

и к проблеме природы сил, формирующих и движущих космо-социодинамические процессы.

В контексте эмбриональной аналогии исходный клеточный симметроид может интерпретироваться или играть роль растущей клеточной структуры зародыша, в которой постепенно возникает душа, ощущение самого существования – «я». Сама по себе система клеток еще не является организмом в полном смысле слова, а тем более зачатком разумного существа. Эмбрион становится таковым, лишь обретая субъективное переживание собственного существования или, по крайней мере, потенцию такого переживания. Сколь далеко может простираться данная аналогия на космос, пока сказать сложно, но то, что потенциальная рефлексивность уже заложена в первоосновы устройства Вселенной, следует признать фактом. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Циолковский К.Э. Космическая философия. Живая Вселенная / К.Э. Циолковский. – М., 2017.
2. Пенроуз Р. Циклы времени. Новый взгляд на эволюцию Вселенной / Р. Пенроуз. – М., 2014.
3. А.В. Колесников, С.Н. Сиренко, Г.Г. Малинецкий. Хаос и трансформация категории времени в постнеклассической науке // Философия науки. 2019. №1. С. 35–56.
4. Gisin N. Real Numbers are the Hidden Variables of Classical Mechanics / N. Gisin // <https://arxiv.org/abs/1909.04514>.
5. N. Gisin. Mathematical languages shape our understanding of time in physics // Nature Physics. 2020. №16. P. 114–116
6. Колесников А.В. Киберкосмизм. Цифровая философия темпорального универсума / А.В. Колесников. – Минск, 2022.
7. М. Фейгенбаум. Универсальность в поведении нелинейных систем // Успехи физических наук. 1983. №2. С. 343–374.

ТРЕХМЕРНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК И БИОПРИНТИНГ

Аннотация. Представлены подходы к формированию плоских и объемных клеточных паттернов с применением метода биопринтинга, обсуждаются особенности трехмерного культивирования, когда за счет более интенсивных межклеточных взаимодействий у клеточного ансамбля появляются свойства, нехарактерные для одиночных клеток, создаются условия, необходимые для возникновения процессов самоорганизации в системе взаимодействующих клеток, трансформации в тканеподобные и органоподобные структуры. Современные методы биопринтинга позволяют увеличить производительность этих процессов путем инженерного внесения дополнительных уровней организации.

Ключевые слова: трехмерное клеточное культивирование, гидрогели, биопринтинг.

Для цитирования: Денисов А., Пашкевич С. Трехмерное культивирование клеток и биопринтинг // Наука и инновации. 2023. №11. С. 27–31. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-11-27-31>

Методы *in vitro* активно применяются в биомедицине при моделировании патологических процессов, разработке новых лекарственных препаратов и методов клеточной терапии, в биоинженерии. При культивировании клетки помещаются в питательную среду в специализированном инкубаторе с контролем уровней CO₂, pH и температуры для поддержания условий, необходимых для их жизнедеятельности.

Классические подходы основаны на их выращивании на плоской (2D) жесткой поверхности – на дне луночного планшета или чашки Петри. Такие условия далеки от естественной физиологической среды

УДК 57.086.83



Андрей Денисов,

заведующий лабораторией клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета, ведущий научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси, кандидат биологических наук; an.denisov@gmail.com



Светлана Пашкевич,

заведующий лабораторией нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси, кандидат биологических наук, доцент; skypasht@mail.ru

и не позволяют воспроизводить сложную трехмерную (3D) структуру и микроокружение клеток в тканях *in vivo*, что может снижать релевантность экспериментальных данных. Так, в области создания новых лекарственных препаратов типичный процесс разработки включает ряд этапов исследований – доклинических (*in vitro* на клеточной культуре и на животных) и клинических, при этом последние наиболее затратны, в связи с чем актуально выявление нежелательных свойств или неэффективности тестируемых субстанций именно на ранних стадиях. При этом 90% препаратов, успешно прошедших доклинические испытания, при переходе к клиническим терпят неудачу [1]. Более 95% соединений, которые убивают опухолевые клетки в культуре или результативны против опухолей у животных, не проходят I фазу клинических испытаний [2]. Это свидетельствует о несовершенстве существующих экспериментальных моделей, в частности *in vitro*, и актуальности новых разработок в данной области. В настоящее время интенсивно развивается подход *in silico*, позволяющий с помощью методов компьютерного моделирования выполнять предварительный анализ свойств синтезируемых молекул. Однако усовершенствование используемых экспериментальных моделей *in vitro* для повышения эффективности процесса разработки и тестирования препаратов по-прежнему актуально, в том числе, и с целью снижения потребности в проведении опытов на животных *in vivo* в соответствии с современными тенденциями в области биоэтики.

В связи с этим активно развиваются методы 3D-культивирования для более полного воссоздания клеточного окружения, соответствующего

условиям *in vivo*. 3D-культуры отличаются более интенсивными взаимодействиями клеток между собой, а также с внеклеточным матриксом, наличием пространственных градиентов биохимических факторов, питательных веществ, кислорода и тестируемых субстанций, что приводит к возникновению новых, в терминах системной биологии – эмерджентных [3] свойств у трехмерной популяции клеток по сравнению с одиночными или клетками на плоском субстрате – таких, как устойчивость к действию фармакологических препаратов и способность к самоорганизации [4].

Для создания трехмерных популяций клеток используют как методы формирования клеточных сфероидов при культивировании в жидкой среде в условиях отсутствия адгезивной подложки, так и трехмерные скаффолды с применением гидрогелей на основе альгината, коллагена и широкого ряда других естественных или синтетических субстанций для моделирования внеклеточного окружения [5]. Гидрогель на основе клеточной суспензии в культуральной емкости позволяет, однако, в основном получать клеточные популяции с исходной гомогенной структурой. Вместе с тем интенсивно развивается подход по биопечати клеточных популяций с различной пространственной конфигурацией с помощью 3D-биопринтеров. Они активно применяются в исследованиях для создания тканеинженерных конструкций, разработки новых подходов в биомедицине, в том числе для построения научно-технологического базиса восстановления тканей и органов при решении задач регенеративной медицины [6].

В совместных исследованиях сотрудников кафедры биофизики БГУ и лаборатории нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси

разрабатываются методы трехмерного культивирования клеток линии глиомы С6 и первичной культуры коры головного мозга крысы, создания упорядоченных клеточных паттернов с применением разработанного 3D-биопринтера, позволяющего формировать их в чашке Петри путем трехмерного позиционирования шприца с клеточной суспензией и ее дозирования в соответствии с заданным алгоритмом. Вид печатающего узла биопринтера представлен на *рис. 1А*. Типичный вид клеток глиомы крысы С6 при стандартном протоколе культивирования в чашке Петри показан на *рис. 1Б*. После высевания из суспензии клетки оседают на дно чашки равномерным слоем, прикрепляются к ее поверхности и распластываются, принимая характерную вытянутую веретенообразную форму с отростками.

На *рис. 2А* представлен паттерн из суспензии клеток глиомы С6, сформированный на дне чашки Петри при помощи биопринтера. Клеточная суспензия образует упорядоченную квадратную решетку в виде капель. По завершении процесса печати чашку Петри помещали на 15 мин в клеточный инкубатор, чтобы клетки осели на дно и закрепились, после чего промывали раствором фосфатного буфера, заливали средой культивирования и снова помещали в клеточный инкубатор. На *рис. 2Б* показаны клетки после одних суток культивирования. В отличие от однородного слоя, создаваемого по стандартной методике, они растут в виде паттерна в узлах решетки, сформированного посредством биопечати. В дальнейшем происходит пролиферация (разрастание путем размножения делением), распространение клеток по незанятым изначально участкам субстрата, и в течение нескольких дней клетки С6 полностью заполняют дно плотным монослоем.

На *рис. 2В* – фрагмент аналогичного клеточного паттерна на поверхности гидрогеля, полученного путем растворения 3%-ного желатина в среде культивирования с последующей его сшивкой ферментом трансглутаминазой [7]. На *рис. 2Г* показан участок паттерна после 4 суток культивирования. Морфология клеточной культуры существенно отличается от таковой в случае роста на плоском субстрате (*рис. 2Б*) – формируется плотный трехмерный кластер, от которого клетки разрастаются в стороны по объему гидрогеля. Одиночные имеют преимущественно округлую форму с тонкими отростками. Интенсивность пролиферации в 3D условиях также отличается – в случае роста аналогичного паттерна

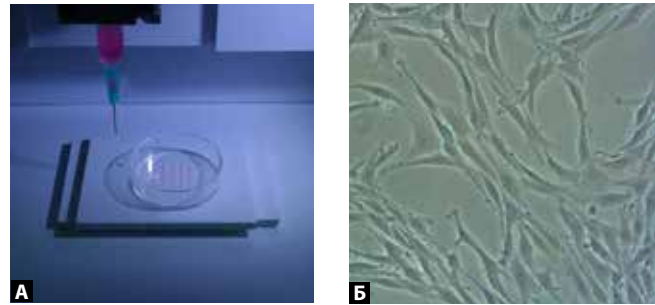


Рис. 1. Печатающий узел биопринтера (А). Клетки глиомы крысы С6, растущие на дне чашке Петри (Б)

на плоском субстрате клетки за это время полностью заполняют все свободное пространство.

С помощью методов биопринтинга можно создавать и более сложные структуры с применением композитных скаффолдов. На *рис. 3А* представлено фазово-контрастное изображение паттерна в виде решетки, сформированного из коллаген-альгинат-желатинового гидрогеля, оптимизированного для культивирования нейронов и дополнительно загруженного флуоресцентными графеновыми квантовыми точками (максимум поглощения – 485 нм, максимум испускания – 530 нм),

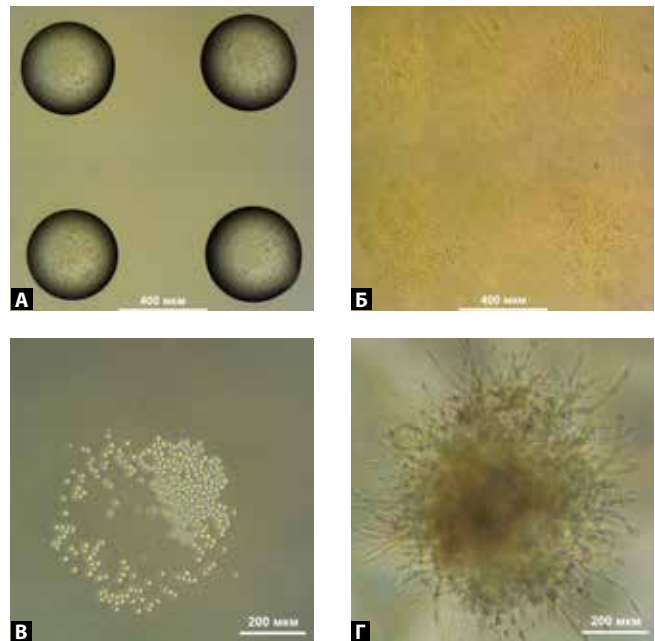


Рис. 2. Паттерн из суспензии клеток глиомы С6, сформированный на дне чашки Петри при помощи биопринтера: после печати (А) и через одни сутки культивирования (Б). Фрагмент паттерна из клеток глиомы С6, полученный на поверхности гидрогеля: после печати (В) и через 4 суток культивирования (Г)

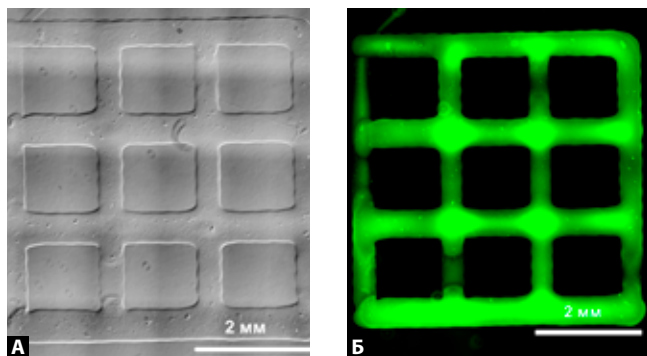


Рис. 3. Паттерн в виде решетки, сформированный из коллаген-альгинат-желатинового гидрогеля, загруженного флуоресцентными графеновыми квантовыми точками: фазово-контрастное изображение (А) и флуоресцентное изображение (Б)

а на рис. 3Б – соответствующее флуоресцентное изображение. Наноразмерные флуоресцентные углеродные материалы позволяют визуализировать клетки нервной ткани [8] и способны доставлять конъюгированные препараты. Как биосовместимый электропроводящий материал графен может улучшать механические и электрические характеристики гидрогеля при использовании в качестве интерфейсного элемента электродов сенсоров электрической активности при их сопряжении с трехмерными биоинженерными конструкциями, моделирующими нервную ткань.

Представленные методы формирования клеточных паттернов могут применяться при исследовании процессов миграции и пролиферации клеток. Задействованная в работе линия клеток глиомы крысы С6 широко используется при моделировании роста и инвазии опухолей, в том числе в условиях трехмерного культивирования [9]. Интенсивно развиваются методы экспериментального моделирования опухолевых процессов с помощью 3D-печати. Хотя трехмерное культивирование в гидрогелевых скаффолдах позволяет улучшить релевантность данных по сравнению с 2D-подходами, для создания более сложных моделей с гетерогенной структурой и васкуляризацией сложно обойтись без 3D-биопринтинга [10], открывающего новые перспективы для разработки персонализированных методов терапии онкозаболеваний [11].

Полученный эффект формирования клеточной культуры с различными свойствами из изначально одинаковых паттернов (рис. 2Б и 2Г) отражает существенные различия в условиях роста клеток при 2D- и 3D-культивировании.

Отличия в морфологии отдельных клеток (распластанные на поверхности и округлые/шарообразные в гидрогеле) определяют большую интенсивность их взаимодействия с внеклеточной средой в случае 2D-культуры. Плотная структура клеточного кластера при 3D-культивировании ведет к возникновению градиентов концентрации веществ, поступающих из внеклеточного раствора, факторов роста, вырабатываемых клетками, кислорода и др., что нехарактерно для культуры на плоской поверхности. Более низкая скорость пролиферации клеток глиомы С6 при 3D-культивировании дает возможность проведения длительных, более реалистичных экспериментов по сравнению с условиями 2D, когда клетки формируют плотный монослой за несколько дней, и становится необходимым их пересечение. При этом рост и увеличение размеров клеточных кластеров приводит к возникновению гипоксических состояний в их центрах с последующей гибелью клеток, что является особенностью методов 3D-культивирования, причем негативные процессы могут наблюдаться уже для структур толщиной порядка 200 мкм. В связи с этим весьма актуальна разработка методов биопринтинга для создания сосудистой сети, которая обеспечивала бы поступление кислорода и питательных веществ в объем клеточных конструкций [12].

Интенсификация межклеточных взаимодействий в трехмерной клеточной культуре обуславливает возникновение явления самоорганизации в данной сложной системе [4]. Одно из наиболее значимых практических применений такого эффекта – разработка методов формирования органоидов – трехмерных клеточных структур, получаемых из стволовых клеток и обладающих определенными свойствами органов с дифференцированными клетками и тканеподобной архитектурой [13]. Хотя структура органоидов во многом упрощена относительно полнофункционального органа, отсутствует васкуляризация и иннервация, органоиды при этом обладают преимуществами культуры *in vitro* (контролируемые условия роста, возможность масштабирования) и позволяют исследовать многие аспекты функционирования ткани [4].

Следует отметить, что для нейронов эмерджентные свойства могут проявляться уже при 2D-культивировании отдельных диссоциированных клеток благодаря формированию ими развитой сети отростков – нейритов,

посредством которых нейроны передают генерируемые электрические импульсы через синаптические контакты. Культивируемая биологическая нейронная сеть может спонтанно генерировать паттерны электрической активности, несвойственные одиночным нейронам [14]. Вследствие усложнения строения в процессе роста и развития у нервной ткани возникают принципиально новые качества. Зарождение сознания и интеллекта – наиболее яркий пример проявления эмерджентности в нейрофизиологии.

Мозг – наиболее сложно организованный орган, и для нервной ткани эмерджентные свойства и самоорганизация исследуются на различных уровнях: от молекулярных сигнальных каскадов синаптической передачи [15] до церебральных органоидов и мозга в целом [16]. При этом даже двумерная сеть из нескольких сотен тысяч нейронов, культивируемых на планарном микроэлектродном массиве, спонтанно генерирует сложные наборы пространственно-временных паттернов электрической активности, что делает эксперименты по исследованию процессов обучения *in vitro* труднопроизводимыми. Одним из подходов по улучшению стабильности нейросетевого ответа на стимуляцию может быть формирование нейронной сети методом биопечати в виде упорядоченной решетки, подобной представленной на рис. 3А.

Несмотря на успехи в области методов трехмерного культивирования, производимые с их помощью тканеинженерные конструкции находят лишь ограниченное применение в клинической практике. Это связано с тем, что получаемые клеточные продукты уступают по своим свойствам естественным тканям. Улучшить ситуацию может комбинация методов биопринтинга и формирования органоидов, чтобы создавать изначально организованную клеточную структуру и таким образом повысить эффективность последующего процесса самоорганизации клеток [17]. Прогресс этих направлений рассматривается как часть процесса смены парадигмы тканевой инженерии – сдвиг фокуса от конструирования ткани/органа (tissue engineering) на создание условий для развития, воспроизведения этапов органогенеза (developmental engineering) [18]. К передовым достижениям в этой области относится разработка ассембляжидов – композитных конструкций, объединяющих органоиды различных типов для более полного воссоздания функций органов [19].

■ **Summary.** The paper presents approaches to the formation of flat and three-dimensional cellular patterns using bioprinting methods, discusses the features of three-dimensional culture, when due to more intensive intercellular interactions the cell ensemble has properties that are not typical for single cells, the conditions necessary for the emergence of self-organization processes are created in the system of interacting cells, transformation into tissue-like and organ-like structures. Modern bioprinting methods provide increased productivity of these processes by engineering the additional levels of organization.

■ **Keywords:** three-dimensional cell culture, hydrogels, bioprinting.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-11-27-31>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. D. Sun [et al.]. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? // *Acta Pharm Sin B*. 2022. Vol. 12. №7. P. 3049–3062.
2. A.B. Kunnumakara [et al.]. Cancer drug development: The missing links // *Experimental biology and medicine* (Maywood N.J.). 2019. Vol. 244. №8. P. 663–689.
3. M. Adler, A.R. Chavan, R. Medzhitov. *Tissue Biology: In Search of a New Paradigm* // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2023. Vol. 39. №1. P. 67–89.
4. A. Xavier da Silveira dos Santos, P. Liberali. From single cells to tissue self-organization // *The FEBS Journal*. 2019. Vol. 286. №8. P. 1495–1513.
5. J. Lou, D.J. Mooney. Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture // *Nature Reviews Chemistry*. 2022. Vol. 6. №10. P. 726–744.
6. I. Matai [et al.]. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering // *Biomaterials*. 2020. Vol. 226. P. 119536.
7. L.S. Moreira Teixeira [et al.]. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. №5. P. 1281–1290.
8. А.А. Денисов, А.В. Богданова, Т.А. Кулагова, Т.Е. Кузнецова, Д.П. Токальчик, С.Г. Пашкевич. Диффузия графеновых квантовых точек в срезы гиппокампа крысы *in vitro* // *Новости медико-биологических наук*. 2022. Т. 25. №4. Стр. 14–18.
9. F.M. Kievit [et al.]. Chitosan–alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31. №22. P. 5903–5910.
10. M.G. Sánchez-Salazar, M.M. Álvarez, G. Trujillo-de Santiago. Advances in 3D bioprinting for the biofabrication of tumor models // *Bioprinting*. 2021. Vol. 21. Стр. e00120.
11. R. Augustine [et al.]. 3D Bioprinted cancer models: Revolutionizing personalized cancer therapy // *Translational Oncology*. 2021. Vol. 14. №4. P. 101015.
12. C. Tomasina [et al.]. Bioprinting Vasculature: Materials, Cells and Emergent Techniques // *Materials* (Basel). 2019. Vol. 12. №17. P. 2701.
13. C. Corró, L. Novellasdemunt, V.S.W. Li. A brief history of organoids // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020. Vol. 319. №1. P. C151–C165.
14. Denisov A.A. et al. Patterns of Electrical Activity Generated by Biological Neural Network *in vitro* // *Open semantic technologies for intelligent systems*. 2018. P. 265–268.
15. U.S. Bhalla, R. Iyengar. Emergent Properties of Networks of Biological Signaling Pathways // *Science*. 1999. Vol. 283. №5400. P. 381–387.
16. M. Thiebaut De Schotten, S.J. Forkel. The emergent properties of the connected brain // *Science*. 2022. Vol. 378. №6619. P. 505–510.
17. C. He [et al.]. Organoid bioprinting strategy and application in biomedicine: A review // *IJB*. 2023. Vol. 9. №6. P. 0112.
18. J. Chakraborty, S. Chawla, S. Ghosh. Developmental biology-inspired tissue engineering by combining organoids and 3D bioprinting // *Current Opinion in Biotechnology*. 2022. Vol. 78. P. 102832.
19. S.P. Paşca. Assembling human brain organoids // *Science*. 2019. Vol. 363. №6423. P. 126–127.

Статья поступила в редакцию 31.10.2023 г.