

# СФЕРОИДЫ ИЗ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО И МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ФЕНОТИПОВ КАК СТРОИТЕЛЬНЫЕ БЛОКИ В БИОПЕЧАТИ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2025.17.1.11

УДК 611.018.1:004.94

Поступила 19.11.2024 г.

© **Д.П. Ревокатова**, младший научный сотрудник лаборатории клинических смарт-нанотехнологий Института регенеративной медицины;  
**П.И. Котенева**, младший научный сотрудник дизайн-центра «Биофабрика» Института регенеративной медицины;  
**Н.В. Кошелева**, к.б.н., доцент, зав. лабораторией клинических смарт-нанотехнологий Института регенеративной медицины;  
**А.И. Шпичка**, к.б.н., доцент, зав. лабораторией прикладной микрофлюидики Института регенеративной медицины;  
**П.С. Тимашев**, д.х.н., профессор Института регенеративной медицины; научный руководитель Научно-технологического парка биомедицины

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991

Основу большинства тканей и органов составляют клетки эпителиального и мезенхимального фенотипов. Эпителиальные клетки формируют защитные барьеры, играют ключевую роль в процессах абсорбции и секреции, а также участвуют в обмене веществ. Мезенхимальные клетки, обладая высокой пластичностью и способностью к миграции, обеспечивают структурную поддержку, способствуют восстановлению тканей и играют важную роль в ремоделировании матрикса. Взаимодействие между этими двумя типами клеток является критически важным для поддержания целостности и функциональности организма.

Современная тканевая инженерия направлена на создание искусственных тканей и органов, которые обладают необходимым клеточным составом, механическими свойствами и функциональным потенциалом для использования в медицине. Одним из самых популярных методов тканевой инженерии является 3D-биопечать, которая позволяет создавать сложные трехмерные структуры с заданными характеристиками. В последнее время особое внимание уделяется биопечати с применением сфероидов — трехмерных клеточных агрегатов, которые могут быть использованы в качестве строительных блоков для создания тканеинженерных конструкций. За счет многочисленных контактов клеток между собой и накопления внеклеточного матрикса в сфероиде создаются условия, близкие к естественным тканям и органам.

Для оптимизации условий биопечати важно иметь точное представление о механических характеристиках сфероидов, так как они непосредственно влияют на способность клеток к миграции и слиянию, а следовательно, и на скорость формирования конструкта и его итоговую морфологию. Данный обзор обобщает существующие данные о различиях в механических свойствах эпителиальных и мезенхимальных сфероидов, рассматривает методы их совместного культивирования в различных приложениях регенеративной медицины, а также анализирует особенности их использования при разных методах биопечати для получения высококачественных тканевых конструкций.

**Ключевые слова:** биопечать; сфероиды; тканевая инженерия; механические свойства сфероидов; эпителиальные и мезенхимальные клетки.

**Как цитировать:** Revokatova D.P., Koteneva P.I., Kosheleva N.V., Shpichka A.I., Timashev P.S. Spheroids from epithelial and mesenchymal cell phenotypes as building blocks in bioprinting (review). *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2025; 17(1): 121, <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.1.11>

**Для контактов:** Ревокатова Дарья Петровна, e-mail: revokatova.d@gmail.com

## Spheroids from Epithelial and Mesenchymal Cell Phenotypes as Building Blocks in Bioprinting (Review)

**D.P. Revokatova**, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Smart- and Nanotechnologies, Institute of Regenerative Medicine;

**P.I. Koteneva**, Junior Researcher, Biofabrika Design Center, Institute of Regenerative Medicine;

**N.V. Kosheleva**, PhD, Associate Professor, Head of Laboratory of Clinical Smart- and Nanotechnologies, Institute of Regenerative Medicine;

**A.I. Shpichka**, PhD, Associate Professor, Head of Laboratory of Applied Microfluidics, Institute of Regenerative Medicine;

**P.S. Timashev**, DSc, Professor, Institute of Regenerative Medicine; Chief Scientific Officer of the Scientific and Technological Park of Biomedicine

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia

Most tissues and organs are based on cells of the epithelial and mesenchymal phenotypes. Epithelial cells build protective barriers, have a key role in absorption and secretion, and participate in metabolism. Characterized by high plasticity and ability to migrate, mesenchymal cells ensure structural support, promote tissue restoration and are important for matrix remodeling. Interaction between these two cell types is critical for maintaining the body integrity and functioning.

Modern tissue engineering is aimed at creation of artificial tissues and organs that have the required cellular composition, mechanical properties and functional potential for medical usage. One of the most popular methods of tissue engineering is 3D bioprinting, which allows creating complex three-dimensional structures with specified characteristics. Recently, special attention has been paid to bioprinting with spheroids being three-dimensional cellular aggregates that can be used as building blocks for tissue-engineered structures. Due to numerous cell-to-cell contacts and accumulation of extracellular matrix, spheroids ensure conditions allowing to form anatomical tissues and organs.

To optimize bioprinting conditions, one shall precisely understand the mechanical properties of spheroids, as they directly affect the ability of cells to migrate and fuse, and thus the rate of construct formation and its overall morphology. This review summarizes the available data on the differences in mechanical properties of epithelial and mesenchymal spheroids, examines methods for their co-culturing in various applications of regenerative medicine, as well as analyzes the peculiarities of their use in different bioprinting methods to obtain high-quality tissue constructs.

**Key words:** bioprinting; spheroids; tissue engineering; mechanical properties of spheroids; epithelial and mesenchymal cells.

### Введение

В последние десятилетия бурно развивается тканевая инженерия, происходит объединение достижений технологий материаловедения, клеточной биологии, физики и трансплантологии для решения проблем регенеративной медицины. Технология биопечати является одним из самых перспективных подходов к формированию биоэквивалентов как для заместительной терапии, так и для получения адекватных моделей тестирования эффективности и безопасности персонализированных лекарственных препаратов.

Стратегия тканевой инженерии «сверху вниз» с формированием трехмерных конструкций и последующим добавлением к ним суспензии клеток имеет ограничения, связанные со сниженной жизнеспособностью клеток после трансплантации, с отсутствием межклеточных контактов и внеклеточного матрикса (ВКМ). Поэтому в последнее время популярен подход «снизу вверх», который предполагает биопечать

с использованием не суспензии клеток, а предварительно сформированных трехмерных агрегатов клеток — сфероидов, в которых клетки сформировали комплексы межклеточных контактов, синтезировали ВКМ, дифференцировались в заданном направлении и адаптировались к гипоксии [1, 2]. В конструктах, сформированных с использованием сфероидов, жизнеспособность, пролиферация и функционально-дифференцировочный потенциал значительно выше, чем при биопечати с применением суспензии клеток.

Изучение строения и свойств сфероидов как ключевого компонента биочернил для формирования ткани является одной из фундаментальных задач тканевой инженерии и имеет важное практическое значение. Основу большинства тканей и органов составляют клетки эпителиального и мезенхимального фенотипов. Эпителиальные клетки формируют защитные барьеры, играют ключевую роль в процессах абсорбции и секреции, а также участвуют в обмене веществ. Мезенхимальные клетки, обладая высокой пластичностью и способностью к миграции,

обеспечивают структурную поддержку, способствуют восстановлению тканей и играют важную роль в ремоделировании. Взаимодействие между этими двумя типами клеток является критически важным для поддержания целостности и функциональности организма. Помимо этого, все процессы развития, морфогенеза, регенерации и онкогенеза тесно связаны с переходами между эпителиальным и мезенхимальным фенотипами клеток и поиск новых моделей для их изучения является важной задачей регенеративной медицины [3]. Комбинирование сфероидов из различных типов клеток при формировании тканеинженерных конструкций позволяет воссоздавать сложные тканеспецифичные структуры.

Данный обзор обобщает имеющиеся данные о различиях между эпителиальными и мезенхимальными сфероидными, рассматривает методы их совместного культивирования в различных приложениях регенеративной медицины, а также анализирует особенности их использования при разных методах трехмерной биопечати для получения высококачественных тканевых конструкций.

### Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Основным типом клеток для использования в регенеративной медицине являются мультипотентные стромальные клетки (МСК), впервые описанные Александром Яковлевичем Фриденштейном как популяция стволовых клеток костного мозга, способных дифференцироваться в остеогенном направлении [4]. Термин «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки» был введен благодаря работам группы Арнольда Каплана [5]. Многие исследования показывают, что популяция МСК гетерогенна по своим характеристикам и сильно варьирует от ткани-источника [6]. Тем не менее роль МСК как при естественной регенерации, так и в тканевой инженерии неоспорима. Известно, что МСК обладают выраженным «хоумингом», т.е. тропностью к местам повреждений, а также обладают противовоспалительными и иммуносупрессивными свойствами [7]. Кроме того, МСК слабо экспрессируют главные комплексы гистосовместимости, таким образом их трансплантация не приводит к иммунному ответу со стороны хозяина и отторжению, что делает их удобным источником клеток для использования в регенеративной медицине [8].

Согласно общепринятым критериям, МСК должны иметь фибробластоподобную морфологию, адгезироваться к пластику, экспрессировать поверхностные маркеры CD105, CD73, CD90 и дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [9]. Основными источниками МСК служат костный мозг, жировая ткань, амниотическая жидкость, пуповинная кровь и вартонов студень пупочного канатика [10]. В зависимости от тканевого источника МСК демонстрируют разные возможности

к дифференцировке и пролиферации. Показано, что МСК костного мозга имеют наибольший потенциал к остеогенной дифференцировке [11], тогда как у МСК жировой ткани преобладает ангиогенный потенциал. МСК, полученные из пуповинной крови, обладают самым высоким пролиферативным потенциалом, что дает возможность поддерживать их в культуре в течение длительного времени [12, 13]. Наряду с классическими источниками МСК доступными и перспективными их источниками являются пульпа зуба, десна и периодонтальная связка [14, 15]. МСК из данных источников имеют более высокий потенциал к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях по сравнению с МСК жировой ткани [16]. Таким образом, в зависимости от целей исследования должен быть выбран определенный источник популяции МСК.

### Эпителиальные клетки

Эпителиальная ткань — это совокупность эпителиальных клеток, обладающих апикобазальной полярностью, тесно прилежащих друг к другу, связанных за счет плотных контактов и выступающих поверхности и полости большинства органов. Эпителиальная ткань обладает высоким регенеративным потенциалом и выполняет защитную, секреторную, транспортную, абсорбционную и другие функции [17]. Эпителий представлен во многих системах органов человека, например таких, как кожа, роговица глаза, половая, мочевыводящая, пищеварительная, дыхательная системы [18–20]. Первичные культуры эпителиальных клеток широко применяют для исследования процессов дифференцировки и адгезии клеток, абсорбции, проницаемости и механизмов регенерации тканей [21]. Они также используются в анализе метаболических нарушений гомеостаза, например формирования фиброзной ткани при заживлении и эпителиально-мезенхимальной пластичности в случае развития злокачественных образований [22, 23]. Помимо этого, культуры эпителиальных клеток широко применяют для изучения цитотоксичности лекарственных препаратов и химических веществ.

Кроме первичных культур существует большое количество коммерчески доступных культур эпителиальных клеток человека, полученных из разных источников, таких как бронхи, легкие, трахея, плацента, мочевого пузыря, молочные железы, проксимальные канальцы почки, эндометрий сосудов, ретинальный пигментный эпителий сетчатки и др. В зависимости от целей исследования выбирается тот или иной источник эпителиальных клеток.

Восстановление барьерных эпителиальных тканей является важной и перспективной задачей в тканевой инженерии. Биозквиваленты для облегчения регенерации тканей или *ex vivo* тестирований могут представлять собой клеточные пласты, созданные из эпителиальных клеток, а также тканеинженерные

конструкции различного состава, созданные методами 3D-биопечати [24, 25].

### Преимущества 3D-культивирования

Наиболее перспективным подходом для исследования процессов дифференцировки и межклеточных взаимодействий в условиях, приближенных к таковым в нативной ткани, может служить использование сфероидов, в котором формируется градиент факторов роста, питательных веществ, кислорода [26], усиливаются взаимодействия между клетками посредством увеличения количества адгезионных контактов [27] и связей с новосинтезированным ВКМ [28]. 3D-культуры клеток в форме сфероидов приближены к нативной ткани по реализации многоклеточного микроокружения, сигнальных путей и межклеточных взаимодействий, что позволяет использовать их для моделирования процессов, происходящих в нативных тканях [29].

Преимущества 3D-культивирования показаны для многих типов клеток. Так, жизнеспособность гепатоцитов в сфераоидах выше, чем в монослое, и в 3D-культуре они сохраняют высокую способность к детоксикации [30]. В сфераоидах эндотелиальных клеток путем апоптоза центральных клеток формируются просветы сосудов, что позволяет изучать васкулогенез [31]. Кроме того, клеточные сфероиды широко применяют в онкологических исследованиях для анализа морфологических изменений в трансформированных клетках [32].

Преимущества 3D-культивирования неоднократно были отмечены в работах с использованием МСК. При монослойном культивировании МСК быстро «стареют», накапливается их генетическая нестабильность, что ограничивает сроки культивирования, снижаются продукция паракринных факторов, дифференцировочный потенциал и способность восстанавливать ткани реципиента после трансплантации [33]. В трехмерных условиях культуру можно поддерживать в течение длительного периода времени (до 7 мес) [34]. Одним из объяснений данного феномена является увеличение в сфераоидах экспрессии маркеров плюрипотентности *Oct4A* и *Nanog*, *SOX2*, *SSEA-4*, *TRA-1-60* и *TRA-181*. Это объясняет длительное сохранение стволовости клеток в сфераоидах по сравнению с монослоем [35]. Показано, что после диссоциации сфероида раствором трипсина клетки пролиферируют активнее, чем клетки монослойной культуры. Таким образом, 3D-культивирование также увеличивает пролиферативный потенциал клеток [36].

Процесс активации пролиферации и миграции клеток сфероида при помещении его в 2D-условия на адгезивный субстрат называется реактивацией [2]. Показано, что в сфераоидах усиливается секреторная активность и, как следствие, повышается противовоспалительный потенциал МСК за счет та-

ких цитокинов и факторов роста, как VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), основной фактор роста фибробластов, ангиогенин, прокатепсин В и интерлейкин-11 [37].

При 3D-культивировании также возрастают дифференцировочный потенциал и чувствительность клеток к индукторам, что имеет важное значение для регенеративной медицины. Например, при воздействии VEGF сфероиды из МСК быстрее дифференцируются в ангиогенном направлении, чем в монослойной культуре [38, 39]. 3D-культивирование клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) стимулирует экспрессию таких генов ангиогенеза, как *CD31*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, а также *Tie-1*, *Tie-2* — рецепторов к ангиопоэтину, важному фактору роста, стимулирующему ангиогенез [40]. В сфераоидах из МСК жировой ткани, а также периодонтальной связки возрастает эффективность остеогенной дифференцировки, что подтверждается увеличением синтеза щелочной фосфатазы, остеокальцина и минерализации [41, 42]. Эффективная дифференцировка объясняется высоким содержанием ВКМ в сфероидах, который способствует сигналингу через  $\alpha 2\beta 1$ -интегриновые рецепторы, что необходимо для остеогенеза [43]. В 3D-культуре возрастает и миогенный потенциал МСК по сравнению с монослоем. В сфераоидах образуются зрелые структуры — миофибриллы, тогда как в 2D-культурах отмечают только начальные стадии спонтанной миогенной дифференцировки — экспрессию маркера *MyoD* [44]. Показано также, что сфероиды обладают более высоким регенеративным потенциалом по сравнению с монослойной культурой и дольше сохраняют потенциал к дифференцировке после трансплантации в область повреждения [43]. На примере травмы костной ткани черепа показано, что при трансплантации в область повреждения суспензии МСК костного мозга спустя 4 нед область повреждения в большей степени заполняется фиброзной тканью, тогда как трансплантация сфероидов способствует формированию полноценной костной ткани [45]. Аналогичные результаты получены для МСК, выделенных из периодонтальной связки и жировой ткани [42, 46].

Преимущества 3D-культивирования показаны также и для эпителиальных клеток. Известно, что первичные культуры эпителиальных клеток при культивировании в 2D-условиях теряют свой истинно эпителиальный фенотип, претерпевая эпителиально-мезенхимальный переход и приобретая смешанный фенотип. 3D-культуры сфероидов позволяют восстановить фенотип клеток за счет обратного мезенхимально-эпителиального перехода [47–49]. Мезенхимальные клетки также при помещении в 3D-культуру частично проходят мезенхимально-эпителиальный переход при эпителизации поверхностной зоны сфероидов [50]. Кроме того, создание 3D-культур сфероидов из эпителиальных клеток позволяет воссоздавать более естественное



микроокружение за счет межклеточных контактов и контактов с ВКМ, повышая жизнеспособность эпителиальных клеток, миграционную и секреторную активность по сравнению с 2D-культурами [51, 52].

Органотипичные модели злокачественных опухолей эпителиального происхождения зачастую успешно получают и применяют для дальнейших исследований и диагностики в форме клеточных сфероидов [53, 54]. Сфероиды из опухолевых клеток позволяют открывать новые особенности инвазии новообразований различных типов рака. Установлено, что совместное культивирование опухолевых клеток эпителиального фенотипа с МСК усиливает изменение фенотипа с эпителиального на мезенхимальный. Это, тем не менее, позволяет добиться положительного эффекта для воссоздания более точной модели инвазии рака молочной железы [53]. В случае раковых клеток толстой кишки показано приобретение клетками инвазивного фенотипа в составе трехмерных культур при дополнительной стимуляции факторами роста эпителия и крипт, притом что подобного перехода фенотипа в 2D-культуре не происходило [55].

### Формирование сфероидов

Сфероиды можно формировать из различных культур клеток: опухолевой и неопухолевой природы, мезенхимальных и эпителиальных феноти-

пов (рис. 1). Морфология сфероидов, а также эффективность их формирования зависят от типа клеток и их морфофункциональных особенностей. Неопухолевые сфероиды имеют 2 зоны: внешнюю и внутреннюю. Сфероиды из клеток имеют 3 зоны: пролиферативная внешняя кора, нейтральная молчащая зона и некротическое ядро [56]. Сфероиды из клеток эпителиального фенотипа во внутренней зоне имеют плотно упакованные клетки с хорошо развитым цитоскелетом и большим количеством контактов друг с другом, тогда как сфероиды из клеток мезенхимального фенотипа имеют плотно упакованную поверхностную зону из эпителиоподобных клеток и рыхлую внутреннюю зону с большим количеством ВКМ [57]. Как правило, к 7-му дню культивирования клетки полностью прекращают пролиферировать [39], за исключением сфероидов, сформированных из раковых клеточных линий [58, 59].

В процессе формирования сфероидов принято выделять этапы миграции, агрегации и адгезии, компактизации [60]. Сначала отдельные шарообразные клетки движутся в случайных направлениях с помощью коротких выростов — филлоподий, затем клетки начинают контактировать друг с другом за счет адгезионных контактов, образуя агрегаты. Этот процесс занимает примерно два часа [61]. Затем начинается компактизация, где основную роль играют E-кадгерин, актин и тубулин микротрубочек [60].

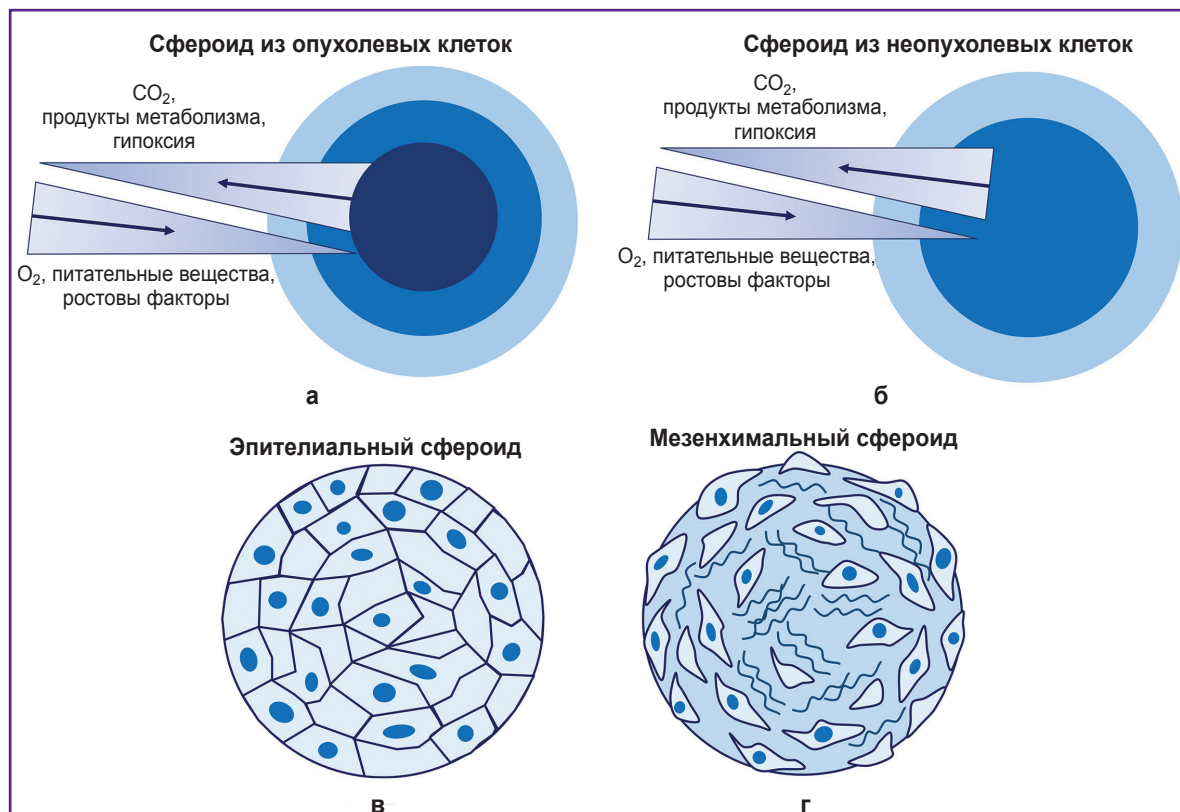


Рис. 1. Структура сфероидов, сформированных из опухолевых (а) и неопухолевых (б) клеток, из клеток эпителиального (в) и мезенхимального фенотипов (г)

Для установления роли основных молекул цитоскелета применяют различные соединения, селективно блокирующие полимеризацию структур в клетках. Для разрушения актинового цитоскелета обычно используется цитохалазин D — блокатор полимеризации фибриллярного актина [62], для разрушения белков клеточной адгезии применяют антитела к E-кадгерину, интегринам и коннексинам. Для блокирования полимеризации тубулиновых микротрубочек используют нокодазол и колхицин. В процессе формирования сфероидов цитоскелет подвергается значительным изменениям. Как правило, в 3D-культурах актиновые микрофиламенты клетки находятся в кортикальном слое цитоплазмы [63]. Показано, что в поверхностных клетках сфероидов снижается жесткость по сравнению с монослойной культурой [64]. Цитохалазин D оказывает разное влияние на сфероиды из разных типов клеток. Так, например, сфероиды из МСК костного мозга могут формироваться в присутствии цитохалазина D, однако становятся более рыхлыми, их диаметр на 133% больше по сравнению с контролем [65], а обработка эпителиальных сфероидов цитохалазином D, даже в очень низких концентрациях, полностью нарушает их формирование [66]. Для хондросфер показано, что обработка цитохалазином D серьезно влияет на динамику сли-

яния и распространения клеток и значительно снижает механические свойства сфероидов. При этом разрушение микротрубочек нокодазолом значительно влияет на реактивацию сфероидов и неожиданно приводит к увеличению жесткости. Разрушение промежуточных филаментов (виментина) также влияет на реактивацию [67].

Нарушение цитоскелета и межклеточных контактов наибольшее влияние оказывает на формирование эпителиальных сфероидов, что объясняется особенностями их строения и функционирования естественных эпителиальных тканей за счет большого количества межклеточных контактов [68, 69]. Изучение факторов, влияющих на межклеточную адгезию клеток эпителиального и мезенхимального фенотипов, позволяет прогнозировать распределение в сфероидах при самоорганизации [68, 69], а также намеренно влиять на процессы сортировки и сепарации при сфероидогенезе и формировании искусственных тканей [70, 71].

Вклад разных компонентов цитоскелета и ВКМ в механические свойства сфероидов в первую очередь зависит от типа клеток. Анализ влияния молекул цитоскелета и адгезии на формирование сфероидов из клеток эпителиального и мезенхимального фенотипов представлен в табл. 1 [65, 67–76]. Приведенные

Таблица 1

**Роль элементов цитоскелета и молекул адгезии в формировании эпителиальных, мезенхимальных и смешанных сфероидов**

Тип сфероида	Воздействие и его эффект	Тип клеток	Влияние на сфероидогенез (+/±/-)	Литература
<b>Актиновый цитоскелет</b>				
Эпителиальный	Цитохалазин D (ингибирует полимеризацию положительных концов фибриллярного актина)	Культура гепатоцитов крысы	±; при концентрации 1 мкМ происходило нормальное формирование сфероидов, однако при концентрации более 10 мкМ формирование было нарушено	[72]
		Первичная культура гепатоцитов самца крысы	-; полноценные сфероиды не формировались, только отдельные клеточные кластеры	[73]
Мезенхимальный	Цитохалазин D (ингибирует полимеризацию положительных концов фибриллярного актина)	МСК костного мозга	±; сфероиды сформировались, но имели больший на 133% размер по сравнению с контролем	[65]
		Первичная культура хондроцитов овцы	±; при концентрации 10 мкМ сфероиды формировались, но были рыхлыми и хрупкими. Поверхность была покрыта ошаренными клетками, сфероиды теряли способность сливаться друг с другом, а клетки теряли способность к пролиферации и миграции после помещения сфероидов в 2D-условия на адгезивную поверхность	[67]
<b>Молекулы адгезии (кадгерины, коннексины, молекулы zona occludens, интегрин и др.)</b>				
Эпителиальный	Антитела к молекулам адгезии (против E-кадгерина, коннексина 32)	Гепатоциты крысы	-; формирование сфероидов значительно нарушалось еще на стадии агрегации	[72]
	Антитела к молекулам адгезии (против молекул ZO-1)		+; формирование сфероидов проходило нормально	
	Нокадаун E-кадгерина, α-катенина, P-кадгерина	Колоректальный рак (SW620, DLD-1, HCT116)	-; клетки колоректального рака, потерявшие E-кадгерин, α-катенин, P-кадгерин, не могли	[69]

Тип сфероида	Воздействие и его эффект	Тип клеток	Влияние на сфероидогенез (+/±/-)	Литература
	Нокдаун E-кадгерина	Рак молочной железы (MCF10A)	формировать сфероиды и участвовать в агрегации с клетками, имеющими данные молекулы ±; клетки без E-кадгерина, инкапсулированные в матрикс (коллаген-альгинат) повышенной жесткости, не могли мигрировать из смешанных сфероидов	[68]
Мезенхимальный	Воздействие на экспрессию кадгеринов (E, N, P) с помощью <i>synNotch</i> -сигналинга	Фибробласты мыши (L929)	+; в сфероиде происходила реорганизация клеток при включении различных кадгеринов через молекулярный каскад <i>synNotch</i>	[74]
<b>Микротрубочки</b>				
Эпителиальный	Нокодазол и таксол	Первичная культура гепатоцитов крысы	+; формирование сфероидов не было нарушено, несмотря на беспорядочную организацию тубулиновых сетей клеток	[73]
	Колхицин	Культура гепатоцитов крысы	±; при концентрации 0,5 мкМ происходило нормальное формирование сфероидов, однако при концентрации более 5 мкМ формировались нерегулярные агрегаты	[72]
Мезенхимальный	Нокодазол	Первичная культура хондроцитов овцы	±; сфероиды формировались нормально, одна поверхность была представлена частично ошаренными клетками, нарушена миграция клеток после помещения сфероидов в 2D-условия на адгезивную поверхность (1 мкМ)	[67]
<b>Другие молекулы и факторы, влияющие на клеточную адгезию</b>				
Эпителиальный	Окадаевая кислота (ингибирует некоторые протеинфосфатазы)	Культура гепатоцитов крысы	±; при концентрации 3–30 нМ сфероиды не формировались, однако при меньшей (0,3 нМ) концентрации формирование не нарушалось	[72]
	Лектины		±; в зависимости от типа лектинов образование сфероидов проходило по-разному, для некоторых культур формирование нарушалось	
	Ингибиторы синтеза глико-сфинголипидов и протеогликанов		+; нарушения формирования сфероидов не выявлено	
	Жесткость окружающей среды	Рак молочной железы (MCF10A, MCF7)	±; смешанные сфероиды (MCF10A и MCF7) в матрикс (коллаген-альгинат) повышенной жесткости претерпевали сортировку и сепарацию клеток	[68]
Мезенхимальный	WFA (ингибитор промежуточных филаментов)	Первичная культура хондроцитов овцы	±; формирование сфероидов проходило успешно, но была нарушена миграция клеток из сфероида в монослой (1 мкМ)	[67]
Эпителиальный/ Мезенхимальный	ДНК-гибридизация	Эпителий рака молочных желез (MDA-MB-468), фибробласты (NIH/3T3)	+; сфероиды из клеток, конъюгированных с комплементарными молекулами ДНК, успешно формировали смешанную культуру, а также синтезировали значительно больше фибронектина	[70]
	Y-27632 (ингибитор ROCK)	Клетки островков Лангерганса и МСК	+; при добавлении ингибитора ROCK (30 мкМ) успешно формировались смешанные сфероиды, в контрольной группе происходили сортировка и сепарация клеток	[75]
	Поверхностное натяжение	Нейрональные клетки и глия	+; поверхностное натяжение и сила взаимодействия между клетками способствуют сортировке клеток в сфероиде	[71, 76]

Примечания: «+» в столбце «Эффект на сфероидогенез (+/±/-)» обозначает формирование сфероидов, несмотря на воздействие; «±» — формирование происходило с описанными нарушениями; «-» — сфероиды не формировались.

данные свидетельствуют, что, используя различные блокаторы, можно воздействовать на механические свойства сфероидов и, как следствие, — на их поведение после биопечати.

## Механические свойства сфероидов

В процессе роста сфероид активно синтезирует различные компоненты ВКМ, формируя тем самым механическое напряжение. Клетка может определить жесткость микроокружения, связываясь с ВКМ через различные контакты и компоненты цитоскелета [77]. Связь обеспечивается преимущественно за счет фокальных контактов, которые состоят из интегриновых рецепторов на поверхности мембраны и связывают актиновый цитоскелет с ВКМ [78]. Механические изменения могут приводить к активации ассоциированных с интегринами киназ и запускать различные сигнальные каскады, например ERK, JNK, Wnt-катенин и Hippo [79]. Сигнальный путь Hippo участвует в процессе механотрансдукции, т.е. переводит механические сигналы на уровень экспрессии генов [80]. При культивировании клеток в мягком матриксе компонент YAP/TAZ Hippo-каскада находится в цитоплазме, а при повышении жесткости комплекс транслоцируется в ядро, изменяя экспрессию генов и влияя на дифференцировку и пролиферацию клеток [81]. Таким образом, жесткость матрикса напрямую воздействует на клеточную дифференцировку. Например, показано, что при культивировании МСК на более мягком субстрате клетки дифференцируются в адипогенном направлении, тогда как более жесткий субстрат стимулирует появление остеоцитов [82]. Жесткий субстрат влияет на остеогенную дифференцировку через механочувствительные гены. Сжатие и растяжение клеток блокирует миогенную и адипогенную дифференцировку, подавляя экспрессию генов *MyoD* и *PPAR-γ*, и в то же время активирует экспрессию генов *Runx2*, *Osterix*, *Msx2* и *Sox9*, стимулируя остеогенную дифференцировку МСК [83].

Многие белки ВКМ аккумулируют ростовые факторы. Например, фибронектин связывает VEGF [84]. Некоторые компоненты ВКМ сами по себе способны активировать рецепторы. Так, например, ламинины, фибриллины и тромбоспондины в своем составе имеют домен, подобный эпидермальному фактору роста, который способен связываться с соответствующим рецептором [85]. Таким образом, в сфероиде за счет накопления ВКМ создается благоприятное механическое окружение для направленной дифференцировки.

В настоящее время активно развиваются методы измерения механических свойств микрообъектов, доказана ключевая роль биомеханических взаимодействий при развитии организма, а также в патологических и регенеративных процессах. Показано влияние жесткости субстрата на рост и дифференцировку стволовых клеток [86], установлена более низкая

жесткость раковых клеток по сравнению с нормальными [87] и изучается важная роль механических сил в эмбриональном развитии.

Для характеристики жесткости материала принято использовать модуль Юнга, который измеряется в паскалях (Па). Для определения локальных свойств ткани, а также монослойной культуры или поверхностных клеток сфероидов обычно используют наиндентирование и метод атомно-силовой микроскопии [88]. Метод ограничен измерением свойств поверхности с глубиной проникновения (индентирования) не более 1 мкм. Для макрообразцов (от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров толщиной) применяют механические тесты на растяжение, сжатие и изгиб материала, которые позволяют получить усредненные механические свойства по всему образцу [89, 90]. В настоящее время разработаны системы, позволяющие таким методом анализировать агрегаты клеток и клеточные пласты.

Кроме того, для определения жесткости клеточного пласта, сфероида или ткани целиком используются метод сжатия параллельными пластинами на приборе MicroSquisher [91] и кавитационная реология [92]. С помощью данных методов показано, что монослойная культура МСК, культивируемая на пластике, в среднем имеет модуль Юнга, исчисляющийся в гигапаскалях (ГПа), а в сфероидах жесткость поверхностных клеток не превышает 0,1 кПа. С помощью атомно-силовой микроскопии установлено, что модуль Юнга сфероидов из клеточной линии фибробластов мыши 3T3 лежит в диапазоне 0,3–3,5 кПа [93], а из эпителиальной линии клеток аденокарциномы толстой кишки человека (LS174T) — в диапазоне 0,3–0,6 кПа.

Метод кавитационной реологии использован для анализа механических свойств сфероидов из трансформированной клеточной линии НЕК 293. Критическое давление, необходимое для разрыва связи между клетками в таких сфероидах, составляло 0,013–0,500 кПа [94]. С помощью прибора MicroSquisher показано, что модуль Юнга трехдневных сфероидов из МСК равняется  $42,28 \pm 6,14$  Па, а семидневных сфероидов —  $62,40 \pm 5,58$  Па [95]. Анализ механических свойств для мягких биологических тканей или компонентов биоэквивалента осуществляют с помощью реометра, который измеряет такие параметры гелей и жидкостей, как модуль сдвига и вязкость [96].

Для анализа механических свойств, а также поверхностного натяжения сфероидов может быть использован метод аспирации, который заключается во всасывании микропипеткой единичного сфероида, а затем вычислении необходимых параметров в соответствии с уравнением Юнга–Лапласа (описывает зависимость между внутренним давлением сфероидов и клеточной средой через изогнутую границу раздела) [97]. Таким методом было проведено сравнение механических и вязкоупругих свойств сфероидов



разного размера, полученных из HUVEC, 3T3, клеток рака молочной железы мыши (4T1), фибробластов кожи человека (HDF) и совместной культуры МСК человека и HUVEC [98]. Сфероиды из фибробластов и МСК быстрее компактизовались и формировали больше ВКМ на поверхности по сравнению с эпителиальными сфероидными. С помощью данного метода также показано, что поверхностное натяжение сфероидов из HUVEC, 3T3, 4T1, HDF, МСК/HUVEC и МСК через 2 дня культивирования составило ~14, 30, 37, 41, 51 и 66 [мН/м] соответственно. Иными словами, поверхностное натяжение сфероидов, содержащих только МСК, примерно в пять раз выше, чем сфероидов из эндотелиальных клеток. Установлено также, что поверхностное натяжение сфероидов 4T1, HDF и МСК/HUVEC увеличивается с течением времени, тогда как натяжение сфероидов, полученных из других типов клеток, практически не меняется. Выявлена положительная корреляция между поверхностным натяжением сфероидов и их компактностью [99], которая зависит от количества коллагена [100]. Жесткость сфероида во многом зависит от состава и структуры ВКМ, которые могут обладать модулем упругости в диапазоне от нескольких мегапаскалей (эластин) до нескольких гигапаскалей (коллаген) [101]. При этом механические свойства также могут значительно отличаться в зависимости от ориентации, сшивок и взаимодействия различных типов волокон [102].

Так как сфероиды широко используют для моделирования процессов морфогенеза, регенерации и метастазирования тканей и при этом они служат строительными блоками при биопечати, изучение их механических свойств является важной задачей тканевой инженерии. Поверхностное натяжение и жесткость сфероидов оказывают большое влияние на их способность к слиянию, а также на реактивацию, т.е. способность клеток мигрировать из сфероида после помещения его на адгезивный субстрат или в гидрогель [103, 104]. Эти параметры в свою очередь напрямую связаны со скоростью созревания напечатанного конструкта [105–108]. Изменение механических свойств сфероидов за счет моделирования компонентов цитоскелета с использованием специфических блокаторов может повышать эффективность процессов слияния и реактивации сфероидов после биопечати [109].

Механизм слияния клеточных агрегатов принято рассматривать по аналогии с механизмом слияния капель жидкости [110]. Согласно данной модели, основными параметрами, определяющими механизм и скорость слияния, являются вязкость и поверхностное натяжение [111], что в клеточных сфероидных определяется молекулами клеточной адгезии, цитоскелетом и ВКМ.

Известны исследования, направленные на выявление связи между механическими свойствами сфероидов и скоростью их слияния [94, 112, 113],

однако полученные в них результаты несколько противоречивы. Например, показано, что натяжение поверхностных клеток в сфероидных из фибробластов способствует их более быстрому слиянию по сравнению со сфероидными из эпителиальных клеток (линия клеток яичника китайского хомячка СНО) [112]. В других исследованиях утверждается, что слияние сфероидов из эпителиальных клеток (ретикулярный пигментный эпителий) происходит быстрее, чем из мезенхимальных клеток, выделенных из лимба глаза [113]. По всей вероятности, высокое содержание ВКМ и плотная упаковка клеток во внешнем слое МСК сфероидов негативно влияют на их миграцию и, соответственно, на слияние сфероидов. При этом трехдневные сфероиды из МСК сливаются быстрее, что связано с низким содержанием ВКМ. Аналогичные результаты показаны для сфероидов из хондроцитов овец. На ранних сроках культивирования они сливаются быстрее, чем на поздних сроках в связи с накоплением ВКМ [114]. Более эффективное слияние сфероидов из эпителиальных клеток может быть также обусловлено тем, что коллективная миграция больше свойственна эпителиальным клеткам с хорошо развитыми межклеточными контактами [115].

В контексте тканевой инженерии часто необходимо объединять несколько типов клеток или сфероидов в составе конструкта, чтобы он наилучшим образом воспроизводил структуру ткани *in vitro*. Для этого используют сфероиды из разных типов клеток, при этом можно добавлять клетки последовательно для формирования организованных слоев. Например, добавление суспензии эпителиальных клеток к предварительно сформированному мезенхимальному сфероиду позволяет создать *in vitro* модель для изучения процессов эмбриогенеза и эпителиально-мезенхимальной пластичности [3, 116], что лежит в основе множества морфогенетических процессов, а также регенерации и метастазирования тканей [117]. Можно также использовать отдельно сфероиды из мезенхимальных и эпителиальных клеток для биопечати, их послойное разделение произойдет уже при созревании конструкта. Показано, что при слиянии мезенхимальных и эпителиальных сфероидов происходит обрастание эпителиальными клетками мезенхимальных [113]. Изучение механических характеристик сфероидов разных фенотипов требует дальнейших исследований, поскольку они непосредственно влияют на способ созревания биоэквивалента после биопечати [47], а именно на скорость слияния сфероидов, миграцию клеток и формирование отростков. Основные способы созревания биоэквивалентов после биопечати представлены на рис. 2.

## Биопечать сфероидными

Трехмерная биопечать имеет множество преимуществ, позволяет создавать сложноорганизованные

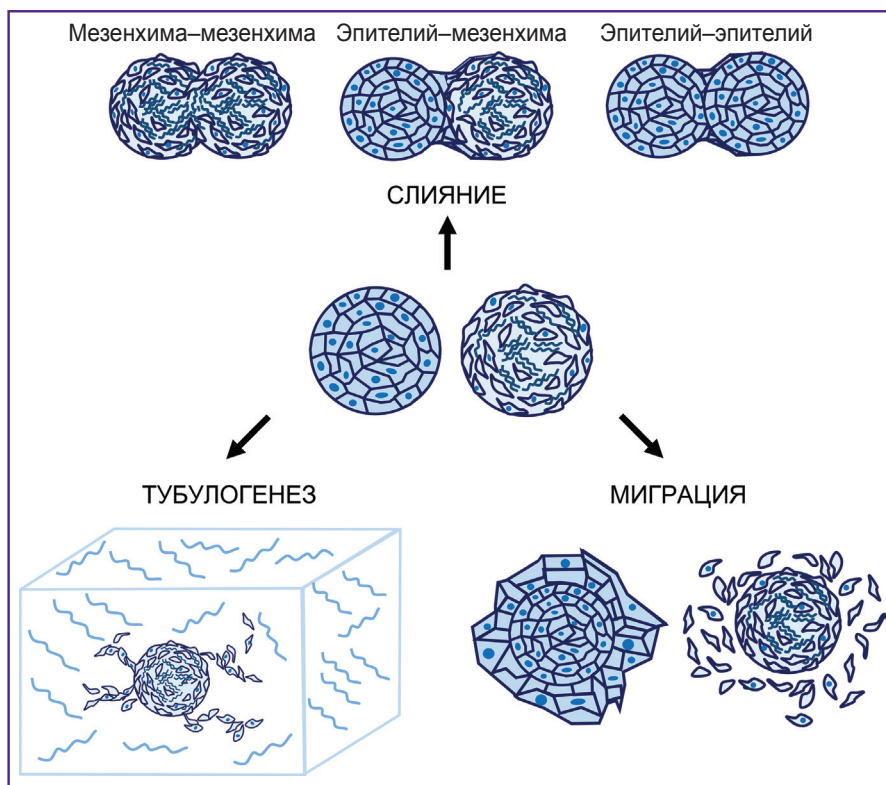


Рис. 2. Способы созревания биоэквивалента после биопечати

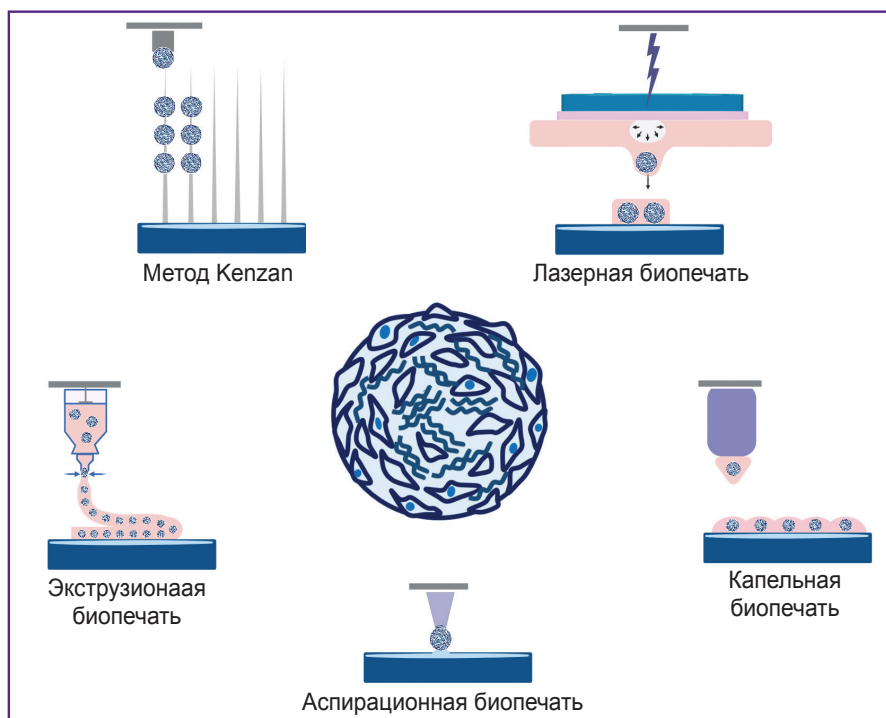


Рис. 3. Методы биопечати с использованием сфероидов

ткани, состоящие из нескольких слоев разных типов клеток в соответствующем ВКМ [118, 119]. В настоящее время разработано уже много разных методов биопечати, таких как экструзионная, аспираци-

онная, лазерная, капельная и др. [120, 121] (рис. 3). Выбор метода зависит от желаемой морфологии и размера биоэквивалента, используемого гидрогеля, а также от фенотипа клеток и их механических характеристик. Использование сфероидов в качестве строительных блоков привлекает внимание все большего числа исследователей [122, 123], поскольку они обладают повышенной регенеративной способностью по сравнению с монослойной культурой, лучше имитируют физиологические условия, свойственные нативной ткани, и обладают высокой жизнеспособностью.

Полноценное заполнение напечатанного конструкта может осуществляться как за счет миграции клеток из сфероида, так и за счет их слияния. А эти параметры напрямую зависят от механических свойств сфероидов [57], использованного гидрогеля, а также от расстояния между ними [124]. Например, для сфероидов из МСК жировой ткани показано, что при расположении их на расстоянии менее 100 мкм друг от друга они, скорее всего, будут сливаться, а на расстоянии более 400 мкм — формировать отростки по направлению друг к другу [124]. Сфероиды из HUVEC, находящиеся друг от друга на расстоянии 800 мкм, формируют более разветвленную сеть отростков (общая длина отростков составляет 11 мм) по сравнению с группой, где расстояние между сфероидами 3000 мкм (6 мм) [105]. Степень дифференцировки также может оказывать значительное влияние на скорость слияния. Например, сфероиды из МСК, дифференцированные в остеогенном направлении, сливаются

тывать при создании хрящевых эквивалентов [107]. Слияние сфероидов из кардиомиоцитов и фибробластов происходит на 4-е сутки культивирования при расстоянии между ними около 50 мкм [105].

При биопечати сфероидами отмечаются некоторые сложности, связанные в первую очередь с агрегацией сфероидов друг с другом и засорением

сопла. Данная проблема может быть решена подбором специального состава гидрогеля и метода биопечати, а также за счет уменьшения размера сфероидов и модификации их механических характеристик. Сравнение методов биопечати и особенностей использованных сфероидов приведено в табл. 2 [98, 105–108, 125–137].

Таблица 2

## Методы биопечати и их применение для создания биоэквивалентов

Модель	Тип клеток	Тип гидрогелей	Характеристика модели	Результаты	Литература
<b>Экструзионная биопечать</b>					
Рак молочной железы	Клетки рака молочной железы MDA-MB-231 МСК жировой ткани	Гиалуроновая кислота	Биопечать биоэквивалентов жировой ткани сфероидами из МСК размером 228±22 мкм с последующей дифференцировкой в адипогенном направлении и дальнейшим нанесением на поверхность конструкта клеток рака молочной железы	Создан биоэквивалент для изучения взаимодействия раковых клеток и жировой ткани в модели рака молочной железы человека. Показана способность раковых клеток снижать содержание липидов и ремоделировать ВКМ в жировой ткани	[125]
	Клетки рака молочной железы MCF10A, MCF10A-NeuN, MDA-MB-231, MCF7 HUVEC	Матригель Желатин-альгинат Коллаген-альгинат	Послойная биопечать сфероидами размером ~70 мкм в концентрации 120–150 сфероидов/см <sup>2</sup> из эпителиальных клеток молочной железы и эндотелиальных клеток	Создан биоэквивалент для изучения взаимодействия между эпителиальными клетками молочной железы и эндотелиальными клетками сосудов. Показано, что совместная культура в напечатанном конструкте более устойчива к паклитакселу по сравнению с монокультурой клеток	[126]
Хрящевая ткань	МСК	Ксантановая камедь + альгинат	Биопечать сфероидами из МСК размером ~180 мкм, состоящими из ~3048 клеток, в концентрации 2500 сфероидов на 1 мл гидрогеля с последующей дифференцировкой в хондрогенном направлении в течение 28 дней	Создан биоэквивалент хрящевой ткани, показана его хондрогенная дифференцировка и жизнеспособность в течение 56 дней культивирования, описан оптимальный способ размешивания биочернил для снижения риска разрушения сфероидов и их равномерного распределения в гидрогеле. Показано, что через 46 ч описанные сфероиды полностью сливаются; выявлено, что для биопечати лучше использовать сфероиды на 5-е сутки культивирования, чем на 7-е сутки	[107]
Печень	Первичные гепатоциты мыши	Децеллюляризованный матрикс, полученный из печени свиньи + желатин + гиалуроновая кислота + CaCl <sub>2</sub> Гиалуроновая кислота + альгинат + желатин	На первом этапе получали сфероиды из гепатоцитов размером 160–220 мкм, смешанных с децеллюляризованным матриксом печени. Затем полученными сфероидами печатали соплом 120 мкм с использованием гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты, альгината и желатина	Получена функциональная модель печени <i>in vitro</i> для оценки токсичности лекарственных средств. Показано, что заключение сфероидов в матрикс печени способствует получению более адекватной модели, так как увеличивает чувствительность биоэквивалента к гепатотоксичным препаратам, а также стимулирует экспрессию печеночных генов	[127]
Хрящевая ткань	Хондроциты ушной раковины кролика	Желатин метакрилат (GelMA) 10% Полиэтилен оксид 1%	Сфероиды из хондроцитов с содержанием 500 клеток в цилиндрических конструктах (диаметр 10 мм, длина 2,5 мм), по 275 сфероидов на конструкт	Получен функциональный эквивалент хрящевой ткани, который спустя 4 нед после трансплантации стимулировал отложение гликозаминогликанов и коллагена II типа. Спустя	[128]

Модель	Тип клеток	Тип гидрогелей	Характеристика модели	Результаты	Литература
				12 нед имплантированный эквивалент имел строение, схожее с натуральной хрящевой тканью с типичной морфологией хондроцитов и внеклеточным матриксом	
Печень	Эндотелиальные клетки C166 Первичные гепатоциты мыши	Желатин метакрилат (GelMA)	Биопечать самоорганизованными сфероидными из гепатоцитов и эндотелиальных клеток поверх заранее сформированного полимерного каркаса, имеющего аналоги сосудов, заселенных сфероидными из эндотелиальных клеток	Получен функциональный васкуляризованный биоэквивалент печени, экспрессирующий характерные маркеры, а также сохраняющий жизнеспособность и стимулирующий неоваскуляризацию в течение двух недель после его трансплантации мыши	[129]
Щитовидная железа	Тироциты Эндотелиальные клетки (аллантаоиса)	Коллаген	Сфероиды из тироцитов и эндотелиальных клеток размером около 390 и 490 мкм соответственно	Получен функциональный васкуляризованный эквивалент щитовидной железы, способный нормализовать уровень тироксина в крови и температуру тела после подсадки под капсулу почки мышам с гипотиреозом	[130]
<b>Лазерная биопечать</b>					
Хрящевая ткань	Клетки надкостницы человека	Коллаген	Биопечать сфероидными из клеток надкостницы человека размером 150 и 300 мкм, которые предварительно подвергались дифференцировке в хондрогенном направлении в течение 3, 7 и 14 дней	Получен многослойный биоэквивалент хрящевой ткани. Показано, что для лазерной печати оптимальными являются сфероиды размером 150 мкм, предварительно дифференцированные в хондрогенном направлении в течение 7 дней. Выбраны оптимальные настройки лазера для снижения деградации сфероидов. Разработана система target and shoot, позволяющая использовать для биопечати сфероиды размером около 300 мкм, а также целенаправленно выбирать сфероиды из суспензии для печати	[131]
Сфероиды в гидрогеле	Полученные из пуповинной крови МСК человека	ПЭГ-фибрин + гиалуроновая кислота	Биопечать сфероидными размером 150 мкм	Проведен анализ влияния настроек и способов лазерного переноса сфероидов на их жизнеспособность	[132]
<b>Аспирационная биопечать</b>					
Костная ткань	МСК костного мозга Моноциты ТНР-1, дифференцированные в остеокласты	Альгинат	Биопечать сфероидными из МСК (400–800 мкм), дифференцированными в течение 28 дней в остеогенном направлении, а также сфероидными из совместной культуры МСК и моноцитов (2:1 и 3:2) (250–600 мкм), одновременно дифференцированными в направлении остеобластов и остеокластов. Для аспирации использовали сопло с диаметром 200 мкм	Получен биоэквивалент костной ткани для изучения процессов ремоделирования кости. Подобран оптимальный состав микрогеля на основе альгината для снижения деформации сфероидов, вызванной механическими характеристиками гидрогеля, а также для увеличения скорости их слияния. Показано, что сфероиды, дифференцированные в остеогенном направлении, сливаются медленнее	[106]
Хрящевая ткань	МСК		<i>Стратегия 1.</i> Биопечать 3-дневными сфероидными из МСК (150–450 мкм) с последующим	Получен биоэквивалент хрящевой ткани. Показано, что наиболее эффективным является подход	[108]



Модель	Тип клеток	Тип гидрогелей	Характеристика модели	Результаты	Литература
			извлечением конструктора на 4-е сутки и хондрогенной дифференцировкой в течение 20 дней <i>Стратегия 2.</i> Биопечать 3-дневными сфероидными из МСК, предварительно дифференцированными в хондрогенном направлении в течение 19 дней, с последующей биопечатью и извлечением конструктора из гидрогеля	с предварительной дифференцировкой МСК сфероидов в хондрогенном направлении перед их использованием для биопечати. Это связано с тем, что накопление ВКМ при такой дифференцировке приводит к увеличению сфероидов, а также поверхностного натяжения клеток, что критически важно при аспирационной биопечати, так как влияет на сохранность сфероидов. Показано также, что в этом случае получается более зрелая хрящевая ткань по сравнению с эквивалентом, полученным при печати МСК-сфероидными	
Костная ткань	МСК		<i>Стратегия 1.</i> Сфероиды из МСК, дифференцированные в остеогенном направлении в течение 14 дней <i>Стратегия 2.</i> Дифференцировка МСК в монослое (7 дней) с последующей дифференцировкой в сфероиде (7 дней) <i>Стратегия 3.</i> Дифференцировка МСК в монослое (12 дней) с последующей дифференцировкой в сфероиде (2 дня)	Получен биоэквивалент костной ткани. Показано, что использование сфероидов для биопечати, дифференцированных в остеогенном направлении, является неэффективным подходом, так как накопление ВКМ негативно влияет на их способность к слиянию. Оптимальной стратегией является дифференцировка МСК в остеогенном направлении в монослое и затем краткосрочное 3D-культивирование перед биопечатью. В этом случае сфероиды лучше сливаются и формируют целостный и более зрелый костный биоэквивалент	[108]
Сердце	ИПСК Фибробласты сердца МСК костного мозга	Модифицированная гиалуроновая кислота	МСК-сфероиды размером 200–400 мкм (5000 и 10000 клеток соответственно) Кардиосфероиды (5000 клеток), полученные путем смешения кардиомиоцитов из ИПСК и фибробластов в соотношении 4:1 для моделирования здоровой и 1:4 для моделирования фиброзной сердечной ткани	Разработана функциональная модель очагового фиброза сердца. Благодаря точной биопечати получена микроткань сердца путем слияния здоровых и фиброзных сфероидов в определенном соотношении. Показано влияние фиброзных рубцов на электрофизиологические свойства ткани. Микроткань из здоровых сфероидов имела увеличенную амплитуду сокращения по сравнению с фиброзной. Показана возможность использовать данную модель для тестирования препаратов на основе микроРНК Использованы гидрогели, которые локально разрушаются при печати, что снижает напряжение сдвига, оказываемое на сфероид и, следовательно, уменьшает их деформацию. После печати такие гидрогели могут восстановить свою структуру При печати сфероидов на расстоянии ~50 мкм через 4 дня происходило их слияние. Особенности гидрогеля	[105]

Модель	Тип клеток	Тип гидрогелей	Характеристика модели	Результаты	Литература
				позволяют извлечь из него созревший конструктор без механического нарушения	
Костная ткань	MCK HUVEC	Фибрин	Сфероиды из MCK и HUVEC в соотношении 1:1 размером около 400 мкм <i>Стратегия 1.</i> Биопечать 2-дневными сфероидными, слияние в течение 3 дней и последующая индукция остеогенной дифференцировки в течение 12 дней <i>Стратегия 2.</i> Сфероиды в течение 5 дней культивировали в стандартной среде, затем в течение 10 дней индуцировали в остеогенном направлении и использовали для биопечати конструкторов, которые в течение 2 дней также выдерживали в остеогенной среде	Получен эквивалент костной ткани. Показано, что более эффективным является подход, в котором для биопечати используют предварительно дифференцированные сфероиды, так как это позволяет получить более зрелый и стабильный конструктор	[98]
<b>Капельная биопечать</b>					
Сердце	Человеческие фибробласты сердца Кардиомиоциты человека (AC16)	Альгинат	Использовали суспензию клеток	Разработана модель для оценки электростатических взаимодействий между кардиомиоцитами и фибробластами в сердечной ткани	[133]
Печень	Гепатоциты из ИПСК Эмбриональные стволовые клетки	Альгинат	Использовали суспензию клеток	Получены функциональные эквиваленты печени, сохраняющие жизнеспособность в течение 17 сут культивирования и экспрессирующие такие печеночные маркеры, как альбумин и HNF4a	[134]
Альвеолы	Эндотелиальные клетки (EA.hy926) Клетки альвеолярного эпителия II типа (A549)	Матригель	Использовали суспензию клеток	Получена <i>in vitro</i> модель альвеол легких, состоящих из эндотелиальных клеток, базальной мембраны и эпителиальных клеток	[135]
<b>Метод Kenzan</b>					
Сосуды	HUVEC Гладкомышечные клетки аорты Дермальные фибробласты человека	Без гидрогеля	Сфероиды размером около 600 мкм из эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток аорты и дермальных фибробластов человека были нанизаны на иглы диаметром 170 мкм, находящиеся на расстоянии 400 мкм	Получен механически прочный и зрелый биоэквивалент сосуда размером 1,5 мм в диаметре и 7 мм в длину, сохраняющий свою целостность после имплантации крысам	[136]
Эндометриоз	Эпителиальные клетки эндометрия (12Z) Иммортализованные стромальные клетки, выделенные из матки пациентки с незлокачествен-	Без гидрогеля	Гетеросфероиды размером 500 мкм с эпителиальными клетками (12Z) на поверхности и стромальными клетками (T-HESCs) в центральной зоне сфероиды Моносфероиды из 12Z и T-HESCs	Получена функциональная модель эндометриоза и эндометриотического микроокружения <i>in vitro</i>	[137]

Модель	Тип клеток	Тип гидрогелей	Характеристика модели	Результаты	Литература
	венными миомами (T-HESCс) Клетки рака яичника (HEYA8)				

### Экструзионная биопечать

Одним из самых первых и простых методов биопечати является экструзионный, который заключается в выдавливании вязкого материала из картриджа биопринтера согласно определенной программе, задающей давление, скорость, температуру и 3D-модель биопечати. Это быстрый и легко масштабируемый способ, который позволяет получать конструкторы с высокой клеточной плотностью и сохранять жизнеспособность клеток на уровне около 70–80% [138]. Однако разрешение такой печати составляет около 100–200 мкм, что значительно ниже, чем у аспирационной и лазерной биопечати [139]. По сравнению с другими технологиями данный метод является самым универсальным и может быть использован с разными типами сфероидов и гидрогелей. Однако он не применим для сфероидов большого размера, которые могут засорять сопло, к тому же механическое сдавливание приводит к гибели поверхностных клеток. Сфероиды маленького размера при использовании часто распределяются в гидрогеле неравномерно, и это приводит к тому, что они находятся далеко друг от друга, хуже сливаются и не формируют необходимую структуру конструктора.

Впервые возможность экструзионной биопечати с использованием сфероидов была показана в 2004 году в научной группе под руководством российского ученого Владимира Миронова [140]. С тех пор в этой сфере достигнуты большие успехи. Например, с использованием сфероидов из клеток щитовидной железы и эндотелиальных клеток аллантаоиса получена функционирующая щитовидная железа мыши, которая после трансплантации под почечную капсулу поддерживала уровень тироксина в крови и температуру тела [130]. Особое внимание уделяется биопечати эквивалентов печени, например для тестирования гепатотоксических лекарственных препаратов. С помощью сфероидов, состоящих из эндотелиальных клеток, МСК и гепатоцитов, получен жизнеспособный конструктор печени, клетки которого не только экспрессируют печеночные белки, но также продуцируют мочевины и альбумин, т.е. сохраняют функциональность [141]. В исследовании [127] гепатоциты мыши были предварительно инкапсулированы в децеллюляризованный матрикс печени, что привело к формированию зрелого и функционального биоэквивалента, гораздо более чувствительного к гепатотоксичным препаратам по сравнению с обычными гепатосфероидом.

Много исследований посвящено биопечати сердечной ткани. Ученым уже удалось добиться сократимости сфероидов, полученных из совместной культуры кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов [142]. Разработана функциональная модель очагового фиброза сердца для изучения электрофизиологических свойств ткани и тестирования лекарств [105]. Сфероиды из МСК жировой ткани в составе напечатанных конструкций используют для регенерации мягких тканей вследствие поддержки ангиогенеза [130, 143], а также для инженерии костной ткани [144, 145]. Сфероиды из МСК и HUVEC, инкапсулированные в гидрогель из коллагена и фибрина, формируют конструкторы, которые эффективно дифференцируются в остеогенном направлении и формируют разветвленную сосудистую сеть по сравнению с суспензией тех же клеток в гидрогеле [146]. Получены биоэквиваленты хрящевой ткани [107, 128]. Довольно много исследований посвящено моделям различных раковых заболеваний [147]. Получен биоэквивалент для изучения взаимодействия между раковыми клетками и жировой тканью [125], а также между эпителиальными и эндотелиальными клетками [126] в модели рака молочной железы человека.

### Аспирационная биопечать

Принцип аспирационной биопечати заключается в захвате одного сфероида путем аспирации и в переносе его на точную позицию в каркасе или гидрогеле. Погрешность размещения сфероида составляет не более 11–15% по отношению к его размеру [98]. Данный метод дает возможность работать со сфероидом разного размера, а также с разными механическими характеристиками, так как позволяет подобрать определенную силу аспирации, чтобы избежать деформации сфероида. В исследовании 2020 г. подробно описан механизм выбора аспирационной силы при биопечати в зависимости от механических характеристик сфероидов (вязкоупругих свойств и поверхностного натяжения). Для этого были проанализированы механические и вязкоупругие свойства сфероидов размером 200–600 мкм из клеток эндотелия вены пуповины человека (HUVEC), фибробластов мыши (3T3), клеток рака молочной железы мыши (4T1), фибробластов кожи человека (HDF) и совместной культуры МСК человека и HUVEC, а также описано соответствие этих характеристик оптимальной аспирационной силе и времени биопечати [98].

Метод аспирационной биопечати успешно применялся для создания костной [106, 108], хрящевой [108], сердечной [105] и других тканей. Показано, что для получения хрящевых эквивалентов наиболее эффективным является подход, при котором выполняют предварительную дифференцировку МСК-сфероидов в хондрогенном направлении и уже затем их используют для биопечати. Это связано с тем, что накопление ВКМ при хондродифференцировке приводит к увеличению размера сфероидов, а также к возрастанию силы поверхностного натяжения клеток, что критически важно при аспирационной биопечати, так как влияет на сохранность сфероидов [108]. При получении костного эквивалента установлено, что более эффективной является биопечать с использованием недифференцированных сфероидов из МСК с их последующим слиянием и дальнейшей остеодифференцировкой целого конструкта. Это объясняется тем, что высокое содержание ВКМ значительно увеличивает поверхностное натяжение в клетках сфероида и не дает им слиться в полноценный конструкт [108]. Однако в исследовании [98], в котором для получения эквивалента костной ткани использовали совместную культуру МСК и HUVEC, более зрелый конструкт был получен из смешанных сфероидов, предварительно дифференцированных в остеогенном направлении.

С помощью аспирационной биопечати в недавнем исследовании [105] была получена функциональная модель очагового фиброза сердца путем слияния здоровых (из кардиомиоцитов) и фиброзных (из кардиомиоцитов и фибробластов) сфероидов в определенном соотношении. Показаны влияние фиброзных рубцов на электрофизиологические свойства ткани, а также возможность использования данной модели для тестирования препаратов на основе микроРНК. Благодаря высокой точности позиционирования сфероидов при аспирационной биопечати изучено влияние расстояния между сфероидами на их функциональный потенциал. Установлено, что сфероиды из HUVEC, находящиеся ближе друг к другу (400 мкм), формируют более разветвленную сеть отростков по сравнению с группой, где расстояние между сфероидами составляет 3000 мкм.

### Лазерная биопечать

Лазерная биопечать в основном применяется для печати суспензией клеток [148] и позволяет манипулировать объектами с высокой точностью (до 1 мкм), использовать широкий диапазон вязкости биочернил [149] и обеспечивать высокую жизнеспособность клеток после биопечати. Технология, основанная на индуцированном лазером переносе клеток (laser-induced forward transfer, LIFT), впервые была успешно использована для печати сфероидами в 2023 г., когда стало понятно, что сфероиды из МСК пупочного канатика человека размером около 150 мкм могут

быть с высокой точностью напечатаны с использованием гидрогеля [132]. В данном исследовании был также проведен анализ влияния настроек и способов лазерного переноса сфероидов на их жизнеспособность [132].

Принцип лазерной биопечати заключается в создании каплей с клетками либо сфероидами, которые под действием импульса лазера переносятся от «донора» к «реципиенту». В качестве донорской подложки обычно используется предметное стекло, покрытое тонким металлическим слоем, поглощающим энергию, а также слоем биочернил (клетки или сфероиды с гидрогелем). Энергия лазера поглощается металлическим слоем в точке его фокусировки. При этом энергопоглощающий слой нагревается и испаряется, формируется пузырек, который выталкивает из слоя струю гидрогеля с клетками или сфероидами. После этого капля попадает на акцепторную подложку, перемещаясь по струе биочернил, где формирует конструкт. Такой способ обеспечивает высокую скорость печати, точность перемещения клеток, а также их выживаемость. Однако условия переноса нужно подбирать в зависимости от типа гидрогеля и клеток [132].

Поскольку это довольно новый метод, пока мало исследований, описывающих применение лазерной биопечати со сфероидами. Есть еще одно исследование 2024 г., где лазерная биопечать успешно применена для создания тканевых эквивалентов хрящевой ткани с использованием сфероидов из клеток надкостницы, предварительно дифференцированных в хондрогенном направлении в течение 7 дней [131].

### Капельная биопечать

Капельная биопечать впервые была разработана в 2000-х гг., когда научная группа под руководством Накамуры из университета Тоямы оптимизировала обычный принтер для бумаги и сделала его совместимым с клетками и вязкими гидрогелевыми чернилами [150]. Первыми конструктами, напечатанными таким способом, стали трубчатые структуры, состоящие из клеток HeLa. Капельная биопечать обладает высоким разрешением, сопоставимым с лазерной биопечатью, и является одним из самых простых, быстрых и дешевых методов [151]. Помимо этого капельная биопечать может быть использована для нанесения биочернил непосредственно в область дефекта за счет распыления капель с клетками, что важно для восстановления глубоких ран, ожогов и других поверхностных дефектов [152].

Однако капельная биопечать имеет довольно много недостатков. Одной из самых частых проблем является засорение сопла. Так как его диаметр обычно составляет 10–150 мкм, данный метод несовместим с использованием крупных объектов, например сфероидов >150 мкм, а также с вязкими гидрогелями [153]. Поэтому при капельной биопечати клетки



обычно переносят в составе обычной питательной среды и печатают на поверхность гидрогеля [154]. Капельная биопечать также часто используется для получения самих сфероидов [155] и по принципу действия напоминает метод «висячей капли». При использовании капельной биопечати есть возможность получать сфероиды заданного размера, сразу инкапсулированные в определенный гидрогель [156].

Для биопечати сфероидами данный метод используется очень редко, так как сфероиды имеют диаметр, превышающий размер сопла, а сама технология печати не позволяет получить конструкт с высокой клеточной плотностью и, как следствие, с высокой механической прочностью [157].

Несмотря на описанные выше ограничения, есть несколько примеров успешной капельной биопечати. Например, с использованием гидрогеля на основе альгината были разработаны функциональные биоэквиваленты печени, состоящие из гепатоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а также из эмбриональных стволовых клеток человека. Через 17 дней после биопечати получен функциональный конструкт, экспрессирующий такие печеночные маркеры, как альбумин и HNF4a [134]. Альгинатный гидрогель является оптимальным для капельной биопечати, так как получается путем смешения двух жидких компонентов: альгината и хлорида кальция, которые при смешивании формируют вязкий гидрогель. Это решает проблему засорения сопла.

В исследовании [135] капельная биопечать использована для получения *in vitro* модели альвеол легких, состоящих из эндотелиальных клеток, базальной мембраны и эпителиальных клеток. Для этого был напечатан биоэквивалент, состоящий из клеток альвеолярного эпителия II типа (A549) и эндотелиальных клеток (EA.hy926), разделенных между собой матригелем. Показано, что в отличие от ручного метода замешивания биопечать позволяет создать гомогенные клеточные слои.

Методом капельной биопечати была получена модель для оценки электростатических взаимодействий между кардиомиоцитами и фибробластами в сердечной ткани, при этом использовали два типа клеток: фибробласты сердца и кардиомиоциты человека [133].

Однако во всех описанных выше исследованиях для биопечати была использована суспензия клеток, а не сфероиды.

### Метод Kenzan

Слово «кензан» (kenzan) пришло из японской культуры и дословно переводится как «гора из мечей». Это держатель из множества игл, предназначенный для фиксации растений при создании цветочных композиций. Японские исследователи предложили использовать аналогичные конструкции для фиксации

сфероидов и получения микротканей [158]. Данный способ позволяет расположить сфероиды на поверхности предварительно спроектированного конструкта с точностью до 1 мкм. Конструкт представляет собой временную опору, состоящую из микроигл из нержавеющей стали, которые могут быть извлечены после слияния сфероидов и формирования должной структурной организации.

В настоящее время известен один коммерчески доступный биопринтер, принцип которого основан на методе Kenzan. Это японский биопринтер Bio-3D Printer, имеющий размер микроигл примерно 160 мкм в диаметре, которые расположены на расстоянии 500 мкм. Чтобы сфероиды в такой системе контактировали и сливались, их размер должен быть не менее 400–600 мкм. Этот метод очень редко применяется для биопечати, хотя он особенно удобен для получения трубчатых структур, например сосудов, трахеи и уретры. Для получения сосудистых структур методом Kenzan сфероиды размером около 600 мкм из эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток аорты и дермальных фибробластов человека нанизывали на иглы диаметром 170 мкм, находящиеся на расстоянии 400 мкм. Спустя четыре дня культивирования сфероиды сливались, формировали зрелый конструкт, иглы извлекались. Сформированные сосуды имели размер 1,5 мм в диаметре и 7 мм в длину. Они были механически прочными и сохраняли свою структурную целостность после имплантации крысам [136].

Есть несколько успешных исследований, где такая технология применялась для создания уретры и трахеи, однако их результаты пока не опубликованы, а только представлены в виде докладов на конференциях. В исследовании [137] таким методом получена функциональная модель эндометриоза. При этом использованы сфероиды размером около 500 мкм из эпителиальных клеток, полученных из матки с эндометриозом (линия клеток 12Z), а также из клеточной линии эпителия рака яичника (HEYA8).

### Заключение

Биопечать с использованием сфероидов в качестве клеточного компонента биочернил является перспективным направлением регенеративной медицины. В сфероидах клетки формируют комплексы межклеточных контактов, синтезируют внеклеточный матрикс, эффективнее дифференцируются в заданном направлении и адаптируются к гипоксии [27–29]. Вследствие этого биоэквиваленты, сформированные с использованием сфероидов, проявляют гораздо более высокую жизнеспособность и функционально-дифференцировочный потенциал по сравнению с конструктами, которые были напечатаны с использованием суспензии клеток [122, 140].

Созревание биоэквивалентов после печати происходит либо за счет слияния сфероидов, либо

путем миграции клеток и формирования отростков. Тот или иной тип созревания зависит от того, на каком расстоянии находятся сфероиды, а также от их механических свойств. Сфероиды из МСК жировой ткани сливаются, если находятся на расстоянии менее 100 мкм друг от друга, а на расстоянии более 400 мкм формируют отростки по направлению друг к другу [124]. Сфероиды из эндотелиальных клеток при высокой плотности печати также формируют более разветвленную сеть отростков [105].

Сфероидам из мезенхимальных клеток свойственно накапливать внеклеточный матрикс, поэтому чем дольше срок их культивирования, тем хуже они будут сливаться в итоговом биоэквиваленте [107]. Остеогенная и хондрогенная дифференцировка МСК приводит к увеличению жесткости и накоплению внеклеточного матрикса, поэтому такие сфероиды не сливаются после биопечати. Многие исследователи рекомендуют дифференцировать тканеинженерный конструкт после первичной стадии созревания, т.е. после слияния сфероидов. В этом случае формируется более целостная структура со свойствами микрооткани [106, 108]. Однако при аспирационной печати, напротив, лучше использовать сфероиды, предварительно дифференцированные в остеогенном и хондрогенном направлении, так как в этом случае высокое поверхностное натяжение позволяет сохранить их от механического разрушения при аспирации [108]. Аналогично это показано и для лазерной биопечати [131].

Самым популярным методом остается экструзионная биопечать. Это быстрый и легко масштабируемый способ, который позволяет сохранить жизнеспособность клеток на уровне около 70–80% [138, 139]. Однако при экструзионной биопечати достаточно сложно получить эквивалент с высокой клеточной плотностью и четким распределением сфероидов, что приводит к неравномерному созреванию эквивалентов. Помимо этого экструзионная биопечать обладает достаточно низким разрешением и не подходит для тех случаев, когда нужно поместить сфероид в точно заданную позицию при воспроизведении сложной архитектуры ткани.

Наибольшим разрешением обладают аспирационная и лазерная биопечать. Аспирационная биопечать позволяет разместить сфероид с погрешностью не более 11–15% по отношению к его размеру [98]. Высокая точность позволяет помещать сфероиды близко друг к другу и четко контролировать расстояние между ними, а также механизм созревания эквивалента (слияние, миграция или формирование отростков). Однако это очень медленный метод, и на перемещение одного сфероида уходит около 20 с [159]. Перемещение сфероидов здесь осуществляется за счет аспирационных сил, которые необходимо четко подбирать в зависимости от механических свойств объекта. Для снижения деформации лучше всего использовать более зрелые сфероиды с высоким содержанием внеклеточного матрикса. Однако

в этом случае созревание эквивалента будет проходить дольше, так как сфероиды будут хуже сливаться [98, 106, 108]. Лазерная биопечать позволяет расположить сфероиды с точностью до 1 мкм, а также обеспечивает высокую жизнеспособность клеток [148, 149]. Этот метод преимущественно используется для биопечати клетками и со сфероидными примесями всего в нескольких исследованиях.

Метод Kenzan также обладает высоким разрешением (до 1 мкм) и позволяет расположить сфероиды в непосредственной близости друг от друга, что приводит к формированию плотной микрооткани. Однако он накладывает ограничения на размер сфероидов и не может использоваться с объектами в диаметре меньше, чем 400 мкм. При этом для большинства сфероидов показано, что оптимальным является размер 200–300 мкм. В ином случае снижается жизнеспособность клеток в центральной зоне сфероида. Кроме того, метод Kenzan не позволяет создавать биоэквиваленты сложной формы и применим в основном для печати простых плоских или трубчатых структур [136, 158].

Таким образом, при выборе способа биопечати важно обращать внимание на такие ключевые параметры, как фенотип клеток, входящих в состав сфероидов, их механические характеристики, желаемую клеточную плотность финального тканевого эквивалента и степень дифференцировки сфероидов. Для печати плотных, сложноорганизованных биоэквивалентов лучше отдать предпочтение аспирационной и лазерной биопечати, так как эти методы позволяют позиционировать сфероиды с высокой точностью и при плотном контакте. Если необходимо печатать эквиваленты крупного размера, то лучше использовать экструзионную биопечать, так как это один из самых простых и быстрых методов.

Безусловно, при использовании метода биопечати требуется учитывать множество нюансов и, к сожалению, не существует четко сформулированных правил, соблюдение которых позволило бы гарантированно получить необходимый тканевый эквивалент. Тем не менее технология биопечати с применением сфероидов представляет собой один из самых перспективных методов в области тканевой инженерии. В ближайшем будущем метод, безусловно, будет оптимизирован для создания биоэквивалентов различных типов, что откроет новые возможности как для заместительной терапии, так и для разработки адекватных моделей, позволяющих тестировать эффективность и безопасность лекарственных препаратов.

**Вклад авторов.** Д.П. Ревокатова — написание разделов «Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки», «Эпителиальные клетки», «Преимущества 3D-культивирования», «Механические свойства сфероидов», «Биопечать сфероидными»; П.И. Котенева — написание раздела «Формирование сфероидов» и создание иллюстраций; Н.В. Кошелева

лева — руководство написанием текста и создание плана статьи; А.И. Шпичка — финальное редактирование текста; П.С. Тимашев — разработка концепции статьи.

**Благодарность.** Исследование проведено на научной базе лаборатории, созданной в рамках Программы академического лидерства «Приоритет 2030».

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по грантовому соглашению №075–15–2024–640 (Сеченовский университет).

**Конфликта интересов** нет.

## Литература/References

- Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 2009; 30(12): 2164–2174, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.084>.
- Kosheleva N.V., Efremov Y.M., Koteneva P.I., Ilina I.V., Zurina I.M., Bikmulina P.Y., Shpichka A.I., Timashev P.S. Building a tissue: mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro- and nanoscale. *Acta Biomater* 2023; 165: 140–152, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.051>.
- Jeon S., Lee H.S., Lee G.Y., Park G., Kim T.M., Shin J., Lee C., Oh I.H. Shift of EMT gradient in 3D spheroid MSCs for activation of mesenchymal niche function. *Sci Rep* 2017; 7(1): 6859, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07049-3>.
- Фриденштейн А.Я., Петракова К.В., Куролесова А.И., Фролова Г.П. Клетки предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга. *Цитология* 1968; 5: 557–567.  
Fridenshteyn A.Ya., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. Progenitor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Analysis of heterotopic bone marrow transplants. *Tsitologiya* 1968; 5: 557–567.
- Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641–650, <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- Costa L.A., Eiro N., Fraile M., Gonzalez L.O., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F.J. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78(2): 447–467, <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>.
- Gao F., Chiu S.M., Motan D.A., Zhang Z., Chen L., Ji H.L., Tse H.F., Fu Q.L., Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; 7(1): e2062, <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
- Han Y., Li X., Zhang Y., Han Y., Chang F., Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells* 2019; 8(8): 886, <https://doi.org/10.3390/cells8080886>.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317, <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 12, <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
- Lee Y.C., Chan Y.H., Hsieh S.C., Lew W.Z., Feng S.W. Comparing the osteogenic potentials and bone regeneration capacities of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial bone defect model. *Int J Mol Sci* 2019; 20(20): 5015, <https://doi.org/10.3390/ijms20205015>.
- Baksh D., Yao R., Tuan R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25(6): 1384–1392, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>.
- Cho S.W., Sun H.J., Yang J.Y., Jung J.Y., Choi H.J., An J.H., Kim S.W., Kim S.Y., Park K.J., Shin C.S. Human adipose tissue-derived stromal cell therapy prevents bone loss in ovariectomized nude mouse. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(9–10): 1067–1078, <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0355>.
- Otabe K., Muneta T., Kawashima N., Suda H., Tsuji K., Sekiya I. Comparison of gingiva, dental pulp, and periodontal ligament cells from the standpoint of mesenchymal stem cell properties. *Cell Med* 2012; 4(1): 13–21, <https://doi.org/10.3727/215517912X653319>.
- Roato I., Chinigò G., Genova T., Munaron L., Mussano F. Oral cavity as a source of mesenchymal stem cells useful for regenerative medicine in dentistry. *Biomedicines* 2021; 9(9): 1085, <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091085>.
- Fabre H., Ducret M., Degoul O., Rodriguez J., Perrier-Groult E., Aubert-Foucher E., Padeloup M., Auxenfans C., McGuckin C., Forraz N., Mallein-Gerin F. Characterization of different sources of human MSCs expanded in serum-free conditions with quantification of chondrogenic induction in 3D. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 2186728, <https://doi.org/10.1155/2019/2186728>.
- Guillot C., Lecuit T. Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science* 2013; 340(6137): 1185–1189, <https://doi.org/10.1126/science.1235249>.
- Fuest M., Yam G.H., Mehta J.S., Duarte Campos D.F. Prospects and challenges of translational corneal bioprinting. *Bioengineering (Basel)* 2020; 7(3): 71, <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030071>.
- Nie N., Gong L., Jiang D., Liu Y., Zhang J., Xu J., Yao X., Wu B., Li Y., Zou X. 3D bio-printed endometrial construct restores the full-thickness morphology and fertility of injured uterine endometrium. *Acta Biomater* 2023; 157: 187–199, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.12.016>.
- Torras N., Zabalo J., Abril E., Carré A., García-Díaz M., Martínez E. A bioprinted 3D gut model with crypt-villus structures to mimic the intestinal epithelial-stromal microenvironment. *Biomater Adv* 2023; 153: 213534, <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213534>.
- Urkasemsin G., Rungarunlert S., Ferreira J.N. Bioprinting strategies for secretory epithelial organoids. *Methods Mol Biol* 2020; 2140: 243–249, [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_16).



22. Llorián-Salvador M., Byrne E.M., Szczepan M., Little K., Chen M., Xu H. Complement activation contributes to subretinal fibrosis through the induction of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in retinal pigment epithelial cells. *J Neuroinflammation* 2022; 19(1): 182, <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02546-3>.
23. Gołąbek-Grenda A., Olejnik A. In vitro modeling of endometriosis and endometriotic microenvironment — challenges and recent advances. *Cell Signal* 2022; 97: 110375, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110375>.
24. Zhu M., Iwano T., Takeda S. Fallopian tube basal stem cells reproducing the epithelial sheets in vitro-stem cell of fallopian epithelium. *Biomolecules* 2020; 10(9): 1270, <https://doi.org/10.3390/biom10091270>.
25. Deniz Derman I., Yeo M., Castaneda D.C., Callender M., Horvath M., Mo Z., Xiong R., Fleming E., Chen P., Peeples M.E., Palucka K., Oh J., Ozbolat I.T. High-throughput bioprinting of the nasal epithelium using patient-derived nasal epithelial cells. *Biofabrication* 2023; 15(4): 044103, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aced23>.
26. Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv* 2016; 34(8): 1427–1441, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>.
27. Langhans S.A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol* 2018; 9: 6, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
28. Pontes Soares C., Midlej V., de Oliveira M.E., Benchimol M., Costa M.L., Mermelstein C. 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS One* 2012; 7(5): e38147, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038147>.
29. Ryu N.E., Lee S.H., Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells* 2019; 8(12): 1620, <https://doi.org/10.3390/cells8121620>.
30. Shen H., Cai S., Wu C., Yang W., Yu H., Liu L. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture and future development. *Micromachines (Basel)* 2021; 12(1): 96, <https://doi.org/10.3390/mi12010096>.
31. Chiba M., Yokoyama C., Okada M., Hisatomi H. Mitochondrial DNA reduced by hypoxic conditions in three-dimensional (3D) spheroid cell cultures. *Tumour Biol* 2014; 35(12): 12689–12693, <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2593-6>.
32. Benien P., Swami A. 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncol* 2014; 10(7): 1311–1327, <https://doi.org/10.2217/fon.13.274>.
33. Yannarelli G., Pacienza N., Cuniberti L., Medin J., Davies J., Keating A. Brief report: The potential role of epigenetics on multipotent cell differentiation capacity of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2013; 31(1): 215–220, <https://doi.org/10.1002/stem.1262>.
34. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro. *Bull Exp Biol Med* 2014; 158(1): 137–144, <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2709-4>.
35. Pochampally R. Colony forming unit assays for MSCs. *Methods Mol Biol* 2008; 449: 83–91, [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1_6).
36. Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J Cell Mol Med* 2014; 18(10): 2009–2019, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12336>.
37. Bartosh T.J., Ylöstalo J.H., Mohammadipoor A., Bazhanov N., Coble K., Claypool K., Lee R.H., Choi H., Prockop D.J. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(31): 13724–13729, <https://doi.org/10.1073/pnas.1008117107>.
38. Gorkun A.A., Revokatova D.P., Zurina I.M., Nikishin D.A., Bikmulina P.Y., Timashev P.S., Shpichka A.I., Kosheleva N.V., Kolokoltsova T.D., Saburina I.N. The duo of osteogenic and angiogenic differentiation in ADSC-derived spheroids. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 572727, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.572727>.
39. Gorkun A.A., Shpichka A.I., Zurina I.M., Koroleva A.V., Kosheleva N.V., Nikishin D.A., Butnaru D.V., Timashev P.S., Repin V.S., Saburina I.N. Angiogenic potential of spheroids from umbilical cord and adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells within fibrin gel. *Biomed Mater* 2018; 13(4): 044108, <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aac22d>.
40. Stahl A., Wenger A., Weber H., Stark G.B., Augustin H.G., Finkenzerler G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322(2): 684–692, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.175>.
41. Gurumurthy B., Bierdeman P.C., Janorkar A.V. Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose derived stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2017; 105(4): 1230–1236, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35974>.
42. Moritani Y., Usui M., Sano K., Nakazawa K., Hanatani T., Nakatomi M., Iwata T., Sato T., Ariyoshi W., Nishihara T., Nakashima K. Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Periodontol Res* 2018; 53(5): 870–882, <https://doi.org/10.1111/jre.12577>.
43. Murphy K.C., Hoch A.I., Harvestine J.N., Zhou D., Leach J.K. Mesenchymal stem cell spheroids retain osteogenic phenotype through  $\alpha 2\beta 1$  signaling. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(9): 1229–1237, <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0412>.
44. Сабурина И.Н., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Горкун А.А., Пулин А.А., Еремин И.И., Зорин В.Л., Копнин П.Б. Динамика изменения миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2018; 62(4): 111–119.
- Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Gorkun A.A., Pulin A.A., Eremin I.I., Zorin V.L., Kopnin P.B. The dynamics of changes in myogenic potential of stromal cells from alveolar oral mucosa in 2D and 3D culture. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2018; 62(4): 111–119.



45. Yamaguchi Y., Ohno J., Sato A., Kido H., Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnol* 2014; 14: 105, <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0105-9>.
46. Müller A.M., Mehrkens A., Schäfer D.J., Jaquiere C., Güven S., Lehmicke M., Martinetti R., Farhadi I., Jakob M., Scherberich A., Martin I. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater* 2010; 19: 127–135, <https://doi.org/10.22203/ecm.v019a13>.
47. Zurina I.M., Shpichka A.I., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Grebenik E.A., Kuznetsova D.S., Zhang D., Rochev Y.A., Butnaru D.V., Zharikova T.M., Istranova E.V., Zhang Y., Istranov L.P., Timashev P.S. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro. *Biomed Mater* 2018; 13(5): 054104, <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aace1c>.
48. Grisanti S., Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(2): 391–405.
49. Репин В.С., Сабурина И.Н. *Клеточная биология развития*. Под ред. Деева Р.В. М; 2010.  
Repin V.S., Saburina I.N. *Kletochnaya biologiya razvitiya* [Developmental cell biology]. Pod red. Deeva R.V. [Deev R.V. (editor)]. Moscow; 2010.
50. Haghwerdi F., Khozaei Ravari M., Taghiyar L., Shamekhi M.A., Jahangir S., Haririan I., Baghaban Eslaminejad M. Application of bone and cartilage extracellular matrices in articular cartilage regeneration. *Biomed Mater* 2021; 16(4): 10.1088/1748-605X/ac094b, <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac094b>.
51. Al-Juboori A.A.A., Ghosh A., Jamaluddin M.F.B., Kumar M., Sahoo S.S., Syed S.M., Nahar P., Tanwar P.S. Proteomic analysis of stromal and epithelial cell communications in human endometrial cancer using a unique 3D co-culture model. *Proteomics* 2019; 19(21–22): e1800448, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800448>.
52. Hong X., Xu Y., Pang S.W. Enhanced motility and interaction of nasopharyngeal carcinoma with epithelial cells in confined microwells. *Lab Chip* 2023; 23(3): 511–524, <https://doi.org/10.1039/d2lc00616b>.
53. Hong H.K., Yun N.H., Jeong Y.L., Park J., Doh J., Lee W.Y., Cho Y.B. Establishment of patient-derived organotypic tumor spheroid models for tumor microenvironment modeling. *Cancer Med* 2021; 10(16): 5589–5598, <https://doi.org/10.1002/cam4.4114>.
54. Haykal M.M., Nahmias C., Varon C., Martin O.C.B. Organotypic modeling of the tumor landscape. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 606039, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.606039>.
55. Ludwig K., Tse E.S., Wang J.Y. Colon cancer cells adopt an invasive phenotype without mesenchymal transition in 3-D but not 2-D culture upon combined stimulation with EGF and crypt growth factors. *BMC Cancer* 2013; 13: 221, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-221>.
56. Lazzari G., Couvreur P., Mura S. Multicellular tumor spheroids: a relevant 3D model for the in vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. *Polymer Chemistry* 2017; 8(34): 4947–4969, <https://doi.org/10.1039/c7py00559h>.
57. Kosheleva N.V., Efremov Y.M., Shavkuta B.S., Zurina I.M., Zhang D., Zhang Y., Minaev N.V., Gorkun A.A., Wei S., Shpichka A.I., Saburina I.N., Timashev P.S. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. *Sci Rep* 2020; 10(1): 12614, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69540-8>.
58. Hildebrandt C., Büth H., Thielecke H. A scaffold-free in vitro model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2011; 43(2): 91–100, <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.12.004>.
59. Caprio N.D., Burdick J.A. Engineered biomaterials to guide spheroid formation, function, and fabrication into 3D tissue constructs. *Acta Biomater* 2023; 165: 4–18, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.052>.
60. Lee B.H., Kim M.H., Lee J.H., Seliktar D., Cho N.J., Tan L.P. Modulation of Huh7.5 spheroid formation and functionality using modified PEG-based hydrogels of different stiffness. *PLoS One* 2015; 10(2): e0118123, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118123>.
61. Lee Y.B., Kim E.M., Byun H., Chang H.K., Jeong K., Aman Z.M., Choi Y.S., Park J., Shin H. Engineering spheroids potentiating cell-cell and cell-ECM interactions by self-assembly of stem cell microlayer. *Biomaterials* 2018; 165: 105–120, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.049>.
62. Schliwa M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J Cell Biol* 1982; 92(1): 79–91, <https://doi.org/10.1083/jcb.92.1.79>.
63. Zhou Y., Chen H., Li H., Wu Y. 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. *J Cell Mol Med* 2017; 21(6): 1073–1084, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12946>.
64. Vyas V., Solomon M., D'Souza G.G.M., Huey B.D. Nanomechanical analysis of extracellular matrix and cells in multicellular spheroids. *Cell Mol Bioeng* 2019; 12(3): 203–214, <https://doi.org/10.1007/s12195-019-00577-0>.
65. Kim S.A., Lee E.K., Kuh H.J. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Exp Cell Res* 2015; 335(2): 187–196, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.016>.
66. Smyrek I., Mathew B., Fischer S.C., Lissek S.M., Becker S., Stelzer E.H.K. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biol Open* 2019; 8(1): bio037051, <https://doi.org/10.1242/bio.037051>.
67. Gryadunova A.A., Koudan E.V., Rodionov S.A., Pereira F.D.A.S., Meteleva N.Y., Kasyanov V.A., Parfenov V.A., Kovalev A.V., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A. Cytoskeleton systems contribute differently to the functional intrinsic properties of chondrospheres. *Acta Biomater* 2020; 118: 141–152, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.007>.
68. Cai G., Li X., Lin S.S., Chen S.J., Rodgers N.C., Koning K.M., Bi D., Liu A.P. Matrix confinement modulates 3D spheroid sorting and burst-like collective migration. Preprint. *bioRxiv* 2024; 2023.07.23.549940, <https://doi.org/10.1101/2023.07.23.549940>.
69. Stadler M., Scherzer M., Walter S., Holzner S., Pudelko K., Riedl A., Unger C., Kramer N., Weil B., Neesen J., Hengstschläger M., Dolznig H. Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Sci Rep* 2018; 8(1): 1151, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19384-0>.

70. Saemundsson S.A., Ganguly S., Curry S.D., Goodwin A.P., Cha J.N. Controlling cell organization in 3D coculture spheroids using DNA interactions. *ACS Biomater Sci Eng* 2023; 9(6): 3185–3192, <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.3c00546>.
71. Bijonowski B. *Spatiotemporal regulation of cell-cell adhesions*. IntechOpen; 2022, <https://doi.org/10.5772/intechopen.97009>.
72. Nakamura M., Shinji T., Ujike K., Hirasaki S., Koide N., Tsuji T. Cytoskeletal inhibitors, anti-adhesion molecule antibodies, and lectins inhibit hepatocyte spheroid formation. *Acta Med Okayama* 2002; 56(1): 43–50, <https://doi.org/10.18926/AMO/31727>.
73. Tzanakakis E.S., Hansen L.K., Hu W.S. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; 48(3): 175–189, [https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200103\)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200103)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2).
74. Toda S., Blauch L.R., Tang S.K.Y., Morsut L., Lim W.A. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling. *Science* 2018; 361(6398): 156–162, <https://doi.org/10.1126/science.aat0271>.
75. Hoffecker I.T., Iwata H. Manipulation of cell sorting within mesenchymal stromal cell-islet cell multicellular spheroids. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(11–12): 1643–1653, <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0305>.
76. Perez J.E., Jan A., Villard C., Wilhelm C. Surface tension and neuronal sorting in magnetically engineered brain-like tissue. *Adv Sci (Weinh)* 2023; 10(27): e2302411, <https://doi.org/10.1002/advs.202302411>.
77. Gomez G.A., McLachlan R.W., Yap A.S. Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends Cell Biol* 2011; 21(9): 499–505, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.05.006>.
78. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 2017; 14(127): 20160877, <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
79. Geiger B., Spatz J.P., Bershadsky A.D. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(1): 21–33, <https://doi.org/10.1038/nrm2593>.
80. Zheng Y., Pan D. The hippo signaling pathway in development and disease. *Dev Cell* 2019; 50(3): 264–282, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.003>.
81. Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giullitti S., Michielin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 2013; 154(5): 1047–1059, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>.
82. Smith L.R., Cho S., Discher D.E. Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics. *Physiology (Bethesda)* 2018; 33(1): 16–25, <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2017>.
83. Rutkovskiy A., Stenslkken K.O., Vaage I.J. Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res* 2016; 22: 95–106, <https://doi.org/10.12659/msmbr.901142>.
84. Wijelath E.S., Rahman S., Namekata M., Murray J., Nishimura T., Mostafavi-Pour Z., Patel Y., Suda Y., Humphries M.J., Sobel M. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res* 2006; 99(8): 853–860, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000246849.17887.66>.
85. Schenk S., Hintermann E., Bilban M., Koshikawa N., Hojilla C., Khokha R., Quaranta V. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol* 2003; 161(1): 197–209, <https://doi.org/10.1083/jcb.200208145>.
86. Johns M.M., Garrett C.G., Hwang J., Ossoff R.H., Courey M.S. Quality-of-life outcomes following laryngeal endoscopic surgery for non-neoplastic vocal fold lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113(8): 597–601, <https://doi.org/10.1177/000348940411300801>.
87. Cross S.E., Jin Y.S., Rao J., Gimzewski J.K. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol* 2007; 2(12): 780–783, <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.388>.
88. Efremov Y.M., Kotova S.L., Timashev P.S. Viscoelasticity in simple indentation-cycle experiments: a computational study. *Sci Rep* 2020; 10(1): 13302, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70361-y>.
89. Krivega E.S., Kotova S.L., Timashev P.S., Efremov Y.M. Mechanical characterization of soft biomaterials: which time and spatial scale to choose? *Soft Matter* 2024; 20(26): 5095–5104, <https://doi.org/10.1039/d4sm00530a>.
90. Vazquez O.R., Avila I.O., Díaz J.C.S., Hernandez E. An overview of mechanical tests for polymeric biomaterial scaffolds used in tissue engineering. *Journal of Research Updates in Polymer Science* 2016; 4(4): 168–178, <https://doi.org/10.6000/1929-5995.2015.04.04.1>.
91. Efremov Y.M., Dokrunova A.A., Efremenko A.V., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853(11 Pt B): 3117–3125, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.008>.
92. Fuentes-Caparrs A.M., Dietrich B., Thomson L., Chauveau C., Adams D.J. Using cavitation rheology to understand dipeptide-based low molecular weight gels. *Soft Matter* 2019; 15(31): 6340–6347, <https://doi.org/10.1039/c9sm01023h>.
93. Jorgenson A.J., Choi K.M., Sicard D., Smith K.M., Hiemer S.E., Varelas X., Tschumperlin D.J. TAZ activation drives fibroblast spheroid growth, expression of profibrotic paracrine signals, and context-dependent ECM gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2017; 312(3): C277–C285, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00205.2016>.
94. Blumlein A., Williams N., McManus J.J. The mechanical properties of individual cell spheroids. *Sci Rep* 2017; 7(1): 7346, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07813-5>.
95. Baraniak P.R., Cooke M.T., Saeed R., Kinney M.A., Fridley K.M., McDevitt T.C. Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012; 11: 63–71, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.018>.
96. Schroyen B., Vlassopoulos D., Van Puyvelde P., Vermant J. Bulk rheometry at high frequencies: a review of experimental approaches. *Rheol Acta* 2020; 59, 1–22, <https://doi.org/10.1007/s00397-019-01172-w>.
97. Guevorkian K., Colbert M.J., Durth M., Dufour S., Brochard-Wyart F. Aspiration of biological viscoelastic

- drops. *Phys Rev Lett* 2010; 104(21): 218101, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.218101>.
98. Ayan B., Heo D.N., Zhang Z., Dey M., Povilianskas A., Drapaca C., Ozbolat I.T. Aspiration-assisted bioprinting for precise positioning of biologists. *Sci Adv* 2020; 6(10): eaaw5111, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw5111>.
99. Foty R.A., Steinberg M.S. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol* 2005; 278(1): 255–263, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.012>.
100. Kim M.H., Takeuchi K., Kino-Oka M. Role of cell-secreted extracellular matrix formation in aggregate formation and stability of human induced pluripotent stem cells in suspension culture. *J Biosci Bioeng* 2019; 127(3): 372–380, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.08.010>.
101. Guimarães C.F., Gasperini L., Marques A.P., Reis R.L. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nature Reviews Materials* 2020; 5(5): 351–370, <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0169-1>.
102. Padhi A., Nain A.S. ECM in differentiation: a review of matrix structure, composition and mechanical properties. *Ann Biomed Eng* 2020; 48(3): 1071–1089, <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02337-7>.
103. Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010; 463(7280): 485–492, <https://doi.org/10.1038/nature08908>.
104. Pegoraro A.F., Janmey P., Weitz D.A. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9(11): a022038, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038>.
105. Daly A.C., Davidson M.D., Burdick J.A. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nat Commun* 2021; 12(1): 753, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21029-2>.
106. Kim M.H., Banerjee D., Celik N., Ozbolat I.T. Aspiration-assisted freeform bioprinting of mesenchymal stem cell spheroids within alginate microgels. *Biofabrication* 2022; 14(2): 10.1088/1758-5090/ac4dd8, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac4dd8>.
107. Decarli M.C., Seijas-Gamardo A., Morgan F.L.C., Wieringa P., Baker M.B., Silva J.V.L., Moraes Â.M., Moroni L., Mota C. Bioprinting of stem cell spheroids followed by post-printing chondrogenic differentiation for cartilage tissue engineering. *Adv Healthc Mater* 2023; 12(19): e2203021, <https://doi.org/10.1002/adhm.202203021>.
108. Ayan B., Celik N., Zhang Z., Zhou K., Kim M.H., Banerjee D., Wu Y., Costanzo F., Ozbolat I.T. Aspiration-assisted freeform bioprinting of prefabricated tissue spheroids in a yield-stress gel. *Commun Phys* 2020; 3: 183, <https://doi.org/10.1038/s42005-020-00449-4>.
109. Efremov Y.M., Zurina I.M., Presniakova V.S., Kosheleva N.V., Butnaru D.V., Svistunov A.A., Rochev Y.A., Timashev P.S. Mechanical properties of cell sheets and spheroids: the link between single cells and complex tissues. *Biophys Rev* 2021; 13(4): 541–561, <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00821-w>.
110. Dechristé G., Fehrenbach J., Griseti E., Lobjois V., Poinard C. Viscoelastic modeling of the fusion of multicellular tumor spheroids in growth phase. *J Theor Biol* 2018; 454: 102–109, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.05.005>.
111. Foty R.A., Pflieger C.M., Forgacs G., Steinberg M.S. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* 1996; 122(5): 1611–1620, <https://doi.org/10.1242/dev.122.5.1611>.
112. Jakab K., Damon B., Marga F., Doaga O., Mironov V., Kosztin I., Markwald R., Forgacs G. Relating cell and tissue mechanics: implications and applications. *Dev Dyn* 2008; 237(9): 2438–2449, <https://doi.org/10.1002/dvdy.21684>.
113. Kosheleva N.V., Iliina I.V., Kozhina K.V., Zurina I.M., Roskova A.E., Gorkun A.A., Ovchinnikov A.V., Agranat M.B., Morozov S.G., Saburina I.N. Cellular model based on laser microsurgery of cell spheroids to study the repair process. *Russian Journal of Developmental Biology* 2017; 48(1): 56–64, <https://doi.org/10.1134/s1062360417010076>.
114. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation in vitro. *CARTILAGE* 2018; 11(4): 521–531, <https://doi.org/10.1177/1947603518798890>.
115. Mayor R., Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(2): 97–109, <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>.
116. Belair D.G., Wolf C.J., Wood C., Ren H., Grindstaff R., Padgett W., Swank A., MacMillan D., Fisher A., Winnik W., Abbott B.D. Engineering human cell spheroids to model embryonic tissue fusion in vitro. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184155, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184155>.
117. Forte E., Chimenti I., Rosa P., Angelini F., Pagano F., Calogero A., Giacomello A., Messina E. EMT/MET at the crossroad of stemness, regeneration and oncogenesis: the Ying-Yang equilibrium recapitulated in cell spheroids. *Cancers (Basel)* 2017; 9(8): 98, <https://doi.org/10.3390/cancers9080098>.
118. Matai I., Kaur G., Seyedsalehi A., McClinton A., Laurencin C.T. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials* 2020; 226: 119536, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536>.
119. Mandrycky C., Wang Z., Kim K., Kim D.H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv* 2016; 34(4): 422–434, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>.
120. Unagolla J.M., Jayasuriya A.C. Hydrogel-based 3D bioprinting: a comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl Mater Today* 2020; 18: 100479, <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100479>.
121. Yusupov V., Churbanov S., Churbanova E., Bardakova K., Antoshin A., Evlashin S., Timashev P., Minaev N. Laser-induced forward transfer hydrogel printing: a defined route for highly controlled process. *Int J Bioprint* 2020; 6(3): 271, <https://doi.org/10.18063/ijb.v6i3.271>.
122. Benmeridja L., De Moor L., De Maere E., Vanlauwe F., Ryx M., Tytgat L., Vercruyse C., Dubruel P., Van Vlierberghe S., Blondeel P., Declercq H. High-throughput fabrication of vascularized adipose microtissues for 3D bioprinting. *J Tissue Eng Regen Med* 2020; 14(6): 840–854, <https://doi.org/10.1002/term.3051>.



- 123.** De Moor L., Smet J., Plovyt M., Bekaert B., Vercruyse C., Asadian M., De Geyter N., Van Vlierberghe S., Dubruel P., Declercq H. Engineering microvasculature by 3D bioprinting of prevascularized spheroids in photo-crosslinkable gelatin. *Biofabrication* 2021; 13(4): 10.1088/1758-5090/ac24de, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac24de>.
- 124.** Kim S.J., Byun H., Lee S., Kim E., Lee G.M., Huh S.J., Joo J., Shin H. Spatially arranged encapsulation of stem cell spheroids within hydrogels for the regulation of spheroid fusion and cell migration. *Acta Biomater* 2022; 142: 60–72, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.01.047>.
- 125.** Horder H., Guaza Lasheras M., Grummel N., Nadernezhad A., Herbig J., Ergün S., Teßmar J., Groll J., Fabry B., Bauer-Kreisel P., Blunk T. Bioprinting and differentiation of adipose-derived stromal cell spheroids for a 3D breast cancer-adipose tissue model. *Cells* 2021; 10(4): 803, <https://doi.org/10.3390/cells10040803>.
- 126.** Swaminathan S., Hamid Q., Sun W., Clyne A.M. Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models. *Biofabrication* 2019; 11(2): 025003, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aafc49>.
- 127.** Kim M.K., Jeong W., Jeon S., Kang H.W. 3D bioprinting of dECM-incorporated hepatocyte spheroid for simultaneous promotion of cell-cell and -ECM interactions. *Front Bioeng Biotechnol* 2023; 11: 1305023, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1305023>.
- 128.** Liu R., Jia L., Chen J., Long Y., Zeng J., Liu S., Pan B., Liu X., Jiang H. Chondrocyte spheroid-laden microporous hydrogel-based 3D bioprinting for cartilage regeneration. *International Journal of Bioprinting* 2023, <https://doi.org/10.36922/ijb.0161>.
- 129.** Jiang Z., Jin B., Liang Z., Wang Y., Ren S., Huang Y., Li C., Sun H., Li Y., Liu L., Li N., Wang J., Cui Z., Huang P., Yang H., Mao Y., Ye H. Liver bioprinting within a novel support medium with functionalized spheroids, hepatic vein structures, and enhanced post-transplantation vascularization. *Biomaterials* 2024; 311: 122681, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122681>.
- 130.** Bulanova E.A., Koudan E.V., Degosserie J., Heymans C., Pereira F.D., Parfenov V.A., Sun Y., Wang Q., Akhmedova S.A., Sviridova I.K., Sergeeva N.S., Frank G.A., Khesuani Y.D., Pierreux C.E., Mironov V.A. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct. *Biofabrication* 2017; 9(3): 034105, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa7fdd>.
- 131.** Hall G.N., Fan Y., Viellerobe B., Iazzolino A., Dimopoulos A., Poirion C., Clapies A., Luyten F.P., Guillemot F., Papantoniu I. Laser-assisted bioprinting of targeted cartilaginous spheroids for high density bottom-up tissue engineering. *Biofabrication* 2024; 16(4): 10.1088/1758-5090/ad6e1a, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ad6e1a>.
- 132.** Minaeva E.D., Antoshin A.A., Kosheleva N.V., Koteneva P.I., Gonchukov S.A., Tsykina S.I., Yusupov V.I., Timashev P.S., Minaev N.V. Laser bioprinting with cell spheroids: accurate and gentle. *Micromachines (Basel)* 2023; 14(6): 1152, <https://doi.org/10.3390/mi14061152>.
- 133.** Khoury R.E., Nagiah N., Mudloff J.A., Thakur V., Chattopadhyay M., Joddar B. 3D bioprinted spheroidal droplets for engineering the heterocellular coupling between cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Cyborg Bionic Syst* 2021; 2021: 9864212, <https://doi.org/10.34133/2021/9864212>.
- 134.** Faulkner-Jones A., Fyfe C., Cornelissen D.J., Gardner J., King J., Courtney A., Shu W. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D. *Biofabrication* 2015; 7(4): 044102, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/044102>.
- 135.** Horváth L., Umehara Y., Jud C., Blank F., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting. *Sci Rep* 2015; 5: 7974, <https://doi.org/10.1038/srep07974>.
- 136.** Itoh M., Nakayama K., Noguchi R., Kamohara K., Furukawa K., Uchihashi K., Toda S., Oyama J., Node K., Morita S. Scaffold-free tubular tissues created by a bio-3D printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in rat aortae. *PLoS One* 2015; 10(9): e0136681, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136681>.
- 137.** Wendel J.R.H., Wang X., Smith L.J., Hawkins S.M. Three-dimensional biofabrication models of endometriosis and the endometriotic microenvironment. *Biomedicine* 2020; 8(11): 525, <https://doi.org/10.3390/biomedicine8110525>.
- 138.** Murphy S.V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 2014; 32(8): 773–785, <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
- 139.** Ozbolat I., Hospodiuk M., Pan N., Moncal K.K., Akkouch A. A bioprinted pancreatic tissue model with multiscale vascularization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2016; 4, <https://doi.org/10.3389/conf.fbioe.2016.01.01105>.
- 140.** Jakab K., Neagu A., Mironov V., Markwald R.R., Forgacs G. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(9): 2864–2869, <https://doi.org/10.1073/pnas.0400164101>.
- 141.** Goulart E., de Caires-Junior L.C., Telles-Silva K.A., Araujo B.H.S., Rocco S.A., Sforca M., de Sousa I.L., Kobayashi G.S., Musso C.M., Assoni A.F., Oliveira D., Caldini E., Raia S., Lelkes P.I., Zatz M. 3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability in vitro. *Biofabrication* 2019; 12(1): 015010, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab4a30>.
- 142.** Polonchuk L., Suriya L., Lee M.H., Sharma P., Liu Chung Ming C., Richter F., Ben-Sefer E., Rad M.A., Mahmodi Sheikh Sarmast H., Shamery W.A., Tran H.A., Vettori L., Haeusermann F., Filipe E.C., Rnjak-Kovacina J., Cox T., Tipper J., Kabakova I., Gentile C. Towards engineering heart tissues from bioprinted cardiac spheroids. *Biofabrication* 2021; 13(4): 10.1088/1758-5090/ac14ca, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac14ca>.
- 143.** Pati F., Ha D.H., Jang J., Han H.H., Rhie J.W., Cho D.W. Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration. *Biomaterials* 2015; 62: 164–175, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.043>.
- 144.** Tytgat L., Van Damme L., Van Hoorick J., Declercq H., Thienpont H., Ottevaere H., Blondeel P., Dubruel P., Van Vlierberghe S. Additive manufacturing of photo-crosslinked gelatin scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomater* 2019; 94: 340–350, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.062>.



145. Ahmad T., Shin H.J., Lee J., Shin Y.M., Perikamana S.K.M., Park S.Y., Jung H.S., Shin H. Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral-coated nanofibers and human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater* 2018; 74: 464–477, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.035>.
146. Heo D.N., Hospodiuk M., Ozbolat I.T. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2019; 95: 348–356, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.046>.
147. Zhuang P., Chiang Y.H., Fernanda M.S., He M. Using spheroids as building blocks towards 3D bioprinting of tumor microenvironment. *Int J Bioprint* 2021; 7(4): 444, <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i4.444>.
148. Ovsianikov A., Gruene M., Pflaum M., Koch L., Maiorana F., Wilhelm M., Haverich A., Chichkov B. Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication* 2010; 2(1): 014104, <https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/1/014104>.
149. Antoshin A.A., Churbanov S.N., Minaev N.V., Zhang D., Zhang Y., Shpichka A.I., Timashev P.S. LIFT-bioprinting, is it worth it? *Bioprinting* 2019; 15: e00052, <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00052>.
150. Nishiyama Y., Nakamura M., Henmi C., Yamaguchi K., Mochizuki S., Nakagawa H., Takiura K. Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology. *J Biomech Eng* 2009; 131(3): 035001, <https://doi.org/10.1115/1.3002759>.
151. Mironov V., Trusk T., Kasyanov V., Little S., Swaja R., Markwald R. Biofabrication: a 21<sup>st</sup> century manufacturing paradigm. *Biofabrication* 2009; 1(2): 022001, <https://doi.org/10.1088/1758-5082/1/2/022001>.
152. Skardal A., Mack D., Kapetanovic E., Atala A., Jackson J.D., Yoo J., Soker S. Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(11): 792–802, <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0088>.
153. Ozbolat I.T., Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* 2016; 76: 321–343, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>.
154. Gurkan U.A., El Assal R., Yildiz S.E., Sung Y., Trachtenberg A.J., Kuo W.P., Demirci U. Engineering anisotropic biomimetic fibrocartilage microenvironment by bioprinting mesenchymal stem cells in nanoliter gel droplets. *Mol Pharm* 2014; 11(7): 2151–2159, <https://doi.org/10.1021/mp400573g>.
155. Liu C., Chen Y., Chen H., Zhang P. Droplet-based bioprinting for fabrication of tumor spheroids. *International Journal of Bioprinting* 2024; 10(1): 1214, <https://doi.org/10.36922/ijb.1214>.
156. Kotlarz M., Ferreira A.M., Gentile P., Russell S.J., Dalgarno K. Droplet-based bioprinting enables the fabrication of cell–hydrogel–microfibre composite tissue precursors. *Bio-Design and Manufacturing* 2022; 5(3): 512–528, <https://doi.org/10.1007/s42242-022-00192-5>.
157. Gudapati H., Dey M., Ozbolat I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: past, present and future. *Biomaterials* 2016; 102: 20–42, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.012>.
158. Moldovan N.I., Hibino N., Nakayama K. Principles of the Kenzan method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part B Rev* 2017; 23(3): 237–244, <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2016.0322>.
159. Heo D.N., Ayan B., Dey M., Banerjee D., Wee H., Lewis G.S., Ozbolat I.T. Aspiration-assisted bioprinting of co-cultured osteogenic spheroids for bone tissue engineering. *Biofabrication* 2020; 13(1): 10.1088/1758-5090/abc1bf, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/abc1bf>.