ПАТОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

ANIMAL PATHOLOGY, MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY, PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

УДК 619:616-001.4
https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-3-43-52

Оригинальное эмпирическое исследование

EDN: BYGFJD

Разработка методики получения биоэквивалента соединительной ткани кролика

С.Н. Головин ✉, **Е.Ю. Кириченко**, **Д.А. Седова**
Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
✉labbiobez@yandex.ru

Аннотация
Введение. Клеточная терапия и тканевая инженерия обладают значительным потенциалом применения в ветеринарии, однако использование данных технологий в Российской Федерации в настоящее время ограничено из-за отсутствия стандартизированных протоколов выделения клеток, подбора доноров и создания тканевых эквивалентов. Особую актуальность для клинической ветеринарии имеет разработка методики получения биоэквивалента соединительной ткани, ведь она составляет до половины массы тела и является основой для нормального функционирования кожи, слизистых оболочек и внутренних органов животных. Цель исследования — разработать методику получения тканевого эквивалента соединительной ткани кролика.
Материалы и методы. Исследование проведено на базе ДГТУ в период с 13 ноября 2023 г. по 17 марта 2025 г. Объектом исследования выступили мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) и фибробласты взрослых самцов кролика. Ферментными методами были выделены ММСК из большого сальника и фибробласты из кожи животных. Получены стабильные культуры клеток, исследован их дифференцировочный потенциал при миогенной и липогенной индукции *in vitro*. С применением экструзионной 3D-биопечати созданы эквиваленты соединительной ткани, морфологические свойства которой изучены с помощью световой, конфокальной и электронной микроскопии.
Результаты исследования. Индукция наборами факторов обеспечила дифференцировку ММСК в адипо- и миогенном направлении. Адипогенная дифференцировка сопровождалась образованием липидных капель, миогенная — формированием миотрубочек. 3D-биопечать позволила сформировать эквиваленты соединительной ткани с сохранением жизнеспособности клеток, развитием межклеточных контактов и активной секрецией в течение не менее 72 ч.
Обсуждение и заключение. Разработан новый подход к получению тканевых эквивалентов соединительной ткани кролика благодаря оптимизации методов выделения и дифференцировки ММСК. Сформированные конструкты продемонстрировали морфофункциональную активность, что подтверждает перспективность их применения в клинической ветеринарии для регенерации соединительной ткани и в экспериментальных исследованиях.

Ключевые слова: тканевая инженерия, культура клеток, мезенхимальные стволовые клетки, ММСК, тканевой эквивалент, биоэквивалент, кролик, липобласты, фибробласты, трансмиссионная электронная микроскопия

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № FZNE-2024-0004.

Для цитирования. Головин С.Н., Кириченко Е.Ю., Седова Д.А. Разработка методики получения биоэквивалента соединительной ткани кролика. *Ветеринарная патология*. 2025;24(3):43–52. https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-3-43-52

© Головин С.Н., Кириченко Е.Ю., Седова Д.А., 2025

Original Empirical Research

Development of a Methodology for Obtaining Connective Tissue Bioequivalent for Rabbits

Sergey N. Golovin✉, **Evgeniya Yu. Kirichenko**, **Darya A Sedova**
Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation
✉labbiobez@yandex.ru

Abstract

Introduction. The potential of cell therapy and tissue engineering technologies in veterinary medicine is quite high. However, the use of these technologies in the Russian Federation is currently limited due to the absence of standardized protocols for cell isolation, donor selection and creation of tissue equivalents. Development of a methodology for obtaining connective tissue bioequivalent is particularly relevant for clinical veterinary medicine, as connective tissue constitutes up to the half of the body weight and ensures the normal functioning of skin, mucous membranes, and internal organs of animals. The aim of this study is to develop a methodology for obtaining connective tissue equivalent for rabbits.

Materials and Methods. The study was conducted at Don State Technical University (DSTU) from November 13, 2023 to March 17, 2025. The objects of the study were multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) and fibroblasts from adult male rabbits. Enzymatic methods were used to isolate MMSCs from the greater omentum and fibroblasts from the animal skin. Stable cell lines were obtained, and their differentiation potential was studied *in vitro* during myogenic and lipogenic induction. Connective tissue equivalents were created using 3D extrusion bioprinting, their morphological properties were studied by means of light, confocal, and electron microscopy.

Results. Application of the sets of factors during induction ensured the adipogenic and myogenic differentiation of MMSCs. Adipogenic differentiation came along with formation of lipid droplets, while myogenic differentiation — with formation of myotubes. 3D bioprinting enabled creation of connective tissue equivalents with maintained cell viability, developing intercellular contacts, and active secretion for at least 72 hours.

Discussion and Conclusion. A new approach to obtaining connective tissue equivalents for rabbits was developed by optimizing MMSCs isolation and differentiation techniques. The resulting constructs demonstrated morphological and functional activity, thus, confirmed their potential for using in clinical veterinary medicine for regeneration of connective tissue and for experimental studies.

Keywords: tissue engineering, cell culture, mesenchymal stem cells, MMSCs, tissue equivalent, bioequivalent, rabbit, lipoblasts, fibroblasts, transmission electron microscopy

Funding. The research was funded by the grant No. FZNE-2024-0004 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

For Citation. Golovin SN, Kirichenko EYu, Sedova DA. Development of a Methodology for Obtaining Connective Tissue Bioequivalent for Rabbits. *Russian Journal of Veterinary Pathology*. 2025;24(3):43–52. https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-3-43-52

Введение. В настоящее время в ветеринарии активно внедряются клеточные технологии, основанные на применении культур клеток и тканевых эквивалентов. Это обусловлено как необходимостью снижения этической нагрузки при экспериментальных исследованиях и совершенствованием экспериментальных моделей *in vitro*, так и развитием регенеративной медицины и внедрением в ветеринарию достижений в области медицины человека [1, 2]. Ориентиром в развитии данного научного направления является реализация биоэтических принципов 3R — Replacement, Reduction, Refinement (англ. Замена, Сокращение, Усовершенствование) [3], — направленных на оптимизацию использования животных в экспериментах, что стимулирует переход к *in vitro* моделям [4]. Клеточные культуры и тканевые эквиваленты, применяемые в качестве экспериментальных моделей, представляют собой практическую реализацию этих принципов, позволяя не только заменить и сократить число животных в исследованиях, но и повысить точность и воспроизводимость результатов за счет стандартизации [5].

Тканевой эквивалент (биоэквивалент) — это биоинженерный конструкт, представляющий собой аналог ткани или органа. Основными свойствами тканевого эквивалента являются клеточный состав, состав и свойства межклеточного вещества и определенная гистотипическая архитектура [6].

Соединительная ткань составляет около 50 % массы тела животных и выполняет важнейшие функции: опорную, репаративную, метаболическую; клетки в ее составе влияют на дифференцировку эпителиальных и мышечных клеток и ангиогенез. Соединительная ткань участвует в большинстве функций организма в норме,

всегда вовлекается в патологический процесс и участвует в регенерации [7]. Вот почему разработка и внедрение в клиническую практику биоэквивалентов соединительной ткани, для временного или постоянного замещения дефектов и повреждений собственных тканей, высоко востребованы в регенеративной медицине.

С 2025 г. FDA (Food and Drug Administration — Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США) официально рекомендует использование *in vitro* платформ в токсикологических исследованиях и оценке эффективности новых фармакологических средств, отмечая, что клеточные модели, органоиды и тканевые эквиваленты более точно воспроизводят молекулярно-клеточные механизмы патогенеза, уменьшают межэкспериментальную вариабельность и повышают предсказательную способность получаемых данных [8, 9]. Интеграция *in vitro* систем на доклиническом этапе разработки лекарств позволяет снизить число отказов на более поздних стадиях клинических испытаний и оптимизировать риск-менеджмент при тестировании новых терапевтических стратегий [5, 9]. Современные исследования подтверждают, что применение клеточных культур дает воспроизводимые и статистически надежные данные при использовании меньших групп животных по сравнению с традиционными *in vivo* моделями, что сводит к минимуму биоэтические риски и повышает рациональность научных подходов [5]. Параллельно развивается направление модификации клеточных систем для создания высокоточных моделей специфических патологий, включая инфекционные, онкологические и метаболические, что дает возможность детального изучения молекулярных механизмов патогенеза и поиска новых мишеней для потенциальных лекарственных соединений [10, 11].

В ветеринарной регенеративной медицине активно внедряется использование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) для терапии остеоартрита у лошадей и спинальных травм у собак и кошек [12]. Клиническая эффективность ММСК подтверждена исследованиями на собаках, где внутрисуставное введение аутологичных ММСК улучшало функцию суставов и снижало болевой синдром [13, 14]. Аналогичные результаты получены при лечении лошадей с повреждениями связочного аппарата [14–16]. Также терапия стволовыми клетками показала эффективность в лечении острых и хронических поражений кожи у собак [12].

Совершенствуется технология 3D-биопечати, позволяющая создавать многослойные тканевые конструкты из клеток и биосовместимых полимеров, близкие по архитектуре и механическим свойствам к собственным тканям. Применение бионапечатанных имплантатов при восстановлении костных дефектов у домашних животных улучшает остеоинтеграцию и ускоряет заживление [17]. 3D-бионапечатанные тканевые конструкты применяются в скрининге и исследованиях противоопухолевой и лучевой терапии у животных. Фантомы, изготовленные из тканевых эквивалентов, могут быть использованы для измерения и проверки распределения дозы облучения, обеспечивая точность планов лучевой терапии домашних животных и проведение калибровки оборудования [18].

В ветеринарии трехмерные тканевые эквиваленты позволяют создавать персонализированные модели опухолей животных с использованием различных клеток и биомаркеров для подбора таргетной химиотерапии и иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний [12]. Также тканевые эквиваленты кожи и соединительной ткани, сконструированные из соответствующих клеточных культур и матрикса, могут быть использованы для лечения ожогов животных и являются перспективным направлением в лечении ран у животных в целом [19, 12]. В мировой практике накоплен значительный опыт в этом отношении [20, 12], однако в Российской Федерации до сих пор отсутствует производство доступных тканевых эквивалентов с клетками для лечения ран как человека, так и животных, поскольку не разработаны стандартизированные протоколы выделения клеток, подбора доноров и получения биоэквивалентов. Таким образом, *цель исследования* — разработать методику создания тканевых эквивалентов соединительной ткани, выполняющей важнейшие функции в организме, из биоматериалов кролика.

Материалы и методы. Исследование проведено в период с 13 ноября 2023 г. по 17 марта 2025 г. на факультете «Биоинженерия и ветеринарная медицина» ДГТУ (г. Ростов-на-Дону): все эксперименты с клеточными культурами выполнены в лаборатории клеточных технологий; содержание и работа с лабораторными животными осуществлялась в виварии факультета в соответствии с действующими нормативными актами.

В качестве животных-доноров использовались взрослые самцы кролика *Oryctolagus cuniculus domesticus* породы советская шиншилла (n=3). Для выделения ММСК фрагменты жировой ткани массой 2 г были взяты из большого сальника путем чрескожной биопсии; для выделения фибробластов были взяты биоптаты кожи живота.

Для выделения ММСК фрагменты жировой ткани большого сальника выдерживали 60 мин в 0,2 %-ном растворе коллагеназы в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS) при температуре 37 °C с постоянным перемешиванием. После фильтрации получившейся суспензии через клеточное сито осаждали клеточную фракцию с помощью центрифугирования. Осадок вносили в культуральные флаконы со средой DMEM/F12, в которую добавляли 10 % фетальной бы-

чьей сыворотки (ФБС) и 1 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека-2. Выделенную культуру клеток пересевали в течение пяти пассажей, после чего криоконсервировали.

Фибробласты выделяли из биоптатов кожи: после обработки антисептиком биоптаты асептически иссекали ножницами и переносили на 15 мин в подогретый до температуры 37 °С раствор трипсина для диссоциации клеток. Затем осаждали клетки центрифугированием, вносили в культуральные флаконы со средой DMEM с 10 % ФБС, антибиотиками и антимикотиками и инкубировали при 37 °С с 5 % CO_2. Используя свойство фибробластов быстро адгезироваться к поверхности флаконов, для сепарации их от других типов клеток через 4 ч флаконы промывали от неприкрепившихся клеток и вносили новую питательную среду, через 2 ч процедуру повторяли, после чего культивировали выделенные клетки до субконфлуэнтного монослоя. Субкультивирование фибробластов осуществляли без добавления антибиотиков и антимикотиков.

ММСК подвергали липогенной и миогенной дифференцировке. Первую использовали для получения липобластов, необходимых для формирования биоэквивалента соединительной ткани. Миогенная дифференцировка служила маркером мультипотентности выделенных стволовых клеток.

В качестве индукторов адипогенной дифференцировки использовалась среда DMEM с 4 мг/л глюкозы, 10 % ФСБ, 1 мкмоль дексаметазона, 100 мкмоль индометацина, 500 мкмоль 3-изобутил-1-метилксантина и 10 мкг/мл инсулина [21]. Воздействие индукторов на клетки осуществлялось в течение 10 суток, после чего клетки содержались в стандартной среде DMEM. В качестве отрицательного контроля дифференцировки ММСК культивировали в полной среде DMEM без индукторов. Маркером дифференцировки являлось образование в цитоплазме клеток липидных капель [22].

Для индукции миогенной дифференцировки использовали среду DMEM с 4 мг/л глюкозы, 10 % ФБС, 10 мкмоль 5-азацитидина и 50 мкмоль гидрокортизона. Воздействие индукторов проводилось в течение 15 суток, после чего клетки содержались в стандартной среде DMEM. В качестве отрицательного контроля дифференцировки ММСК культивировали в полной среде DMEM без индукторов. Маркером миогенной дифференцировки считали слияние клеток с образованием миотрубочек [23].

Для подсчета клеток на всех этапах культивирования применялся усовершенствованный алгоритм на основе искусственного интеллекта YOLOv8S-seg, разработанный и описанный нами ранее [24].

Для создания тканевых эквивалентов соединительной ткани был применен метод 3D-биопечати. