

TISSUE AND ORGAN REGENERATION

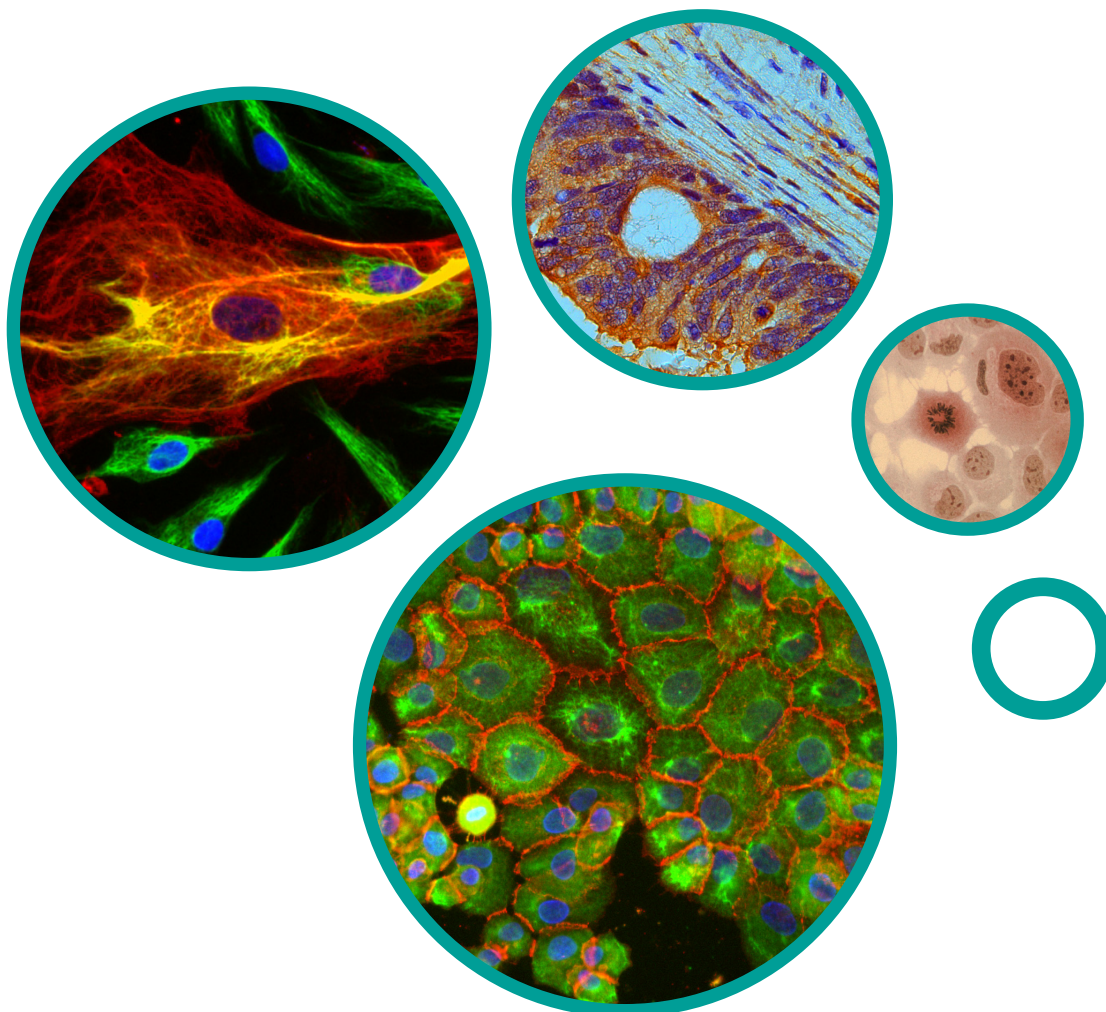
# РЕГЕНЕРАЦИЯ

## органов и тканей

Регенеративная биомедицина Евразии

1

Том (Vol.) 3  
2025



ОБЩЕСТВО  
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ  
МЕДИЦИНЫ

ISSN 2949-5938

## Цели и задачи

Ключевой задачей журнала является создание площадки для освещения и диалога об основных достижениях, проблемах и задачах регенеративной биомедицины, а также обобщение современных представлений о фундаментальных механизмах регенерации тканей и органов.

Концепция журнала предусматривает всестороннее освещение вопросов, связанных с выяснением механизмов регенерации и обновления тканей, а также с возможностью разработки и практического применения подходов регенеративной биомедицины. Важным аспектом также является формирование и развитие этой отрасли науки как самостоятельного направления на стыке физиологии, клеточной биологии, биологии развития, биохимии и наук о материалах.

### Главный редактор

**В.А. Ткачук**, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

### Заместитель главного редактора

**П.И. Макаревич**, д-р мед. наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7259-9180

### Редактор выпуска

**А.Н. Томилин**, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 8079-5581

### Редакционная коллегия

**В.В. Белоусов**, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6517-8373

**Л.Б. Буравкова**, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8594-2532

**Д.В. Бутнару**, канд. мед. наук, доцент, проректор по международной деятельности, заместитель директора по научной работе ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2408-5133

**М.В. Воронцова**, канд. мед. наук, заместитель декана по науке Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4168-6851

**Е.А. Воротеляк**, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2310-9118

**М.М. Галагудза**, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 2485-4176

**И.И. Еремин**, канд. мед. наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6098-7226

**А.Ю. Ефименко**, д-р мед. наук, заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5110-5998

**М.Н. Карагяур**, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9504-4257

**М.А. Лагарькова**, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4315-1701

**М.А. Масчан**, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора-директор Института молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия) Scopus Author ID: 562880

**К.А. Рубина**, д-р биол. наук, профессор РАН, руководитель лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9471-2511

**Е.В. Семина**, д-р биол. наук, заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия) eLibrary SPIN: 4586-4001

**В.И. Севастьянов**, д-р мед. наук, профессор, директор АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2895-1090

**Н.С. Сергеева**, д-р биол. наук, профессор, заведующая отделением прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1805-8141

**О.В. Степанова**, канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8229-8935

**А.Н. Томилин**, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 8079-5581

**Редакционный совет**

**А.В. Васильев**, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7050-9087

**В.В. Власов**, д-р хим. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 6416-3640

**С.В. Готье**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5969-5749

**Н.И. Дризе**, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1705-2900

**С.М. Закиян**, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 7274-2622

**А.Д. Каприн**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1759-8101

**С.А. Лукьянов**, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, Ректор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2920-8861

**Е.В. Парфенова**, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, Заместитель генерального директора — директор НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9042-7848

**Г.Т. Сухих**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9374-5710

**В.П. Чехонин**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий отделом медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8292-2807

**Е.Л. Чойнзонов**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия) eLibrary SPIN: 2240-8730

**Е.В. Шляхто**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 6679-7621

**К.Н. Ярыгин**, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7567-1230

<b>Периодичность</b>	выходит 4 раза в год
<b>Префикс DOI</b>	<a href="https://doi.org/10.60043">https://doi.org/10.60043</a>
<b>ISSN</b>	2949-5938
<b>Свидетельство о регистрации средства массовой информации</b>	Серия Эл № ФС77-83582 от 13 июля 2022 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
<b>Учредитель, издатель, редакция</b>	Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины» (ОГРН 1187700008165)
<b>Адрес</b>	119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 1
<b>Телефон редакции</b>	+7 (999) 922-41-19
<b>Сайт</b>	<a href="https://regmed-journal.ru/">https://regmed-journal.ru/</a>
<b>e-mail</b>	<a href="mailto:journal@regmedru.com">journal@regmedru.com</a>
<b>Выход в свет</b>	31.03.2025
<b>Копирайт</b>	© Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины», оформление, 2025
<b>Журнал открыт для ознакомления на сайте</b>	<a href="https://regmed-journal.ru">https://regmed-journal.ru</a>
<b>Цена</b>	распространяется бесплатно
<b>Условия распространения материалов:</b>	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
<b>Редакторы-корректоры</b>	И.С. Пигулевская, Л.А. Зелексон
<b>Верстка</b>	О.В. Храмова

В оформлении обложки использованы микрофотографии, полученные к.б.н. В.Ю. Сысоевой, В.Н. Бирюковой.

## Aims and scope

The key objective of the journal is to create a platform for coverage and dialogue about the main achievements, problems and tasks of regenerative biomedicine, as well as to summarize modern ideas about the fundamental mechanisms of tissue and organ regeneration.

The concept of the journal provides comprehensive coverage of issues related to elucidating the mechanisms of tissue regeneration and renewal, as well as the possibility of developing and practical application of regenerative biomedicine approaches. An important aspect is also the formation and development of this branch of science as an independent direction at the intersection of physiology, cell biology, developmental biology, biochemistry and materials sciences.

### Editor-in-Chief

**Vsevolod A. Tkachuk**, Dr.Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

### Deputy Editor-in-Chief

**Pavel I. Makarevich**, MD, Dr. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7259-9180

### Editor of the Issue

**Alexei N. Tomilin**, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Cytology RAS (Saint Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 8079-5581

### Editorial board

**Vsevolod V. Belousov**, Dr. Sci. (Medicine), Corresponding Member of RAS, General Director of the Federal Center for Brain and Neurotechnologies FMBA of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6517-8373

**Lyudmila B. Buravkova**, Dr.Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director, Institute of Medical and Biological Problems of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN:8594-2532

**Denis V. Butnaru**, MD, Dr.Sci. (Medicine), Associate Professor, Vice-Rector for International Affairs, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2408-5133

**Maria V. Vorontsova**, MD, Dr.Sci. (Medicine), Deputy Dean for Science, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4168-6851

**Ekaterina A. Vorotelyak**, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Head of the laboratory of cell biology of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2310-9118

**Mikhail M. Galagudza**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Institute of Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V. A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 2485-4176

**Ilya I. Eremin**, MD, Dr.Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Budgetary Institution

Russian Scientific Center for Chemistry named after Academician B.V. Petrovsky (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6098-7226

**Anastasia Yu. Efimenko**, MD, Dr. Sci. (Medicine) Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5110-5998

**Maxim N. Karagyaur**, MD, Dr.Sci. (Biology), Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9504-4257

**Maria A. Lagarkova**, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution Federal Research Center for Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4315-1701

**Mikhail A. Maschan**, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Deputy Director General, Director of the Institute of Molecular and Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) Scopus Author ID: 562880

**Ksenia A. Rubina**, Dr. Sci. (Biology), Professor of RAS, Head of the Laboratory of Morphogenesis and Tissue Reparation, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9471-2511

**Ekaterina V. Semina**, Dr. Sci. (Biology), Deputy Head for Development and Project Activities at the Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) eLibrary SPIN: 4586-4001

**Viktor I. Sevastyanov**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Director of the Institute of Biomedical Research and Technology (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2895-1090

**Natalya S. Sergeeva**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Prediction of the Effectiveness of Conservative Treatment, Moscow Research Institute named after P.A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1805-8141

**Olga V. Stepanova**, Dr.Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Cell Biology and Regenerative Medicine, Department of Fundamental and Applied Neurobiology Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8229-8935

**Alexei N. Tomilin**, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Cytology RAS (Saint Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 8079-5581

**Editorial Council**

**Andrey V. Vasiliev**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7050-9087

**Valentin V. Vlasov**, Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Full Member of RAS, Scientific Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 6416-3640

**Sergey V. Gauthier**, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director of the National Medical Research Center for Transplantology and Artificial Organs named after Academician V.I. Shumakov, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5969-5749

**Nina I. Drize**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1705-2900

**Suren M. Zakiyan**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 7274-2622

**Andrey D. Kaprin**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1759-8101

**Sergey A. Lukyanov**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Full Member of RAS, Rector of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2920-8861

**Yelena V. Parfyonova**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy General Director — Director of the Research Institute of Experimental Cardiology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Cardiology named after Academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9042-7848

**Gennady T. Sukhikh**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9374-5710

**Vladimir P. Chekhonin**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Head of the Department of Medical Nanobiotechnologies, Research Institute of Translational Medicine, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8292-2807

**Evgeny L. Choinzonov**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director of the Oncology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia) eLibrary SPIN: 2240-8730

**Evgeny V. Shlyakhto**, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V.A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 6679-7621

**Konstantin N. Yarygin**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7567-1230

<b>Frequency</b>	quarterly
<b>DOI Prefix</b>	<a href="https://doi.org/10.60043">https://doi.org/10.60043</a>
<b>ISSN</b>	2949-5938
<b>Certificate and Registry</b>	Certificate of mass media registration series EI No. FS77-83582 dated July 13, 2022 issued by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications (Roskomnadzor)
<b>Founder, publisher, editorial office</b>	Regional public organization “Society of Regenerative Medicine” (OGRN 1187700008165)
<b>Address</b>	119991, Moscow, Lomonosovsky Prospekt, 27, building 1
<b>Editorial phone</b>	+7 (999) 922-41-19
<b>Website</b>	<a href="https://regmedjournal.ru/">https://regmedjournal.ru/</a>
<b>e-mail</b>	<a href="mailto:journal@regmedru.com">journal@regmedru.com</a>
<b>The publication</b>	31.03.2025
<b>Copyright</b>	© Regional public organization “Society of Regenerative Medicine”, layout, 2025
<b>Online open access:</b>	<a href="https://regmed-journal.ru">https://regmed-journal.ru</a>
<b>Price</b>	free
<b>Distribution</b>	The content is distributed under the Creative Common License CC BY
<b>Editors and proofreaders</b>	Irina S. Pigulevskaya, Lev A. Zelexon
<b>Layout</b>	Olga V. Khramova

- |           | <b>ОБЗОРЫ И КОММЕНТАРИИ</b>  | <b>REVIEWS AND COMMENTS</b>   |
|-----------|--|---|
| <b>6</b>  | Индивидуальное применение клеточных продуктов: баланс доступности и требований к прорывным методам терапии<br><b>П.И. Макаревич</b>  | Personalized cellular products: balancing accessibility and demand for breakthrough therapies<br><b>Pavel I. Makarevich</b>   |
| <b>10</b> | Эволюция подходов к манипуляции генетическим материалом живых объектов: от селекции к редактированию генома<br><b>Д.В. Стамбольский, А.В. Захарова, М.Н. Карагяур</b>  | Evolution of approaches to manipulating the genetic material of living objects: from selection to genome editing<br><b>Dmitry V. Stambolsky, Alina V. Zakharova, Maxim N. Karagyaur</b>   |
| <b>22</b> | Использование мезенхимальных стромальных клеток и их экзосом в коррекции ишемических повреждений кишечника<br><b>В.В. Плечев, К.В. Данилко, В.М. Тимербулатов, В.А. Маркелов</b>                                     | Use of mesenchymal stromal cells and their exosomes in the correction of ischemic intestinal injuries<br><b>Vyacheslav V. Plechev, Ksenia V. Danilko, Vil M. Timerbulatov, Vitaly A. Markelov</b>   |
|           | <b>ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ</b>   | <b>ORIGINAL ARTICLES</b>  |
| <b>31</b> | Полуавтоматический метод аннотирования фазово-контрастных изображений живых культур клеток для сегментации ядер на основе машинного обучения<br><b>М.В. Балясин, А.Г. Демченко, А.В. Ляндуп</b>                      | Semi-automatic method of annotating phase-contrast images of live cell cultures for nuclei segmentation based on machine learning<br><b>Maxim V. Balyasin, Anna G. Demchenko, Alexey V. Lyundup</b>   |
| <b>41</b> | Эквиваленты кожи, полученные на основе 3D-биопечати и фибробластов, для заживления ран и регенерации<br><b>Ю.С. Саенко, Е.С. Агеева, К.А. Юрченко, Э.Т. Дегирменджи, Н.А. Волкова, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин</b> | 3D bioprinted and fibroblast-based skin equivalents for wound healing and regeneration<br><b>Yulia S. Saenko, Elizabeth S. Ageeva, Ksenia A. Yurchenko, Evelina T. Degirmenji, Nadezhda A. Volkova, Irina I. Fomochkina, Anatoly V. Kubyshkin</b> |



# Индивидуальное применение клеточных продуктов: баланс доступности и требований к прорывным методам терапии

П.И. Макаревич<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Медицинский научно-образовательный институт ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, 27, корп. 10

<sup>2</sup> Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Россия, 121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15а

\* Адрес для корреспонденции: [makarevichpi@my.msu.ru](mailto:makarevichpi@my.msu.ru)

## Аннотация

Краткий комментарий затрагивает аспекты обращения клеточных продуктов по индивидуальным протоколам применения. В комментарии затрагиваются два потенциально дискуссионных аспекта, связанных с возможным использованием индивидуального подхода как пути для применения аллогенных продуктов без регистрации, а также касательно недостаточно четких регуляторных определений в этой области.

**Ключевые слова:** биомедицинские клеточные продукты, госпитальное исключение, индивидуальные клеточные продукты

**Конфликт интересов:** автор является членом редакционной коллегии журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеет отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования; мнение автора является частным мнением и не отражает позиции надзорных или экспертных органов.

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Для цитирования:** Макаревич П.И. Индивидуальное применение клеточных продуктов: баланс доступности и требований к прорывным методам терапии. *Регенерация органов и тканей*. 2025;3(1):6–9. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-6-9>

Получена 15.01.2025

Обработана 01.02.2025

Принята 05.02.2025

# Personalized cellular products: balancing accessibility and demand for breakthrough therapies

Pavel I. Makarevich<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow Lomonosovskiy ave., 27, bld. 10

<sup>2</sup> Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E.I. Chazov, Russia, 121552, Moscow, Academician Chazov str., 15A

\* Correspondence address: [makarevichpi@my.msu.ru](mailto:makarevichpi@my.msu.ru)

## Abstract

Genome editing systems are powerful tools capable of precisely modifying genetic material in its natural context within a living organism. Thanks to these remarkable capabilities, editing systems have found a wide range of applications in all areas of biological science and medicine. In this manuscript, we provide a brief historical overview of the origins and development of various genome editing systems. The evolution of this field has been accompanied by significant discoveries and the awarding of numerous Nobel Prizes. Tracing the logic of scientific thought in the quest to understand and modify the material basis of heredity, this manuscript aims to provide budding researchers with a comprehensive picture of the vast (literally) universe of genome editing systems. Understanding the full spectrum of potential activity of editing systems obliges researchers to use them thoughtfully and responsibly to the article yet reasonably common within the subject discipline.

**Keywords:** biomedical cell products, hospital exemption, individual cell products

**Conflicts of Interest:** the author has been a member of the editorial board of the journal “Organ and Tissue Regeneration” since 2023 but had no role in the decision to publish this article. This article has undergone the journal’s established peer-review process; the author’s opinion is his or her own and does not reflect the position of any supervisory or expert bodies.

**Funding:** the study was carried out as part of Lomonosov Moscow State University state assignment.

**For citation:** Makarevich P.I. Personalized cellular products: balancing accessibility and demand for breakthrough therapies. *Tissue and organ regeneration*. 2025;3(1):6-9. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-6-9>

Received 15.01.2025

Revised 01.02.2025

Accepted 05.02.2025

Применение клеточных продуктов в мировой практике ведется по двум основным трекам, которые можно определить общими, но не юридическими терминами «регистрационный» и «индивидуальный». Традиционно принятым и в целом заимствованным из практики исследования и внедрения лекарственных средств является регистрационный подход, включающий полный цикл доклинических, клинических исследований и централизацию с применением

государственного регулирования обращения зарегистрированного продукта. Альтернативой для ускорения доступа пациентов к новой терапии и быстрого внедрения уникальных продуктов клеточной терапии стал индивидуальный подход, в котором исключается этап регистрации и каждое применение является по сути созданием персонифицированного продукта для данного конкретного пациента. Ключевым условием применения этого подхода стало

производство и применение клеточного продукта непосредственно в одном и том же медицинском учреждении, на основании чего долгое время активно использовалось понятие «госпитальное исключение» (англ. *hospital exemption*). Данный подход, несомненно, сыграл важнейшую роль в быстром и очень убедительном начале применения многих продуктов на основе клеток (CAR-T, модифицированных гемопоэтических клеток человека). Кроме того, для целого ряда академических научных площадок на базе университетов и национальных медицинских центров ЕС, США и стран Азии это стало уникальной возможностью внедрения прорывной терапии, для которой не всегда имелись полноценные регуляторные подходы. Таким образом, индивидуальный трек применения клеточных продуктов представляется эффективным способом ускорения их применения, что также дает ценную информацию об их безопасности и эффективности, а также расширяет число центров, где пациенты могут получать доступ к новым методам лечения. Следует сразу же отметить, что в абсолютном большинстве юрисдикций результаты применения индивидуальных продуктов не могут быть использованы как замена или суррогат регистрационных клинических исследований, т.е. не являются основанием для регистрации.

Очевидным образом мы приходим к тому, что существование индивидуального пути применения клеточных продуктов не должно быть потенциально препятствующим или дающим конкурентные преимущества перед регистрируемыми продуктами. Это обстоятельство решается по-разному, однако в большинстве стран со сформированной регуляторикой в данной области адаптирована модель, которую сленгово иногда называют по стране происхождения «испанской», при которой возможно сосуществование одного и того же продукта (или очень близких аналогов), применяемого индивидуально и в рамках стандартного обращения с государственной регистрацией. В целом это позволяет, например, как применять CAR-T-терапию в рамках ведущих медицинских и академических центров, так и дает возможность ведущим фармацевтическим компаниям развивать свои продукты этого класса и получать свою долю рынка. В конечном счете, ключевым стимулом для внедрения системы индивидуального применения стало обеспечение доступа пациентов к передовой терапии

и, хотя интересы производителей также должны соблюдаться, именно этический и гуманитарный аспекты являются доминирующими. В рамках упомянутой выше системы при соблюдении ряда условий и требований пациенты оказываются охваченными современными протоколами лечения, академические центры внедряют разработки на своей базе, а индустриальный сектор сохраняет ожидаемые преимущества за счет возможности экспорта, применения на коммерческой основе программ по типу госгарантий на оплату дорогостоящей терапии для отдельных групп пациентов.

В Российской Федерации в настоящее время применение индивидуальных биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) регулируется актуальной редакцией Федерального закона № 180-ФЗ и постановлениями правительства РФ № 384 и 385 от 28 марта 2024 года. В целом, дабы не утруждать читателя особенностями регуляторного поля, мы можем констатировать, что внедрявшаяся с 2016 года система государственного контроля, регистрации и обращения БМКП была успешно переориентирована на трек индивидуального применения соответствующих БМКП непосредственно в медицинской организации, где они были произведены для единственного пациента. Все это полностью соответствует базовым требованиям мировой практики госпитального исключения, а требование к наличию в организации применения производственной площадки, имеющей соответствующую лицензию на производство БМКП, выдаваемую Росздравнадзором, дополнительно защищает пациентов.

Тем не менее в рамках данной процедуры с учетом отечественной практики следует отметить два важных вопроса, которые в ближайшее время встанут перед отечественной отраслью регенеративной медицины.

1) Наиболее очевидным форматом для индивидуальных БМКП, несомненно, являются продукты аутологичного типа. При этом формально аллогенное происхождение индивидуально БМКП не является ограничением для разрешения производства и применения такого продукта. В данной ситуации возникает необходимость крайне тщательной этической и биомедицинской экспертизы аллогенных БМКП, для которых более традиционный регистрационный трек применения с полноценными

клиническими исследованиями может занимать годы. Говоря проще, перевод такого продукта в категорию индивидуального БМКП открывает путь к его использованию в клинике и создает репутационные преимущества для разработчика и организации, производящей и применяющей его на своей базе. При этом возможно, что уровень доклинических исследований, необходимых для полноценной оценки безопасности и эффективности такого продукта, не всегда достижим в современных реалиях, что ставит в уязвимое положение в первую очередь контингент пациентов.

2) В актуальной регуляторике слабо развита критериальность понятий, касающихся госпитального исключения, в том числе и в ряде стран, где индивидуальный трек применяется с успехом в течение последнего десятилетия. Так, например, в странах ЕС достаточно размыто понятие «нерутинности» (англ. «*non-routine*»), которое является определяющим для принятия решения о применении клеточного продукта по процедуре госпитального исключения. Единственными государствами, где существуют разъясняющие документы по этому вопросу, долгое время были Великобритания и Германия. Аналогично и в Российской Федерации в ряде случаев принятие решения о применении опирается на очень сложные для экспертизы вопросы соотношения риска и пользы. Однако четких критериев для отнесения про-

дуктов к индивидуальным БМКП (например, жизненные показания, наличие или отсутствие альтернативной терапии, количество применений в год) в настоящее время не указано. Это, с одной стороны, создает меру гибкости, необходимой для новых областей медицины, где попытка зарегулировать каждый аспект четкими дефинициями и критериями приводит к избыточным ограничениям. С другой стороны, репутационные потери при неудачных применениях или негативных исходах независимо от ситуации ложатся на отрасль в целом, в связи с чем возникает описанная выше дискуссионная ситуация.

В целом следует признать, что в нашей стране в настоящее время сложилась достаточно благоприятная ситуация для применения и внедрения уникального класса клеточных продуктов, причем перечисленные выше проблемы и вопросы не являются сугубо нашей проблемой. Подобного рода корректировки и пояснения периодически приходится проводить FDA США, ЕМА и другим регуляторам, что связано с динамически развивающейся областью, в которой мы работаем и развитие которой зависит от многих составляющих. Мы продолжим фокусировать наше внимание на ключевой для всех медицинских исследователей задаче — благополучии и безопасности пациентов, получающих прорывные методы лечения, дающие им надежду на излечение или уменьшение страданий.

### Об авторе

**Макаревич Павел Игоревич** — д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биоинженерии Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

### Author

**Pavel I. Makarevich** — Dr. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bioengineering at the Center for Regenerative Medicine of the Medical Scientific and Educational Institute at Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine at the Faculty of Medicine at Lomonosov Moscow State University.

### Вклад автора

**П.И. Макаревич** — концепция работы, подготовка рукописи, утверждение рукописи.

### Author contribution statement

**Pavel I. Makarevich** — concept of the work, manuscript preparation, manuscript approval.

# Эволюция подходов к манипуляции генетическим материалом живых объектов: от селекции к редактированию генома

Д.В. Стамбольский\*, А.В. Захарова, М.Н. Карагяур

Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 10

\* Адрес для корреспонденции: [stambolskydv@my.msu.ru](mailto:stambolskydv@my.msu.ru)

## Аннотация

Системы редактирования генома представляют собой мощный инструмент, способный прицельно модифицировать генетический материал в его природном контексте внутри живого организма. Благодаря таким удивительным возможностям системы редактирования нашли широкий спектр применения во всех сферах биологической науки и медицины. В данной рукописи мы проводим краткий исторический экскурс по вопросу возникновения и развития различных систем геномного редактирования. Эволюция данного направления сопровождалась грандиозными открытиями и вручением целого ряда Нобелевских премий. Отслеживая логику научной мысли в стремлении понять и модифицировать материальную основу наследственности, данная рукопись ставит своей целью сформировать у начинающих исследователей целостную картину об огромной вселенной (без преувеличения) систем геномного редактирования. Понимание же полноты всего спектра потенциальной активности систем редактирования обязывает исследователей к вдумчивому и ответственному их применению.

**Ключевые слова:** системы редактирования генома, CRISPR/Cas9, TIGR/Tas, преимущества и ограничения систем геномного редактирования

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

**Для цитирования:** Стамбольский Д.В., Захарова А.В., Карагяур М.Н. Эволюция подходов к манипуляции генетическим материалом живых объектов: от селекции к редактированию генома. *Регенерация органов и тканей*. 2025;3(1): 10–21. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-10-21>

Получена 18.02.2025

Обработана 21.03.2025

Принята к публикации 25.03.2025

# Evolution of approaches to manipulating the genetic material of living objects: from selection to genome editing

Dmitry V. Stambolsky\*, Alina V. Zakharova, Maxim N. Karagyaur

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovsky Ave., 27/10

\* Correspondence: [stambolskydv@my.msu.ru](mailto:stambolskydv@my.msu.ru)

## Abstract

Genome editing systems are powerful tools capable of precisely modifying genetic material in its natural context within a living organism. Due to these remarkable capabilities, editing systems have found a wide range of applications in all areas of biological science and medicine. In this review, we provide a brief historical overview of the origins and development of various genome editing systems. The evolution of this field has been accompanied by significant discoveries and the awarding of numerous Nobel Prizes. Tracing the logic of scientific thought in the quest to understand and modify the material basis of heredity, this manuscript aims to provide budding researchers with a comprehensive picture of the vast universe of genome editing systems. Understanding the full spectrum of potential activity of editing systems obliges researchers to use them thoughtfully and responsibly.

**Keywords:** genome editing systems, CRISPR/Cas9, TIGR/Tas, advantages and limitations of genome editing systems

**Conflicts of interest:** the authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** the study was carried out as part of Lomonosov Moscow State University state assignment.

**For citation:** Stambolsky D.V., Zakharova A.V., Karagyaur M.N. Evolution of approaches to manipulating the genetic material of living objects: from selection to genome editing. *Tissue and organ regeneration*. 2025;3(1): 10–21. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-10-21>

Received 18.02.2025

Revised 21.03.2025

Accepted 25.03.2025

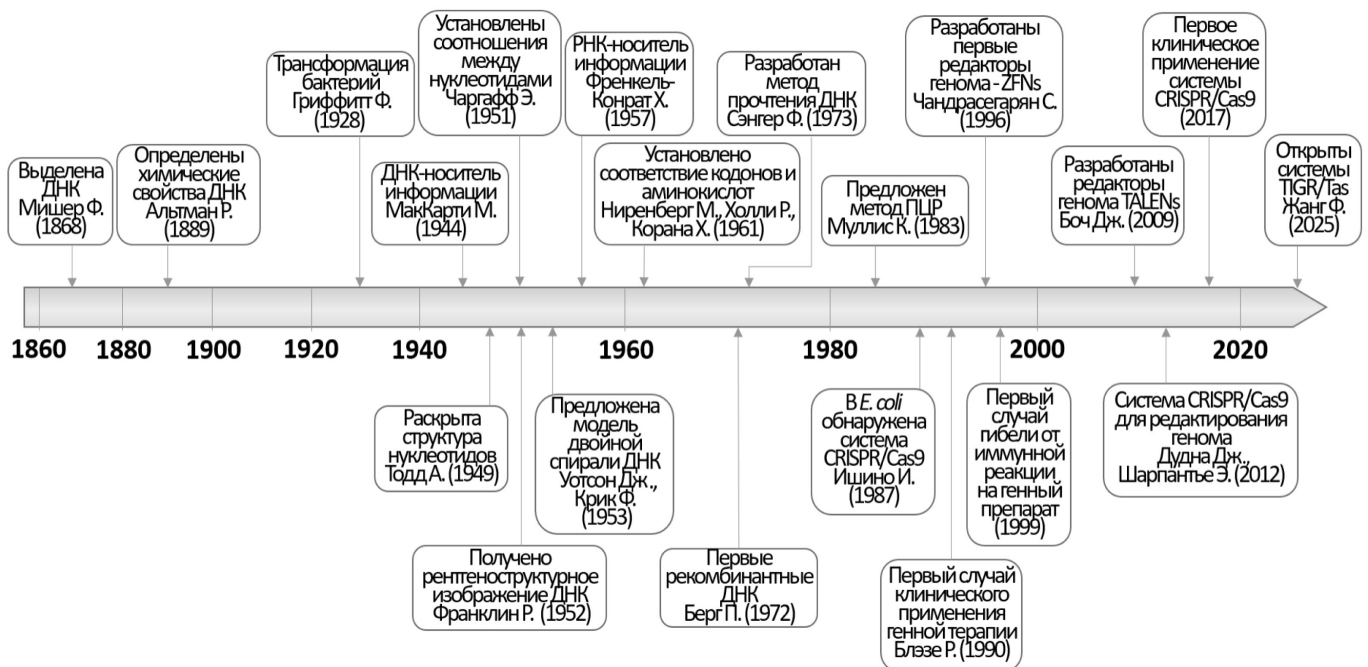
Редактирование или модификация генома — это процедура направленной вставки, удаления или перемещения фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в геноме живого организма [1].

История редактирования генома начиналась со становления генетики как науки и открытия ДНК и ее роли в хранении, передаче и реализации наследственной информации [2]. Наследственная передача признаков была известна задолго до открытия ДНК. Первым подходом к получению организмов с желательными геномами были селекционные работы по получению

с помощью последовательных, многократных скрещиваний видов животных и сортов растений, у которых случайно возникшие желательные признаки в результате селекционного отбора закреплялись в гомозиготном состоянии [3]. С момента понимания роли ДНК в наследственности селекционеры для повышения шансов на получение желательного признака начали использовать методы, повышающие частоту изменений структуры ДНК (химический или радиационный мутагенез) [4]. Однако такие подходы носили эмпирический ненаправленный характер и редко приводили к достижению нужного результата [5].

Понимание механизмов хранения и передачи генетической информации началось с открытия нуклеиновых кислот. Впервые ДНК была выделена из отделяемого раны пациента швейцарским химиком Фридрихом Мишером в 1868 году [6] (рис.). Полученное им вещество он назвал нуклеин. Он определил, что выделенное вещество является кислотой, но его функции остались для него неизвестными. ДНК в чистом виде впервые выделил немецкий исследователь Рихард Альтман в 1889 году, он же впервые назвал ее нуклеиновой кислотой [7]. В 1928 г. английский ученый Фредерик Гриффит провел эксперимент, в котором показал, что непатогенный штамм *Streptococcus pneumoniae* может трансформироваться в вирулентный при добавлении к нему гомогената патогенного штамма. Данное явление получило название бактериальной трансформации [8]. Позднее, в 1944 году, при фракционировании материала, переносящего изучаемые свойства, группой британских исследователей было показано, что за трансформацию отвечает именно ДНК, а другие молекулярные фракции таким свойством не обладают [9]. В 1940-е годы под руководством Александра Тодда в Британии были установлены детали химического строения нуклеотидов (Нобелевская премия по химии, 1957 год) [10].

В дальнейшем множество исследователей изучали нуклеотидный состав ДНК из различных источников. На основании этих исследований в 1951 году были сформулированы правила Чаргаффа, четко определяющие количественные соотношения между нуклеотидами в составе ДНК [11]. В 1952 году Розалинд Франклин под руководством Мориса Уилкинса с помощью рентгеноструктурного анализа получила изображение молекулы ДНК [12]. Данные о том, что ДНК содержит информацию о самой себе и о строении белков, впервые были получены в 1952 г. Альфредом Херши (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1969 год) и Мартой Чейз [13]. В 1957 году Хейнц Френкель-Конрат продемонстрировал, что носителем генетической информации может быть не только ДНК, но и рибонуклеиновая кислота (РНК) [14]. На основе массива всех ранее полученных знаний о ДНК в 1953 году Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком молекула ДНК была описана как двойная спираль, состоящая из цепей нуклеотидов, притом нуклеотиды первой спирали комплементарно связаны с нуклеотидами второй спирали (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1962 год) [15].



**Рис.** Хронология ключевых открытий, сформировавших современное понимание структуры генетического материала и возможности его редактирования

**Fig.** Timeline of key discoveries that have shaped the current understanding of genetic material structure and the possibility of its editing.

Смысловое прочтение структуры ДНК было начато с предположения о триплетности генетического кода, которое было высказано российским физиком Георгием Гамовым в 1954 году [16]. Он предположил, что триплетов, построенных их 4 разных нуклеотидов (А, Т, G, С), входящих в состав ДНК, достаточно для кодирования 20 протеиногенных аминокислот. В дальнейшем это предположение было в 1961 году подтверждено Маршаллом Ниренбергом (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1968 год) и Генрихом Маттеи, что позволило установить соответствия между кодонами и аминокислотами [17].

С момента открытия роли ДНК как ключевого носителя информации о структуре живой материи и с момента описания ее структуры и механизмов реализации записанной в ней информации возникла идея о внесении направленных изменений в геном. Редактирование генома в аспекте целеполагания — это способ придания организму желательных свойств или способ лечения в случаях, когда заболевание обусловлено наличием в геноме определенных вариантов в последовательности ДНК.

ДНК представляет собой чрезвычайно прочную и стабильную молекулу, защищенную от внесения в нее случайных изменений. Дальнейшие исследования в этой области позволили создать методическую базу для разработки технологий редактирования генома [18]. В 1973 году Фредериком Сэнгером был разработан метод секвенирования ДНК [19]. В 1974 году описаны и получены первые рестриктазы — ферменты, позволяющие разрезать ДНК в строго определенных местах [20]. В 1972 г. под руководством Пола Берга исследователи впервые сконструировали ДНК, включающую гены *E. coli*, гены бактериофага и вируса SV40 [21]. В 1983 году Кери Муллисом был предложен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который позволил «тиражировать» нужные молекулы ДНК в требуемом объеме [22]. Это важное открытие быстро нашло свое применение в диагностике наследственных и инфекционных заболеваний и было по достоинству оценено научным и медицинским сообществом с присвоением в 1993 году Кери Муллису Нобелевской премии по химии.

В 1990 г. в США была проведена первая клиническая процедура генотерапии. Пациентке с иммунодефицитом была введена генетическая конструкция, кодирующая фермент аденозин-

дезаминазу ADA [23]. Наблюдался клинический эффект, но его поддержание требовало повторных введений конструкции.

Гибель пациента от анафилактического шока при процедуре генотерапии семейной гиперхолестеринемии, использующей аденовирусный вектор, как минимум на десятилетие затормозила развитие и внедрение генотерапевтических подходов в клиническую практику [24].

Целью редактирования генома является внесение заданных изменений в его последовательность. Для этого необходимо синтезировать нужную последовательность ДНК и обеспечить ее доставку и встраивание в нужный орган, в ткань, в тип клеток, в конкретный участок молекулы ДНК. Даже если генотерапия не имеет своей целью постоянное встраивание новой последовательности в геном, тканевая и клеточная специфичность доставки генетической конструкции имеет существенное значение.

До момента открытия систем редактирования генома для осуществления направленной вставки в геном целевого организма в основном полагались на гомологичную рекомбинацию, происходившую между высокоомологичными участками ДНК, один из которых локализован в геноме целевой клетки и подлежит редактированию, а второй является синтетическим фрагментом, имеющим гомологию с целевым участком ДНК, и вводится извне [25, 26]. Такая возможность продемонстрирована для всех эукариотических клеток [27]. Метод используется до настоящего времени при создании клеточных линий, когда возможен отбор клеточных клонов по заданному признаку [28]. Данный подход имеет ряд существенных недостатков: во-первых, недостаточная частота естественных рекомбинаций ДНК; во-вторых, недостаточная специфичность встраивания синтезированных последовательностей в геном — встроившийся не в то место фрагмент ДНК может либо не работать, либо вызывать нежелательные последствия [29, 30].

Изучение природы такого рода рекомбинаций позволило установить, что абсолютное их большинство обусловлено возникновением разрывов ДНК, а внесение разрыва повышает эффективность гомологичной рекомбинации в 1000 раз [31, 32]. Последующие исследования в области прецизионного редактирования генома были направлены

на поиск подходов к внесению прицельных разрывов в двойную спираль ДНК [33]. Обычные эндонуклеазы, выделенные из микроорганизмов, широко используемые в молекулярной биологии и геномной инженерии, при встрече с полногеномной ДНК не способны обеспечить необходимую специфичность, так как геном содержит множество распознаваемых ими участков [34].

Одним из первых инструментов для внесения двуцепочечных разрывов в ДНК стали мегануклеазы — ферменты бактериального и фагового происхождения, специфически распознающие относительно длинные последовательности нуклеотидов (до 40 пар оснований), что обеспечивало высокую точность разрезания [35, 36]. Существенным их недостатком являлась практическая невозможность прицельно перенацелить их на новую последовательность ДНК [37].

В попытках повысить гибкость распознавания ДНК-мишеней были созданы истинно искусственные программируемые нуклеазы с ДНК-специфичными модульными доменами класса «цинковые пальцы», так называемые Zinc-Finger Nucleases (ZFNs) [38]. Каждый из таких модулей в составе цинковых пальцев способен специфически распознавать конкретный триплет нуклеотидов. Специфичность ДНК-связывающего домена нуклеазы обеспечивается за счет сочетаний 3–5 таких модулей [39]. Данный подход до сих пор иногда используется, но он не полностью оправдал возложенные надежды — распознавание целевых последовательностей ДНК сложными рекомбинантными белками, содержащими «цинковые пальцы», далеко не всегда является специфичным, не говоря уже о сложности сборки таких модульных многокомпонентных систем [40, 41].

Параллельно с ZFNs разрабатывались системы редактирования, основанные на белках TALE (эффektor, подобный активатору транскрипции) из паразитических микроорганизмов рода *Xanthomonas*, способствующие инвазии бактерий в ткани растения через изменение транскрипционной программы хозяйской растительной клетки и коллапс ее защитных механизмов [42]. Такого рода геномные редакторы получили название TALENs, или TALE нуклеазы [43].

В отличие от ZFNs каждый из модулей ДНК-распознающего домена TALENs способен распознавать отдельный нуклеотид, что придает

данному редактору большую гибкость [44]. Все же распознавание последовательностей ДНК с помощью аминокислотных остатков не обладает достаточной специфичностью, а сборка и адаптация такого рода редакторов крайне трудоемка и затратна [45]. Поэтому появление редакторов, основанных на других принципах (CRISPR/Cas и TIGR/Tas), произвело революцию в редактировании генома [46]. В основе системы CRISPR/Cas лежит система бактериального иммунитета, защищающая бактерий от агентов, содержащих чужеродные нуклеиновые кислоты [47]. Локус CRISPR был впервые обнаружен в 1987 г. у *Escherichia coli* [48]. Впоследствии была уточнена его структура — в 1993 году были описаны повторяющиеся последовательности, разделенные равными промежутками, а в 2002 году были открыты гены *cas* — гены локусов CRISPR, кодирующие белки Cas [49, 50]. В 2007 году была установлена и доказана роль системы CRISPR как основы адаптивного иммунитета бактерий [47]. Наконец в 2012 году Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье предложили использовать систему CRISPR/Cas для внесения прицельных разрывов в таргетные области ДНК [51, 52]. В 2017 году прошли первые клинические испытания лечения серповидноклеточной анемии с использованием системы CRISPR/Cas [53]. «За разработку метода редактирования генома» в 2020 году Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье была присуждена Нобелевская премия по химии [54].

Существенным отличием системы CRISPR/Cas от вышеописанных мегануклеаз, ZFNs и TALENs является использование для распознавания специфических последовательностей ДНК нуклеотидных последовательностей РНК, а не конформационных сочетаний аминокислот в составе ДНК-распознающих доменов нуклеаз [55, 56]. В связи с этим CRISPR/Cas-системы еще называют РНК-направляемыми нуклеазами. Системы CRISPR/Cas обладают высокой специфичностью, высокой гибкостью и низкой себестоимостью, что делает их крайне удобным инструментом для прицельного внесения двуцепочечных разрывов в ДНК как с целью выключения генов, так и для точного встраивания необходимых последовательностей [57].

Исследования последнего десятилетия позволили сделать системы редактирования еще более гибкими, что было достигнуто дополнением их различными функциональными доменами:

для редактирования оснований, праймированного редактирования, модификации эпигенома и управления активностью отдельных генов, прижизненного мечения целевых участков генома, инактивации целых хромосом и прочих задач [56, 59]. Возможности применения систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas во многом ограничены лишь фантазией исследователя [57].

В 2025 году было описано новое семейство программируемых РНК-направляемых нуклеаз — система редактирования генома TIGR/Tas (Tandem Interspaced Guide RNA-Targeting Systems, Системы наведения на направляющих РНК с перемежающимися повторами), представители которого рассматриваются как потенциальная альтернатива CRISPR/Cas [60]. Система TIGR/Tas, как и CRISPR/Cas, выполняет функцию адаптивного бактериального иммунитета. Основные отличия от CRISPR/Cas заключаются в способности редактировать практически любую последовательность ДНК (нет зависимости от РАМ-последовательности), меньшем размере нуклеаз (около 350 аминокислот) и способности TIGR-РНК связываться с 2 цепями ДНК одновременно [61]. С одной стороны, указанные параметры могут увеличить гибкость систем редактирования, а с другой, снизить ее прецизионность или эффективность, что было ранее продемонстрировано при модификации систем CRISPR/Cas. Возможности применения системы TIGR/Tas для прицельного редактирования генома в настоящий момент активно изучаются [62].

Редактирование генов сделало возможным прорывное развитие различных областей биологических наук и медицины [63, 55]. Его уже широко используют в молекулярной и клеточной биологии, биоинженерии и сельском хозяйстве [64]. Так, редактирование генома уже позволяет моделировать патогенные мутации человека с целью установления их вовлеченности в патогенез и функциональной значимости в клеточных и животных моделях [65, 66]. Системы CRISPR/Cas увеличивают продуктивность культурных растений и животных и делают их более устойчивыми к инфекциям [64]. Редактирование генов вирусов открывает возможности к разработке живых биотехнологически аттенуированных вакцин, а модификация геномов насекомых в ближайшее время позволит искоренить вектор-переносимые инфекции с минимальным влиянием на экологию [65–68].

Редактирование генома постепенно входит и в медицинскую практику [69]. Так, с помощью технологий редактирования генома удалось установить молекулярно-генетические причины ряда наследственных заболеваний, создать породу свиней — универсальных доноров для ксенотрансплантации, разработать подходы к терапии наследственных заболеваний и созданию более эффективных CAR T-лимфоцитов для лечения рака крови и солидных опухолей [53, 70, 71]. Говоря о клиническом применении систем редактирования генома, нельзя не упомянуть лекарственные препараты Casgevy (одобрен FDA для лечения бета-талассемии и серповидноклеточной анемии) и NTLA-2001 (проходит III фазу клинических испытаний для лечения транстиретинового амилоидоза) [71–73].

В связи с недостатком данных о возможных нежелательных последствиях использования генной терапии и редактирования генома решение о применении данных технологий должно приниматься лишь в тех случаях, когда их польза такого применения будет очевидно превышать его потенциально возможный вред [74, 75]. Наиболее перспективным направлением редактирования генома в медицине является лечение тяжелых моногенных наследственных заболеваний путем исправления или замещения дефектных генов, причем пока преимущественно *ex vivo* с тщательной проверкой отредактированных клеток [76, 57]. Перспективным выглядит применение методов редактирования генома при разработке методов клеточной терапии для получения клеток с повышенным терапевтическим потенциалом [53, 77]. В то же время к применению данных технологий *in situ* стоит относиться с осторожностью, поскольку их применение может сопровождаться нежелательными эффектами: нецелевым редактированием и возникновением хромосомных мутаций [78–80]. Использование систем редактирования для лечения опухолевых и инфекционных заболеваний (за исключением модификации генома эффекторных иммунных клеток или выключения генов рецепторов, задействованных в проникновении инфекционного агента) мы считаем низкоэффективным [81, 82]. Причина этого кроется в сочетании относительно невысокой эффективности систем редактирования и низкой эффективности стратегии негативной селекции для лечения опухолевых и инфекционных заболеваний [83].

Говоря о редактировании генома, нельзя не затронуть и этические аспекты, связанные с безопасностью и последствиями для организма и экосистемы в целом широкого применения методов редактирования геномов [84]. Необходимость общественного обсуждения и государственного регулирования этих технологий является важным аспектом их применения [85, 86]. Признание потенциальных проблем безопасности, связанных с редактированием генома, подчеркивает важность мониторинга пациентов во время и после лечения [87]. На данном этапе развития в качестве наименее опасных выглядят регулируемые генетические конструкции с управляемой активностью либо конструкции, имеющие ограниченный срок действия [88]. В связи с этим представляют интерес элиминируемые конструкции на основе РНК или плазмидных ДНК [89]. В качестве целевых клеток

для редактирования генома по озвученным выше причинам следует в первую очередь рассматривать клетки, которые могут быть отредактированы *ex vivo*, проверены и возвращены в организм: гемопоэтические стволовые клетки, лейкоциты, кератиноциты, фибробласты [90–92].

### Заключение

Системы редактирования генома представляют собой мощный прецизионный инструмент, который произвел или еще произведет революцию, без сомнения, во всех сферах биологической науки и медицины. Понимая такой потенциал данной технологии (в том числе и негативные стороны ее использования), необходимо отслеживать отсроченные последствия ее применения, постепенно раздвигая по мере необходимости существующие технические и даже некоторые этические ограничения.

### Литература

1. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet.* 2008;122(6):565–581. DOI: 10.1007/s00439-007-0433-0
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature.* 1953;171(4356):737–738. DOI: 10.1038/171737a0
3. Lehnert H, Berner T, Lang D, Beier S, Stein N, Himmelbach A, Kilian B, Keilwagen J. Insights into breeding history, hotspot regions of selection, and untapped allelic diversity for bread wheat breeding. *Plant J.* 2022;112(4):897–918. DOI: 10.1111/tpj.15952
4. Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. *Science.* 1927;66(1699):84–87. DOI: 10.1126/science.66.1699.84
5. Riaz M, Yasmeen E, Saleem B, Hameed MK, Saeed Almheiri MT, Saeed Al Mir RO, et al. Evolution of agricultural biotechnology is the paradigm shift in crop resilience and development: a review. *Front Plant Sci.* 2025;16:1585826. DOI: 10.3389/fpls.2025.1585826
6. Miescher F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hoppe-Seyler's Med Chem.* 1871;4:441–460.
7. Altmann R. *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen.* Leipzig: Veit & Co., 1890.
8. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond).* 1928;27(2):113–159. DOI: 10.1017/S0022172400031879
9. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation. *J Exp Med.* 1944;79(2):137–158. DOI: 10.1084/jem.79.2.137
10. Todd AR. Nucleotides, nucleosides, and nucleic acids. *Angew Chem.* 1958;70(1):1–17. DOI: 10.1002/anie.195800011
11. Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia.* 1950;6(6):201–209. DOI: 10.1007/BF02173653
12. Franklin RE, Gosling RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature.* 1953;171:740–741. DOI: 10.1038/171740a0
13. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in the growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 1952;36(1):39–56. DOI: 10.1085/jgp.36.1.39
14. Fraenkel-Conrat H, Singer B. Reconstitution of infectivity with ribonucleic acid and virus protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1957;43(9):707–713. DOI: 10.1073/pnas.43.9.707

15. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737–738. DOI: 10.1038/171737a0
16. Gamow G. Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures. *Nature*. 1954;173:318. DOI: 10.1038/173318a0
17. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961;47(10):1588–1602. DOI: 10.1073/pnas.47.10.1588
18. Karagyaur MN, Rubtsov YP, Vasiliev PA, Tkachuk VA. Practical recommendations for improving efficiency and accuracy of the CRISPR/Cas9 genome-editing system. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(6):629–642. DOI: 10.1134/S0006297918060020
19. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2
20. Roberts RJ. Restriction enzymes and their use in molecular cloning. *Annu Rev Biochem*. 1976;45:485–528. DOI: 10.1146/annurev.bi.45.070176.002501
21. Jackson DA, Symons RH and Berg P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli* Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 69, No. 10, 1972, pp. 2904–2909. DOI:10.1073/pnas.69.10.2904
22. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335–350. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
23. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270(5235):475–480. DOI: 10.1126/science.270.5235.475
24. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80(1–2):148–158. DOI: 10.1016/j.ymgme.2003.08.016
25. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288–1292. DOI: 10.1126/science.2660260
26. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51(3):503–512. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90646-5
27. Smithies O. The integration of homologous DNA sequences in mammalian chromosomes. *Nature*. 1985;317(6039):230–234. DOI: 10.1038/317230a0
28. Trudeau DL, Smith MA, Arnold FH. Innovation by homologous recombination. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(6):902–909. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.10.007
29. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, et al. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 1987;330(6148):576–578. DOI: 10.1038/330576a0
30. Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*. 2003;300(5620):763. DOI: 10.1126/science.1078395
31. Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8096–8106. DOI: 10.1128/MCB.14.12.8096-8106.1994
32. Choulika A, Perrin A, Dujon B, Nicolas JF. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1995;15(4):1968–1973. DOI: 10.1128/MCB.15.4.1968-1973.1995
33. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011;188(4):773–782. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
34. Roberts RJ. Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem*. 1976;4:123–164. DOI: 10.3109/10409237609105456
35. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges. *Curr Gene Ther*. 2011;11(1):11–27. DOI: 10.2174/156652311794520111
36. Stoddard BL. Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys*. 2005;38(1):49–95. DOI: 10.1017/S0033583505004063

37. Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(22):e149. DOI: 10.1093/nar/gkl720
38. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(3):1156–1160. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156
39. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 2005;435(7042):646–651. DOI: 10.1038/nature03556
40. Carroll D. Genome engineering: Zinc-finger nucleases and beyond. *Nat Protoc.* 2011;6(2):239–254. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
41. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* 2014;15(5):321–334. DOI: 10.1038/nrg3686
42. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009;326(5959):1509–1512. DOI: 10.1126/science.1178811
43. Карагяур МН, Примак АЛ, Джауари СС, Бозов КД, Макусь ЮВ. Технологии редактирования генома и перспективы их применения в биомедицине. Регенерация органов и тканей. 2024;2(1):54–77. DOI: 10.60043/2949-5938-2024-1-54-77
44. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55. DOI: 10.1038/nrm3486
45. Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae.* 2014;6(3):19–40.
46. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096. DOI: 10.1126/science.1258096
47. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140
48. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429–5433. DOI: 10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987
49. Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol.* 1995;17(1):85–93. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\_17010085.x
50. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565–1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
51. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816–821. DOI: 10.1126/science.1225829
52. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819–823. DOI: 10.1126/science.1231143
53. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–260. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054
54. Nobel Foundation. The Nobel Prize in Chemistry 2020: Emmanuelle Charpentier and Jennifer A Doudna. [NobelPrize.org](https://www.nobelprize.org). 2020.
55. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262–1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010
56. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55. DOI: 10.1038/nrm3486
57. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9:1911. DOI: 10.1038/s41467-018-04252-2
58. Dyikanov DT, Vasiluev PA, Rysenkova KD, Aleksandrushkina NA, Tyurin-Kuzmin PA, Kulebyakin KY, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 technology to knock out genes of interest

- in aneuploid cell lines. *Tissue Eng Part C Methods*. 2019;25(3):168–175. DOI: 10.1089/ten.TEC.2018.0365
59. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576(7785):149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4
  60. Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, et al. Structure and Engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*. 2016;164(5):950–961. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.039
  61. Faure G, Saito M, Wilkinson ME, Quinones-Olvera N, Xu P, Flam-Shepherd D, et al. TIGR-Tas: A family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses. *Science*. 2025;388(6746):eadv9789. DOI: 10.1126/science.adv9789
  62. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Joung JK. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016;529(7587):490–495. DOI: 10.1038/nature16526
  63. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015;21(2):121–131. DOI: 10.1038/nm.3793
  64. Gao C. Genome editing in crops: from bench to field. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(7):476–495. DOI: 10.1038/s41580-021-00409-y
  65. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, et al. A CRISPR–Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*. 2016;34(1):78–83. DOI: 10.1038/nbt.3439
  66. Dipaola MG, Fortuna C, Severini F, Bevivino G, Di Luca M, Nolan T, et al. Temporal and spatial profiling of *Aedes albopictus* immune responses to chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2025;19(10):e0013588. DOI: 10.1371/journal.pntd.0013588
  67. Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife*. 2014;3:e03401. DOI: 10.7554/eLife.03401
  68. Mazloum A, Karagyaur M, Chernyshev R, van Schalkwyk A, Jun M, Qiang F, Sprygin A. Post-genomic era in agriculture and veterinary science: successful and proposed application of genetic targeting technologies. *Front Vet Sci*. 2023;10:1180621. DOI: 10.3389/fvets.2023.1180621
  69. Petraitytė G, Preikšaitienė E, Mikštienė V. Genome Editing in Medicine: Tools and Challenges. *Acta Med Litu*. 2021;28(2):205–219. DOI: 10.15388/Amed.2021.28.2.8
  70. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR–Cas9. *Science*. 2017;357(6357):1303–1307. DOI: 10.1126/science.aan4187
  71. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365. DOI: 10.1126/science.aba7365
  72. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR–Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021;385(6):493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454
  73. Intellia Therapeutics. NTLA-2001 phase III clinical data release. 2024.
  74. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015;519(7544):410–411. DOI: 10.1038/519410a
  75. Baylis F. Altered inheritance: CRISPR and the ethics of human genome editing. *CRISPR J*. 2019;2(4):203–209. DOI: 10.4159/9780674241954
  76. Cornu TI, Mussolino C, Cathomen T. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat Med*. 2017;23(4):415–423. DOI: 10.1038/nm.4313
  77. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015;348(6230):36–38. DOI: 10.1126/science.aab1028
  78. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1726–1737. DOI: 10.1056/NEJMoa1817226
  79. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*. 2018;36(8):765–771. DOI: 10.1038/nbt.4192

80. Papathanasiou S, Markoulaki S, Blaine LJ, Leibowitz ML, Zhang CZ, Jaenisch R, et al. Whole chromosome loss and genomic instability in mouse embryos after CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Commun.* 2021;12(1):5855. DOI: 10.1038/s41467-021-26097-y
81. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol.* 2020;10:1387. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387
82. Rehman SU, Abbas GH. CRISPR/CAS9-based gene editing in cancer therapy: A systematic review and meta-analysis on current status and future directions. *Medicine (Baltimore).* 2026;105(2):e47114. DOI: 10.1097/MD.00000000000047114
83. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature.* 2020; 578(7794):229–236. DOI: 10.1038/s41586-020-1978-5
84. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance.* Washington, DC: National Academies Press; 2017. DOI: 10.17226/24623
85. Karagyaur MN, Efimenko AYu, Makarevich PI, Vasiluev PA, Akopyan ZhA, Bryzgalina EV, et al. Ethical and legal aspects of using genome-editing technologies in medicine (review). *Contemporary Technologies in Medicine.* 2019;11(3):117–135. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.16
86. Bredenoord AL, Schneider M, van Delden JJM. Ethical issues in genome editing: CRISPR-Cas9 and beyond. *EMBO Rep.* 2021;22(1):e52018. DOI: 10.15252/embr.202052018
87. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, Carroll D, Charo RA, Charpentier E, et al. CRISPR germline engineering: the community speaks. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):478–486. DOI: 10.1038/nbt.3227
88. Wang H, Lu H, Lei YS, Gong CY, Chen Z, Luan YQ, et al., Development of a Self-Restricting CRISPR-Cas9 System to Reduce Off-Target Effects. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:390–401. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.06.012
89. Xu CL, Ruan MZC, Mahajan VB, Tsang SH. Viral Delivery Systems for CRISPR. *Viruses.* 2019;4;11(1):28. DOI: 10.3390/v11010028.
90. Park SH, Lee CM, Dever DP, Davis TH, Camarena J, Srifa W, et al. Highly efficient editing of the  $\beta$ -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(15):7955–7972. DOI: 10.1093/nar/gkz475
91. Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romero Z, Kaufman ML, Joglekar AV, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood.* 2016;127(7):839–848. DOI: 10.1182/blood-2015-11-679381
92. Bischof J, Hierl M, Koller U. Emerging Gene Therapeutics for Epidermolysis Bullosa under Development. *Int J Mol Sci.* 2024;25(4):2243. DOI: 10.3390/ijms25042243

### Об авторах

**Стамбольский Дмитрий Викторович** — к.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел научных программ и инновационных технологий, Университетская клиника, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

**Захарова Алина Вячеславовна** — аспирант, факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

**Карагяур Максим Николаевич** — д.б.н., доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины, старший научный сотрудник Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

### Authors

**Dmitry V. Stambolsky** — Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Department of Scientific Programs and Innovative Technologies, University Clinic, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

**Alina V. Zakharova** — PhD student, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

**Maxim N. Karagyaur** — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Senior Researcher, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

---

### Вклад авторов

**Д.В. Стамбольский** — концепция рукописи, анализ и интерпретирование данных, написание статьи.

**А.В. Захарова** — анализ и интерпретирование данных, написание статьи.

**М.Н. Карагяур** — итоговая переработка статьи, иллюстрирование рукописи.

### Author contribution statement

**Dmitry V. Stambolsky** — manuscript concept, data analysis and interpretation, article writing.

**Alina V. Zakharova** — data analysis and interpretation, article writing.

**Maxim N. Karagyaur** — article writing, final revision of the article, illustrations.

# Использование мезенхимальных стромальных клеток и их экзосом в коррекции ишемических повреждений кишечника

В.В. Плечев<sup>1,2,\*</sup>, К.В. Данилко<sup>3</sup>, В.М. Тимербулатов<sup>1</sup>, В.А. Маркелов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, д. 3

<sup>2</sup> ГБУЗ «Республиканский кардиологический центр», Россия, 450106, Уфа, ул. Степана Кувыкина, д. 96

<sup>3</sup> Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Россия, Уфа, 450054, ул. Заки Валиди, д. 32/2

\* Адрес для корреспонденции: [slava.plechev.00@mail.ru](mailto:slava.plechev.00@mail.ru)

## Аннотация

**Цель исследования:** провести комплексный анализ современных научных данных о применении мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и их экзосом для коррекции ишемических повреждений кишечника, оценить перспективы клинического применения и выявить существующие ограничения.

**Материалы и методы.** В основу исследования положен систематический анализ публикаций за период 2000–2024 гг. в базах данных PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary, Кохрейновской библиотеки. Использованы ключевые слова: «ишемия кишечника», «мезенхимальные стромальные клетки», «экзосомы», «регенеративная медицина», «кишечная ишемия-реперфузия». Поиск выявил 235 публикаций; после исключения дубликатов и скрининга аннотаций отобрано 127 работ. Полные тексты 89 статей проанализированы на предмет соответствия цели исследования. В окончательный анализ включены 25 источников.

**Результаты.** Установлено, что МСК и продуцируемые ими экзосомы демонстрируют выраженный терапевтический эффект при ишемическом повреждении кишечника. Основные механизмы включают паракринную регуляцию через секрецию факторов роста (VEGF, FGF, HGF), иммуномодуляцию (снижение TNF- $\alpha$ , IL-6 на 60–70%), стимуляцию ангиогенеза (повышение плотности капилляров на 45%) и подавление апоптоза (снижение на 50–60%). Наибольшей эффективностью обладают аутологичные МСК жировой ткани и костного мозга, в то время как аллогенные клетки требуют дополнительного изучения безопасности. Экзосомы как бесклеточная альтернатива демонстрируют сопоставимую с МСК эффективность при меньшем риске осложнений. В проанализированных исследованиях не выявлено убедительных данных о превосходстве МСК над экзосомами или наоборот; большинство авторов указывают на сопоставимые терапевтические эффекты.

**Заключение.** Терапия на основе МСК и экзосом представляет собой перспективное направление в лечении ишемических повреждений кишечника, соответствующее принципам регенеративной и персонализированной медицины. Однако для широкого клинического внедрения необходимы дальнейшие исследования для стандартизации протоколов, оценки долгосрочных результатов и разработки единых требований к материалам, включая показания, противопоказания, дозировки и виды используемого клеточного продукта.

**Ключевые слова:** ишемическое повреждение кишечника, мезенхимальные стромальные клетки, экзосомы, регенеративная медицина, клеточная терапия, ангиогенез, внеклеточные везикулы, ишемический колит, паракринный механизм

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Плечев В.В., Данилко К.В., Тимербулатов В.М., Маркелов В.А. Использование мезенхимальных стромальных клеток и их экзосом в коррекции ишемических повреждений кишечника. *Регенерация органов и тканей*. 2025;3(1): 22–30. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-22-30>

Получена 10.02.2025

Обработана 18.03.2025

Принята 21.03.2025

## Use of mesenchymal stromal cells and their exosomes in the correction of ischemic intestinal injuries

Vyacheslav V. Plechev<sup>1,2,\*</sup>, Ksenia V. Danilko<sup>3</sup>, Vil M. Timerbulatov<sup>1</sup>, Vitaly A. Markelov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Russia, 450008, Ufa, Lenin St., 3

<sup>2</sup> Republican Cardiology Center, Russia, 450106, Ufa, Stepan Kuvykin St., 96

<sup>3</sup> Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, 450054, Ufa, Zaki Validi St., 32/2

\* Correspondence: [slava.plechev.00@mail.ru](mailto:slava.plechev.00@mail.ru)

### Abstract

**The purpose of the study:** to conduct a comprehensive analysis of current scientific data on the use of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their exosomes for the correction of ischemic intestinal damage, assess the prospects for clinical application, and identify existing limitations.

**Materials and methods.** The study is based on a systematic analysis of publications from 2000 to 2024 in PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary, and the Cochrane Library. The keywords used were “intestinal ischemia”, “mesenchymal stromal cells”, “exosomes”, “regenerative medicine”, and “intestinal ischemia-reperfusion”. The search identified 235 publications; after excluding duplicates and screening abstracts, 127 were selected. The full texts of 89 articles were analyzed for relevance to the study objective. The final analysis included 25 references.

**Results.** MSCs and the exosomes they produce have been shown to exhibit a significant therapeutic effect in ischemic intestinal injury. The main mechanisms include paracrine regulation through the secretion of growth factors (VEGF, FGF, HGF), immunomodulation (a 60–70% reduction in TNF- $\alpha$  and IL-6), stimulation of angiogenesis (an increase in capillary density by 45%), and suppression of apoptosis (a 50–60% reduction). Autologous adipose- and bone marrow-derived MSCs demonstrate the greatest efficacy, while allogeneic cells require further safety studies. Exosomes, as a cell-free alternative, demonstrate efficacy comparable to MSCs with a lower risk of complications. The analyzed studies did not reveal convincing evidence of the superiority of MSCs over exosomes or vice versa; most authors indicate comparable therapeutic effects.

**Conclusion.** MSC- and exosome-based therapy represents a promising approach to treating ischemic intestinal injury, aligned with the principles of regenerative and personalized medicine. However, for widespread clinical implementation, further research is needed to standardize protocols, evaluate long-term outcomes, and develop uniform requirements for materials, including indications, contraindications, dosages, and types of cellular product used.

**Keywords:** ischemic intestinal injury, mesenchymal stromal cells, exosomes, regenerative medicine, cell therapy, angiogenesis, extracellular vesicles, ischemic colitis, paracrine mechanism

**Conflict of interest:** the authors declare that there is no conflict of interest.

**Funding:** this research received no external funding.

**For citation:** Plechev V.V., Danilko K.V., Timerbulatov V.M., Markelov V.A., Tagirov R.V. Use of mesenchymal stromal cells and their exosomes in the correction of ischemic intestinal injuries. *Tissue and organ regeneration*. 2025;3(1): 22–30. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-22-30>

Received 10.02.2025

Revised 18.03.2025

Accepted 21.03.2025

#### Список сокращений:

ИПК — ишемические повреждения кишечника

МСК — мезенхимальные стромальные клетки

## 1. Введение

Ишемическое повреждение кишечника (ИПК) представляет собой серьезную медицинскую проблему с высоким уровнем летальности, достигающим 60–90% при развитии гангрены кишечника и распространенном перитоните [1]. Ежегодная заболеваемость острой мезентериальной ишемией составляет 5–12 случаев на 100 000 населения, при этом риск развития заболевания значительно возрастает у пациентов пожилого возраста и при наличии сердечно-сосудистой патологии [2]. Среди пациентов, госпитализированных в отделения интенсивной терапии, распространенность ишемии кишечника достигает 8–10%, что ассоциировано с высокой летальностью в этой группе [3].

Патогенез ИПК включает сложный каскад патологических процессов: окклюзию мезентериальных сосудов (эмболия, тромбоз), неокклюзионную ишемию на фоне снижения сердечного выброса, ишемически-реперфузионное повреждение, апоптоз энтероцитов и нарушение барьерной функции кишечника с последующей бактериальной транслокацией [4]. Современные методы лечения ограничены и включают

хирургическую реваскуляризацию, резекцию некротизированных участков кишки и симптоматическую терапию, что часто не позволяет добиться полноценного восстановления структуры и функции кишечника [5]. Симптоматическое лечение, включающее антикоагулянтную и антиагрегантную терапию, может приводить к ятрогенным осложнениям, включая кровотечения, в то время как хирургические вмешательства нередко сопровождаются рецидивами ишемии и развитием синдрома короткой кишки [6].

В связи с этим активно развиваются новые направления регенеративной медицины, среди которых особое место занимает терапия с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и их производных — экзосом [7]. Настоящий обзор направлен на комплексный анализ современных данных о применении клеточных технологий в коррекции ИПК, оценку сравнительной эффективности различных типов МСК и их экзосом, а также перспектив их клинического применения на основе результатов экспериментальных и клинических исследований [8, 9].

### Дизайн исследования и стратегия поиска

Основой для исследования послужил систематический анализ публикаций за период 2000–2024 гг., посвященных доклиническим и клиническим исследованиям терапии ишемии кишечника с использованием МСК и экзосом. Поиск литературы проводился в электронных базах PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary, Кохрейновской библиотеки с использованием ключевых слов и их комбинаций: “intestinal ischemia”, “mesenchymal stromal cells”, “exosomes”, “ischemic colitis”, “cell therapy”.

### Процесс отбора и анализа литературы

Всего идентифицировано 235 публикаций; после исключения дубликатов ( $n = 42$ ) и скрининга аннотаций ( $n = 66$ ) отобрано 127 работ. После анализа полных текстов на соответствие критериям включения в окончательный обзор отобран 25 источников, включая 13 оригинальных исследований, 10 обзоров и 2 клинических руководства.

Методология включала сравнительный анализ эффективности различных типов МСК и их экзосом, источников получения МСК (костный мозг, жировая ткань, пупочный канатик), путей введения (внутривенный, интраперитонеальный, интрамуральный). Отдельно анализировался молекулярный состав экзосом, их механизмы действия и результаты применения в экспериментальных моделях ИПК.

## 2. Механизмы терапевтического действия МСК и экзосом

МСК демонстрируют выраженный протективный эффект при ишемически-реперфузионном повреждении кишечника через несколько механизмов. Ряд исследований показал, что внутривенное введение МСК костного мозга крысам с ишемией кишечника приводит к значительному снижению апоптоза энтероцитов на 45% и уменьшению площади некроза на 60% по сравнению с контрольной группой [8, 10].

Ключевую роль в реализации терапевтического эффекта играет паракринная активность МСК, опосредованная секрецией экзосом. Авторы идентифицировали в экзосомах МСК более 150 различных микроРНК, среди которых miR-21, miR-146a и miR-210 проявляют наиболее выраженную противовоспалительную и регенеративную активность [7, 9, 11].

### Иммуномодуляция и противовоспалительное действие

МСК секретируют широкий спектр противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- $\beta$ ) и индуцируют поляризацию макрофагов из провоспалительного (M1) в противовоспалительный фенотип (M2). Крупное исследование продемонстрировало, что экзосомы МСК, несущие микроРНК (miR-146a, miR-181), подавляют ключевые звенья NF- $\kappa$ B сигнального пути, уменьшая продукцию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 на 60–70% [12].

### Стимуляция ангиогенеза

Это важнейший механизм восстановления кровотока в ишемизированной ткани. МСК и их экзосомы секретируют широкий спектр проангиогенных факторов: VEGF, FGF, HGF, Angiopoietin-1. МикроРНК экзосом (miR-21, miR-126, miR-210) напрямую стимулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, способствуя неоваскулогенезу в ишемизированной зоне. В ряде работ показано увеличение плотности капилляров в зоне ишемии на 45% после терапии экзосомами МСК [13].

### Подавление апоптоза и стимуляция пролиферации

Экзосомы МСК доставляют в клетки-мишени микроРНК, которые подавляют экспрессию проапоптотических генов (таких как PTEN, регулятор miR-21). Это повышает выживаемость эпителиоцитов и энтероцитов в условиях ишемии и реперфузии. Некоторые исследования [15] продемонстрировали снижение апоптоза энтероцитов на 50–60% после введения экзосом МСК [14].

### Активация стволовых клеток кишечника

Доказано, что экзосомы МСК способны стимулировать пролиферацию и самообновление стволовых клеток крипт кишечника через активацию сигнальных путей Wnt/ $\beta$ -catenin и Notch, ускоряя регенерацию слизистой оболочки [15].

## 3. Сравнительный анализ эффективности МСК и экзосом

В проанализированных исследованиях не выявлено однозначных данных о превосходстве МСК или экзосом. Большинство авторов указывают на сопоставимые терапевтические эффекты при использовании обоих подходов [7, 13, 21]. Экзосомы обладают рядом преимуществ: отсутствие риска малигнизации, низкая иммуногенность, возможность

стандартизации и длительного хранения. МСК, в свою очередь, обеспечивают более длительное и устойчивое терапевтическое действие за счет способности к персистенции в тканях и непрерывной продукции регенеративных факторов [16, 23]. Выбор между клеточной и бесклеточной терапией может определяться конкретной клинической ситуацией, доступностью ресурсов и целями лечения.

### Сравнительная эффективность различных источников МСК

**МСК костного мозга (BM-MSC).** BM-MSC остаются наиболее изученным типом, демонстрирующим стабильный терапевтический эффект. Показано, что BM-MSC повышают выживаемость животных с экспериментальной ишемией кишечника с 25 до 70% [13, 16]. Преимущества: хорошо охарактеризованный фенотип, предсказуемое поведение *in vivo*. Недостатки: инвазивность забора, ограниченное количество клеток, снижение пролиферативного потенциала с возрастом донора.

**МСК жировой ткани (AD-MSC).** AD-MSC обладают более высокой пролиферативной активностью и доступностью. Авторы отмечают их превосходство в стимуляции ангиогенеза через повышенную экспрессию VEGF и FGF2 на 40% по сравнению с BM-MSC [11, 17]. Преимущества: легкодоступность, возможность получения большого количества клеток, сохранение

потенциала при криоконсервации. Недостатки: вариабельность в зависимости от донора, возможное влияние сопутствующих заболеваний на качество клеток.

**МСК пупочного канатика (UC-MSC).** UC-MSC характеризуются выраженной иммуномодулирующей активностью, однако требуют более тщательного контроля при аллогенном применении [18]. Преимущества: высокая пролиферативная активность, молодой клеточный источник, минимальные этические ограничения. Недостатки: риск иммунного ответа при повторном введении, ограниченная возможность аутологичного применения. Сравнительная характеристика источников МСК представлена в таблице.

### Молекулярные механизмы действия экзосом

Экзосомы МСК несут комплекс биологически активных молекул, обеспечивающих регенеративный эффект:

- miR-21 ингибирует апоптоз через подавление PDCD4 и активацию PI3K/Akt пути, что подтверждено в различных исследованиях на модели ишемии кишечника у мышей [19].
- miR-146a модулирует воспалительный ответ через регуляцию TLR/NF-κB сигналинга, снижая экспрессию провоспалительных цитокинов [20].
- miR-210 стимулирует ангиогенез через взаимодействие с Ephrin A3 и активацию VEGF-опосредованных путей [21].

**Таблица.** Сравнительная характеристика различных источников МСК при терапии ишемических повреждений кишечника

**Table .** Comparative characteristics of various sources of MSCs in the treatment of ischemic intestinal damage

Источник МСК	Преимущества	Недостатки	Ключевые исследования
Костный мозг (BM-MSC)	Наиболее изученный тип, стабильный терапевтический эффект, хорошо охарактеризованный фенотип, предсказуемое поведение <i>in vivo</i>	Инвазивность забора, ограниченное количество клеток, снижение пролиферативного потенциала с возрастом донора	Chen Y. et al., 2020 [8] Wang M. et al., 2023 [13] Kim Y., Jo E.K., 2023 [16]
Жировая ткань (AD-MSC)	Легкодоступность, высокий выход клеток, сохранение потенциала при криоконсервации, повышенная ангиогенная активность (экспрессия VEGF и FGF2 на 40% выше)	Вариабельность в зависимости от донора, возможное влияние сопутствующих заболеваний на качество клеток	Lee H.J. et al., 2022 [11] Liu H. et al., 2023 [17] Park H.S. et al., 2023 [15]
Пупочный канатик (UC-MSC)	Высокая пролиферативная активность, молодой клеточный источник, минимальные этические ограничения, выраженная иммуномодулирующая активность	Риск иммунного ответа при повторном введении, ограниченная возможность аутологичного применения	Zhang B. et al., 2023 [9] Watanabe S. et al., 2024 [18] Li X. et al., 2023 [12]

- Белки теплового шока (HSP70, HSP90) обеспечивают цитопротекцию, предотвращая денатурацию белков в условиях оксидативного стресса [22].

#### 4. Инновационные подходы и перспективы

##### Генетически модифицированные МСК

Перспективным направлением является использование генетически модифицированных МСК. Исследования демонстрируют, что МСК с гиперэкспрессией SDF-1 $\alpha$  проявляют усиленный хоминг к зоне ишемии и повышают эффективность терапии на 40% по сравнению с нативными клетками [17, 23]. Другие перспективные мишени для генной модификации включают гены, кодирующие VEGF, HGF, и антиапоптотические белки.

##### Биоинженерные конструкции

Отдельного внимания заслуживает разработка «целевых систем доставки» (targeted delivery systems). Создана гидрогелевая матрица с инкапсулированными экзосомами МСК, обеспечивающая пролонгированное высвобождение биологически активных компонентов непосредственно в зоне повреждения [20, 24]. Подобные системы позволяют преодолеть ограничения, связанные с быстрым клиренсом экзосом при системном введении.

##### Комбинированные подходы

Перспективным направлением является комбинация клеточной терапии с традиционными методами лечения. В некоторых исследованиях показано, что сочетанное применение МСК с антикоагулянтной терапией позволяет достичь синергетического эффекта, улучшая выживаемость животных с мезентериальным тромбозом на 55% по сравнению с монотерапией [21, 25].

#### 5. Обсуждение

Проведенный анализ свидетельствует о значительном терапевтическом потенциале МСК и экзосом в лечении ИПК. Накопленные данные позволяют рассматривать клеточную терапию как перспективную альтернативу традиционным методам лечения [1–7].

Ключевыми преимуществами экзосомной терапии являются:

- отсутствие риска малигнизации, связанного с введением живых клеток [7, 16, 22];
- низкая иммуногенность, позволяющая использовать аллогенные препараты [16, 18, 22];

- возможность стандартизации и длительного хранения как фармакологического препарата [7, 24, 25];
- способность преодолевать гистогематические барьеры, обеспечивая доставку в труднодоступные зоны [22, 24].

Критическими точками приложения терапии являются:

- подавление оксидативного стресса через активацию Nrf2-опосредованных путей [8, 13, 14];
- стимуляция ангиогенеза и восстановление микроциркуляции [9, 11, 13, 17];
- модуляция иммунного ответа и снижение воспаления [7, 12, 16, 17];
- активация эндогенных стволовых клеток кишечника [9, 15, 18].

Однако остается ряд нерешенных вопросов, требующих дальнейшего изучения. Наиболее важными являются стандартизация протоколов получения и характеристики экзосом, определение оптимальных доз и режимов введения, изучение долгосрочных эффектов терапии [5, 7]. Особого внимания заслуживает вопрос биораспределения экзосом после системного введения и их потенциальное влияние на отдаленные органы и ткани [22, 24, 25].

Важным аспектом является сравнительная эффективность аутологичных и аллогенных клеток. Если аутологичные МСК лишены риска иммунного отторжения и демонстрируют лучшую интеграцию в ткани-мишени [8, 11], то аллогенные клетки предлагают удобство готового к применению продукта [16–18]. Однако их долгосрочная безопасность и эффективность при ИПК требуют тщательной проверки в контролируемых клинических испытаниях.

#### 6. Перспективы

Дальнейшие исследования должны быть направлены на:

1. Оптимизацию протоколов получения и характеристики экзосом — разработку стандартизированных методов выделения, очистки и характеристики экзосом, включая определение их биохимического состава и функциональной активности.
2. Разработку «целевых систем доставки» (targeted delivery systems) — создание систем направленной доставки экзосом в зону ишемии

с использованием наночастиц, гидрогелей и других носителей.

3. Проведение масштабных рандомизированных клинических исследований — организацию исследований фаз II/III с участием большого количества пациентов для оценки эффективности и безопасности терапии.

4. Изучение долгосрочных эффектов и безопасности терапии — мониторинг отдаленных последствий клеточной и экзосомной терапии, включая потенциальный риск неоплазий и иммунологических осложнений.

5. Разработку комбинированных подходов — изучение синергетических эффектов при комбинации клеточной терапии с традиционными методами лечения, включая фармакотерапию и хирургические вмешательства.

6. Персонализацию терапии — разработку подходов к индивидуальному подбору клеточных продуктов на основе характеристик пациента и особенностей течения заболевания.

## 7. Заключение

Терапия на основе МСК и экзосом представляет собой перспективное направление в лечении ишемических повреждений кишечника, соответствующее принципам регенеративной и пер-

сонализированной медицины. Многочисленные экспериментальные исследования демонстрируют комплексное регенеративное воздействие на ишемизированную ткань через влияние на ключевые патогенетические механизмы повреждения. При этом МСК и экзосомы демонстрируют сопоставимую терапевтическую эффективность, что подтверждает ведущую роль паракринных механизмов в реализации регенеративного потенциала клеточной терапии.

В отличие от традиционных методов, направленных преимущественно на симптоматическое облегчение или хирургическое удаление поврежденных тканей, терапия МСК и экзосомами нацелена на восстановление микроокружения ткани и запуск внутренних механизмов репарации. Это представляет собой принципиально новый подход в лечении ишемических поражений кишечника.

Комбинация клеточной терапии с существующими хирургическими методами может значительно улучшить прогноз пациентов с ишемической болезнью кишечника. Однако для широкого клинического внедрения необходимы дальнейшие исследования для стандартизации протоколов, оценки долгосрочных результатов и разработки единых требований к материалам, включая показания, противопоказания, дозировки и виды используемого клеточного продукта.

## Литература

1. Acosta S, Ogren M, Sternby NH, Bergqvist D, Bjorck M. Fatal colonic ischemia: A population-based study. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41(11):1312–1319.
2. Clair DG, Beach JM. Mesenteric Ischemia. *N Engl J Med.* 2016;374(10):959–968.
3. Bala M, Kashuk J, Moore EE, et al. Acute mesenteric ischemia: guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World J Emerg Surg.* 2017;12:38.
4. Brandt LJ, Feuerstadt P, Longstreth GF, Boley SJ. ACG Clinical Guideline: Epidemiology, Risk Factors, Patterns of Presentation, Diagnosis, and Management of Colon Ischemia (CI). *Am J Gastroenterol.* 2015;110(1):18–44.
5. Geng X, Li Q, Li Y, Lu T, Wang Y. Stem cell therapy for ischemic bowel disease: a systematic review. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):486.
6. Harki J, van Vliet AK, Bierau J, van Nieuwenhoven EJ, van der Hulle T, de Bruin RWF. Long-term outcomes after acute mesenteric ischemia: a retrospective cohort study. *Surgery.* 2023;173(2):456–465.
7. Zhang J, Lv S, Liu X, Song B, Shi L. Therapeutic Potential of Exosomes Derived from Stem Cells in Spinal Cord Injury: A Systematic Review of Preclinical Studies. *Neurosci Bull.* 2023;39(1):159–174.
8. Chen Y, Yu B, Xue G, et al. Effects of mesenchymal stem cells on hypoxia-induced endothelial cell damage and repair in vitro. *Int J Mol Med.* 2020;46(2):751–761.

9. Zhang B, Wu X, Zhang X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ $\beta$ -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med.* 2023;12(3):145–156.
10. Wang M, Li Y, Yang Y, et al. Exosomal miR-223 derived from mesenchymal stem cells ameliorates acute kidney injury by targeting NLRP3. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):205.
11. Lee HJ, Lee JS, Lee SH, et al. Comparative Analysis of the Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue and Bone Marrow on Ischemia/Reperfusion-Induced Bladder Dysfunction in a Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8342.
12. Li X, He XT, Yin Y, Wu RX, Tian BM, Chen FM. The Administration of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells and their Roles in Bone Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2023;18(2):181–195.
13. Wang M, Wang Y, Wang Z, Liu H, Wu X. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and non-coding RNAs: potential therapeutic targets for ischemic stroke. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1126635.
14. Zhao Y, Haney MJ, Gupta R, et al. GDNF-expressing macrophages restore motor functions in a mouse model of Parkinson's disease. *Nat Commun.* 2023;14(1):6789.
15. Park HS, Lee J, Kim JW, et al. Adipose-derived stem cell exosomes alleviate pathology of amyotrophic lateral sclerosis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023;642:89–95.
16. Kim Y, Jo EK. The role of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in the immune system. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):135.
17. Liu H, Li R, Liu T, Yang L, Yin G, Xie Q. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2023;14:1125879.
18. Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, et al. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J Gastroenterol.* 2024;59(2):89–102.
19. Liu Q, Wang H, Hu D, et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on osteosarcoma proliferation and apoptosis. *J Orthop Surg Res.* 2023;18(1):689.
20. Gupta R, Ghosh A, Saha S, Chakraborty S. Exosome-mediated delivery of anticancer drugs for the treatment of liver cancer. *Med Oncol.* 2024;41(1):1123.
21. Johnson A, Smith B, Brown C, et al. Mesenchymal stem cell therapy for intestinal ischemia: current status and future directions. *Stem Cells Transl Med.* 2023;12(3):145–156.
22. Martinez C, Garcia J, Lopez M. Extracellular vesicles as novel therapeutics for intestinal diseases. *Gut.* 2023;72(6):1123–1135.
23. Brown K, Davis J, Miller K, et al. Mechanisms of MSC-mediated protection in intestinal ischemia. *J Clin Invest.* 2023;133(8):e167892.
24. Thompson R, Wilson E, Anderson P. Advances in stem cell therapy for gastrointestinal diseases. *Stem Cells Dev.* 2023;32(7):167–179.
25. Garcia J, Rodriguez L, Sanchez M. Extracellular vesicles in regenerative medicine: current challenges. *Nat Rev Mater.* 2023;8(5):345–362.

### Об авторах

**Плечев Вячеслав Владимирович** — ординатор по специальности «сердечно-сосудистая хирургия» ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»; врач-терапевт ГБУЗ «Республиканский кардиологический центр».

**Данилко Ксения Владимировна** — заведующая лабораторией клеточных культур Института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет».

**Тимербулатов Виль Мамилович** — член-корр. РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургии с курсом эндоскопии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет».

Плечев В.В. и соавт.  
МСК и экзосомы в коррекции ишемии кишечника

**Маркелов Виталий Андреевич** — младший научный сотрудник лаборатории клеточных культур Института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет».

### Authors

**Vyacheslav V. Plechev** — Resident in cardio-vascular surgery at Bashkir State Medical University; General Practitioner of the State Budgetary Healthcare Institution Republican Cardiology Center.

**Ksenia V. Danilko** — Head of the Cell Culture Laboratory, Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University.

**Vil M. Timerbulatov** — Dr. Sci. (Medicine), Head of the Department of Surgery with a Course in Endoscopy, Bashkir State Medical University; Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences.

**Vitaly A. Markelov** — Junior Research Fellow, Cell Culture Laboratory, Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University.

---

### Вклад авторов

**В.В. Плечев** — концепция и дизайн работы, сбор данных, анализ и интерпретация данных, составление статьи.

**К.В. Данилко** — концепция и дизайн работы.

**В.М. Тимербулатов** — сбор данных, окончательное утверждение версии для публикации, итоговая переработка статьи.

**В.А. Маркелов** — концепция и дизайн работы.

### Author contribution statement

**Vyacheslav V. Plechev** — concept or design of the study, data collection, data analysis and interpretation, article drafting.

**Ksenia V. Danilko** — concept and design of the study.

**Vil M. Timerbulatov** — data collection, final approval of the version for publication.

**Vitaly A. Markelov** — concept and design of the study.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-31-40>



# Полуавтоматический метод аннотирования фазово-контрастных изображений живых культур клеток для сегментации ядер на основе машинного обучения

М.В. Балясин<sup>1,2,\*</sup>, А.Г. Демченко<sup>2</sup>, А.В. Люндуп<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

<sup>2</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1

\* Адрес для корреспонденции: [balyasin\\_mv@rudn.ru](mailto:balyasin_mv@rudn.ru)

## Аннотация

В текущей работе разработан комплексный подход для определения ядер живых клеток на изображениях без флуоресцентных меток. Поскольку в клеточной биологии актуальными являются подсчет клеток, оценка динамики роста клеток и конfluентности, то существует целесообразность в автоматизации получения этих данных. Для автоматизации применяют алгоритмы на основе машинного обучения, которые необходимо обучать на изображениях конкретных культур клеток. Обучение алгоритмов является трудоемким процессом и требует длительной ручной разметки. Также доступные методы анализа на основе машинного обучения обладают низкой точностью определения живых клеток без флуоресцентной окраски. **Цель исследования:** упростить создание набора данных аннотированных клеток с последующим обучением алгоритмов на изображениях живых культур клеток. **Материалы и методы.** Методика включала использование сверточных нейронных сетей на основе алгоритма для сегментации ядер клеток на флуоресцентных и гистологических изображениях StarDist. Для создания аннотированных фазово-контрастных изображений культуры клеток образцы окрашивали ядерным флуоресцентным красителем DAPI с последующей отбраковкой некачественных изображений при помощи классификации в программе Cellprofiler Analyst. Обучение модели на основе StarDist проводили на 1130 изображениях автоматически аннотированных ядер на фазово-контрастных изображениях культуры эпителиальных клеток респираторного тракта человека, полученных на объективе 10×, размером 1600×1200 пикселей и глубиной цвета 16 бит. **Результаты исследования.** Полученная модель показала хорошую точность ( $F_1 = 0,765$ ) сегментации ядер на валидационном наборе данных. Модель применили для определения времени удвоения популяции культуры эпителиальных клеток. **Заключение:** разработанный подход позволил создать аннотации и обучить модель машинного обучения для получения данных без применения флуоресцентных меток «label-free» на живых культурах клеток.

**Ключевые слова:** машинное обучение, сверточные нейронные сети, сегментация ядер, фазово-контрастные изображения, label-free

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для федерального государственного

бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

**Для цитирования:** Балясин М.В., Демченко А.Г., Люндуп А.В. Полуавтоматический метод аннотирования фазово-контрастных изображений живых культур клеток для сегментации ядер на основе машинного обучения. *Регенерация органов и тканей*. 2025;3(1): 31–40. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-31-40>

Получена 27.02.2025

Обработана 18.03.2025

Принята 25.03.2025

## Semi-automatic method of annotating phase-contrast images of live cell cultures for nuclei segmentation based on machine learning

Maxim V. Balyasin<sup>1,2,\*</sup>, Anna G. Demchenko<sup>2</sup>, Alexey V. Lyundup<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University), Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6

<sup>2</sup> Research Centre for Medical Genetics, Russia, 115522, Moscow, Moskvorechye str., 1

\* Corresponding author: balyasin\_mv@rudn.ru

### Abstract

This study developed a comprehensive approach for identifying live cell nuclei in images without fluorescent labels. Since cell biology involves counting cells and assessing cell growth dynamics and confluence, it is expedient to automate the collection of this data. Machine learning algorithms are used for automation, which must be trained on images of specific cell cultures. Training algorithms is a labor-intensive process and requires lengthy manual annotation. Also, available machine learning-based analysis methods have low accuracy in identifying living cells without fluorescent staining. **Aim of the study.** To simplify the creation of a dataset of annotated cells with subsequent training of algorithms on images of living cell cultures. **Materials and methods.** The methodology involved the use of convolutional neural networks based on an algorithm for segmenting cell nuclei in fluorescent and histological images using StarDist. To create annotated phase-contrast images of cell cultures, samples were stained with the nuclear fluorescent dye DAPI, followed by the rejection of poor-quality images using classification in the CellProfiler Analyst program. The StarDist-based model was trained on 1,130 images of automatically annotated nuclei in phase-contrast images of human respiratory tract epithelial cell cultures, obtained with a 10x lens, 1,600x1,200 pixels in size, and 16-bit color depth. **Results.** The resulting model showed good accuracy ( $F_1 = 0.765$ ) in segmenting nuclei on the validation dataset. The model was used to determine the population doubling time of the epithelial cell culture population. **Conclusion.** The developed approach made it possible to create annotations and train a machine learning model to obtain data without the use of fluorescent labels (“label-free”) on live cell cultures.

**Keywords:** machine learning, convolutional neural networks, nuclear segmentation, phase-contrast images, label-free

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** This work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics named after Academician N.P. Bochkov.

**For citation:** Balyasin M.V., Demchenko A.G., Lyundup A.V. Semi-automatic method of annotating phase-contrast images of live cell cultures for nuclei segmentation based on machine learning. *Tissue and organ regeneration*. 2025;3(1):31–40. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-31-40>

Received 27.02.2025

Received 18.03.2025

Accepted 25.03.2025

#### Список сокращений:

**CNN** — сверточные нейронные сети (convolutional neural networks)

**ML** — машинное обучение (machine learning)

**PDT** — время удвоения популяции (population doubling time)

## Введение

Сегментация клеток является важной задачей в биомедицинских исследованиях. Классические методы сегментации и морфометрического анализа изображений не отличаются высокой точностью, а также обладают низкой способностью к обобщению [1]. На смену им пришли алгоритмы машинного обучения, но даже самые актуальные алгоритмы требуют разметки исходных данных для последующего обучения [2]. Аннотация объектов интереса на микроскопических изображениях требует значительных затрат времени и труда на ручную разметку данных [3]. Задача сегментации медико-биологических изображений клеток и структур ткани решается многими коллективами, некоторые сосредоточены на решении узких задач, например сегментации окрашенных ядер культур клеток и гистологических срезов, другие — на разработке генерализованных алгоритмов [4–6]. Разнообразие задач исследователя не позволяет на текущий момент использовать предобученные модели без их точной настройки [7]. Другая проблема — это необходимость применения селективных красителей для визуализации структур клетки, без которых наиболее трудно выполнить сегментацию отдельных клеток в живой культуре [8]. Фазово-контрастная микроскопия представляет собой оптимальный метод для наблюдения живых неокрашенных клеток, но автоматическая сегментация отдельных клеток и их структур на таких изображениях остается сложной задачей из-за низкого контраста и артефактов оптической системы [9, 10]. Также есть исследование по применению сегментации ядер для подсчета клеток на изображениях светлого поля [11, 12]. Однако

все это требует трудоемкого процесса подготовки набора данных для обучения моделей [13]. В данном исследовании представлен подход, который может помочь исследователям облегчить задачу подготовки набора данных для последующего обучения необходимой ML модели на примере задачи сегментации ядер культуры клеток без применения меток.

## Материалы и методы

### Подготовка образцов и набора данных

Для обучения модели использовали ФК-изображения культуры эпителиальных клеток респираторного тракта человека, полученные с помощью микроскопии в режиме реального времени на приборе Celena X (Logos biosystems, Корея) на объективе с увеличением 10×. Клетки культивировали в соответствии с протоколом, опубликованном ранее [14]. Для формирования обучающего набора данных клетки пассировали в различной концентрации начиная с 50 000 клеток/см<sup>2</sup> в 24-луночный планшет с шагом разведения 1:1,2 в двух технических повторах. Клетки культивировали в течение 12 часов, после чего фиксировали при помощи 4% раствора параформальдегида в фосфатно-солевом буфере в течение 15 минут, трижды проводили отмывку раствором DPBS («ПанЭко», Россия) и окрашивали раствором DAPI (Abcam, США) в концентрации 1 мкг/мл. Затем получали флуоресцентные изображения DAPI с соответствующим полем зрения на ФК.

### Обучение модели

Полученный набор данных с 24-луночного планшета подготовили, проведя двухэтапный полуавтоматический отбор изображений с помощью

программ CellProfiler версии 4.2.6 (Broad Institute of MIT and Harvard, США) и CellProfiler Analyst (Broad Institute of MIT and Harvard, США) версии 3.0.4 [15, 16]. На первом этапе удаляли фотографии, где ядра клеток в канале DAPI находились не в фокусе. На втором этапе на полученных изображениях проводили сегментацию ядер при помощи предобученной модели StarDist [17]. На полученных сегментированных изображениях ядер клеток с помощью CellProfiler Analyst удаляли артефакты, клетки на краю лунки и за пузырями воздуха. Таким образом всего было получено 1130 изображений и 22 636 сегментированных объектов, из которых 960 изображений были использованы для обучения модели и 170 — для валидации и проверки ее точности. Для обучения и сегментации изображений был взят алгоритм StarDist на основе CNN архитектуры U-net с последующей сегментацией объектов звездчатой формы. Архитектура U-Net была выбрана, поскольку она является специализированной и широко признанной моделью для задач семантической сегментации, демонстрирующей более высокую точность по сравнению с моделями детекции объектов (такими, как Mask R-CNN или YOLO), которые часто показывают худшие результаты в подобных задачах. Для этого использовали предварительно обученную модель на наборе данных DSB2018 для сегментации флуоресцентно окрашенных ядер клеток. Обучение длилось 450 эпох, с размером пакета 4, размером изображения для обучения 256×256 пикселей, скоростью обучения 3E-4. Время обучения составило 8–9 часов. В ходе обучения использовали аугментацию данных: отражение и поворот в случайном направлении и на случайный угол, изменение размера и яркости изображения. Для оценки хода обучения и точности модели использовали loss функцию и метрику IoU (коэффициент Жаккара). Итоговую точность модели оценивали по таким показателям, как precision, recall, accuracy, F1 score (коэффициент Дайса), mean true score, mean matched score, panoptic quality. Для обучения и применения модели использовали ноутбук с характеристиками: ЦП AMD Ryzen 7 7735HS 3.2 ГГц 8 ядер (16 логических), оперативная память SODIMM DDR5 16Gb 4800 МГц, видеокарта NVIDIA GeForce RTX4060 laptop.

Обученная модель, набор изображений (2600 изображений), исходный код для обучения и применения модели доступны в открытом облачном хранилище Яндекс-диск <https://disk.yandex.ru/d/eff1D0qDw3gACg>. Также в облачном хранилище находится подробная документация по установ-

ке необходимого программного обеспечения, примеры использования модели и инструкции по адаптации подхода для других типов изображений. Для воспроизведения результатов предоставлены файлы с параметрами обучения и предварительно обработанные данные.

### Проверка модели на фазово-контрастных изображениях культуры клеток в реальном времени

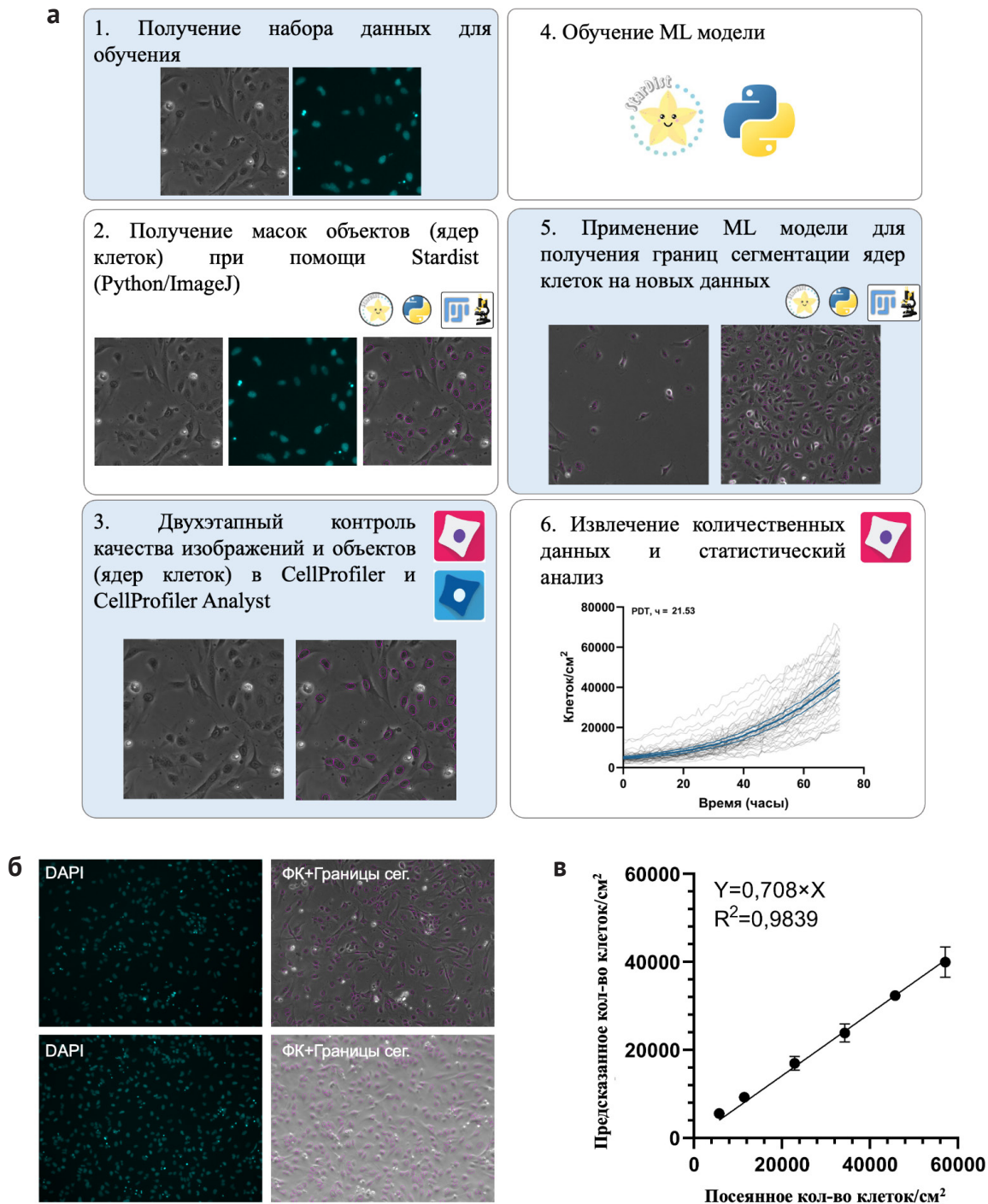
Для оценки применимости модели проводили пассирование клеток на 24-луночный планшет с концентрацией клеток  $50 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> в 3-х технических повторах. Культуры инкубировали в течение 72 часов при +37 °С, высокой влажности и атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем каждый час проводили получение изображений с 16 полей зрения на лунку планшета. На полученном наборе изображений во времени проводили сегментацию ядер клеток, оценивали плотность клеток и PDT.

### Статистический анализ

Для статистического анализа применяли программное обеспечение GraphPad Prism версии 10.1 (США). Методы статистической обработки данных включали среднее значение и 95% доверительный интервал (ДИ). Для оценки соответствия плотности клеток на изображениях обучающей выборки и количества посеянных клеток рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона плотности клеток на изображениях и в зависимости от концентрации посаженных клеток. Также оценивали скорость роста живой культуры клеток методом оценки PDT при помощи расчета угла наклона натурального логарифма плотности клеток от времени роста. Статистическую значимость принимали при  $p$  значение < 0,05.

### Результаты

В ходе работы был разработан протокол подготовки аннотаций изображений для обучения и применения модели машинного обучения, который включает в себя этапы: получение пар флуоресцентных и ФК изображений, контроль качества изображений и объектов, обучение модели, применение модели и анализ данных (рис. 1а). В результате двухэтапного контроля качества изображений и объектов в программах CellProfiler и CellProfiler Analyst был получен набор данных с 1130 пар изображений, на которых была проведена сегментация ядер (рис. 1б). Для обучения модели допускались пары



**Рис. 1.** Набор данных для обучения ML модели с последующей сегментацией ядер на изображениях культуры эпителиальных клеток на ФК, окрашенных DAPI: а – схема протокола подготовки данных, обучения и анализа изображений; б – исходные флуоресцентные и ФК-изображения культур клеток с нанесенными границами сегментированных ядер клеток (GT); в – результаты автоматической сегментации ядер на основе изображений DAPI при помощи предварительно обученной модели CNN в соответствии с плотностью посева клеток; объектив 10×; данные представлены как среднее значение ± 95% ДИ; коэффициент корреляции Пирсона  $R^2$

**Fig. 1.** Training dataset for an ML model with subsequent nucleus segmentation in phase-contrast (PC) images of an epithelial cell culture stained with DAPI: а – schematic of the data preparation, training, and image analysis workflow; б – raw fluorescence and PC images of cell cultures with overlaid boundaries of segmented cell nuclei (ground truth, GT); в – results of automated nucleus segmentation from DAPI images using a pre-trained CNN model according to cell seeding density; 10× objective; data are presented as mean ± 95% CI; Pearson correlation coefficient ( $R^2$ )

изображений при наличии небольшого отклонения от фокуса на ФК или полученное около края лунки планшета при условии, что флуоресцентное изображение ядра клетки находится в фокусе и хорошо визуализируется (рис. 1б).

**Таблица 1.** Оценка производительности модели по основным метрикам

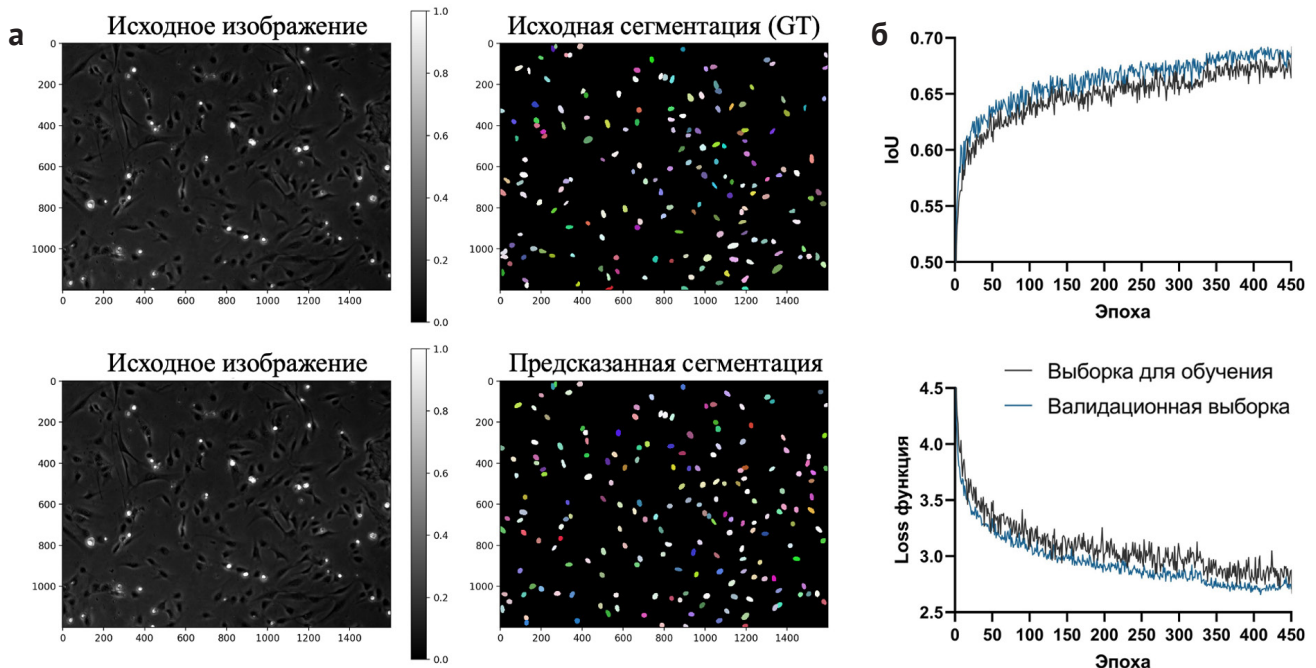
**Table 1.** Model performance evaluation using the main metrics

Параметр	Оценка
$N$ true	22 636
$N$ predicted	22 342
$N$ true positive	17 196
$N$ false positive	5146
$N$ false negative	5440
Precision	0,77
Recall	0,76
Accuracy	0,619
$F_1$ score	0,765
Mean true score	0,577
Mean matched score	0,759
Panoptic quality	0,58

Коэффициент корреляции между количеством посеянных клеток и оценкой плотности клеток на изображениях методом сегментации флуоресцентных ядер алгоритмом StarDist через 24 часа после посева составил  $R^2 = 0,9839$ .

Разные условия, в которых были получены изображения, такие как высокая и низкая плотность клеток, искажение фазового контраста на границе лунки, а также аугментация изображений, позволили добавить вариабельность для обучающей выборки, что привело к увеличению стабильности результирующей модели и возможности к обобщению на новых наборах данных. Обучение модели заняло ~8,5 часа (рис. 2б). Метрика IoU для обучающей выборки составила 0,68, для валидационной выборки — 0,689, что соответствует хорошему качеству результирующих масок (рис. 2а).

Более высокое значение IoU для валидационной выборки связано с применением аугментации изображений на обучающей выборке, которая не используется при оценке валидационной выборки. Параметры точности модели представлены в таблице 1. Так, обучение производилось на 22 636 флуоресцентно окрашенных ядрах.



**Рис. 2.** Прогресс обучения и результаты модели CNN на тестовом наборе изображений: а – границы сегментированных ядер клеток, сгенерированные при помощи CNN на тестовом наборе изображений; б – параметры обучения модели в зависимости от эпохи, IoU и loss функция для обучающей и валидационной выборки

**Fig. 2.** Training progress and CNN model performance on the test image set: a – boundaries of segmented cell nuclei generated by the CNN on the test image set; б – training parameters as a function of epoch: IoU and loss for the training and validation sets

Метрика точности precision составила 0,77, accuracy = 0,619, а  $F_1 = 0,765$ . Положительная прогностическая ценность для определения ядер составила 76,97%, чувствительность — 76,99%. Полученные показатели соответствуют приемлемой предиктивной модели.

Для оценки качества сегментации использовали следующие метрики:

$N$  true — общее количество истинных объектов (ground truth) в наборе данных;

$N$  predicted — общее количество предсказанных объектов моделью;  $N$  true positive — количество истинно-положительных предсказаний;

$N$  false positive — количество ложноположительных предсказаний;

$N$  false negative — количество ложноотрицательных предсказаний.

Precision вычисляется как доля правильно предсказанных положительных результатов из всех предсказаний модели ( $N$  true positive / ( $N$  true positive +  $N$  false positive)). Высокое значение означает низкий уровень ложноположительных результатов.

Recall вычисляется как доля правильно предсказанных положительных результатов из всех истинных положительных результатов ( $N$  true positive / ( $N$  true positive +  $N$  false negative)). Высокое значение означает низкий уровень ложноотрицательных результатов.

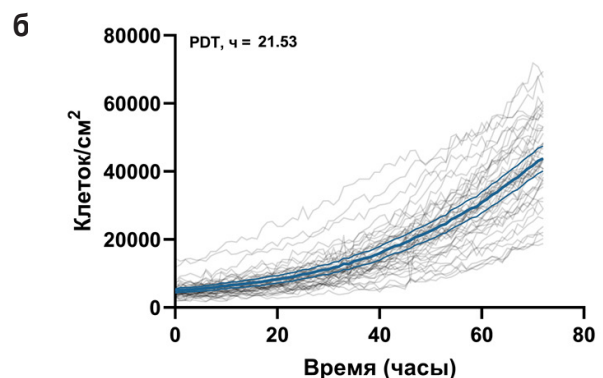
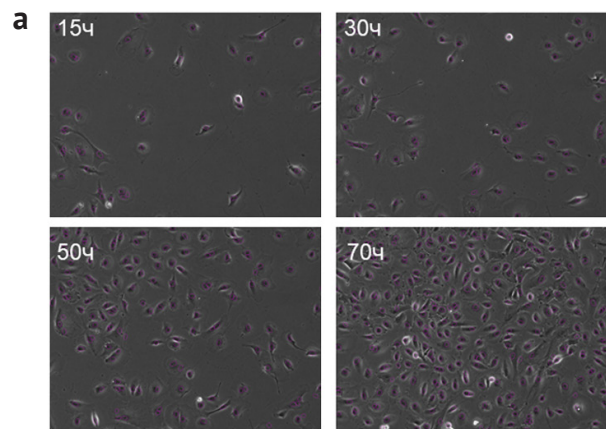
Accuracy вычисляется как общая точность предсказаний модели с учетом всех типов ошибок ( $N$  true positive / ( $N$  true positive +  $N$  false positive +  $N$  false negative)). В контексте сегментации это часто называют «средней точностью» (average precision).

$F_1$  score — вычисляется как гармоническое среднее Precision и Recall ( $2 \times (\text{Precision} \times \text{Recall}) / (\text{Precision} + \text{Recall})$ ). Высокое значение указывает на хорошую производительность модели.

Mean true score — среднее значение метрики IoU (intersection over union) для всех истинных объектов, которые были сопоставлены с предсказанными объектами. Нормализуется по общему количеству истинных объектов.

Mean matched score — среднее значение метрики IoU для всех истинно-положительных сопоставлений. Это среднее значение IoU для тех объектов, которые были успешно сопоставлены.

Panoptic quality — метрика, объединяющая сегментацию и классификацию объектов. Вычисляется как  $(\text{sum\_matched\_score}) / (N \text{ true positive} + N \text{ false positive} / 2 + N \text{ false negative} / 2)$ , где  $\text{sum\_matched\_score}$  равен сумме IoU по всем  $N$  true positive. Она учитывает как качество сегментации (через IoU), так и качество обнаружения (через  $N$  true positive,  $N$  false positive,  $N$  false negative).



**Рис. 3.** Оценка на новом наборе данных скорости роста культуры эпителиальных клеток на ФК изображений без меток: а — пример роста культуры клеток через 15 часов, 30, 50 и 70 часов после начала эксперимента с нанесенными границами ядер при помощи CNN модели 1; б — PDT культуры клеток на основе результатов сегментации ядер клеток; объектив 10×, регрессионная линия — среднее значение  $\pm$  95% ДИ

**Fig. 3.** Evaluation of the growth rate of an epithelial cell culture on a new dataset of label-free PC images: а — example of cell culture growth at 15, 30, 50, and 70 h after the start of the experiment with nuclear boundaries overlaid using CNN model 1; б — population doubling time (PDT) of the cell culture based on nucleus segmentation results; 10× objective; regression line shown as mean  $\pm$  95% CI

Полученную модель применяли для оценки скорости роста живой культуры эпителиальных клеток респираторного эпителия в режиме реального времени. Модель эффективно сегментировала ядра клеток на всех стадиях роста культуры клеток начиная с низкой плотности на 0 час, заканчивая 70 часами роста (рис. 3а). В результате оценки количества ядер во времени на живой культуре клеток PDT составила 21,53 часа (рис. 3б), а конечная плотность — 43 786 клеток/см<sup>2</sup> (40 130–47 441, 95% ДИ).

Таким образом, разработан подход для получения аннотированных изображений, который показывает высокую точность в сегментации ядер клеток на ФК изображениях и который можно применять для решения задач количественного анализа живых культур клеток без применения флуоресцентных меток.

### Заключение

Разработанный полуавтоматический метод аннотирования для обучения модели машинного обучения сегментации ядер на ФК-изображениях показал высокую эффективность и точность. Несмотря на то что метрика точности IoU на ФК-изображениях в сравнении с флуоресцентно окрашенными ядрами обладает более низкой точностью, сегментация ядер в нашей работе показала точность предсказанных масок выше, чем при сегментации всей клетки на фазовом контрасте [17]. Метод определения ядер клеток по ФК-изображениям

является перспективным для введения неинвазивных контролей качества в режиме реального времени в области клеточных технологий, для скрининга и тестирования веществ, а также в исследовательских целях.

Одним из ограничений для исследователей в применении машинного обучения на текущий момент может стать необходимость использования кода и его написание. В предложенном подходе выбраны такие алгоритмы, которые имеют наиболее полную документацию по установке, применению, а также имеют примеры, которые можно повторить для воспроизведения методик. Другим ограничением текущей работы является то, что все изображения для анализа получены на одном микроскопе. В дальнейшем мы планируем провести тестирование на изображениях с других микроскопов, а также расширить алгоритм сегментации, добавив возможность отслеживания траектории отдельной клетки или ядра [18–20].

Стоит отметить, что, несмотря на наличие в открытом доступе большого количества проектов по сегментации микроскопических изображений, нет хорошо генерализованных моделей, поэтому исследователям необходимо до обучать доступные модели на своих данных. Предложенный нами метод позволяет облегчить исследователям применение методов машинного обучения и компьютерного зрения, а также адаптировать их под свои задачи путем валидации модели на изображениях.

### Литература

1. Ayanzadeh A., Yağar H.O., Özuysal Ö.Y., Okvur D.P., Töreyn B.U., Ünay D., Önal S. Cell segmentation of 2D phase-contrast microscopy images with deep learning method // 2019 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO). IEEE, 2019. P. 1–4.
2. Kirillov A., Mintun E., Ravi N., Mao H., Rolland C., Gustafson L., et al. Segment anything // Proceedings of the IEEE/CVF International Conference on Computer Vision. 2023. P. 4015–4026.
3. Kakumani A.K., Padma Sree L. A Deep Learning Approach for Segmenting Time-Lapse Phase Contrast Images of NIH 3T3 Fibroblast Cells // New Trends in Computational Vision and Bio-inspired Computing: Selected works presented at the ICCVBIC 2018, Coimbatore, India. Cham: Springer International Publishing, 2020. P. 855–862.
4. Shamshad F., Khan S., Zamir S.W., Khan M.H., Hayat M., Khan F.S., Fu H. Transformers in medical imaging: A survey // Medical Image Analysis. 2023. Vol. 88. P. 102802.
5. Greenwald N.F., Miller G., Moen E., Kong A., Kagel A., Dougherty T., et al. Whole-cell segmentation of tissue images with human-level performance using large-scale data annotation and deep learning // Nature Biotechnology. 2022. Vol. 40, № 4. P. 555–565.

6. Stringer C., Wang T., Michaelos M., Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation // *Nature Methods*. 2021. Vol. 18, № 1. P. 100–106.
7. Lee M.Y., Bedia J.S., Bhate S.S., Barlow G.L., Phillips D., Fantl W.J., et al. CellSeg: a robust, pre-trained nucleus segmentation and pixel quantification software for highly multiplexed fluorescence images // *BMC Bioinformatics*. 2022. Vol. 23, № 1. P. 46.
8. Holme B., Bjørnerud B., Pedersen N.M., de la Ballina L.R., Wesche J., Haugsten E.M. Automated tracking of cell migration in phase contrast images with CellTraxx // *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13, № 1. P. 22982.
9. Hörst F., Rempe M., Heine L., Seibold C., Keyl J., Baldini G., et al. Cellvit: Vision transformers for precise cell segmentation and classification // *Medical Image Analysis*. 2024. Vol. 94. P. 103143.
10. Berg S., Kutra D., Kroeger T., Straehle C.N., Kausler B.X., Haubold C., et al. Ilastik: interactive machine learning for (bio) image analysis // *Nature Methods*. 2019. Vol. 16, № 12. P. 1226–1232.
11. Ali R., Gooding M., Szilágyi T., Vojnovic B., Christlieb M., Brady M. Automatic segmentation of adherent biological cell boundaries and nuclei from brightfield microscopy images // *Machine Vision and Applications*. 2012. Vol. 23, № 4. P. 607–621.
12. Cross-Zamirski J.O., Mouchet E., Williams G., Schönlieb C.B., Turkki R., Wang Y. Label-free prediction of cell painting from brightfield images // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 10001.
13. Pachitariu M., Stringer C. Cellpose 2.0: how to train your own model // *Nature Methods*. 2022. Vol. 19, № 12. P. 1634–1641.
14. Demchenko A., Belova L., Balyasin M., Kochergin-Nikitsky K., Kondrateva E., Voronina E., et al. Airway basal cells from human-induced pluripotent stem cells: a new frontier in cystic fibrosis research // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2024. Vol. 12. P. 1336392.
15. Stirling D.R., Swain-Bowden M.J., Lucas A.M., Carpenter A.E., Cimini B.A., Goodman A. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability // *BMC Bioinformatics*. 2021. Vol. 22, № 1. P. 433.
16. Stirling D.R., Carpenter A.E., Cimini B.A. CellProfiler Analyst 3.0: accessible data exploration and machine learning for image analysis // *Bioinformatics*. 2021. Vol. 37, № 21. P. 3992–3994.
17. Schmidt U., Weigert M., Broaddus C., Myers G. Cell detection with star-convex polygons // *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 265–273.
18. Tsai H.F., Gajda J., Sloan T.F., Rares A., Shen A.Q. Usiigaci: Instance-aware cell tracking in stain-free phase contrast microscopy enabled by machine learning // *SoftwareX*. 2019. Vol. 9. P. 230–237.
19. Fazeli E., Roy N.H., Follain G., Laine R.F., von Chamier L., Hänninen P.E., et al. Automated cell tracking using StarDist and TrackMate // *F1000Research*. 2020. Vol. 9. P. 1279.
20. Moen E., Borba E., Miller G., Schwartz M., Bannon D., Koe N., et al. Accurate cell tracking and lineage construction in live-cell imaging experiments with deep learning // *bioRxiv*. 2019. 803205.

### Об авторах

**Балысин Максим Витальевич** — младший научный сотрудник Научно-образовательного ресурсного центра «Клеточные технологии» ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»; научный сотрудник Лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

**Демченко Анна Григорьевна** — к.б.н., старший научный сотрудник Лаборатории редактирования генома ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

**Льондуп Алексей Валерьевич** — к.м.н., директор Научно-образовательного ресурсного центра «Клеточные технологии» ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»; ведущий научный сотрудник Лаборатории

Балясин М.В., Демченко А.Г., Люндуп А.В.

Полуавтоматический метод аннотирования изображений культур

мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова». SPIN: 4954-3004

### Authors

**Maxim V. Balyasin** — Junior Researcher, Scientific and Educational Resource Center “Cell Technologies”, RUDN University; Researcher, Laboratory of Mutagenesis, Research Centre for Medical Genetics.

**Anna G. Demchenko** — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genome Editing, Research Centre for Medical Genetics.

**Alexey V. Lyundup** — Cand. Sci. (Medicine), Director, Scientific and Educational Resource Center “Cell Technologies”, RUDN University; Leading Researcher, Laboratory of Mutagenesis, Research Centre for Medical Genetics.

---

### Вклад авторов

**М.В. Балясин** — концепция или дизайн работы, сбор данных, анализ и интерпретация данных.

**А.Г. Демченко** — сбор данных, составление статьи, итоговая переработка статьи.

**А.В. Люндуп** — окончательное утверждение версии для публикации.

### Author contribution statement

**Maxim V. Balyasin** — conception or design of the work; data acquisition; data analysis and interpretation.

**Anna G. Demchenko** — data acquisition; drafting the manuscript; critical revision of the manuscript.

**Alexey V. Lyundup** — final approval of the version to be published.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-41-65>



# Эквиваленты кожи, полученные на основе 3D-биопечати и фибробластов, для заживления ран и регенерации

Ю.С. Саенко<sup>1,2</sup>, Е.С. Агеева<sup>1,2,\*</sup>, К.А. Юрченко<sup>1,2</sup>, Э.Т. Дегирменджи<sup>1,2</sup>,  
Н.А. Волкова<sup>1,2</sup>, И.И. Фомочкина<sup>1,2</sup>, А.В. Кубышкин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского, Россия, 295051, Симферополь, бульвар Ленина, д. 5/7

<sup>2</sup> Инжиниринговый центр «Генетические и клеточные биотехнологии», Россия, 295051, Симферополь, бульвар Ленина, д. 5/7

\* Адрес для корреспонденции: [ageevaeliz@rambler.ru](mailto:ageevaeliz@rambler.ru)

## Аннотация

Интенсивное развитие персонализированной медицины раскрывает новые возможности разработки технологий регенеративной медицины и трансляции этих разработок в клинику. Одним из интенсивно развиваемых направлений в создании новых лечебных подходов является использование биопечати для изготовления конструкций тканей и органов. Особое внимание привлекает разработка кожных эквивалентов, способных воспроизводить сложную архитектурную организацию и функциональные свойства тканей кожи. В обзоре проведен анализ публикаций, представленных в базах данных Scopus, PubMed и RSCI, охватывающих области биопечати, тканевой инженерии и регенеративной медицины. Использовались опубликованные данные, посвященные разработке биоматериалов, протоколам 3D-биопечати, характеристикам биопечатных кожных конструкций и результатам как доклинических, так и клинических исследований, актуальные по состоянию на сентябрь 2025 года. Анализ показал, что одним из наиболее перспективных направлений является оптимизация 3D-биопечати кожных конструкций, основанных на использовании фибробластов, кератиноцитов и инновационных биоматериалов, таких как гидрогели, коллагеновые матрицы и GelMA. Эти технологии позволяют создавать полнослойные, васкуляризированные структуры, обеспечивая достаточно высокую точность пространственного распределения клеток и поддержку микросреды, необходимой для регенерации тканей. Дальнейшие исследования по оптимизации параметров печати, правильному выбору компонентов биочернил, интеграции фибробластов и других клеточных компонентов позволят более точно моделировать дермальные слои и стимулировать процессы регенерации. Применение дополнительных биологических факторов будет способствовать формированию устойчивой сосудистой сети, лучшей приживляемости конструкций, что значительно улучшит функциональную интеграцию напечатанных конструкций в ткани организма-реципиента. Таким образом, интеграция передовых методов 3D-биопечати, оптимизированных биочернил и мультিকлеточных конструкций открывает перспективы создания кожных эквивалентов нового поколения, которые смогут не только ускорить процесс регенерации, но и обеспечить эстетически оптимальный результат для пациентов, страдающих от серьезных ожогов, травм и других повреждений кожи.

**Ключевые слова:** фибробласты, кератиноциты, 3D-биопринтинг, дерма, биоматериалы.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© Саенко Ю.С., Агеева Е.С., Юрченко К.А., Дегирменджи Э.Т., Волкова Н.А., Фомочкина И.И., Кубышкин А.В., 2025

Саенко Ю.С. и др.  
Эквиваленты кожи для заживления ран и регенерации

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» в рамках проекта МОЛ/2024/ 3.

**Для цитирования:** Саенко Ю.С., Агеева Е.С., Юрченко К.А., Дегирменджи Э.Т., Волкова Н.А., Фомочкина И.И., Кубышкин А.В. Эквиваленты кожи, полученные на основе 3D-биопечати и фибробластов, для заживления ран и регенерации. *Регенерация органов и тканей*. 2025;3(1): 41–65. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-41-65>

Получена 18.01.2025  
Обработана 26.02.2025  
Принята 01.03.2025

## 3D bioprinted and fibroblast-based skin equivalents for wound healing and regeneration

Yulia S. Saenko<sup>1,2</sup>, Elizabeth S. Ageeva<sup>1,2,\*</sup>, Ksenia A. Yurchenko<sup>1,2</sup>,  
Evelina T. Degirmenji<sup>1,2</sup>, Nadezhda A. Volkova<sup>1,2</sup>, Irina I. Fomochkina<sup>1,2</sup>,  
Anatoly V. Kubyshkin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky, Russia, 295051, Simferopol, Lenin Blvd, 5/7

<sup>2</sup> Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnologies”, Russia, 295051, Simferopol, Lenin Blvd, 5/7

\* Correspondence: [ageevaeliz@rambler.ru](mailto:ageevaeliz@rambler.ru)

### Abstract

Intensive development of personalized medicine is revealing new possibilities for the development of regenerative medicine technologies and the translation of these developments into the clinic. One of the rapidly developing directions in creating new therapeutic approaches is the use of bioprinting for the fabrication of tissue and organ constructs. Particular attention is drawn to the development of skin equivalents capable of reproducing the complex architectural organization and functional properties of skin tissues. The review analyzes publications presented in the Scopus, PubMed, and RSCI databases, covering the fields of bioprinting, tissue engineering, and regenerative medicine. Published data were used that are devoted to the development of biomaterials, 3D-bioprinting protocols, characteristics of bioprinted skin constructs, and results of both preclinical and clinical studies, relevant as of September 2025. The analysis showed that one of the most promising directions is the optimization of 3D-bioprinting of skin constructs based on the use of fibroblasts, keratinocytes, and innovative biomaterials such as hydrogels, collagen matrices, and GelMA. These technologies enable the creation of full-thickness, vascularized structures, ensuring sufficiently high accuracy of the spatial distribution of cells and support for the microenvironment necessary for tissue regeneration. Further studies on optimization of printing parameters, proper selection of bioink components, and integration of fibroblasts and other cellular components will allow more precise modeling of the dermal layers and stimulation of regeneration processes. The application of additional biological factors will contribute to the formation of a stable vascular network and better engraftment of constructs, which will significantly enhance the functional integration of printed constructs into the recipient tissue. Thus, the integration of advanced 3D-bioprinting methods, optimized bioinks, and multicellular constructs opens prospects for creating a new generation of skin equivalents, which will not only accelerate the regeneration process but also provide an aesthetically optimal outcome for patients suffering from severe burns, injuries, and other skin damages.

**Keywords:** fibroblast, keratinocytes, 3D-bioprinting, derma, biomaterials.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** The study was carried out with the financial support of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “V.I. Vernadsky Crimean Federal University” within the framework of the MOL/2024/ 3 project.

**For citation:** Saenko Yu.S., Ageeva E.S., Yurchenko K.A., Degirmenji E.T., Volkova N.A., Fomochkina I.I., Kubyshkin A.V. 3D bioprinted and fibroblast-based skin equivalents for wound healing and regeneration. *Tissue and organ regeneration*. 2025;3(1):41–65. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-41-65>

Received 18.01.2025

Revised 26.02.2025

Accepted 01.03.2025

#### Список сокращений:

**3D** — трехмерный

**EGF** — эпидермальный фактор роста

**GelMA** — желатина метакрилоил

**KGF** — фактор роста кератиноцитов

**PDGF** — тромбоцитарный фактор роста

**VEGF** — фактор роста эндотелия сосудов

#### List of abbreviations:

**3D** — three-dimensional

**EGF** — epidermal growth factor

**GelMA** — gelatin methacryloyl

**KGF** — keratinocyte growth factor

**PDGF** — platelet-derived growth factor

**VEGF** — vascular endothelial growth factor

## Введение

Интенсивное развитие персонифицированной медицины раскрывает новые возможности для разработки технологий регенеративной медицины и трансляции этих разработок в клинику. Одним из интенсивно развиваемых направлений в создании новых лечебных подходов является использование биопечати для изготовления конструкций тканей и органов. Причем биопечать трехмерных (3D) клеточных каркасов сейчас стоит на переднем крае как надежный заменитель тканей, особенно в рамках трансляционных исследований. Эта технология создает биологические конструкции с иерархической архитектурой, напоминающей ткани человека. Считается, что воспроизведение сложных тканей с использованием технологий 3D-биопечати может стать ключевым фактором сближения эк-

спериментальных лабораторных и клинических исследований, ускорив путь к использованию продуктов регенеративных технологий в клинической практике.

Развитие технологий прототипирования и расширение ассортимента материалов для биопечати позволяют создавать среды, наиболее приближенные и комплементарные структуре нативных тканей. Данные подходы включают последовательную или одновременную послойную печать нескольких материалов, обеспечивающих поддержку различных типов клеток. Гибкость интеграции биокomпонентов при создании функциональных биочернил позволяет выстраивать пространственно сложные конструкции [1]. В качестве основного компонента биочернил обычно используются гидрогели, что обусловлено

высоким содержанием водного компонента и заметным сходством с естественной внеклеточной матрицей (ВКМ). Благодаря этим свойствам гидрогели формируют обогащенную среду для поддержания жизнеспособности клеток, процессов пролиферации и дифференциации. Интеграция наночастиц и нановолокон позволяет улучшать биопечатные свойства и функциональные характеристики гидрогелей, в то время как добавление факторов роста, лекарственных препаратов, мРНК и других регуляторных компонентов способствует целенаправленному модулированию ключевых молекулярных путей для правильной дифференцировки и улучшения приживляемости [2–4].

В современных исследованиях в области регенеративной медицины особое внимание уделяется разработке кожных эквивалентов, способных воспроизводить сложную архитектурную организацию и функциональные свойства тканей кожи. Одним из наиболее перспективных направлений является оптимизация 3D-биопечати кожных конструкций, основанных на использовании фибробластов, кератиноцитов и инновационных биоматериалов, таких как гидрогели, коллагеновые матрицы и желатина метакрилоил (GelMA). Эти технологии позволяют создавать полнослойные, васкуляризированные структуры, обеспечивая высокую точность пространственного распределения клеток и поддержку микросреды, необходимой для регенерации тканей.

Современные исследования демонстрируют, что использование 3D-биопечати позволяет не только точно повторить анатомическую сложность кожи, но и ускорить процессы заживления ран за счет формирования функциональной сосудистой сети и активизации клеточных сигналов. Цель данного обзора — проанализировать современные методы оптимизации 3D-биопечати кожных эквивалентов для регенеративной медицины, обсудить их технологические и биологические аспекты, а также изучить экспериментальные и клинические данные, подтверждающие их эффективность.

В ходе подготовки данного обзора был проведен анализ публикаций, представленных в базах данных Scopus, PubMed и RSCI, охватывающих области биопечати, тканевой инженерии и регенеративной медицины. В качестве исходного материала использовались опубликованные данные, посвященные разработке биоматериалов,

протоколам 3D-биопечати, характеристикам биопечатных кожных конструкций и результатам как доклинических, так и клинических исследований, актуальные по состоянию на сентябрь 2025 года.

### **Биология кожи, общие механизмы регенерации и история создания кожных эквивалентов**

Кожа — это самый большой орган человеческого тела, обладающий сложной структурой, состоящей из эпидермиса, дермы и гиподермы. Эпидермис, состоящий преимущественно из кератиноцитов, обеспечивает барьерную функцию, тогда как дерма, сформированная из фибробластов, содержит коллагеновые волокна, эластин и другие компоненты внеклеточного матрикса, обеспечивающие механическую прочность и эластичность ткани. Фибробласты играют ключевую роль в регенерации кожи, синтезируя коллаген и широкий спектр факторов роста, которые активизируют процессы заживления ран и реваскуляризации поврежденных тканей.

Основные механизмы регенерации кожи включают активацию клеточных сигналов, обеспечивающих пролиферацию и миграцию кератиноцитов и фибробластов; формирование и ремоделирование внеклеточного матрикса; васкуляризацию, способствующую снабжению ткани кислородом и питательными веществами; межклеточное взаимодействие и регуляцию через цитокины и факторы роста.

При нормальном взаимодействии указанных механизмов и незначительной степени повреждения регенераторные процессы обеспечивают самостоятельное восстановление кожных покровов. Однако при обширных повреждениях кожи, характерных для глубоких ран и ожогов, собственного регенераторного потенциала кожи часто бывает недостаточно. В таких случаях наиболее эффективным способом лечения и восстановления кожных дефектов является применение кожных трансплантатов. Однако использование аутологичных кожных трансплантатов (дерматопластика), полученных из интактных участков тела пациента, сопряжено с рядом трудностей и ограничено доступной площадью в соответствии с объемом повреждения. Подходы к биоинженерии заменителей кожи основаны на комбинированном использовании биоматериалов, факторов роста и клеток [5, 6]. В последние годы все большее развитие получают технологии создания

кожных трансплантатов на основе биоматериалов в сочетании с аутологичными клетками пациента, применение которых способствует безрубцовому заживлению ран и реконструкции всей толщи кожи [7, 8].

Следует отметить, что разработка методов замещения кожи была давней целью современной медицины, начиная с новаторской работы Жака-Луи Ревердена, проведенной в 1870 году с использованием аллотрансплантатов «свежей кожи», и заканчивая биологическими материалами, которые в настоящее время используются в операционных. С момента своего появления в 1874 году аутологичные кожные трансплан-

таты различной толщины не обеспечивают полного восстановления структурных и функциональных свойств кожи. Кроме того, использование трансплантатов сопряжено с формированием болезненных донорских участков, что послужило стимулом для разработки и внедрения биологических заменителей кожи, получивших широкое применение в современной хирургической практике [9]. На начальных этапах разрабатывались и активно внедрялись биокомпозитные повязки, которые существенно улучшают заживление ран, успешное применение которых сделало их одним из наиболее часто используемых средств для лечения больших поверхностных ожогов [10] (табл. 1).

**Таблица 1.** Этапы создания тканеинженерных конструкций и типы применяемых клеток [11]

**Table 1.** Stages of creation of tissue-engineered constructs and types of cells used

Этапы	Вид клеток	Особенности	Недостатки
1950-е годы Billingham R. и Reynolds J. [12]	Аутологичные клетки эпидермиса	Способствует появлению островков эпителизации в ране, которые затем сливались между собой	Слабое прикрепление трансплантата к ложу, отсутствие предотвращения фиброзной контракции, происходящей в подлежащей строме
1971 г. Karasek M. [13]	Аутологичные кератиноциты на раны кроликов	Подложки из биологических тканей (в частности, из кожи свиньи)	Низкий выход клеток при каждом пассаже [14]
1975 г. Phillips и Green H. [15, 16]	Кератиноциты человека	Технология серийного культивирования	Длительность культивирования (3–4 нед.). Дороговизна биологических стимуляторов роста эпидермальных клеток. Ограниченность сроков хранения [17]
1983 г. Bell E. и соавт., 2015 г. Steffens D. и соавт. [18, 19]	Фибробласты и кератиноциты	«Живой эквивалент дермы» – коллагеновый гель, заселенный фибробластами, а на поверхности геля кератиноциты	Трудоемкость, специальное оснащение лаборатории, разработка технологии забора и культивирования клеток, создание банка культур клеток, внедрения системы контроля качества. Кератиноциты, обработанные кондиционированной средой, показали наименьший пролиферативный потенциал, но больший, чем без обработки
1990-е годы Саркисов Д.С. и соавт. [20]	Фибробласты, аллофибробласты	Оптимальные условия для функционирования и пролиферации других типов клеток, способность образовывать межклеточный матрикс, синтезировать цитокины [21]	Риск сенсибилизации организма чужеродными антигенами; вероятность инфекционных заболеваний у донора
1993 г. Wood F. [22]	Аутокератиноциты	Разработали <i>spray on skin</i> . Одноэтапное лечение	Не выявлено
2011 г. Винник Ю.С. и соавт. [23]	Аутофибробласты	Низкий риск отторжения и развития аллергических реакций, исключен риск заражения инфекционными агентами, не возникает трудностей с поиском подходящих доноров, биопсию кожи для получения аутогенных клеток можно проводить неоднократно	Сроки культивации максимально малого количества донорского материала составляют в среднем 3 недели

Современные биологические заменители кожи, как правило, основаны на коллагеновых каркасах, которые обеспечивают инфильтрацию аутологических клеток и стимуляцию дальнейшей регенерации тканей [24]. Также используются инертные бесклеточные матрицы, такие как Al-loderm [25], а также клеточные матрицы с интегрированными компонентами из фибробластов и кератиноцитов, такие как Apligraf [26]. Наиболее приближенный по строению к коже эквивалент Stratograft одобрен FDA (США) в 2022 году и является на данный момент первым зарегистрированным продуктом на основе клеточных технологий для применения при кожных повреждениях [27].

Тканевая инженерия кожи предполагает использование кератиноцитов, выделенных из частичной или полной толщины кожи путем ферментативного расщепления и последующим культивированием на биоактивных каркасах [28, 29]. Такие пористые синтетические или биологические каркасы обеспечивают достаточное питание за счет перфузии и создают условия, благоприятные для пролиферации и дифференцировки клеток, что позволяет формировать ткань, воспроизводящую структурные и биологические характеристики кожи. Интеграция дермального слоя или биомиметического каркаса улучшает эластичность и структурную поддержку лимфатических, сосудистых и других структур, нервных окончаний и, следовательно, функциональность кожи [30]. Выживаемость эпидермального компонента остается одним из основных ограничивающих факторов при биологической замене кожи [31], что связано с относительно большим расстоянием между раневым ложем и аутотрансплантатом. В качестве одного из подходов к преодолению данного ограничения рассматривается заполнение дермальных каркасов мезенхимальными стволовыми клетками и факторами роста для улучшения кровоснабжения сосудов посредством стимуляции ангиогенеза.

Несмотря на большое количество научных исследований по регенерации кожи, в настоящее время создание композитных трансплантатов, состоящих из дермы и эпидермиса на одном этапе трансплантации, остается нерешенной задачей [32]. Это, вероятно, объясняется тем фактом, что многослойную анизотропную структуру эпидермиса [33], содержащую кератиноциты (на разных стадиях дифференцировки), меланоци-

ты и клетки Меркеля, поверхность толстой, но эластичной сосудистой структуры дермы, содержащей нервные окончания, сальные железы и волосяные фолликулы, трудно воспроизвести *in vitro* с помощью традиционных методов тканевой инженерии кожи.

В связи с этим дальнейший прогресс в данной области напрямую зависит от раскрытия молекулярных и клеточных механизмов регенерации кожи, а также от развития технологий культивирования клеток и методов биопечати, которые рассматриваются как ключевые инструменты для успешной разработки функционально полноценных кожных эквивалентов.

### Технологии биопечати и место 3D-биопринтинга для создания кожных эквивалентов

При изготовлении кожных эквивалентов, используемых для заживления ран, применяются *ex vivo* и *in situ* стратегии биопечати. В рамках подхода *ex vivo* формируется кожный конструкт, культивируемый *in vitro*, содержащий дерму и эпидермис, который после достижения необходимой степени зрелости извлекается из системы культивирования и имплантируется в зону повреждения кожи пациента. Используется несколько подходов к биопечати в зависимости от задач и сложности создаваемой структуры (табл. 2).

Одной из наиболее перспективных и быстро развивающихся технологий является трехмерная печать, направленная на воссоздание внеклеточного матрикса тканей и органов человека в комплексе с живыми клетками и факторами роста, на основе биосовместимых материалов [38]. Метод 3D-печати позволяет создавать конструкции, имитирующие архитектуру пространственной геометрии, специфичной для пациента, с управляемым положением клеток, аналогичным структуре нативной ткани [39].

Для биопринтинга используют 3D-принтер с точным послойным нанесением биочернил: смеси живых клеток, питательных веществ и гелевых материалов, имитирующих внеклеточный матрикс [40]. Такая конструкция создает условия для формирования новой ткани, обеспечивает благоприятную среду для миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Существует три основных метода 3D-биопечати (табл. 3).

Таблица 2. Сравнительная характеристика различных типов биопечати [34–37]

Table 2. Comparative characteristics of different types of bioprinting [34–37]

Тип	Основа и компоненты	Определение ключевые функции	Преимущества	Недостатки
2D	Клетки могут расти и расширяться в двух измерениях в виде монослоя на пластине	Для исследования клеточных взаимодействий одного типа клеток с другим	Клетки культуры одинаково получают питательные вещества и факторы роста, находятся в одной стадии клеточного цикла	Слабая дифференцировка клеток. Неустойчивость к препаратам. Быстрая пролиферация. Неточное представление о реакции клеток на механические стимулы
3D	Гидрогели: натуральные (альгинат, желатин), коллаген, синтетические (полиэтиленгликоль), бесклеточные биопленки	Фиксированная структура. Совместимость с различными биокомпонентами. Послойное нанесение клеток	Простая и продуманная технология. Точный контроль формы. Экономичность и масштабируемость	Отсутствие адаптивности. Ограниченная способность имитировать динамические биологические функции
4D	Умные биополимеры (хитозан, полинизопротилакриламид), гидрогели со встроенными наночастицами	Реагирует на раздражители (например, pH, температуру). Динамическая трансформация	Изменение формы в ответ на раздражители. Улучшенная биофункциональность	Сложные требования к материалам. Трудно контролируемые преобразования
5D	Наноцеллюлоза, наноглин, оксид графена. Гибридные гидрогели: GelMA (желатина метакрилоил) с наполнителями и наночастицами для дистанционного управления	Тканеспецифичный матричный каркас. Высокая механическая точность. Дополнительные оси вращения для более сложной печати	Возможность создавать вогнутые или изогнутые формы для лучшего сохранения механических свойств. Возможность машинного обучения	Механически сложный материал. Высокая стоимость. Проблемы с движением
6D	Гидрогели, интегрированные с мягкой электроникой (гибкие токопроводящие чернила)	Умные материалы. Динамическое и анатомическое соответствие. Сочетание пространственной гибкости 5D и динамической отзывчивости 4D	Точность и адаптивность. Имитирует архитектуру <i>in vivo</i> . Возможность печати на теле. Способность изменять форму, интеллектуальное поведение ткани	Сложность. Предназначен для научных исследований. Высокая стоимость и ограниченная доступность

Таблица 3. Сравнение методов, применяемых в биопечати кожи [41–45]

Table 3. Comparison of methods used in skin bioprinting [41–45]

Характеристики	Экструзионная	Струйная	Лазерная
Тип печати	Построчная	По каплям (микрокапельная)	По каплям
Точность	Средняя и низкая	Средняя	Высокая
Плюсы	Низкая стоимость, простота выполнения, возможность печати с высокой плотностью и вязкостью клеток	Низкая стоимость, высокая жизнеспособность клеток, высокое разрешение и производительность, бесконтактная печать	Высокая жизнеспособность клеток, бесконтактная печать, без сопла
Минусы	Засоряющиеся сопла, механическое напряжение, возникающее при нанесении биочернил. Снижение жизнеспособности клеток при увеличении скорости печати	Ограниченное использование биочернил, низкая прочность, засорение сопел, риск механического и термического повреждения клеток, возможность агрегации и седиментации клеток	Низкая масштабируемость, медленная скорость потока из-за быстрого гелеобразования, длительность производства

Каждая из этих технологий имеет свои преимущества и ограничения, связанные с вязкостью биочернил, параметрами печати, сохранением жизнеспособности клеток и возможностями масштабирования. При выборе оптимальной технологии учитываются особенности конструкции кожного эквивалента, требования к биоматериалам и клинической применимости.

Наиболее популярным и распространенным является экструзионный метод, при котором биочернила непрерывно наносятся под пневматическим давлением или с использованием механических поршневых систем [46]. Данный метод позволяет осуществлять печать вязких биочернил с высокой плотностью клеток. Струйная биопечать [47] использует режим печати «капля по требованию», обычно с применением термического или пьезоэлектрического эффектов. При термической биопечати небольшой нагреватель в печатающей головке использует высокие температуры для создания пузырьков пара в биочернилах. Образующиеся паровые пузырьки создают импульс давления, обеспечивающий выброс биочернил. Данный метод отличается высокой скоростью печати и относительной экономической доступностью. Лазерная биопечать применяется для создания аналогов кожи с использованием биочернил с высокой плотностью клеток и разрешением, близким к уровню отдельных клеток.

Биопечатные конструкции могут выполняться в трех различных форматах: в виде клеточных суспензий, инкапсулированных клеток в гидрогеле или бесклеточных моделей. Следует отметить, что при использовании дермоэпидермальных заменителей кожи кератиноциты демонстрируют ограниченную адгезию и пролиферацию на поверхности бесклеточных гидрогелей коллагена. В любом случае функциональные и структурные характеристики конечного продукта определяются свойствами биочернил, которые должны отвечать высоким требованиям биосовместимости, быть механически стабильными и поддерживать сохранение формы напечатанной конструкции [48].

#### Подбор и оптимизация биочернил и биоматериалов для биопринтинга

Одним из ключевых аспектов оптимизации процессов биопечати является выбор подходящих биочернил, способных обеспечить формирование функционально полноценных кожных эк-

вивалентов. На сегодняшний день большое внимание уделяется гидрогелям на основе GelMA, коллагена, альгината натрия и других компонентов, которые обеспечивают биосовместимую среду, поддерживающую клеточную жизнеспособность, предоставляют возможность регулировать механические свойства, вязкость и скорость кросс-сшивания белковых цепей.

Оптимальные биочернила должны соответствовать ряду ключевых требований: обладать высокой биосовместимостью и способностью к поддержанию жизнеспособности клеток; характеризоваться адекватной печатной адаптивностью и возможностью создания стабильных структур; демонстрировать контролируемую биодеградацию, согласованную с регенеративным процессом, а также воспроизводить среду, близкую к естественной для клеток кожи.

В таблице 4 приведены основные биоматериалы, используемые для включения в состав биочернил, и условия их применения в экспериментальных исследованиях.

Краткий обзор проведенных исследований показывает, что Albanna и соавт. [88], Liu и соавт. [52] и Jorgensen и соавт. [58] применяли комбинации, включающие коллаген типа I, желатин, фибриноген или гиалуроновую кислоту, что позволило достичь эффективного дермально-эпидермального взаимодействия, усиленной депозиции коллагена и снижения выраженности контрактуры раны. Cavallo и соавт. [50], Huyan и соавт. [61], Jiao и соавт. [51] и Liu и соавт. [52] использовали формулы желатин-альгинат или коллаген-альгинат для моделирования кожи и поддержки жизнеспособности клеток, улучшая заживление ран, особенно при включении нескольких типов клеток. Somasekharan и соавт. [53] далее подтвердили эти выводы, демонстрируя потенциал биочернил на основе альгината-желатина-диэтиламинэтилацетилцеллюлозы для поддержания жизнеспособности клеток и сохранения фенотипов и функциональности клеток, при этом обеспечивая высокую точность воспроизведения формы.

Zhang и соавт. [60] использовали GelMA и биочернила на основе метакриловых производных гиалуроновой кислоты, подчеркивая важность обработки ВКМ жировой ткани для биосовместимых и печатаемых материалов.

Таблица 4. Свойства и применение биоматериалов

Table 4. Properties and applications of biomaterials

Биоматериалы	Свойства	Применение	Ссылки
Сыворотка Ab	Созревание конструктора, выживаемость клеток при нанесении на поверхность кожи, механическая стабильность	Васкуляризированный конструктор кожи	[49]
Альгинат	Пригодность для печати, биосовместимость, способность к биологическому разложению, достаточная вязкость и упругость, быстрое сшивание в присутствии ионов кальция в гидрогеле, низкая стоимость, отсутствие биологической активности	Эквивалент кожи, заживление ран, ожоги второй степени тяжести	[50–53]
Бактериальная nanoцеллюлоза (BNC)	Высокая влагоудерживающая способность, благоприятные реологические свойства, пригодность для печати, прочность и эластичность, структурная стабильность, морфологическое сходство с коллагеном	Полнослойная гетерогенная ткань искусственная кожа, заживление ран. Может использоваться в качестве механического усилителя для улучшения механической прочности биочернил	[54]
Биоразлагаемый полиуретан (PU)	Пригодность для печати, высокая разрешающая способность, биосовместимость, возможность повлиять на скорость биоразложения, эластичность, умеренная контракция ткани, свойства к истончению, миграция тканей	Обширные раны во всю толщину	[55]
CaCl <sub>2</sub>	Химическая сшивка геля после печати тканевой структуры	Используется с альгинатными биочернилами и биочернилами на основе желатина	[50, 52, 53, 55]
Хитозан	Биосовместимость с тканями, биоразлагаемость, биоактивность, механическая прочность, пригодность для печати, показано фармакологическое действие на разных стадиях заживления ран, включая гемостатическую и антибактериальную активность	Регенерация кожи <i>in vitro</i> и заживление ран	[56]
Коллаген I типа	Созревание конструкции, стабильное приживление тканеинженерного конструктора в ране, механическая стабильность, имеются лиганды для прикрепления клеток	Полнослойные раны, ожоги, язвы	[49, 51]
Диэтиламиноэтил-целлюлоза (DCEL)	Отсутствие цитотоксичности, стабильность, эластичность и пористость; обладает адгезивной способностью, стабильностью; в DCEL клетки однородно распределяются по всей печатной конструкции	Васкуляризованная кожная конструкция, эквиваленты кожных тканей	[53]
Фибриноген	Биосовместимость, способность к биодеградации, клеточная адгезия, быстрое гелеобразование с сохранением трехмерной формы	Раны на всю толщину, ожоги второй степени тяжести, язвы, заживление ран,	[50, 57, 58]
Фибронектин	Стабильное приживление, механическая стабильность, обладает биологической активностью, биодеградация	Васкуляризированный конструктор кожи	[50, 52, 57]
Желатин	Биосовместимость, чувствительность к температуре, небольшое количество лигандов для клеточной адгезии и более низкая биологическая активность, хорошая клеточная жизнеспособность, низкая стоимость; благодаря адгезии клеток подходят для роста, пролиферации фибробластов и ремоделирования внеклеточного матрикса	Ткани <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> ; искусственный кожный трансплантат с эндотелиальными клетками сосудов, моделирование свежей раны	[58, 61]

Биоматериалы	Свойства	Применение	Ссылки
Композиты GelMA	Биосовместимость, ферментативное расщепление, клеточная адгезия и остаточные механические свойства	Модификация желатиновых гидрогелей для улучшения возможности печати, воспроизводимости и тканеинженерных конструкций, системы доставки лекарств и 3D-печать	[59, 60]
Генипин	Биоактивность, механическая прочность, пригодность для печати, противовоспалительные свойства	Регенерация кожи <i>in vitro</i> и заживление ран	[58]
Глицерин	Антибактериальные свойства, биосовместимость повышают стойкость гелей и предотвращают засорение сопел биопринтера	Многочеточная биопечать; заживление ран	[58]
Гиалуроновая кислота	Повышает равномерность распределения клеток в тканеинженерном конструкте	Раны на коже во всю толщу	[58, 60]
Литий фенил-2,4,6-фосфонат триметилбензоила (LAP)	Фотоинициаторная сшивка для индукции цепной полимеризации при воздействии света	Используется с биочернилами желатина метакрилата	[54, 59]
Биоразлагаемая полигликолевая кислота (PGA)	Созревание конструкции, стабильное приживание, механическая стабильность	Васкуляризированный конструкт кожи	[49]
Фиброин шелка	Биосовместимость (высокая пролиферация и адгезия клеток, низкий воспалительный ответ), способность к биодеградации, отсутствие цитотоксичности, высокая прочность на растяжение; образует стабильные пористые 3D-структуры	Полнослойная модель искусственной кожи <i>in vitro</i>	[59]
Термопластичный полиуретан (PU)	Создает эффект перевязки ран при регенерации кожи; поддерживающий раневой перевязочный материал; обладает высокой эластичностью по сравнению с другими биосовместимыми термопластичными полимерами	Индивидуальная печать биомаска для ухода регенерации кожи лица пациента	[55]
Тромбин	Осаждение тромбина на фибриногеновую матрицу приводит к образованию фибрина	Раны по всей толщине, ожоги, язвы	[58, 88]

Включение таких материалов ускоряет заживление ран за счет усиленного сокращения ткани, секреции коллагена, ремоделирования и неоангиогенеза. Choi и соавт. [59], Li и соавт. [54] и Jin и соавт. [62] представили биопечатные конструкции с использованием GelMA, бактериальной целлюлозы или матриц кожи свиньи, применение которых приводило к улучшению васкуляризации, секреции компонентов ВКМ и даже способствовало формированию структур, напоминающих волосяные фолликулы. Совокупность представленных данных указывает на значимость создания пространственно организованных и многослойных конструкций для достижения более

полной регенерации. Hafezi и соавт. [56] использовали хитозан с генипином для повышения сохранности структуры и жизнеспособности клеток при низком давлении печати, в то время как Lee и соавт. [63] реализовали гибридный метод с использованием микропринтера для лучшего контроля осаждения эпидермального слоя. Использование полимеров на основе полиуретана также свидетельствует о попытках обеспечить функциональные механические свойства *in vivo*, что приводит к значительной вторичной эпителизации и стимуляции ангиогенеза. Наконец, Desanlis и соавт. [57] и Baltazar и соавт. [49] продемонстрировали возможность использования только что изолированных

аутологичных кожных клеток или материалов без компонентов животного происхождения, что способствовало формированию стратифицированных эпидермальных слоев и индукции неоангиогенеза *in vivo*. Данные модели представляют высокую научную и прикладную значимость, поскольку поддерживают концепцию использования аутологичных или полностью гуманизированных систем в будущих терапевтических применениях.

#### **Фибробласты как ключевой клеточный компонент кожных эквивалентов**

Фибробласты играют критически важную роль при формировании дермальных слоев кожных эквивалентов. Они синтезируют коллаген и другие матричные белки, создавая каркас, который не только поддерживает механическую целостность ткани, но и способствует ускоренной регенерации ран.

