

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-272>

УДК 57.085.2:547.917



БИОСОВМЕСТИМЫЕ ГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КРАХМАЛА В КАЧЕСТВЕ ЧЕРНИЛ ДЛЯ 3D-ПЕЧАТИ

Е.А. Малик¹, Ю.А. Нащекина², И.А. Барсук^{3,4,5}, К.П. Головкин^{4,5}, В.Е. Александров^{4,6}, В.Ю. Елоховский⁷, В.Е. Юдин⁷¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия³Главное военно-медицинское управление Министерства обороны Российской Федерации, Москва, Россия⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия⁵Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия⁶Санкт-Петербургский государственный педиатрический университет, Санкт-Петербург, Россия⁷Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Носители, предназначенные для культивирования и трансплантации клеток, находят широкое применение в современной тканевой инженерии. Создание чернил для печати таких носителей позволяет в широких пределах варьировать их форму и архитектуру. Хитозан — природный полимер, который уже находит применение в различных областях регенеративной медицины. Скаффолды на его основе являются искусственным прототипом внеклеточного матрикса *in vitro*. Метод трехмерной печати позволит максимально приблизить структуру такого матрикса к свойствам нативной ткани. Однако для улучшения качества печати необходимо как разработать состав чернил на основе хитозана, так и подобрать оптимальные параметры печати.

Цель. Разработка биосовместимых чернил на основе хитозана с оптимальными реологическими свойствами, пригодными для 3D-печати.

Материалы и методы. В исследовании для создания биочернил применялся хитозан фирмы BiologHerpe (Германия) с молекулярной массой 164 кДа и степенью деацетиляции 92,5%. Для модификации биочернил использовали крахмал фирмы Merck (Германия). Для получения трехмерных матриц применяли метод экструзионной 3D-биопечати. В работе использовали 3D-биопринтер фирмы Rokit Invivo (Республика Корея), в котором установлено программное обеспечение Android OS. 3D-печатные матрицы изготавливали из биочернил с различным содержанием хитозана: 4 и 6%. Для исследования биосовместимости печатных конструкций проводили посев культуры мезенхимальных стволовых клеток кролика.

Результаты. Чернила на основе хитозана и крахмала продемонстрировали увеличение вязкости раствора и наилучшие характеристики напечатанных конструкций. Улучшение реологических параметров, оптимальных для печати, происходит при увеличении концентрации хитозана в растворе до 6%, а также при добавлении в раствор крахмала с аналогичной концентрацией. Исследование *in vitro* также показало биосовместимость напечатанных конструкций по отношению к мезенхимным стромальным клеткам.

Выводы. Разработанные чернила могут быть использованы для формирования скаффолдов методом трехмерной печати.

Ключевые слова: биочернила; гидрогель; хитозан; крахмал; биосовместимость; 3D-печать

Для цитирования: Малик Е.А., Нащекина Ю.А., Барсук И.А., Головкин К.П., Александров В.Е., Елоховский В.Ю., Юдин В.Е. Биосовместимые гели на основе хитозана и крахмала в качестве чернил для 3D-печати. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):88–96. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-272>

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20120).

Соответствие принципам этики: исследование выполнено с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Исследование одобрено на заседании локального Биоэтического комитета Института цитологии РАН (протокол № Ф18-00380, от 09.07.2018).

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Барсук Илья Александрович barsuk20220@gmail.com

Статья поступила: 27.09.2024 После доработки: 10.02.2025 Принята к публикации: 14.02.2025 Online first: 06.03.2025

BIOCOMPATIBLE CHITOSAN- AND STARCH-BASED GELS FOR 3D PRINTABLE INKS

Elena A. Malik¹, Yuliya A. Nashchekina², Ilya A. Barsuk^{3,4,5}, Konstantin P. Golovko^{4,5}, Viktor N. Alexandrov^{4,6}, Vladimir Y. Elokhovskiy⁷, Vladimir E. Yudin⁷¹Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia³Main Military Medical Department of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russia⁴Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia⁵St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia⁶St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia⁷Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Introduction. Carriers intended for cell culture and transplantation are widely used in modern tissue engineering. The creation of inks for printing such media assumes a wide range of variations in their shape and architecture. Chitosan as a natural polymer is increasingly finding application in various fields of regenerative medicine. Chitosan-based scaffolds are an artificial prototype of the extracellular matrix *in vitro*. The method of 3D printing can be used to bring the structure of such a matrix as close as possible to the properties of native tissues. However, in order to achieve the desired printing quality, the task of developing a chitosan-based ink composition and selecting optimal printing parameters should be solved.

Objective. Development of a biocompatible chitosan-based ink with optimal rheological properties suitable for 3D printing.

Materials and methods. A bioink was manufactured using the chitosan produced by BiologHerpe (Germany) with a molecular weight of 164 kDa and a deacetylation degree of 92.5%. Starch produced by Merck (Germany) was used to modify the bioink. The method of 3D extrusion bioprinting was used to

© Е.А. Малик, Ю.А. Нащекина, И.А. Барсук, К.П. Головкин, В.Е. Александров, В.Ю. Елоховский, В.Е. Юдин, 2025

obtain 3D matrices by a 3D bioprinter by Rockit Invivo (Republic of Korea) equipped with the Android OS software. 3D-printed matrices were obtained from a bioink with different chitosan concentrations: 4% and 6%. Cultures of rabbit mesenchymal stem cells were seeded to study the biocompatibility of the printed structures.

Results. The developed chitosan- and starch-based inks demonstrated an increased viscosity of the solution and improved characteristics of the printed designs. The rheological parameters were optimized for printing by increasing the chitosan concentration in the solution up to 6%, as well as by introducing starch at a similar concentration into the solution. An *in vitro* study also showed the biocompatibility of the printed structures with respect to mesenchymal stromal cells.

Conclusions. The developed inks can be used to form scaffolds by 3D printing.

Keywords: bioink; hydrogel; chitosan; starch; biocompatibility; 3D printing

For citation: Malik E.A., Nashchekina Y.A., Barsuk I.A., Golovko K.P., Alexandrov V.N., Elokhovskiy V.Y., Yudin V.E. Biocompatible chitosan- and starch-based gels for 3D printable inks. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):88–96. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-272>

Funding: the research was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 21-74-20120).

Compliance with ethical standards: the study was carried out in compliance with the rules of bioethics approved by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Purposes. The study was approved by the Local Bioethical Committee of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. Ф18-00380 of 9 July 2018).

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Ilya A. Barsuk barsuk20220@gmail.com

Received: 27 Sep. 2024 **Revised:** 10 Feb. 2025 **Accepted:** 14 Feb. 2025 **Online first:** 6 Mar. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Аддитивные технологии, в число которых входит 3D-печать, являются движущей силой крупных инноваций во многих областях науки, в том числе в медицине и биологии.

В качестве материала для печати используются различные полимеры природного и синтетического происхождения, а созданные на их основе конструкции могут стать базой для изготовления функциональных трехмерных тканей [1]. Эти биоматериалы называются чернилами, они имитируют состав тканей человеческого или животного организма. Преимуществом 3D-печати является возможность воспроизведения геометрии трехмерной структуры, которая более похожа на естественную биологическую систему, чем двухмерная *in vitro* модель. Структурное сходство напечатанной конструкции может привести к более физиологически релевантным функциональным результатам. Ни одна другая технология не может обеспечить такого уровня геометрической сложности и подобию живым тканям [2].

3D-печать может применяться для создания объемных трехмерных носителей, обеспечивающих трехмерное культивирование клеток с целью их дальнейшей трансплантации в поврежденные органы и ткани [2]. Напечатанные конструкции вместе с культивируемыми на них клетками могут быть использованы в качестве моделей тканей для тестирования новых лекарственных препаратов [3].

Параметры биопечати можно определить как настройки биопринтера (входные данные встроенного программного обеспечения — ПО), которые необходимы для правильного создания 3D-печатных структур. В этом смысле для 3D-печати подходит только определенный диапазон значений, а их выбор является ключевым фактором для получения жизнеспособных структур. Эти значения зависят от состава чернил, который следует тщательно подбирать в каждом конкретном случае [4].

К основным параметрам печати относят температуру диспенсера, температуру подложки, скорость печати и параметры входящего потока (скорость и давление).

Скорость печати (движение в плоскости XY) важна, поскольку она напрямую связана с общим временем 3D-печати. Кроме того, при методе экструзионной печати поток гидрогеля (ширина нити) контролируется преимущественно за счет скорости печати и скорости ретракции. Используемые значения скорости печати варьируют от 0,2 до 150 мм/с, но наиболее часто находятся в диапазоне 1–30 мм/с [4].

Точные размеры напечатанной 3D-структуры сохраняются при правильном выборе входящего потока, который указывается в процентах. Этот параметр отвечает за количество чернил, экструдированных принтером. Калибровка входящего потока также улучшает настройки ретракции [4].

К основным свойствам чернил для 3D-печати относятся пригодность для печати, вязкоупругие свойства, биodeградируемость, цитосовместимость [5]. 3D-матрица должна имитировать биологическую среду и облегчать клеточное прикрепление, пролиферацию и рост клеток, способствовать диспергированию биоактивных молекул и факторов роста, а также содержать пространство для размещения внеклеточного матрикса [6].

В качестве чернил могут использоваться как природные, так и синтетические полимеры, однако предпочтение отдается природным материалам из-за их высокой биосовместимости, хотя они часто обладают недостаточными механическими свойствами [7]. Наиболее часто применяемыми компонентами в чернилах являются хитозан и альгинат, далее — желатин, гиалуроновая кислота, фиброин шелка и полиэтиленгликоль [8]. Гидрогели могут имитировать, например, модуль упругости мягких тканей человеческого тела. Для самых прочных тканей, таких как кости или зубы, требуются другие материалы — термopластичные полимеры с добавлением гидрогелей [8].

Хитозан является одним из перспективных материалов для 3D-печати. Хитозан имеет три типа реакционно-способных функциональных групп: аминogруппы, а также первичные и вторичные гидроксильные группы в положениях C-2, C-3 и C-6 соответственно. Положительный заряд его функциональных групп делает хитозан единственным положительно заряженным природным полисахаридом.

Следовательно, хитозан может взаимодействовать с отрицательно заряженными биомолекулами, липидами, белками, дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) и различными клеточными рецепторами, которые запускают каскад взаимосвязанных реакций в живых организмах, что обуславливает его уникальные характеристики [9]. Примером таких характеристик биочернил на основе хитозана являются хорошее взаимодействие клеток и матрицы, имитация структуры нативной ткани, создание микросреды для обмена кислородом и питательными веществами, а также благоприятный иммунный ответ после имплантации.

По данным авторов J. Huang, H. Fu et al., 3D-печатные структуры проявляли биомолекулярную адаптацию, стабильную биосовместимость и биологическую активность даже после различных постпечатных модификаций [10]. Однако хитозан обладает и некоторыми недостатками, такими как медленная скорость гелеобразования, термолабильность и низкая механическая прочность материалов на его основе.

Важно отметить, что физическая стабильность и механическая прочность чернил для 3D-печати зависят от их вязкоупругих свойств. Обеспечить вязкоупругие свойства хитозана можно за счет физических или химических методов сшивания, а также путем добавления дополнительных компонентов. Поэтому хитозан часто структурно армируется другим биополимером, в том числе полисахаридами. В качестве такого армирующего биополимера может быть использован крахмал [11]. Крахмал состоит из углеводов и обладает такими свойствами, как гидрофильность, биосовместимость, низкая стоимость, хорошая биоразлагаемость и нетоксичность [12]. Крахмал состоит из зернистой формы с линейной амилозой и большим количеством разветвленного амилопектина. Структура крахмала является полукристаллической, в которой добавление ограниченного количества воды и обработка теплом и сдвигом приведут к разрушению водородной связи. На этой стадии крахмал расплавится, и это приведет к образованию термопластичного крахмала. Таким образом, мы предположили, что сочетание таких биосовместимых и биodeградируемых биополимеров, как хитозан и крахмал, компенсирует недостатки каждого биополимера в отдельности, а их совместное использование позволит получить чернила с оптимальными характеристиками для формирования носителей с заданными структурными характеристиками методом 3D-печати. Для получения прогнозируемого результата, а именно матриц с заданными структурными характеристиками, такими как размер и высота ячеек, необходимо определить оптимальное соотношение хитозана и крахмала, а также точные параметры печати.

Цель исследования — разработка биосовместимых чернил с оптимальным соотношением хитозана и крахмала, пригодных для 3D-печати.

Таблица 1. Расчетные концентрации хитозана и крахмала в растворах

Растворы	Концентрация хитозана, %	Концентрация крахмала, %
X/K (4/0)	4	0
X/K (6/0)	6	0
X/K (4/4)	4	4
X/K (6/6)	6	6

Таблица составлена авторами по собственным данным

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения чернил использовали хитозан (BiologHerpe, Германия) с молекулярной массой 164 кДа и степенью деацетилирования 92,5% и крахмал (9005-25-8, ХЧ, Merck, Германия).

В работе использовали мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани кролика по методике [13, 14] и предоставленные Центром клеточных технологий Института цитологии РАН. Жировую ткань промывали в фосфатно-солевом буфере, затем обрабатывали коллагеназой и после инактивации коллагеназы клетки центрифугировали. Культивирование клеток проводили в питательной среде α -MEM (модифицированная среда «Игла») с добавлением L-глутамина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы Gibco, США). В работе использовали клетки 4–9 пассажей.

Методика приготовления раствора

Для получения матрицы на основе чистого хитозана и хитозана с добавлением крахмала применяли следующую методику. Хитозан перемешивали с водой при комнатной температуре в течение 15 мин на лабораторной мешалке (OSC-10L, Россия) при скорости перемешивания 1000 об/мин для получения суспензии, в которую затем добавили уксусную кислоту (в концентрации 97%, 2% от объема раствора), а также крахмал в концентрации от 0 до 6%.

Состав перемешивали в течение 1,5 ч на лабораторной мешалке (OSC-10L, Россия) со скоростью 1000 об/мин до полного растворения хитозана. Растворы с добавлением крахмала в течение 15 минут дополнительно перемешивали при температуре 100 °С на водяной бане для набухания крахмала. Объем хитозана, крахмала и уксусной кислоты рассчитывали в массовых процентах. Содержание хитозана и крахмала в растворе варьировали. Составы растворов представлены в таблице 1. Названия растворов представлены в формате X/K (4/0), где X — хитозан, K — крахмал, а в скобках — концентрация хитозана/концентрация крахмала.

Реология растворов

Зависимость сдвиговой вязкости гидрогелей от скорости деформации измеряли на реометре AntonPaar (модель Physica MCR-301, Австрия) в измерительном узле конус/плоскость CP25 [$d = 1$ mm] в сдвиговом и динамическом режимах в режимах падения и роста скорости деформации (круговой частоты). Проведен тест на релаксацию вязкости при двух скоростях сдвига: 100 и 0,01 s^{-1} .

3D-биопечать

Для получения трехмерных матриц применяли метод экструзионной 3D-биопечати. В работе использовали 3D-биопринтер фирмы RokIt Invivo (Республика Корея), в котором установлено программное обеспечение Android OS.

Для создания дизайна объемной матрицы использовали компьютерную программу для проектирования Autodesk Fusion 360, в которой создали параллелепипед со сторонами 16, 10 и 0,2 мм.

Для задания настроек 3D-принтера и преобразования созданной модели в G-код использовали программу для слайсинга NewCreator K.

Скорость печати (мм/с) — это линейная скорость движения печатного столика. Входящий поток (%) — это давление, оказываемое на гель в шприце. Выбранные параметры печати представлены в таблице 2.

В результате 3D-биопечати получали объемные матрицы. Далее их осаждали в 10% растворе гидроксида натрия в течение 5 мин, после чего промывали дистиллированной водой для удаления остатков щелочи. После этого обрабатывали 96% этанолом для дополнительной стерилизации и еще раз промывали дистиллированной водой.

Анализ качества печати

Основным параметром, описывающим качество печати, в данной работе является пригодность для печати (strand printability, SP), которая рассчитывается по формуле 1:

$$SP = 1 - \frac{D_s - D_{\text{exp}}}{D_s},$$

где D_{exp} — экспериментальный диаметр напечатанных полос (мм);

D_s — теоретически найденный стандартный диаметр (мм).

Экспериментальный диаметр напечатанного волокна измеряли в программе ImageJ. Затем рассчитывали пригодность для печати по формуле 1.

Результат печати считали удовлетворительным при $SP = 1 \pm 0,1$ [12].

В качестве стандартного диаметра D_s принимали диаметр сопла печатающей головки, равный 0,9 мм.

Измерение D_{exp} проводили 30 раз для каждого образца на разных участках матрицы с помощью программы ImageJ. Значения диаметра получали путем сравнения измеренной величины с эталоном.

Культивирование клеточных культур *in vitro*

Для исследования биосовместимости печатных конструкций проводили посев культуры мезенхимальных стволовых клеток кролика на все напечатанные матрицы. Для этого в каждую чашку Петри добавили по 300 мкл суспензии с клетками с концентрацией 5×10^5 мкл⁻¹. Далее инкубировали при 37 °C в течение 40 мин. После этого к каждому образцу добавляли по 8 мл готовой питательной среды, содержащей питательную среду α -MEM (модифицированная среда «Игла») с добавлением L-глутамина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы Gibco, США).

Культивирование клеток осуществляли в асептических условиях при постоянной температуре 37 °C, концентрации CO₂ 5% и влажности 98%. Для анализа взаимодействия клеток с матрицами были сделаны фотографии через 1 ч, 1, 3 и 7 дней от начала исследования. Все эксперименты проводились в 3–5 повторностях. Прижизненная визуализация клеток проведена с помощью фотофиксации камерой Nikon (США); размерная шкала 200 мкм.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, для оценки

Таблица 2. Параметры печати для растворов

Растворы	Скорость печати, мм/с	Входящий поток, %
X/K (4/0)	1–5	25–75
X/K (6/0)	1–5	75–125
X/K (4/4)	3–7	125–175
X/K (6/6)	3–7	125–175

Таблица составлена авторами по собственным данным

статистически значимых различий между конкретными образцами использовали *t*-тест Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные динамической вязкости образцов с разной концентрацией хитозана и крахмала демонстрируют увеличение вязкости раствора полимера с увеличением в растворе концентрации хитозана, а также концентрации крахмала, что вполне естественно (рис. 1). Переход от высокой скорости сдвига (100 с⁻¹), которая имитирует движение раствора полимера в сопле экструдера, к низкой скорости сдвига (0,01 с⁻¹), которая имитирует состояние раствора на столике печатного устройства, демонстрирует наиболее высокую способность восстановления и сохранения формы изделия для состава X/K (6/6).

В первой части эксперимента изменяли скорость печати при постоянном входящем потоке. Во второй части изменяли величину входящего потока при постоянной скорости печати.

На рисунках 2–5 изображены гистограммы, с помощью которых визуально оценивали отношение стандартного диаметра, то есть диаметра сопла (0,9 мм, светлые столбцы), к экспериментальному диаметру (яркие столбцы). Гистограммы с голубыми столбцами 2А — с изменяющейся скоростью, с фиолетовыми 2Б — с изменяющимся входящим потоком. Над столбцами подписаны значения среднего экспериментального диаметра с учетом погрешности. Над гистограммами — фотографии исследуемых образцов. Их делали с одинаковой высотой рядом с миллиметровой бумагой, что позволяет оценить реальные размеры матрицы и рассчитать экспериментальные диаметры.

Результаты показали, что наиболее приближенные значения экспериментального диаметра к стандартному для раствора с содержанием хитозана 4% и крахмала 4% (X/K– 4/4) удалось получить при установке скорости печати 3 мм/м, а входящего потока — 50%. Соответствующие данные представлены на рисунке 2.

Для раствора X/K (6/0) точное значение экспериментального диаметра было достигнуто только при установке скорости печати 3–5 мм/с и входящего потока 100%. Как и в предыдущем случае, данный диапазон можно считать достаточно узким. Соответствующие данные представлены на рисунке 3.

Для раствора X/K (4/4) получили широкий диапазон настроек, при которых экспериментальный диаметр достаточно близок к стандартному: 3–5 мм/с при 150% входящего потока и 5 мм/с при 175% входящего потока. Данные представлены на рисунке 4.

Значение экспериментального диаметра в образце X/K (6/6) оказалось самым стабильным (рис. 5) при изменении

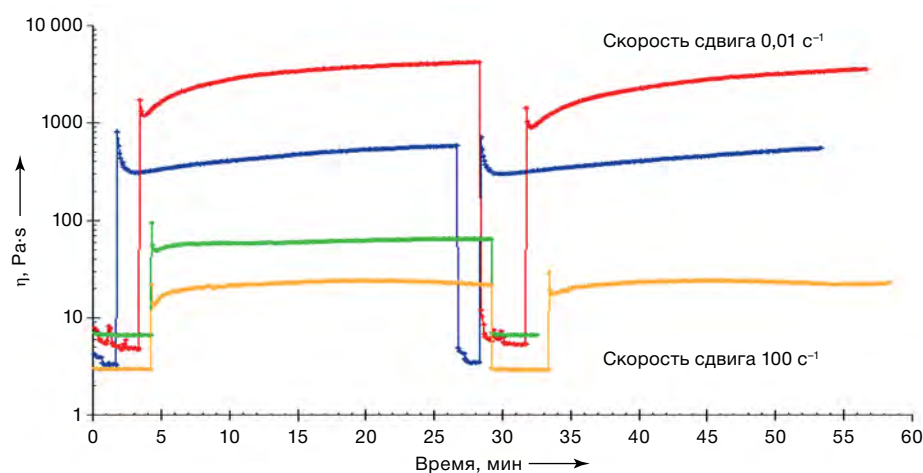


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Динамическая вязкость гидрогелей с разным соотношением хитозана/крахмала (ось X (time t) — время, мин; ось Y (η) — сдвиговая вязкость (Pa·s или Па·с))

Примечание: желтый цвет линии — содержание в растворе 4% хитозана; зеленый цвет линии — содержание в растворе 4% хитозана и 4% крахмала в соотношении 1:1; синий цвет линии — содержание в растворе 6% хитозана; красный цвет линии — содержание в растворе 6% хитозана и 6% крахмала в соотношении 1:1.

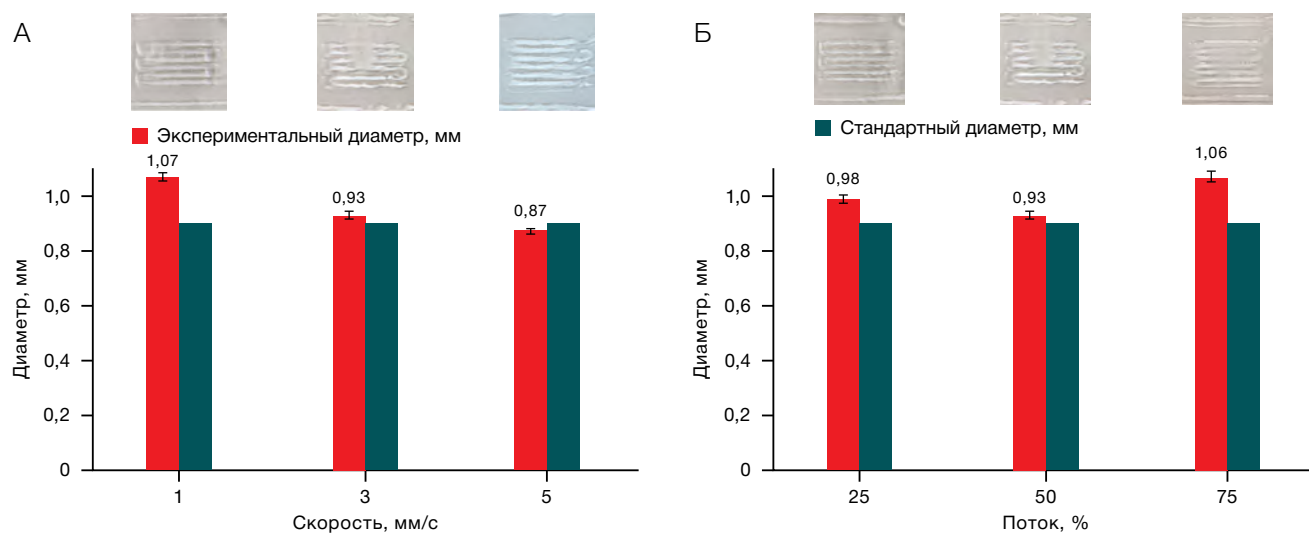


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора X/K (4/0)

