.E., Luker G.D. Hybrid collagen alginate hydrogel as a platform

for 3D tumor spheroid invasion // *Acta Biomaterialia*. 2018. Vol. 75. P. 213–225. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.06.003.

50. Zhang X., Zhai C., Fei H., Liu Y., Wang Z., Luo C., et al. Composite silk-extracellular matrix scaffolds for enhanced chondrogenesis of mesenchymal stem cells // *Tissue Engineering. Part C: Methods*. 2018. Vol. 24, no. 11. P. 645–658. DOI: 10.1089/ten.TEC.2018.0199.

51. Steiner D., Lang G., Fischer L., Winkler S., Fey T., Greil P., et al. Intrinsic vascularization of recombinant eADF4(C16) spider silk matrices in the arteriovenous loop model // *Tissue Engineering. Part A*. 2019. Vol. 25, no. 21–22. P. 1504–1513. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0360.

52. Sanz-Horta R., Matesanz A., Gallardo A., Reinecke H., Jorcano J.L., Acedo P., et al. Technological advances in fibrin for tissue engineering // *Journal of Tissue Engineering*. 2023. Vol. 14. DOI: 10.1177/20417314231190288.

53. Duarte Campos D.F., Zhang S., Kreimendahl F., Köpf M., Fischer H., Vogt M., et al. Hand-held bioprinting for *de novo* vascular formation applicable to dental pulp regeneration // *Connective Tissue Research*. 2019. Vol. 61, no. 2. P. 205–215. DOI: 10.1080/03008207.2019.1640217.

54. Affas S., Schäfer F.M., Algarrahi K., Cristofaro V., Sullivan M.P., Yang X., et al. Augmentation cystoplasty of diseased porcine bladders with bi-layer silk fibroin grafts // *Tissue Engineering. Part A*. 2019. Vol. 25, no. 11–12. P. 855–866. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0113.

55. Saad M., El-Samad L.M., Gomaa R.A., Augustyniak M., Hassan M.A. A comprehensive review of recent advances in silk sericin: extraction approaches, structure, biochemical characterization, and biomedical applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Vol. 250. P. 126067. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126067.

56. Cai H., Wu B., Li Y., Liu Y., Shi L., Gong L., et al. Local delivery of silk-cellulose incorporated with stromal cell-derived factor-1 α functionally improves the uterus repair // *Tissue Engineering. Part A*. 2019. Vol. 25, no. 21–22. P. 1514–1526. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0283.

57. Sapru S., Das S., Mandal M., Ghosh A.K., Kundu S.C. Nonmulberry silk protein sericin blend hydrogels for skin tissue regeneration – *in vitro* and *in vivo* // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 137. P. 545–553. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.121.

58. Arango M.C., Montoya Y., Peresin M.S., Bustamante J., Álvarez-López C. Silk sericin as a biomaterial for tissue engineering: a review // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2020. Vol. 70, no. 16. P. 1115–1129. DOI: 10.1080/00914037.2020.1785454.

59. Urech L., Bittermann A.G., Hubbell J.A., Hall H. Mechanical properties, proteolytic degradability and biological modifications affect angiogenic process extension into native and modified fibrin matrices *in vitro* // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, no. 12. P. 1369–1379. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.045.

60. Zhu S., Yuan Q., Yin T., You J., Gu Z., Xiong S., et al. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications // *Journal of Materials Chemistry. B*. 2018. Vol. 6, no. 18. P. 2650–2676. DOI: 10.1039/c7tb02999c.

61. Kolesky D.B., Homan K.A., Skylar-Scott M.A., Lewis J.A. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. Vol. 113. P. 3179–3184. DOI: 10.1073/pnas.1521342113.

62. Moreira Teixeira L.S., Feijen J., van Blitterswijk C.A., Dijkstra P.J., Karperien M. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, no. 5. P. 1281–1290. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.067.
63. Zhao D., Tie C., Cheng B., Yang S., Wang X., Sun Z., et al. Effect of altering photocrosslinking conditions on the physical properties of alginate gels and the survival of photoencapsulated cells // *Polymer Degradation and Stability*. 2020. Vol. 179. P. 109297. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109297.
64. Da Conceicao Ribeiro R., Pal D., Ferreira A.M., Gentile P., Benning M., Dalgarno K. Reactive jet impingement bioprinting of high cell density gels for bone microtissue fabrication // *Biofabrication*. 2019. Vol. 11. P. 015014. DOI: 10.1088/1758-5090/aaf625.
65. Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications // *Blood*. 2013. Vol. 121, no. 10. P. 1712–1719. DOI: 10.1182/blood-2012-09-306639.
66. Rao R.R., Peterson A.W., Ceccarelli J., Putnam A.J., Stegemann J.P. Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials // *Angiogenesis*. 2012. Vol. 15. P. 253–264. DOI: 10.1007/s10456-012-9257-1.
67. Sorkio A., Koch L., Koivusalo L., Deiwick A., Miettinen S., Chichkov B., et al. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks // *Biomaterials*. 2018. Vol. 171. P. 57–71. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.034.
68. Milazzo G., Ardigo D., Toschi M., Matuska S., Rama P., de Luca M., et al. Holoclar: first of its kind in more ways than one // *Cell & Gene Therapy Insights*. 2016. Vol. 2, no. 2. P. 183–197. DOI: 10.18609/cgti.2016.023.
69. Hakam M.S., Imani R., Abolfathi N., Fakhrzadeh H., Sharifi A.M. Evaluation of fibrin-gelatin hydrogel as bio-paper for application in skin bioprinting: an *in-vitro* study // *Bio-medical Materials and Engineering*. 2016. Vol. 27, no. 6. P. 669–682. DOI: 10.3233/BME-161617.
70. Cubo N., Garcia M., del Cañizo J.F., Velasco D., Jorcano J.L. 3D bioprinting of functional human skin: production and *in vivo* analysis // *Biofabrication*. 2017. Vol. 9. P. 015006. DOI: 10.1088/1758-5090/9/1/015006.
71. Choi Y.-J., Yi H.-G., Kim S.-W., Cho D.-W. 3D cell printed tissue analogues: a new platform for theranostics // *Theranostics*. 2017. Vol. 7, no. 12. P. 3118–3137. DOI: 10.7150/thno.19396.
72. Montalbano G., Toumpaniari S., Popov A., Duan P., Chen J., Dalgarno K., et al. Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin based hydrogels for soft tissue engineering // *Materials Science & Engineering C*. 2018. Vol. 91. P. 236–246. DOI: 10.1016/j.msec.2018.04.101.
73. He K., Wang X. Rapid prototyping of tubular polyurethane and cell/hydrogel constructs // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2011. Vol. 26, no. 4. P. 363–374. DOI: 10.1177/0883911511412553.
74. Xu M., Van Y., Liu H., Yag Y., Wang X. Controlled adipose-derived stromal cells differentiation into adipose and endothelial cells in a 3D structure established by cell-assembly technique // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2009. Vol. 24, no. 1s. P. 31–47. DOI: 10.1177/0883911509102794.
75. Wang X., Yan Y., Zhang R. Rapid prototyping as tool for manufacturing bioartificial livers // *Trends in Biotechnology*. 2007. Vol. 25, no. 11. P. 505–513. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.08.010.
76. Wang X. Intelligent freeform manufacturing of complex organs // *Artificial Organs*. 2012. Vol. 36, no. 11. P. 951–961. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2012.01499.x.

REFERENCES

1. Amirrah I.N., Lokanathan Y., Zulkiflee I., Wee M.F.M.R., Motta A., Fauzi M.B. A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: from biosynthesis to bioscaffold. *Biomedicines*. 2022;10:2307. DOI: 10.3390/biomedicines10092307.
2. Campos L.D., de Almeida Santos Junior V., Pimentel J.D., Carregã G.L.F., Cazarin C.B.B. Collagen supplementation in skin and orthopedic diseases: a review of the literature. *Heliyon*. 2023;9(4):e14961. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14961.
3. Hudson D.M., Archer M., Rai J., Weis M., Fernandes R.J., Eyre D.R. Age-related type I collagen modifications reveal tissue-defining differences between ligament and tendon. *Matrix Biology Plus*. 2021;12:100070. DOI: 10.1016/j.mbps.2021.100070.
4. Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H.-O., Rodemann H.P. Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008;187(3):165–176. DOI: 10.1159/000111805.
5. Trębacz H., Barzycka A. Mechanical properties and functions of elastin: an Overview. *Biomolecules*. 2023;13(3):574. DOI: 10.3390/biom13030574.
6. Holzapfel G.A. Collagen in arterial walls: biomechanical aspects. In: Fratzl P. (ed.). *Collagen. Structure and mechanics*. New York: Springer; 2008, p. 285–324. DOI: 10.1007/978-0-387-73906-9_11.
7. Song Y., Overmass M., Fan J., Hodge C., Sutton G., Lovicu F.J., You J. Application of collagen I and IV in bioengineering transparent ocular tissues. *Frontiers of Surgery*. 2021;8:639500. DOI: 10.3389/fsurg.2021.639500.
8. Balters L., Reichl S. 3D bioprinting of corneal models: a review of the current state and future outlook. *Journal of Tissue Engineering*. 2023;14. DOI: 10.1177/20417314231197793.
9. Kelly D.J., Crawford A., Dickinson S.C., Sims T.J., Mundy J., Hollander A.P., et al. Biochemical markers of the mechanical quality of engineered hyaline cartilage. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18:273–281. DOI: 10.1007/s10856-006-0689-2.
10. Ouyang Z., Dong L., Yao F., Wang K., Chen Y., Li S., et al. Cartilage-related collagens in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: from pathogenesis to therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(12):9841. DOI: 10.3390/ijms24129841.
11. Zheng M., Wang X., Chen Y., Yue O., Bai Z., Cui B., et al. A review of recent progress on collagen-based biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*. 2023;12(16):2202042. DOI: 10.1002/adhm.202202042.
12. Gulevsky A.K., Shcheniavsky I.I. Collagen: structure, metabolism, production and industrial application. *Biotechnologia Acta*. 2020;13(5):42–61. DOI: 10.15407/biotech13.05.042.
13. Gao L., Orth P., Cucchiari M., Madry H. Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on *in vitro* and *in vivo* chondrogenesis of mesenchymal stem cells.

Expert Review of Medical Devices. 2017;14(9):717-732. DOI: 10.1080/17434440.2017.1368386.

14. Roberts S., Menage J., Sandell L.J., Evans E.H., Richardson J.B. Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *The Knee*. 2009;16(5):398-404. DOI: 10.1016/j.knee.2009.02.004.

15. Wu J.-J., Weis M.A., Kim L.S., Eyre D.R. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(24):18537-18544. DOI: 10.1074/jbc.M110.112904.

16. LeBar K., Wang Z. Extracellular matrix in cardiac tissue mechanics and physiology: role of collagen accumulation. In: Sashank Madhurapantula R., Orgel P.R.O.J., Loewy Z. (eds). *Extracellular matrix – developments and therapeutics*. IntechOpen; 2021. DOI: 10.5772/intechopen.96585.

17. Tan J., Zhang Q.-Y., Huang L.-P., Huang K., Xie H.-Q. Decellularized scaffold and its elicited immune response towards the host: the underlying mechanism and means of immunomodulatory modification. *Biomaterials Science*. 2021;9:4803-4820. DOI: 10.1039/d1bm00470k.

18. Hu Y., Liu L., Dan W., Dan N., Gu Z., Yu X. Synergistic effect of carbodiimide and dehydrothermal crosslinking on acellular dermal matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;55:221-230. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.009.

19. Blidi O.E., Omari N.E., Balahbib A., Ghchime R., El Menyiy N., Ibrahim A., et al. Extraction methods, characterization and biomedical applications of collagen: a review. *Bio-interface Research in Applied Chemistry*. 2021;11(5):13587-13613. DOI: 10.33263/BRIAC115.1358713613.

20. Oslan S.N.H., Li C.X., Shapawi R., Mokhtar R.A.M., Noordin W.N.M., Huda N. Extraction and characterization of bioactive fish by-product collagen as promising for potential wound healing agent in pharmaceutical applications: current trend and future perspective. *International Journal of Food Science*. 2022;9437878. DOI: 10.1155/2022/9437878.

21. Alipal J., Mohd Pu'ad N.A.S., Lee T.C., Nayan N.H.M., Sahari N., Basri H., et al. A review of gelatin: properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*. 2021;42(1):240-250. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.12.922.

22. Iakubova O.S., Bekesheva A.A. Scientific substantiation of physical properties of fish gelatin. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*. 2018;3:132-140. (In Russian). DOI: 10.24143/2073-5529-2017-3-132-140. EDN: XYZDKH.

23. Pang Z., Deeth H., Sharma R., Bansal N. Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels. *Food Hydrocolloids*. 2015;43:340-351. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.06.005.

24. Pang Z., Luo Y., Ma P., Chen C., Liu X. Fundamental understanding of the role of gelatin in stabilizing milk protein systems during acidification. *LWT*. 2022;172:114187. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114187.

25. Nagel T., Kelly D.J. The composition of engineered cartilage at the time of implantation determines the likelihood of regenerating tissue with a normal collagen architecture. *Tissue Engineering. Part A*. 2013;19(7-8):824-833. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0363.

26. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T.C. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philosophical Trans-*

actions of the Royal Society A. 2010;368:2123-2139. DOI: 10.1098/rsta.2010.0015.

27. Drzewiecki K.E., Malavade J.N., Ahmed I., Lowe C.J., Shreiber D.I. A thermoreversible, photocrosslinkable collagen bio-ink for free-form fabrication of scaffolds for regenerative medicine. *Technology*. 2017;5(4):185-195. DOI: 10.1142/S2339547817500091.

28. Li Z., Ruan C., Niu X. Collagen-based bioinks for regenerative medicine: fabrication, application and perspective. *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2023;17: 100211. DOI: 10.1016/j.medntd.2023.100211.

29. Marques C.F., Diogo G.S., Pina S., Oliveira J.M., Silva T.H., Reis R.L. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 2019;30:32. DOI: 10.1007/s10856-019-6234-x.

30. No D.Y., Lee K.-H., Lee J., Lee S.-H. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab on a Chip*. 2015;15:3822-3837. DOI: 10.1039/c5lc00611b.

31. Ren X., Wang F., Chen C., Gong X., Yin L., Yang L. Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016;17:301. DOI: 10.1186/s12891-016-1130-8.

32. McCoy M.G., Seo B.R., Choi S., Fischbach C. Collagen I hydrogel microstructure and composition conjointly regulate vascular network formation. *Acta Biomaterialia*. 2016;44:200-208. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.08.028.

33. Mauney J.R., Nguyen T., Gillen K., Kirker-Head C., Gimple J.M., Kaplan D.L. Engineering adipose-like tissue *in vitro* and *in vivo* utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(35):5280-5290. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.017.

34. Skardal A., Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting. *Annals of Biomedical Engineering*. 2015;43(3):730-746. DOI: 10.1007/s10439-014-1207-1.

35. Shingleton W.D., Cawston T.E., Hodges D.J., Brick P. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochemistry and Cell Biology*. 1996;74(6):759-775. DOI: 10.1139/o96-083.

36. Diamantides N., Wang L., Pruiksma T., Siemiatkoski J., Dugopolski C., Shortkroff S., et al. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication*. 2017;9(3):034102. DOI: 10.1088/1758-5090/aa780f.

37. Murphy S.V., Skardal A., Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2013;101A:272-284. DOI: 10.1002/jbm.a.34326.

38. Helary C., Bataille I., Abed A., Illoul C., Anglo A., Louedec L., et al. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. *Biomaterials*. 2010;31(3):481-490. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.073.

39. Yang X., Lu Z., Wu H., Li W., Zheng L., Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Materials Science & Engineering: C*. 2018;83:195-201. DOI: 10.1016/j.msec.2017.09.002.

40. Kreimendahl F., Köpf M., Thiebes A.L., Duarte Campos D.F., Blaeser A., Schmitz-Rode T., et al. Three-dimensional printing and angiogenesis: tailored agarose-type I collagen blends comprise three-dimensional printability and

angiogenesis potential for tissue-engineered substitutes. *Tissue Engineering. Part C: Methods*. 2017;23(10):604-615. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0234.

41. Blaeser A., Heilshorn S.C., Duarte Campos D.F. Smart bioinks as de novo building blocks to bioengineer living tissues. *Gels*. 2019;5(2):29. DOI: 10.3390/gels5020029.

42. Montero F.E., Rezende R.A., da Silva J.V.L., Sabino M.A. Development of a smart bioink for bioprinting applications. *Frontiers in Mechanical Engineering*. 2019;5:56. DOI: 10.3389/fmech.2019.00056.

43. Chang C.C., Boland E.D., Williams S.K., Hoying J.B. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials*. 2011;98B(1):160-170. DOI: 10.1002/jbm.b.31831.

44. Martelli A., Bellucci D., Cannillo V. Additive manufacturing of polymer/bioactive glass scaffolds for regenerative medicine: a review. *Polymers*. 2023;15(11):2473. DOI: 10.3390/polym15112473.

45. Rodriguez-Rivera G.J., Green M., Shah V., Leyendecker K., Cosgriff-Hernandez E. A user's guide to degradation testing of polyethylene glycol-based hydrogels: From in vitro to in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2023;1-13. DOI: 10.1002/jbm.a.37609.

46. Cui Z., Lee B.H., Pauken C., Vernon B.L. Degradation, cytotoxicity, and biocompatibility of NIPAAm-based thermosensitive, injectable, and bioresorbable polymer hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2011;98A(2):159-166. DOI: 10.1002/jbm.a.33093.

47. Diniz I.M.A., Chen C., Xu X., Ansari S., Zadeh H.H., Marques M.M., et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2015;26:153. DOI: 10.1007/s10856-015-5493-4.

48. Cheng L., Yao B., Hu T., Cui X., Shu X., Tang S., et al. Properties of an alginate-gelatin-based bioink and its potential impact on cell migration, proliferation, and differentiation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;135:1107-1113. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.017.

49. Liu C., Lewin Mejia D., Chiang B., Luker K.E., Luker G.D. Hybrid collagen alginate hydrogel as a platform for 3D tumor spheroid invasion. *Acta Biomaterialia*. 2018;75:213-225. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.06.003.

50. Zhang X., Zhai C., Fei H., Liu Y., Wang Z., Luo C., et al. Composite silk-extracellular matrix scaffolds for enhanced chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part C: Methods*. 2018;24(11):645-658. DOI: 10.1089/ten.TEC.2018.0199.

51. Steiner D., Lang G., Fischer L., Winkler S., Fey T., Greil P., et al. Intrinsic vascularization of recombinant eADF4(C16) spider silk matrices in the arteriovenous loop model. *Tissue Engineering. Part A*. 2019;25(21-22):1504-1513. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0360.

52. Sanz-Horta R., Matesanz A., Gallardo A., Reinecke H., Jorcano J.L., Acedo P., et al. Technological advances in fibrin for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*. 2023;14. DOI: 10.1177/20417314231190288.

53. Duarte Campos D.F., Zhang S., Kreimendahl F., Köpf M., Fischer H., Vogt M., et al. Hand-held bioprinting for de novo vascular formation applicable to dental pulp regeneration. *Connective Tissue Research*. 2019;61(2):205-215. DOI: 10.1080/03008207.2019.1640217.

54. Affas S., Schäfer F.M., Algarrahi K., Cristofaro V.,

Sullivan M.P., Yang X., et al. Augmentation cystoplasty of diseased porcine bladders with bi-layer silk fibroin grafts. *Tissue Engineering. Part A*. 2019;25(11-12):855-866. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0113.

55. Saad M., El-Samad L.M., Gomaa R.A., Augustyniak M., Hassan M.A. A comprehensive review of recent advances in silk sericin: extraction approaches, structure, biochemical characterization, and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;250:126067. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126067.

56. Cai H., Wu B., Li Y., Liu Y., Shi L., Gong L., et al. Local delivery of silk-cellulose incorporated with stromal cell-derived factor-1 α functionally improves the uterus repair. *Tissue Engineering. Part A*. 2019;25(21-22):1514-1526. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0283.

57. Sapru S., Das S., Mandal M., Ghosh A.K., Kundu S.C. Nonmulberry silk protein sericin blend hydrogels for skin tissue regeneration – in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;137:545-553. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.121.

58. Arango M.C., Montoya Y., Peresin M.S., Bustamante J., Álvarez-López C. Silk sericin as a biomaterial for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2020;70(16):1115-1129. DOI: 10.1080/00914037.2020.1785454.

59. Urech L., Bittermann A.G., Hubbell J.A., Hall H. Mechanical properties, proteolytic degradability and biological modifications affect angiogenic process extension into native and modified fibrin matrices in vitro. *Biomaterials*. 2005;26(12):1369-1379. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.045.

60. Zhu S., Yuan Q., Yin T., You J., Gu Z., Xiong S., et al. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry. B*. 2018;6(18):2650-2676. DOI: 10.1039/c7tb02999c.

61. Kolesky D.B., Homan K.A., Skylar-Scott M.A., Lewis J.A. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113:3179-3184. DOI: 10.1073/pnas.1521342113.

62. Moreira Teixeira L.S., Feijen J., van Blitterswijk C.A., Dijkstra P.J., Karperien M. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(5):1281-1290. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.067.

63. Zhao D., Tie C., Cheng B., Yang S., Wang X., Sun Z., et al. Effect of altering photocrosslinking conditions on the physical properties of alginate gels and the survival of photoencapsulated cells. *Polymer Degradation and Stability*. 2020;179:109297. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109297.

64. Da Conceicao Ribeiro R., Pal D., Ferreira A.M., Gentile P., Benning M., Dalgarno K. Reactive jet impingement bioprinting of high cell density gels for bone micro-tissue fabrication. *Biofabrication*. 2019;11:015014. DOI: 10.1088/1758-5090/aaf625.

65. Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013;121(10):1712-1719. DOI: 10.1182/blood-2012-09-306639.

66. Rao R.R., Peterson A.W., Ceccarelli J., Putnam A.J., Stegemann J.P. Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. *Angiogenesis*. 2012;15:253-264. DOI: 10.1007/s10456-012-9257-1.

67. Sorkio A., Koch L., Koivusalo L., Deiwick A., Miettinen S., Chichkov B., et al. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks. *Biomaterials*. 2018;171:57-71. DOI: j.biomaterials.2018.04.034.

68. Milazzo G., Ardigo D., Toschi M., Matuska S., Rama P., de Luca M., et al. Holoclar: first of its kind in more ways than one. *Cell & Gene Therapy Insights*. 2016;2(2):183-197. DOI: 10.18609/cgti.2016.023.

69. Hakam M.S., Imani R., Abolfathi N., Fakhrzadeh H., Sharifi A.M. Evaluation of fibrin-gelatin hydrogel as biopaper for application in skin bioprinting: an *in-vitro* study. *Bio-medical Materials and Engineering*. 2016;27(6):669-682. DOI: 10.3233/BME-161617.

70. Cubo N., Garcia M., del Cañizo J.F., Velasco D., Jorcano J.L. 3D bioprinting of functional human skin: production and *in vivo* analysis. *Biofabrication*. 2017;9:015006. DOI: 10.1088/1758-5090/9/1/015006.

71. Choi Y.-J., Yi H.-G., Kim S.-W., Cho D.-W. 3D cell printed tissue analogues: a new platform for theranostics. *Theranostics*. 2017;7(12):3118-3137. DOI: 10.7150/thno.19396.

72. Montalbano G., Toumpaniari S., Popov A., Duan P., Chen J., Dalgarno K., et al. Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin based hydrogels for soft tissue engineering. *Materials Science & Engineering C*. 2018;91:236-246. DOI: 10.1016/j.msec.2018.04.101.

73. He K., Wang X. Rapid prototyping of tubular polyurethane and cell/hydrogel constructs. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2011;26(4):363-374. DOI: 10.1177/0883911511412553.

74. Xu M., Van Y., Liu H., Yag Y., Wang X. Controlled adipose-derived stromal cells differentiation into adipose and endothelial cells in a 3D structure established by cell-assembly technique. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2009;24(1s):31-47. DOI: 10.1177/0883911509102794.

75. Wang X., Yan Y., Zhang R. Rapid prototyping as tool for manufacturing bioartificial livers. *Trends in Biotechnology*. 2007;25(11):505-513. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.08.010.

76. Wang X. Intelligent freeform manufacturing of complex organs. *Artificial Organs*. 2012;36(11):951-961. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2012.01499.x.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Фарион Иван Александрович,

к.х.н., научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
✉ fariv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Бурдуковский Виталий Федорович,

д.х.н., доцент, заместитель директора по научной
работе,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
burdvit@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 01.11.2023.
Одобрена после рецензирования 08.12.2023.
Принята к публикации 31.05.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ivan A. Farion,

Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
✉ fariv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Vitalii F. Burdukovskii,

Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Deputy Director for Research,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
burdvit@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 01.11.2023.
Approved after reviewing 08.12.2023.
Accepted for publication 31.05.2024.