В организме фибробласты представлены несколькими видами клеток, расположенными в разных тканях с характерной специфичностью (перидиты, фибробласты сердца, мышечные фибробласты, дермальные фибробласты). Существуют и другие типы фибробластов, связанные со структурой и функцией толстой кишки, мочевого пузыря, легких и органов пищеварения [64].

По происхождению можно выделить первичные фибробласты, которые происходят из мезенхимы после эпителиально-мезенхимального перехода эпителиальных клеток, давая начало резидентным фибробластам и резидентным «покоящимся» фибробластам. Последние являются основным фактором гомеостаза внеклеточного матрикса. Взаимодействуя с окружающей их средой, фибробласты могут модифицировать свойства клеток и продуктов их секреции, регулируя тем самым процессы развития тканей и способствуя купированию патологических состояний [65].

К основным функциям фибробластов относятся: синтез и поддержание ВКМ, обеспечивающие структурную организацию мягких соединительных тканей; секреция цитокинов и факторов роста; межклеточные взаимодействия как между фибробластами, так и с другими типами клеток, посредством которых они формируют сигнальную среду ниш стволовых клеток; участие в процессах ремоделирования тканей, фиброгенеза и заживления ран.

Фибробласты классифицируют по функциональной активности: фиброз-ассоциированные фибробласты; фибробласты, ассоциированные с заживлением ран; фибробласты, ассоциированные с раком, и фибробласты, ассоциированные со старением.

Наиболее перспективным является изучение физиологии дермальных фибробластов. Популяция клеток представлена несколькими подтипами: папиллярные (поддерживающие эпидермис), ретикулярные (расположенные в более глубоком слое).

При заживлении ран или в ходе воспалительной реакции дермальные фибробласты дифференцируются в миофибробласты, характеризующиеся сократительной активностью и организацией в волокнистые структуры. В результате клетки формируют структурный каркас заживающей раны, способствуя ее закрытию, однако их персистирующая активация может приводить к развитию фиброза, при котором ткани становятся жесткими или рубцуются. Независимо от органа регенерация обычно включает три перекрывающиеся фазы. Сразу после травмы первыми клетками реагирования являются макрофаги и нейтрофилы (стадия воспаления). Через 2–10 дней наступает пролиферативная стадия, которая включает ангиогенез, отложение ВКМ и пролиферацию клеток. В результате образуется новая ткань и уменьшается поврежденная область [66]. Третья стадия — ремоделирование, когда ткань восстанавливает предыдущую гистеоархитектонику, а лежащий в ее основе ВКМ подвергается реорганизации.

Современная концепция заживления тканей после глубоких ран кожи с формированием лоскутов заключается в том, что фасциальные фибробласты способствуют поступлению композитных материалов в рану, при этом коллективная миграция меченых фибробластов лежит в основе этого конвейерного управления. В процессе мобилизации фасции межклеточная адгезия и взаимодействие через N-кадгерин и коннексин 43 играют ключевую роль, способствуя агрегации и закрытию ран плотными пробками из предварительно сформированного фасциального матрикса. Со временем этот временный кожный барьер, сформированный фасцией, ремоделируется в зрелый гипертрофический рубец [67].

Широкое использование фибробластов обусловлено их относительной доступностью, которая достигается за счет возможности легко изолировать клетки из тканей, выращивать в культуре на искусственных поверхностях (стекло и пластик), на природных и/или биоинженерных материалах [68]. Под воздействием определенных стимулов, таких как трансформирующий фактор роста бета  $\beta$ -1, тромбоцитарный фактор роста и инсулиноподобный фактор роста-1, фибробласты способны синтезировать ВКМ, секретировать цитокины, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток при повреждениях кожи.

Определение оптимальных параметров культивирования фибробластов, направленных на увеличение их выживаемости и сохранение пролиферативного потенциала *in vitro*, остается

в числе актуальных задач регенеративной медицины. В таблице 5 приведены основные подходы к созданию оптимальных условий культивирования фибробластов.

Недостатком во многих протоколах получения аутологичных дермоэпидермальных заменителей кожи является длительный период культивирования — от начала выращивания до трансплантации кожного лоскута, который варьирует от пяти [74] до девяти недель [75], а в некоторых моделях может достигать 5 месяцев (табл. 5). Для пациентов с большими ожоговыми ранами это удлиняет время ожидания трансплантации, а сокращение периода культивирования *in vitro* без ухудшения качества кожного трансплантата представляет собой важную задачу, решение которой приведет к улучшению результатов их применения.

**Таблица 5.** Схемы культивирования с применением фибробластов и их особенности

**Table 5.** Fibroblast culture schemes and their features

Основные характеристики исследования	Культивируемые клетки / печатаемые компоненты кожи	Биополимер	Недостатки способа
3 этапа: выделение клеток из биоптата кожи, культивирование; поэтапная подсадка и культивирование клеток для формирования молодого эпидермиса [69]	Фибробласты и кератиноциты	Коллагеновый гидрогель	Длительность до 5 недель
3D-модель кожи для пересадки мышам породы NOD/SCID [70]	Кератиноциты и фибробласты, дифференцированные из ЧИПСК	Планшет Transwell	Длительное культивирование клеток (до 30 дней)
Создание сплошных стратифицированных слоев культивируемых кератиноцитов человека на поверхности модифицированного коллагено-хитозанового каркаса, содержащего фибробласты [71]	Кератиноциты и фибробласты крайней плоти новорожденного	Коллаген-хитозановый каркас	Необходимость исследования отдаленных последствий безопасности и приживаемости
Система культивирования органоидов — модулировали сигнальные пути ФНО- $\beta$ и фактора роста и клеток. Сформированный органоид кожи повторяет схему рецепторов осязания человека [72]	Фибробласты, стволовые клетки эмбриона	96-луночные планшеты, содержащие среду для дифференцировки: матригель, BMP и ФНО- $\beta$	Длительность 4–5 месяцев
Биопленка на основе фибрина (жизнеспособность и пролиферация клеток), сшитые раствором тромбина [73]	МСК из ткани пуповины (жизнеспособность — более 94% в течение 7 дней культивирования)	Трехмерная матрица, среда Eagle (1% раствор антибиотика-антимикотика, 1% L-глутамин, 10% фетальная бычья сыворотка)	Стоимость. Необходимость постоянного добавления клеток в среду

*Примечание:* GelMA — желатина метакрилоил; NOD — мышьяная модель диабета без ожирения [non-obese diabetic]; SCID — мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficiency); ЧИПСК — человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ФНО- $\beta$  — фактор некроза опухоли-бета; МСК — мезенхимальные стромальные клетки; HUVEC — эндотелиальные клетки пупочной вены человека

### Технологические и биологические аспекты создания кожных эквивалентов

Ключевыми параметрами, влияющими на качество биопечати клеточных конструкций, являются вязкость биочернил, температура печати, скорость экструзии и время кросс-сшивания. Исследования показывают, что оптимизация этих параметров позволяет добиться высокоточных 3D-конструкций с минимальными механическими повреждениями клеток. Дополнительные исследования в области реологии биочернил помогают корректировать фазовые переходы материалов и повышать стабильность итоговых структур.

Для успешного формирования функциональных кожных эквивалентов важно воспроизвести микросреду, максимально приближенную к естественной. Это достигается за счет интеграции клеточных факторов, стимуляторов васкуляризации (например, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста кератиноцитов (KGF), эпидермальный фактор роста (EGF)) и применения динамических систем культуры с перфузией. Оптимальный подбор факторов, увеличивающих скорость роста культуры клеток и повышающих устойчивость и жизнеспособность клеток в составе искусственного матрикса, улучшает процесс приживляемости конструкции и обеспечивает более эффективное самовосстановление тканей.

Многообещающим подходом для ускорения роста и начала функционирования тканеинженерных трансплантатов являются динамические биореакторные системы [76].

В биореакторе напечатанный биологический объект проходит стадию «дозревания» и стабилизации своей структуры [77]. Для контроля за этим критически важным процессом, в ходе которого формируются механическая прочность, структурная целостность и биологическая функциональность конструкта, применяются неинвазивные и неструктурные методы мониторинга [78].

Для создания модели кожи разработана динамическая биореакторная система, которая позволяет подвергать большие (диаметром 30 мм) гидрогели коллагена, содержащие фибробласты, циклической деформации за счет контролируемого надувания мембраны под давлением. После трех дней циклической нагрузки обрабо-

танные биореактором дермальные заменители продемонстрировали трехкратное увеличение жесткости материала, обусловленное уплотнением и истончением гидрогелевой матрицы. В отличие от статического культивирования, при котором фибробласты оставались в состоянии покоя, динамические условия стимулировали их вход в клеточный цикл и интенсивную пролиферацию, что приводило к 75%-му увеличению числа клеток независимо от состояния деформации. Было показано, что динамически культивируемые дермальные заменители поддерживают более быструю пролиферацию кератиноцитов и ускоренное образование эпидермиса по сравнению со статически культивируемыми дермальными матрицами. Обсуждается влияние жесткости матрицы, потока интерстициальной жидкости и направленности деформации на пролиферацию фибробластов, что обеспечивает механо-биологическое понимание ускоренного созревания тканей.

Одним из основных факторов, ограничивающих возможности биопечати кожи, как и большинства других тканеинженерных конструкций, является обеспечение адекватной васкуляризации. Реновация кожных эквивалентов становится значительно эффективнее при наличии интегрированной сосудистой сети, что обеспечивает доставку кислорода и питательных веществ к клеткам. Новейшие подходы включают создание предформированных сосудистых каналов, в результате чего достигается генерация капиллярных сетей внутри 3D-структур [79]. Эта технология позволяет не только ускорить процесс заживления ран, но и повысить устойчивость конструкций в условиях динамического культивирования.

Ранние попытки использовать факторы роста, такие как VEGF, с кератиноцитами или каркасами, такими как композит из желатинсульфированного шелка, для стимулирования неоваскуляризации увенчались некоторым успехом, но очевидно, что необходимы дальнейшие исследования в этой области. Потенциальное преимущество 3D-биопечати в организации микро- и макроархитектуры тканей заключается в том, что по мере улучшения разрешения принтера в будущем сосудистая сеть сможет быть напечатана на биопринтере вместе с самой тканью, что позволит создать микрососудистый анастомоз с сосудами реципиента. Некоторые исследователи работали над созданием

многомасштабных сосудистых сетей, включающих дендритные каналы и прямые каналы; однако они все еще были далеки от кровеносных сосудов нативной кожи [79]. Альтернативный подход включает использование микрофлюидных систем, способствующих васкуляризации. В частности, такой подход применен для биопечати с использованием иммуномодулирующих биоматериалов, что может улучшить интеграцию трансплантата и снизить риск отторжения, а также расширить клиническое применение биопечатной кожи [80]. В целом в настоящее время ведется интенсивный поиск различных подходов к совершенствованию васкуляризации тканей, созданных путем биопринтинга [81], но на данный момент требуется еще много исследований в этом направлении.

Алгоритм разработки кожного эквивалента с использованием 3D-биопечати и культуры фибробластов можно представить в виде схемы, показанной на рисунке.

Следует отметить, что для создания полноценных кожных эквивалентов необходимо использовать многоуровневую стратегию печати, при которой отдельные слои моделируются с учетом специфики клеточного состава. Обычно такие конструкции включают базальный слой, где доминируют плотные сети фибробластов, отвечающие за синтез внеклеточного матрикса; эпидермальный слой, состоящий из кератиноцитов, располагающихся в виде моно- или многослойной структуры с характеристиками нормального кожного покрова.

Важно отметить, что выбор биочернил занимает приоритетное место при моделировании дермальных конструкций, поскольку именно их свойства определяют эффективность клеточной адгезии, сохранение функциональной активности клеток в процессе печати и последующей приживляемости конструкции.

#### Доклинические и клинические исследования эффективности приживляемости кожных эквивалентов

Большинство исследований с использованием модельных экспериментов на животных показали обнадеживающие результаты при применении дермальных и кожных эквивалентов, однако в значительной части случаев такие конструкции обладают существенными ограничениями для клинической трансляции.

Модели на мышах и крысах широко применяются на ранних этапах исследований благодаря их доступности и воспроизводимости. Однако кожа мелких экспериментальных животных существенно отличается от кожи человека: она заметно тоньше, имеет более высокую плотность волосяных фолликулов, и заживление происходит преимущественно за счет контрактуры ран. Указанные анатомические и физиологические различия ограничивают возможность точного моделирования процессов заживления ран у человека. В этом контексте модели на свиньях, напротив, обладают некоторыми преимуществами для трансляционных исследований. Кожа свиньи по толщине эпидермиса и дермы, структуре коллагена, сосудистой сети, иммунному ответу и механизму заживления, основанному

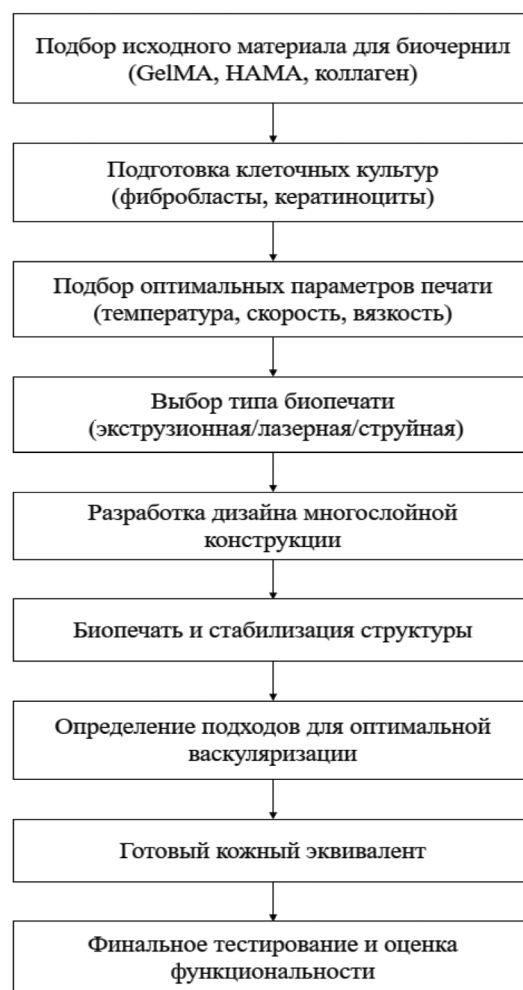


Рис. Блок-схема: процесс создания 3D-биопечатного кожного эквивалента

Fig. Flowchart: the process of creating a 3D bioprinted equivalent of each

преимущественно на реэпителизации, в значительной степени сопоставима с кожей человека [82, 83]. Однако использование свиной часто ограничено более высокими расходами, этическими соображениями и необходимостью специализированной инфраструктуры, что делает их менее доступными для рутинных экспериментов и клинической валидации.

Ключевая проблема в 3D-биопечати кожных заменителей — подбор идеальных биочернил, которые обеспечивают как отличную биосовместимость, так и контролируемые механические свойства [84]. Коллаген, хотя и напоминает естественный ВКМ, обладает недостаточной механической прочностью, что усложняет его использование в качестве самостоятельного печатного материала. Включение желатина, альгината и гиалуроновой кислоты улучшает вязкость биочернил и возможность воспроизводимой печати [85, 86]. Фибриноген способен к перекрестной полимеризации с тромбином для образования фибрина, который поддерживает клеточную адгезию и пролиферацию, обеспечивая быстрое гелеобразование для сохранения 3D-структуры биопечатных конструкций. Дополнительно включение компонентов, таких как глицерол, фотоинициаторы, хитозан и бактериальная nanoцеллюлоза, может улучшать механические свойства, клеточные взаимодействия и биодеградацию, адаптируя биочернила под конкретные задачи [87]. Предметом дискуссий остается введение переменных биоматериалов, что создает значительные проблемы не только для воспроизводимости, но и для дальнейших тестов и регуляторной валидации, необходимых для клинической трансляции.

В ряде доклинических исследований было продемонстрировано, что применение 3D-биопечатных кожных эквивалентов позволяет ускорить процессы заживления ран, улучшить качество регенерации тканей и снизить риск возникновения инфекционных осложнений. Показано, что при использовании коллагена в виде гидрогеля максимальная стабильность формы и оптимальная микро- и макропористая структура достигаются при 37 °С. Хотя авторы отмечают, что прямая 3D-биопечать коллагена ограничена его физическими свойствами, особенно при включении в печать клеток или тканевых сфероидов [88]. Для улучшения печатных свойств используют смешивание с другими материалами (фибриноген и тромбин, хитозан [89]); а также применение низ-

ких концентраций коллагена (2–4%). Оценка влияния различных концентраций коллагена на жизнеспособность клеток показала, что снижение концентрации от 4 до 2% приводит к увеличению жизнеспособности клеток с  $87,2 \pm 2,1$  до  $97,2 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,05$ ). Подобный эффект продемонстрирован при снижении концентрации экстракта коллагена (со 100 до 25%) возрастает жизнеспособность клеток с  $85,07 \pm 6,73$  до  $111,31 \pm 3,65\%$  ( $p < 0,05$ ) [88]. Таким образом, как для кератиноцитов, так и для фибробластов кожи их жизнеспособность изменяется пропорционально плотности клеточной суспензии и обратно пропорционально пространству между каплями.

Низкая плотность клеточной суспензии (0,5 млн клеток/мл) и большое расстояние между каплями (400 нм) приводят к умеренной жизнеспособности фибробластов (84%). В то время как наиболее высокие показатели жизнеспособности клеток (98–99%) наблюдались при плотности клеточной суспензии 1–2 млн клеток/мл и расстоянии между каплями 200 нм [90].

В качестве приоритетных параметров механических свойств материалов необходимо отметить высокий коэффициент набухания, возможность влаго- и воздухообмена в области раны. Средний модуль упругости человеческой кожи — от 100 до 1100 кПа (модуль Юнга) [91]. Степень набухания имеет обратную связь со значениями модуля Юнга.

Одним из ключевых параметров тканеинженерных конструкций является пористость, поскольку она оказывает влияние на образование и рост сосудистой сети. Пористость определяется как отношение суммарного объема полостей (пор) к общему объему тканеинженерной конструкции и находится в тесной взаимосвязи с ее физико-механическими характеристиками. Оптимальная пористость не нарушает процессы адгезии, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток; при этом поры должны быть открытыми и взаимосвязанными [92].

Учитывая определяющее значение васкуляризации для выживаемости и функциональной интеграции тканеинженерных кожных конструкций, особое внимание в доклинических и клинических исследованиях уделяют факторам, определяющим их приживляемость. При этом установлено, что долговременная жизнеспособность дермальных эквивалентов

напрямую зависит от степени сформированности сосудистой сети, обеспечивающей адекватное снабжение клеток кислородом и питательными веществами.

Например, экспериментальные модели с использованием экстрагированных фибробластов показали, что стабильная сетчатая структура гидрогеля способствует формированию обширных кровеносных сосудов в области раны. Применение дополнительных факторов роста (таких, как VEGF, KGF и EGF ангиопоэтин, трансформирующий фактор роста, тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и некоторые интерлейкины) в культурах способствовало росту клеток и более быстрой репопуляции области раны [93], формированию сосудистой сети *in vitro* за счет привлечения периваскулярных клеток [94]. При этом авторы отмечают необходимость соблюдения не только концентрации, но и режимов введения факторов ангиогенеза. Например, избыточные концентрация VEGF могут приводить к формированию сосудов с повышенной проницаемостью [95].

Преимуществом обладают системы, где факторы роста смешивают с гидрогелями или наносят на каркасные структуры перед трансплантацией [96]. В частности, использование композитного каркаса на основе фосфата кальция и полилактогликолевой кислоты с контролируемым одновременным высвобождением PDGF и VEGF, приводило к формированию стабильной и функционально состоятельной сосудистой сети [97]. Интересным подходом является биопечать сосудов с использованием биodeградируемых компонентов биочернил [98] с последующим заселением эндотелиальными клетками [99].

Клинические испытания кожных эквивалентов, полученных с применением 3D-биопечати, демонстрируют перспективы их трансляции в практику. Безусловно, что биопечатаемые конструкции позволяют преодолевать проблему отторжения органов при клиническом применении. Использование аутологичных клеток на этапе создания биочернил позволяет сохранять уникальный иммуногенетический профиль пациента, тем самым снижая риск иммунной несовместимости [100]. Такой персонализированный подход позволяет устранить необходимость в иммуносупрессивной терапии, а следовательно, снизить риски побочных эффектов и повышенной восприимчивости к инфекциям [101].

Использование биопечатных структур сопряжено с рядом этических и регуляторных вопросов, среди которых ключевыми являются принципы качества, клинической эффективности и биобезопасности. Принцип качества предполагает соответствие биопечатных тканей требованиям биосовместимости [102]; используемые биочернила должны быть нетоксичными, прочными, поддерживать васкуляризацию и обеспечивать последующую интеграцию конструкции в ткани организма. Принцип клинической эффективности и безопасности подразумевает обязательное проведение исследований на наличие вирусной, бактериальной, протозойной, грибковой и прионной инфекции при использовании донорских клеток и компонентов биочернил. Большое значение имеет соблюдение принципов безопасного хранения и транспортировки клеток. Принцип прозрачности и доступности доклинических и клинических испытаний предполагает обязательное опубликование результатов имплантации биопечатной ткани (органа) в рецензируемых медицинских научных журналах. Принцип контроля за разработкой цифровой модели пациента и конфиденциальности данных охватывает защиту персональных и биомедицинских данных. Ряд других регламентирующих принципов включает ограничение на изъятие биопечатных тканей у человека после имплантации и другие этические и правовые аспекты, направленные на обеспечение безопасности и прав пациентов [103].

#### **Ограничения и возможности совершенствования подходов к созданию конструкций на основе 3D-биопечати кожи**

Механическая прочность и интеграция компонентов искусственной кожи являются одной из важнейших задач для исследователей. Эта задача подразумевает поиск лучшего метода для достижения быстрого и стабильного гелеобразования без ущерба для жизнеспособности клеток. Например, введение диоксида кремния, наноцеллюлозы и нанокомпозитов на основе гидрогеля может улучшить механическую прочность и интеграцию компонентов в создаваемой ткани. Так, F. Hafezi et al. [56] разработали новые биочернила для экструзионной печати из сшитого хитозана (CH)-генипин, содержащие кератиноциты и дермальные фибробласты человека. Данная композиция биочернил оптимально подходила для клеточного материала, выживаемость которого при ее

использовании была выше 90% [104]. Биопечать материалов с использованием наночастиц, гидрогелей и нановолокон может использоваться в качестве перспективных инструментов для локальной и контролируемой доставки различных лекарственных веществ и регуляторных компонентов в тканевой инженерии [105].

Немаловажными и по-прежнему актуальными являются задачи точной регулировки параметров печати (температура, скорость, давление) для сохранения жизнеспособности клеток и устойчивости конструкций. Остаются вопросы уменьшения ограничений по разрешению и стабильности 3D-печатных структур, особенно при использовании различных типов биоматериалов. Указанные вопросы сочетаются с необходимостью более точной имитации сложной микроструктуры кожи, включая реконструкцию васкуляризованных систем и специфических клеточных ниш. Это является критически важным условием для большей устойчивости биопечатных конструкций и улучшения их интеграции с окружающими тканями реципиента в условиях *in vivo* [106].

Дополнительные исследования по разработке 3D-печатных каркасов, способных высвободить факторы роста в ответ на определенные механические стимулы (сжатие или растяжение) для точного контроля за кинетикой высвобождения факторов роста, могут помочь в функциональном созревании тканей [107]. Ведется поиск биочернил, способных реагировать на окружающую среду, например самовосстанавливаться или разрушаться контролируемым образом [108].

Одна из областей, которая привлекает все большее внимание, — использование генетических технологий. В частности, указывается на возможность модификации экспрессии генов в клеточных линиях, что позволит усовершенствовать стратегии персонализированного улучшения или модификации клеточных культур [109]. Перспективным является направление по использованию антисмысловых олигонуклеотидов для модификации ответа генов, участвующих в регуляции ключевых эффектов клеточных линий [110]. Показана принципиальная возможность использования ДНК-препаратов для блокировки определенных генов с положительным терапевтическим эффектом [111]. Причем при работе с культурами

клеток эта технология может быть весьма эффективной, так как олигонуклеотиды непосредственно помещаются в среду с клеточной культурой или в биочернила и могут регулировать активность определенных генов в раневой поверхности, куда производится приживление созданной конструкции.

Кроме того, большой перспективой обладают возможности использования технологий искусственного интеллекта, которые могут позволить проводить более эффективный поиск состава биочернил, усовершенствовать условия и параметры биопечати, что позволит сделать технологию более эффективной и экономичной [112].

И, несомненно, требуют решения вопросы регуляторной политики и стандартизации при производстве кожных эквивалентов. В конечном счете требуется создание четких протоколов Good Manufacture Practice и Good Clinical Practice для клинического применения 3D-биопечатных кожных эквивалентов [113].

Для решения этих вопросов требуются дальнейшие исследования, междисциплинарное сотрудничество и разработка инновационных подходов для устранения существующих недостатков.

### Заключение

Таким образом, проводимые исследования показывают, что 3D-биопечать открывает уникальные возможности по созданию многоуровневых кожных заменителей, максимально приближенных к структуре и функциональным свойствам натуральной кожи. Дальнейшие исследования по оптимизации параметров печати, правильному выбору компонентов биочернил, интеграции фибробластов и других клеточных компонентов позволят более точно моделировать дермальные слои и стимулировать процессы регенерации. Применение дополнительных биологических факторов будет способствовать формированию устойчивой сосудистой сети, что значительно улучшит функциональную интеграцию напечатанных конструкций в ткани организма-реципиента. Следует подчеркнуть, что современные доклинические и клинические испытания демонстрируют перспективность применения технологий регенеративной медицины, однако для их широкого внедрения необходима

стандартизация и регулирование процессов производства. Интеграция передовых методов 3D-биопечати, оптимизированных биочернил и мультিকлеточных конструкций открывает перспективы создания кожных эквивалентов

нового поколения, которые могут не только ускорить процесс регенерации, но и обеспечить эстетически оптимальный результат для пациентов, страдающих от серьезных ожогов, травм и других повреждений кожи.

## Литература

1. Murphy SV, Atala A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nature Biotechnology*. 2014;32(8):773–785. DOI: 10.1038/nbt.2958
2. Ma X, Liu J, Zhu W, Tang M, Lawrence N, Yu C, et al. 3D Bioprinting of Functional Tissue Models for Personalized Drug Screening and In Vitro Disease Modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;132:235–251. DOI: 10.1016/j.addr.2018.06.011
3. Bishop ES, Mostafa S, Pakvasa M, Luu HH, Lee JM, Wolf JM, et al. 3-D Bioprinting Technologies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Current and Future Trends. *Genes and Diseases*. 2017;4(4):185–195. DOI: 10.1016/j.gendis.2017.10.002
4. Ravanbakhsh H, Karamzadeh V, Bao G, Mongeau L, Juncker D, Zhang YS. Emerging Technologies in Multi-Material Bioprinting. *Advanced Materials*. 2021;33(49):e2104730. DOI: 10.1002/adma.202104730
5. Saifullah Q, Sharma A. Current trends on innovative technologies in topical wound care for advanced healing and management. *Current drug research reviews*. 2024;16(3):319–332. DOI: 10.2174/0125899775262048230925054922
6. Kammona O, Tsanaktidou E, Kiparissides C. Recent Developments in 3D-(Bio)printed Hydrogels as Wound Dressings. *Gels*. 2024;10(2):147. DOI: 10.3390/gels10020147
7. Amini-Nik S, Yousuf Y, Jeschke MG. Scar management in burn injuries using drug delivery and molecular signaling: Current treatments and future directions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;123:135–154. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.017
8. Perez-Valle A, Del Amo C, Andia I. Overview of Current Advances in Extrusion Bioprinting for Skin Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6679. DOI: 10.3390/ijms21186679
9. Hierner R, Degreef H, Vranckx JJ, Garmyn M, Massage P, van Brussel M. Skin grafting and wound healing — the «dermato-plastic team approach». *American Journal of Clinical Dermatology*. 2005;23:343–352.
10. Greenwood JE, Clausen J, Kavanagh S. Experience with Biobrane: uses and caveats for success. *Eplasty*. 2009;9:e25.
11. Потеекаев НН, Фриго НВ, Петерсен ЕВ. Искусственная кожа: виды, области применения. *Клиническая дерматология и венерология*. 2017;16(6):7–15.
12. Billingham RE, Reynolds J. Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *British journal of plastic surgery*. 1952;5(1):25–36.
13. Karasek MA, Charlton ME. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *Journal of Investigative Dermatology*. 1971;56(3):205–210.
14. Fredriksson C, Kratz G, Huss F. Transplantation of cultured human keratinocytes in single cell suspension: A comparative in vitro study of different application techniques. *Burns*. 2008;34(2):212–219.
15. Green H. Regeneration of the skin after grafting of epidermal cultures. *Lab Invest*. 1989;60(5):583–584.
16. Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrest BA. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1989;21(2):191–199.
17. Королева ТА. Клеточные технологии в лечении детей с глубокими ожогами кожи (обзор литературы). *Российский вестник*. 2013;3(3):35–42.
18. Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, et al. The reconstitution of living skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983;81(1):2s–10s.

19. Steffens D, Mathor MB, Santi BT, Luco DP, Pranke P. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. *Regenerative Medicine*. 2015;10(8):975–987.
20. Саркисов ДС, Алексеев АА, Глушенков ЕВ. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожного покрова. *Вестник РАМН*. 1994;7:6–11.
21. Зорин ВЛ, Зорина АИ, Петракова ОС, Черкасов ВР. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи. *Гены и клетки*. 2009;4:26–40.
22. Wood FM, Stoner ML, Fowler BV, Fear MW. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process. *Burns*. 2007;33(6):693–700.
23. Винник ЮС, Салмина АБ, Дробушевская АИ, Теплякова ОВ, Пожиленкова ЕА, Зыкова ЛД. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2011;4:392–397.
24. Moiemens NS, Vlachou E, Staiano JJ, Thawy Y, Frame JD. Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: histologic study, clinical evaluation, and current practice. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;117:160s–174s.
25. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*. 1995;21:243–248.
26. Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf a human skin equivalent. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 1998;11:1–8.
27. Steiglitz BM, Maher RJ, Gratz KR, Schlosser S, Foster J, Pradhan-Bhatt S, et al. The viable bioengineered allogeneic cellularized construct StrataGraft® synthesizes, deposits, and organizes human extracellular matrix proteins into tissue type-specific structures and secretes soluble factors associated with wound healing. *Burns*. 2024;50(2):424–432. DOI: 10.1016/j.burns.2023.06.001
28. Atala A, Kasper FK, Mikos AG. Engineering complex tissues. *Science Translational Medicine*. 2012;4:3307–3339.
29. Park KM, Yang JA, Jung H, Yeom J. In situ supramolecular assembly and modular modification of hyaluronic acid hydrogels for 3D cellular engineering. *ACS Nano*. 2012;6:2960–2968.
30. Zhong S. P., Zhang Y. Z., Lim C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2010;2:510–525.
31. Hansbrough J. F., Cooper M. L., Cohen R., Spielvogel R., Greenleaf G., Bartel R. L., Naughton G. Evaluation of a biodegradable matrix containing cultured human fibroblasts as a dermal replacement beneath meshed skin grafts on athymic mice. *Surgery*. 1992;111:438–46.
32. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*. 2006;3:589–601.
33. Netzlaff F, Kaca M, Bock U, Haltner-Ukomadu E, Meiers P, Lehr C-M, Schaefer UF. Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2007;66:127–34.
34. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32:266–277. DOI: 10.1152/physiol.00036.2016
35. Nikolova MP, Chavali MS. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: a review. *Bioactive Materials*. 2019;4:271–292. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.005
36. Foresti R, Rossi S, Pinelli S, Alinovi R, Sciancalepore C, Delmonte N, et al. In-Vivo Vascular Application via Ultra-Fast Bioprinting for Future 5D Personalised Nanomedicine. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3205. DOI: 10.1038/s41598-020-60196-y
37. Amaya-Rivas JL, Perero BS, Helguero CG, Hurel JL, Peralta JM, Flores FA, Alvarado JD. Future Trends of Additive Manufacturing in Medical Applications: An Overview. *Heliyon*. 2024;10:e26641. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e26641
38. Melchels FPW, Domingos MAN, Klein TJ, Malda J, Bartolo PJ, Huttmacher DW. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*. 2012;37(8):1079–1104. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007

39. Semba JA, Mieloch AA, Rybka JD. Introduction to the State-of-the-Art 3D Bioprinting Methods, Design, and Applications in Orthopedics. *Bioprinting*. 2020;18:e00070. DOI: 10.1016/j.bprint.2019.e00070
40. Kačarević ŽP, Rider PM, Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, et al. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials (Basel)*. 2018;11(11):2199. DOI: 10.3390/ma11112199
41. Olejnik A, Semba JA, Kulpa A, Dańczak-Pazdrowska A, Rybka JD, Gornowicz-Porowska J. 3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives. *ACS Synthetic Biology*. 2022;11(1):26–38. DOI: 10.1021/acssynbio.1c00547
42. Askari M, Naniz MA, Kouhi M, Saberi A, Zolfagharian A, Bodaghi M. Recent Progress in Extrusion 3D Bioprinting of Hydrogel Biomaterials for Tissue Regeneration: A Comprehensive Review with Focus on Advanced Fabrication Techniques. *Biomaterials Science*. 2021;9(3):535–573. DOI: 10.1039/D0BM00973C
43. Albanna M, Binder KW, Murphy SV, Kim J, Qasem SA, Zhao W, et al. In Situ Bioprinting of Autologous Skin Cells Accelerates Wound Healing of Extensive Excisional Full-Thickness Wounds. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–15. DOI: 10.1038/s41598-018-38366-w
44. Miguel SP, Cabral CSD, Moreira AF, Correia IJ. Production and Characterization of a Novel Asymmetric 3D Printed Construct Aimed for Skin Tissue Regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;181:994–1003. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.063
45. Ventura RD. An Overview of Laser-Assisted Bioprinting (LAB) in Tissue Engineering Applications. *Medical Lasers*. 2021;10(2):76–81. DOI: 10.25289/ML.2021.10.2.76
46. Derakhshanfar S, Mbeleck R, Xu K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D Bioprinting for Biomedical Devices and Tissue Engineering: A Review of Recent Trends and Advances. *Bioactive Materials*. 2018;3(2):144–156. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008
47. Chameettachal S, Pati F. “Inkjet-Based 3D Bioprinting”. In: Khademhosseini A., editor. *3D Bioprinting in Regenerative Engineering: Principles and Applications* (2018). P. 99–118.
48. Gopinathan J, Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials Research*. 2018;22:1–15. DOI: 10.1186/s40824-018-0122-1
49. Baltazar T, Jiang B, Moncayo A, Merola J, Albanna MZ, Saltzman WM, Pober JS. 3D Bioprinting of an Implantable Xeno-Free Vascularized Human Skin Graft. *Bioengineering and Translational Medicine*. 2022;8(1):e10324. DOI: 10.1002/btm2.10324
50. Cavallo A, Al Kayal T, Mero A, Mezzetta A. Fibrinogen-Based Bioink for Application in Skin Equivalent 3D Bioprinting. *Journal of Functional Biomaterials*. 2023;14(9):459. DOI: 10.3390/jfb14 090459
51. Jiao T, Lian Q, Lian W, Wang Y, Li D, Reis RL, Oliveira JM. Properties of Collagen/Sodium Alginate Hydrogels for Bioprinting of Skin Models. *Journal of Bionic Engineering*. 2023;20:105–118. DOI: 10.1007/s42235-022-00251-8
52. Liu J, Zhou Z, Zhang M, Song F, Feng C, Liu H. Simple and Robust 3D Bioprinting of Full-Thickness Human Skin Tissue. *Bioengineered*. 2022;13(4):10087–10097. DOI: 10.1080/21655979.2022.2063651
53. Somasekharan LT, Raju R, Kumar S, Geevarghese R, Nair RP, Kasoju N, Bhatt A. Biofabrication of Skin Tissue Constructs Using Alginate, Gelatin and Diethylaminoethyl Cellulose Bioink. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;189:398–409. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.114
54. Li M, Sun L, Liu Z, Shen Z, Cao Y, Han L, et al. 3D Bioprinting of Heterogeneous Tissue-Engineered Skin Containing Human Dermal Fibroblasts and Keratinocytes. *Biomaterials Science*. 2023;11:2461–2477.
55. Dai LG, Dai NT, Chen TY, Kang LY, Hsu S. A Bioprinted Vascularized Skin Substitute With Fibroblasts, Keratinocytes, and Endothelial Progenitor Cells for Skin Wound Healing. *Bioprinting*. 2022;28:e00237.
56. Hafezi F, Shorter S, Tabriz AG, Hurt A, Elmes V, Boateng J, Douroumis D. Bioprinting and Preliminary Testing of Highly Reproducible Novel Bioink for Potential Skin Regeneration. *Pharmaceutics*. 2020;12(6):550. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060550
57. Desanlis A, Albouy M, Rousselle P, Thepot A, Santos MD, Auxenfans C, Marquette C. Validation of an Implantable Bioink Using Mechanical Extraction of Human Skin Cells: First

- Steps to a 3D Bioprinting Treatment of Deep Second Degree Burn. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2021;15(1):37–48. DOI: 10.1002/term.3148
58. Jorgensen AM, Gorkun A, Mahajan N, Willson K, Clouse C, Jeong CG, et al. Multicellular bioprinted skin facilitates human-like skin architecture in vivo. *Science Translational Medicine*. 2023;4(15):eadf7547. DOI: 10.1126/scitranslmed.adf7547
  59. Choi KY, Ajiteru O, Hong H, Suh YJ, Sultan MT, et al. A digital light processing 3D-printed artificial skin model and full-thickness wound models using silk fibroin bioink. *Acta Biomater*. 2023;1(164):159–174. DOI: 10.1016/j.actbio.2023.04.034
  60. Zhang D, Lai L, Fu H, Fu Q, Chen M. 3D-Bioprinted Biomimetic Multilayer Implants Comprising Microfragmented Adipose Extracellular Matrix and Cells Improve Wound Healing in a Murine Model of Full-Thickness Skin Defects. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023;15(25):29713–29728. DOI: 10.1021/acsami.2c21629
  61. Huyan Y, Lian Q, Zhao T, Li D, He J. Pilot Study of the Biological Properties and Vascularization of 3D Printed Bilayer Skin Grafts. *International Journal of Bioprinting*. 2020;6(1):246. DOI: 10.18063/ijb.v6i1.246
  62. Jin R, Cui Y, Chen H, Zhang Z, Weng T, Xia S, et al. Three-dimensional bioprinting of a full-thickness functional skin model using acellular dermal matrix and gelatin methacrylamide bioink. *Acta Biomater*. 2021;131:248–261. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.07.012
  63. Lee HR, Park JA, Kim S, Jo Y, Kang D, Jung S. 3D Microextrusion-Inkjet Hybrid Printing of Structured Human Skin Equivalents. *Bioprinting*. 2021;22:e00143.
  64. Qian Z, Sharma D, Jia W, Radke D, Kamp T, Zhao F. Engineering Stem Cell Cardiac Patch with Microvascular Features Representative of Native Myocardium. *Theranostics*. 2019;9:2143–2157. DOI: 10.7150/thno.29552
  65. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, Definitions, and Functions in Health and Disease. *Cell*. 2021;184(15):3852–3872. DOI: 10.1016/j.cell.2021.06.024
  66. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314–321. DOI: 10.1038/nature07039
  67. Knoedler S, Broichhausen S, Guo R, Dai R, Knoedler L, Kauke-Navarro M, et al. Fibroblasts — the cellular choreographers of wound healing. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1233800. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1233800
  68. Madelaire CB, Klink AC, Israelsen WJ, Hindle AG. Fibroblasts as an experimental model system for the study of comparative physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 2022;260:110735. DOI: 10.1016/j.cbpb.2022.110735
  69. Wahlsten A, Rüttsche D, Nanni M, Giampietro C, Biedermann T, Reichmann E, Mazza E. Mechanical stimulation induces rapid fibroblast proliferation and accelerates the early maturation of human skin substitutes. *Biomaterials*. 2021;273:120779. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021
  70. Kim Y, Park N, Rim YA, Nam Y, Jung H, Lee K, Ju JH. Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*. 2018;9:1–10. DOI: 10.1186/s13287-018-0958-2
  71. Ramin S, Shariati P, Shokrgozar MA, Vossoughi M, Eslamifar A. In vitro Coculture of human skin keratinocytes and fibroblasts on a biocompatible and biodegradable scaffold. *Iranian Biomedical Journal*. 2009;13:169–177.
  72. Lee J, Rabbani C, Gao H, Steinhart M, Woodruff BM, Pflum ZE, et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells. *Nature*. 2020;582(7812):399–404. DOI: 10.1038/s41586-020-2352-3
  73. Cheng RY, Eylert G, Garipey JM, He S, Ahmad H, Gao Y, et al. Handheld instrument for wound-conformal delivery of skin precursor sheets improves healing in full-thickness burns. *Biofabrication*. 2020;12(2):025002. DOI: 10.1088/1758-5090/ab6413
  74. Boyce ST, Simpson PS, Rieman MT, Warner PM, Yakuboff KP, Bailey JK, et al. Randomized, paired-site comparison of autologous engineered skin substitutes and split-thickness skin graft for closure of extensive, full-thickness burns. *Journal of Burn Care and Research*. 2017;38(2):61–70. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000401

75. Germain L, Larouche D, Nedelec B, Perreault I, Duranceau L, Bortoluzzi P, et al. Autologous bilayered self-assembled skin substitutes (SASSs) as permanent grafts: a case series of 14 severely burned patients indicating clinical effectiveness. *European Cells and Materials*. 2018;36:128–141. DOI: 10.22203/eCM.v036a10
76. Riehl BD, Park J-H, Kwon IK, Lim JY. Mechanical stretching for tissue engineering: two-dimensional and three-dimensional constructs. *Tissue Engineering — Part B: Reviews*. 2012;18(4):288–300. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0465
77. Хесуани ЮД, Сергеева НС, Миронов ВА, Мустафин АГ, Каприн АД. Введение в 3D-биопринтинг: история формирования направления, принципы и этапы биоопечати. 2018;14(3):40–47.
78. Mironov V, Kasyanov V, Markwald RR. Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011;22(5):667–673. DOI: 10.1016/j.cop-bio.2011.02.006
79. Amirsadeghi A, Jafari A, Eggermont LJ, Hashemi SS, Bencherif SA, Khorram M. Vascularization strategies for skin tissue engineering. *Biomaterials Science*. 2020;8(15):4073–4094.
80. Yang GH, Kang D, An S, Ryu JY, Lee K, Kim JS, et al. Advances in the development of tubular structures using extrusion-based 3D cellprinting technology for vascular tissue regenerative applications. *Biomaterials Research*. 2022;26(1):73.
81. Jiang H, Li X, Chen T, Liu Y, Wang Q, Wang Z, Jia J. Bioprinted vascular tissue: Assessing functions from cellular, tissue to organ levels. *Materials Today Bio*. 2023;23:100846. DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100846
82. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The Immunology of the Porcine Skin and Its Value as a Model for Human Skin. *Molecular Immunology*. 2015;66(1):14–21. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.10.023
83. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The Pig as a Model for Human Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2001;9(2):66–76. DOI: 10.1046/j.1524-475X.2001.00066.x
84. Kantaros A, Ganetsos T, Petrescu FIT, Alysandratou E. Bioprinting and Intellectual Property: Challenges, Opportunities, and the Road Ahead. *Bioengineering (Basel)*. 2025;12(1):76. DOI: 10.3390/bioengineering12010076
85. Yadav R, Kumar R, Kathpalia M, Ahmed B, Dua K, Gulati M, et al. Innovative approaches to wound healing: insights into interactive dressings and future directions. *Journal of Materials Chemistry B*. 2024;12(33):7977–8006. DOI: 10.1039/d3tb02912c
86. Zhu M, Wang Y, Ferracci G, Zheng J, Cho NJ, Lee BH. Gelatin Methacryloyl and Its Hydrogels With an Exceptional Degree of Controllability and Batch-To-Batch Consistency. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6863. DOI: 10.1038/s41598-019-42186-x
87. Nocera AD, Comín R, Salvatierra NA, Cid MP. Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical Microdevices*. 2018;20(2):1–13. DOI: 10.1007/s10544-018-0270-z
88. Osidak EO, Karalkin PA, Osidak MS, Parfenov VA, Sivogrivov DE, Pereira FDAS, et al. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2019;30(3):31. DOI: 10.1007/s10856-019-6233-y
89. Heidenreich AC, Pérez-Recalde M, González Wusener A, Hermida ÉB. Collagen and chitosan blends for 3D bioprinting: A rheological and printability approach. *Polymer Testing*. 2020;82:106297. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.106297
90. Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Engineering — Part C: Methods*. 2014;20(6):473–484. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0335
91. Kim BS, Kwon YW, Kong JS, Park GT, Gao G, Han W, et al. 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials*. 2018;168:38–53. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.040
92. Ковылин РС, Алейник ДА, Федюшкин ИЛ. Современные пористые полимерные имплантаты: получение, свойства, применение. *Высокомолекулярные соединения С*. 2021;63(1):33–53.

93. Simunovic F, Finkenzeller G. Vascularization strategies in bone tissue engineering. *Cells*. 2021;10(7):1749. DOI: 10.3390/cells10071749
94. Hutton DL, Moore EM, Gimble JM, Grayson WL. Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering — Part A*. 2013;19:2076–2086. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0752
95. Piard C, Luthcke R, Kamalitinov T, Fisher J. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor from mesoporous calcium-deficient hydroxyapatite microparticles promotes in vitro angiogenesis and osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2021;109:1080–1087. DOI: 10.1002/jbm.a.37100
96. Farokhi M, Mottaghitab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;454:216–225. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.080
97. Chen EP, Toksoy Z, Davis BA, Geibel JP. 3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:664188. DOI: 10.3389/fbioe.2021.664188
98. Mathur V, Agarwal P, Kasturi M, Srinivasan V, Seetharam RN, Vasanthan KS. Innovative bioinks for 3D bioprinting: Exploring technological potential and regulatory challenges. *Journal of Tissue Engineering*. 2025;16:1–31. DOI: 10.1177/20417314241308022
99. Yaneva A, Shopova D, Bakova D, Mihaylova A, Kasnakova P, Hristozova M, Semerdjieva M. The Progress in Bioprinting and Its Potential Impact on Health-Related Quality of Life. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(8):910. DOI: 10.3390/bioengineering10080910
100. Lam EHY, Yu F, Zhu S, Wang Z. 3D Bioprinting for Next-Generation Personalized Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(7):6357. DOI: 10.3390/ijms24076357
101. Егоров ИА, Семенчук ОВ. Применение технологии 3D-печати в медицине. *Кронос*. 2022;7(4):29–32. DOI: 10.52013/2658-7556-66-4-8
102. Шутова АА, Бегишев ИР. Этические принципы создания и применения биопринтных технологий. *Russian Journal of Economics and Law*. 2025;19(2):448–463. DOI: 10.21202/2782-2923.2025.2.448-463
103. Kreimendahl F, Köpf M, Thiebes AL, Duarte Campos DF, 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
104. Аймалетдинов АМ, Маланьева АГ, Тамбовский МА, Закирова ЕЮ. 3D-биопечать, как метод тканевой инженерии: применение и перспективы. *Биотехнология*. 2024;40(2):3–22.
105. Zhuang Y, Cui W. Biomaterial-based delivery of nucleic acids for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;176:113885. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113885
106. Fu H, Zhang D, Zeng J, Fu Q, Chen Z, Sun X, et al. Application of 3D-printed tissue-engineered skin substitute using innovative biomaterial loaded with human adipose-derived stem cells in wound healing. *International Journal of Bioprinting*. 2023;9(2):674. DOI: 10.18063/ijb.v9i2.674
107. Budharaju H, Sundaramurthi D, Sethuraman S. Embedded 3D bioprinting — An emerging strategy to fabricate biomimetic & large vascularized tissue constructs. *Bioactive Materials*. 2023;32:356–384. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.10.012
108. Mobaraki M, Ghaffari M, Yazdanpanah A, Luo Y, Mills DK. Bioinks and bioprinting: A focused review. *Bioprinting*. 2020;18:e00080.
109. Shende P, Trivedi R. 3D Printed Bioconstructs: Regenerative Modulation for Genetic Expression. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021;17(4):1239–1250. DOI: 10.1007/s12015-021-10120-2
110. Bremer J, van den Akker PC. In Vivo Models for the Evaluation of Antisense Oligonucleotides in Skin. *Methods in Molecular Biology*. 2022;2434:315–320. DOI: 10.1007/978-1-0716-2010-6\_21

Саенко Ю.С. и др.

Эквиваленты кожи для заживления ран и регенерации

111. Makalish TP, Golovkin IO, Oberemok VV, Laikova KV, Temirova ZZ, Serdyukova OA, et al. Anti-Rheumatic Effect of Antisense Oligonucleotide Cytos-11 Targeting TNF- $\alpha$  Expression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(3):1022. DOI: 10.3390/ijms22031022
112. Shahin H. Keratinocytes and adipose-derived mesenchymal stem cells: The heir and the spare to regenerative cellular therapies for difficult-to-heal skin wounds. Sweden: Linköping University (2023).
113. Sekar MP, Budharaju H, Zennifer A, Sethuraman S, Vermeulen N, Sundaramurthi D, Kalaskar DM. Current standards and ethical landscape of engineered tissues-3D bioprinting perspective. *Journal of Tissue Engineering*. 2021;12:20417314211027677. DOI: 10.1177/20417314211027677

### Об авторах

**Саенко Юлия Сергеевна** — лаборант-исследователь Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии», ординатор ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

**Агеева Елизавета Сергеевна** — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой биологии медицинской, руководитель ЦКП НО «Молекулярная биология» Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии» ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

**Юрченко Ксения Андреевна** — младший научный сотрудник Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии» ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

**Дегирменджи Эвелина Талятовна** — лаборант-исследователь Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии», студентка ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

**Волкова Надежда Александровна** — младший научный сотрудник Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии», студентка ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

**Фомочкина Ирина Ивановна** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой базисной и клинической фармакологии ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

**Кубышкин Анатолий Владимирович** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии, директор Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии» ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского.

### Authors

**Julia S. Saenko** — Research Lab Assistant, Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnology”, ordinator, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

**Elizaveta S. Ageeva** — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Medical Biology, Head of the Center for Collective Use of the Scientific Research Institute “Molecular Biology” of the Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnology”, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

**Ksenia A. Yurchenko** — Junior researcher at the Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnology”, student, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

**Evelina T. Degirmenji** — Research Lab Assistant, Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnology”, student, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

**Nadezhda A. Volkova** — Junior researcher at the Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnology”, student, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

**Irina I. Fomochkina** — Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Basic and Clinical Pharmacology Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

**Anatoly V. Kubyshkin** — Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of General and Clinical Pathophysiology, Head of the Engineering Center “Genetic and Cellular Biotechnology”, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky.

---

### Вклад авторов

**Ю.С. Саенко** — сбор данных, анализ и интерпретация данных.

**Е.С. Агеева** — концепция работы, итоговая переработка статьи.

**К.А. Юрченко** — составление статьи, итоговая переработка статьи.

**Э.Т. Дегирменджи** — сбор данных, анализ и интерпретация данных.

**Н.А. Волкова** — сбор данных, составление статьи.

**И.И. Фомочкина** — итоговая переработка статьи, окончательное утверждение версии для публикации.

**А.В. Кубышкин** — итоговая переработка статьи, окончательное утверждение версии для публикации.

### Author contribution statement

**Julia S. Saenko** — data collection, data analysis and interpretation.

**Elizaveta S. Ageeva** — the concept, final revision of the article.

**Ksenia A. Yurchenko** — article drafting, final revision of the article.

**Evelina T. Degirmenji** — data collection, data analysis and interpretation.

**Nadezhda A. Volkova** — data collection, article drafting.

**Irina I. Fomochkina** — final revision of the article, final approval of the version for publication.

**Anatoly V. Kubyshkin** — final revision of the article, final approval of the version for publication.