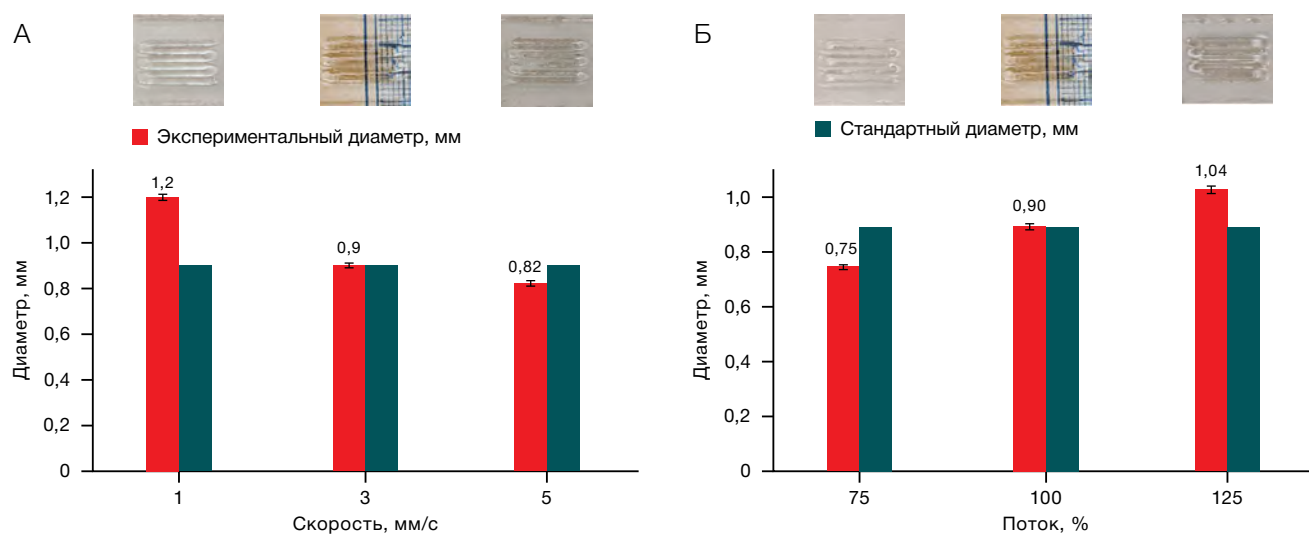


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора X/K (6/0)

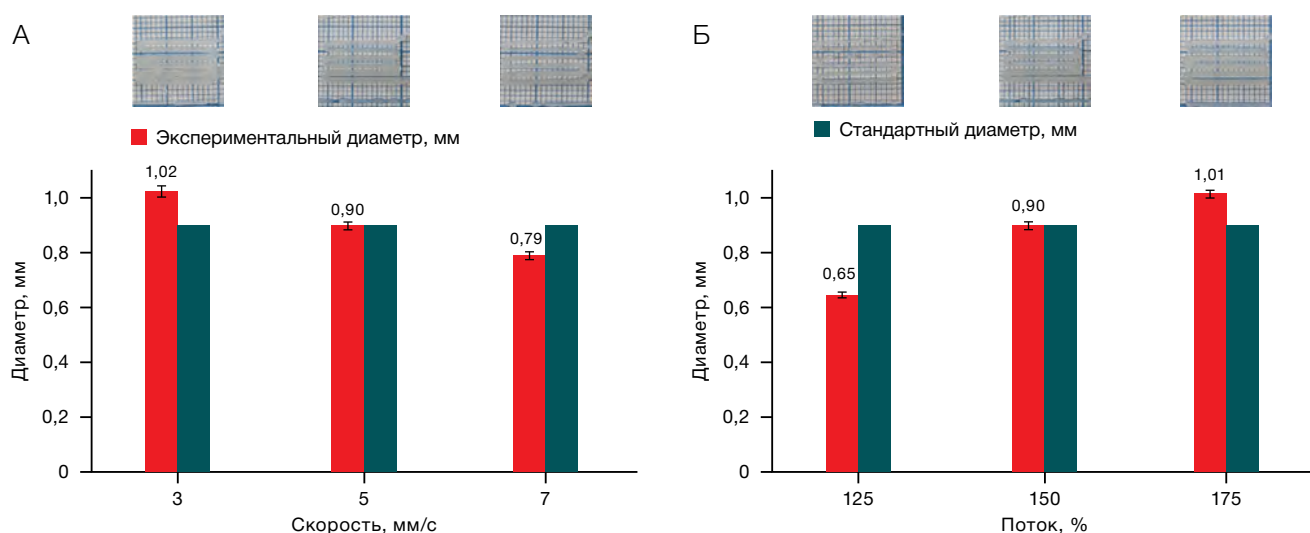


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора Х/К (4/4)

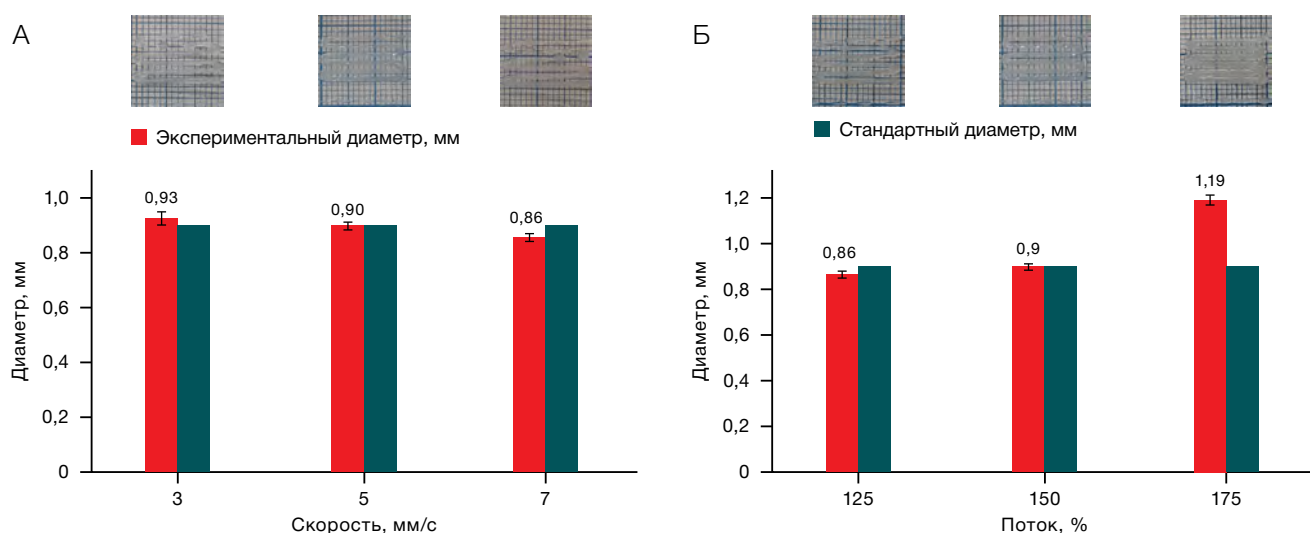


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора Х/К (6/6)

параметров печати. Таким образом, достаточно точной печати (близости реальных размеров теоретическим) можно добиться при установке скорости печати от 3 до 7 мм/с при величине входящего потока от 125 до 150%.

В таблице 3 представлены результаты вычислений пригодности для печати всех образцов.

Приемлемыми считали значения, близкие к $1,0 \pm 0,1$. Во всех группах наблюдали снижение пригодности для печати до 0,9 при увеличении скорости печати или снижении входящего потока, а в предельных случаях — нарушение целостности печатаемой конструкции. При понижении скорости печати и повышении входящего потока экспериментальный диаметр становится больше приемлемого, то есть значения пригодности для печати превышало 1,1. В некоторых случаях встречается слияние полос, что делает невозможным определение экспериментального диаметра и пригодности для печати.

Можно считать удовлетворительным результат при повышении скорости печати до 5 мм/с ($p < 0,01$) при том же значении входящего потока. Следовательно, наблюдали достаточно узкий диапазон настроек, при котором экспериментальный диаметр близок к стандартному.

При установке значения входящего потока меньше среднего (25%, $p < 0,001$) зафиксировали превышение экспериментального диаметра над стандартным, что не соответствует результатам всех остальных групп. Данное отклонение может быть объяснено неравномерным распределением биочернил по площади печатаемой конструкции из-за плохой адгезии к стеклу.

При увеличении входящего потока до 175% ($p < 0,0001$) экспериментальный диаметр превышает допустимые значения (напечатанные линии толще, чем требуется).

Таким образом, можно сделать общий вывод: при повышении скорости печати и снижении входящего потока независимо друг от друга наблюдали уменьшение толщины печатаемой линии. Обратное отмечали при понижении скорости печати и повышении входящего потока.

Пригодность для печати повышается при одновременном увеличении скорости печати и входящего потока для растворов с более высокой вязкостью (рис. 1), таких как Х/К (4/4), Х/К (6/6). Кроме того, для этих растворов характерен широкий диапазон параметров, при которых пригодность для печати близка к 1, а значит, реальные размеры матриц достаточно близки к теоретическим.

Таблица 3. Влияние скорости печати и входящего потока на пригодность для печати чернил на основе растворов хитозана и крахмала

Растворы	Скорость потока, мм/с	Входящий поток, %	Пригодность для печати
Х/К (4/0)	1	50	$1,19 \pm 0,12$
	3	50	$1,03 \pm 0,13$
	5	50	$0,97 \pm 0,10^*$
	3	25	$1,09 \pm 0,13^*$
	3	75	$1,18 \pm 0,14$
Х/К (6/0)	1	100	$1,34 \pm 0,12$
	3	75	$0,84 \pm 0,10$
	3	125	$1,15 \pm 0,12$
	5	100	$0,92 \pm 0,10$
	3	100	$1,00 \pm 0,10$
Х/К (4/4)	5	175	$1,13 \pm 0,14$
	7	150	$0,88 \pm 0,12$
	3	150	$1,14 \pm 0,15$
	5	150	$1,00 \pm 0,12$
	5	125	$0,72 \pm 0,10$
Х/К (6/6)	3	150	$1,03 \pm 0,16$
	5	125	$0,96 \pm 0,13$
	5	150	$1,00 \pm 0,13$
	7	150	$0,95 \pm 0,12$
	5	175	$1,32 \pm 0,16^*$

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: * $p < 0,01$; * $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.

Использование растворов с меньшей плотностью (Х/К (4/0), Х/К (6/0)) в качестве биочернил требует более тщательного выбора настроек печати. Для таких растворов удалось подобрать только одно значение входящего потока, при котором пригодность для печати близка к 1.

В течение 7 дней МСК культивировали как на поверхности матриц, так и рядом с напечатанными филаментами.

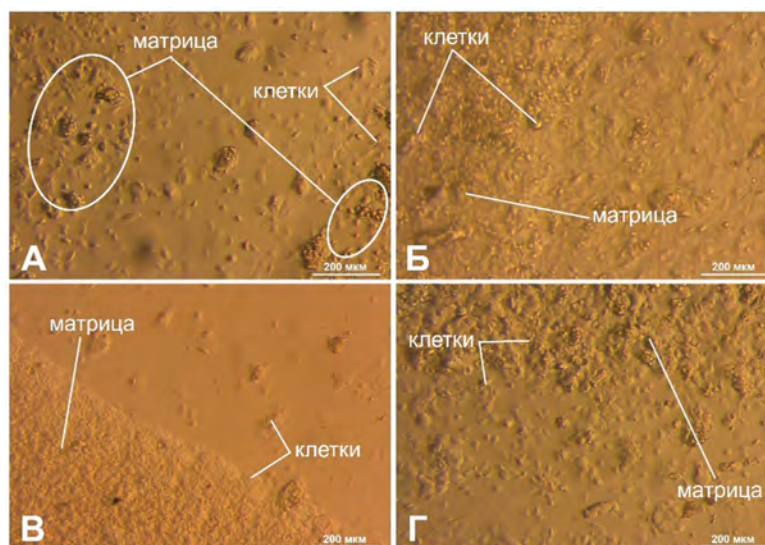
На рисунке 6 представлены результаты культивирования МСК спустя 1 ч после посева. Возле матрицы Х/К (4/0) и на ее поверхности МСК образуют агрегаты (рис. 6А). На рисунке 6Б видно, что клетки распределены

равномерно по поверхности чашки, небольшое скопление присутствует на поверхности матрицы. Наибольшее количество клеток наблюдали на матрице Х/К (4/4) (рис. 6В), при этом клетки были сконцентрированы и не агрегировали. На рисунке 6Г наблюдали неравномерное распределение клеток при их большой концентрации на поверхности матрицы Х/К (6/6).

На рисунке 7 изображены фотографии, сделанные через 1 день после посева. На рисунке 7А наблюдали распластность клеток на поверхности чашки, в то время как на поверхности матрицы Х/К (4/0) клетки образовывали крупные неприкрепленные агрегаты. В случае использования матрицы Х/К (6/0) (рис. 7Б) отмечали большую концентрацию клеток вблизи поверхности. Как и в предыдущем случае, на самой матрице клеток было значительно меньше. На рисунке 7В наблюдали большое количество не распластных клеток на поверхности матрицы Х/К (4/4). На чашке Петри клетки распластались на некотором расстоянии от матрицы. Матрица Х/К (6/6) имеет очень неоднородную структуру, что видно на рисунке 7Г, по которой сложно оценить количество клеток. Между напечатанными полосами концентрация клеток низкая.

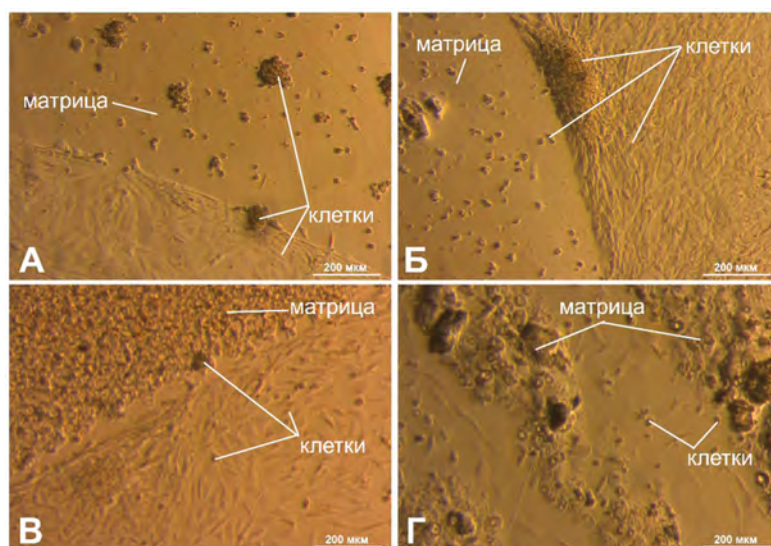
На рисунке 8 приведены фотографии, сделанные через 3 дня после посева. На рисунках 8А и 8Б наблюдали распластность клеток на поверхности чашки Петри. На поверхности матриц Х/К (4/0) и Х/К (6/0) (рис. 8А и Б) клетки в небольшой концентрации и не распластались. На рисунке 8В наблюдали клетки на поверхности матрицы Х/К (4/4) в высокой концентрации. На рисунке 8Г видно, что клетки распластались на расстоянии от поверхности матрицы Х/К (6/0).

На рисунке 9 представлены результаты культивирования МСК спустя 7 дней после посева. На рисунке 9 (А–В) видно, что клетки распластались по поверхности чашки Петри и плотно прилегают к поверхности образцов по бокам. Таким образом, можно сделать предположение о биосовместимости матриц. С другой стороны, на рисунке 9Г клетки адгезируют на некотором расстоянии от матрицы Х/К (6/6), что делает ее наименее предпочтительной для использования. Клетки не распластались по поверхности ни одной из матриц, но наибольшее их количество наблюдается на матрице Х/К (4/4), что может говорить о положительном результате добавления крахмала.



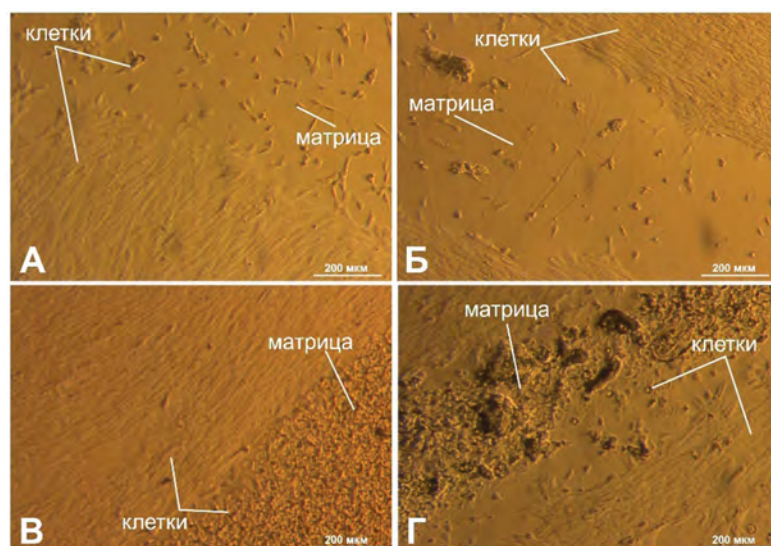
Фотографии выполнены авторами

Рис. 6. Результаты культивирования МСК через 1 ч после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)



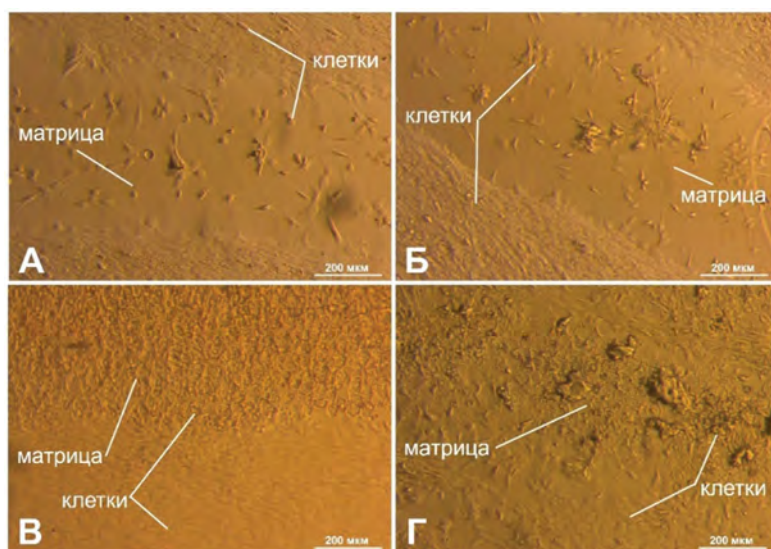
Фотографии выполнены авторами

Рис. 7. Результаты культивирования МСК через 1 день после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)



Фотографии выполнены авторами

Рис. 8. Результаты культивирования МСК через 3 дня после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)



Фотографии выполнены авторами

Рис. 9. Результаты культивирования МСК через 7 дней после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были разработаны чернила на основе хитозана и крахмала, подходящие для 3D-биопечати. Показано, что увеличение концентрации хитозана в растворе до 6%, а также добавление крахмала способствует увеличению динамической вязкости и способствует быстрому восстановлению и сохранению формы раствора полимера во времени после его вытекания из сопла экструдера. В процессе выполнения

экспериментальной работы подобраны оптимальные параметры печати, а именно скорость и входящий поток, которые позволили создать полимерные матрицы с контролируемыми характеристиками структуры. Предварительные эксперименты *in vitro* продемонстрировали биосовместимость полученных конструкций по отношению к мезенхимным стромальным клеткам человека, что позволяет рассчитывать на использование подобных полимерных композиций при разработке раневых покрытий для лечения поврежденных кожных покровов.

Литература / References

1. Borah A, Kumar DS. Overcoming the barriers of two-dimensional cell culture systems with three-dimensional cell culture systems: Techniques, drug discovery, and biomedical applications. *Biomedical Product and Materials Evaluation*. 2022;7:179–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823966-7.00003-7>
2. Pai RR, Sekar JA, Ajit S, Velayudhan S, Kasoju N, Kumar A. Three-dimensional bioprinting of tissues and organs. *Biomedical Product and Materials Evaluation*. 2022;5:135–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823966-7.00018-9>
3. Chircov C, Grumezescu AM. Three-dimensional bioprinting in drug delivery. *Materials for Biomedical Engineering*. 2019;2:19–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816913-1.00002-7>
4. Mancha Sánchez E, Gómez-Blanco JC, López Nieto E, et al. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:776. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00776>
5. Mukherjee P, Rani A, Saravanan P. Polymeric Materials for 3D Bioprinting. *3D Printing Technology in Nanomedicine*. 2019;4:63–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815890-6.00004-9>
6. Iordache F. Bioprinted Scaffolds. *Materials for Biomedical Engineering: Hydrogels and Polymer-based Scaffolds*. 2019;2:35–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816901-8.00002-X>
7. Goel A, Meher MK, Gulati K, Poluri KM. Fabrication of Biopolymer-Based Organs and Tissues Using 3D Bioprinting. *3D Printing Technology in Nanomedicine*. 2019;3:43–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815890-6.00003-7>
8. Islam MM, Shahruzzaman M, Biswas S, Nuris Sakib M, Rashid TU. Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*. 2020;5(1):164–83. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
9. Rajabi M, McConnell M, Cabral J, Ali MA. Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2021;260:117768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117768>
10. Huang J, Fu H, Wang Z, Meng Q, Liu S, Wang H et al. BMSCs-laden gelatin/sodium alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel for 3D bioprinting. *RSC Advances*. 2016;6(110):108423–30. <https://doi.org/10.1039/C6RA24231F>
11. Butler HM, Naseri E, MacDonald DS., Tasker AR, Ali Ahmadi A. Optimization of starch- and chitosan-based bio-inks for 3D bioprinting of scaffolds for neural cell growth. *Materialia*. 2020;(12):100737. <https://doi.org/10.1016/j.mtl.2020.100737>
12. Ghosh S, Gutierrez V, Fernández C, Rodríguez-Pérez M, Viana JC, Reis RL, Mano JF. Dynamic mechanical behavior of starch-based scaffolds in dry and physiologically simulated conditions: effect of porosity and pore size. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(4):950–9. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.02.001>
13. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2425. <https://doi.org/10.3390/ijms23052425>
14. Naghieh S, Sarker M, Sharma NK, Barhoumi Z, Chen X. Printability of 3D Printed Hydrogel Scaffolds: Influence of Hydrogel Composition and Printing Parameters. *Applied Sciences*. 2020;10(1):292. <https://doi.org/10.3390/app10010292>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.А. Малик — постановка методики, выполнение 3D печати; Ю.А. Нащекина — проведение исследования по биосовместимости; И.А. Барсук — лабораторные исследования; К.П. Головки — проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение для публикации рукописи; В.Е. Александров — поиск и обзор литературы; В.Ю. Елоховский — реологические исследования; В.Е. Юдин — концепция исследования, научное руководство.

ОБ АВТОРАХ

Малик Елена Андреевна

<https://orcid.org/0009-0000-2245-2436>
malikalionaa@gmail.com

Нащекина Юлия Александровна, канд. биол. наук

<https://orcid.org/0000-0002-4371-7445>
nashchekina.yu@mail.ru

Барсук Илья Александрович

<https://orcid.org/0000-0002-3728-9966>
barsuk20220@gmail.com

Головки Константин Петрович, д-р мед. наук, доцент

<https://orcid.org/0000-0002-1584-1748>
labws@mail.ru

Александров Виктор Николаевич, д-р мед. наук, профессор

<https://orcid.org/0009-0001-9229-5293>
vnaleks9@yandex.ru

Елоховский Владимир Юрьевич, канд. тех. наук

<https://orcid.org/0000-0001-9123-4926>
vladimir.elokhovskiy@gmail.com

Юдин Владимир Евгеньевич, д-р физ.-мат. наук, профессор

<https://orcid.org/0000-0002-5517-4767>
yudinve@gmail.com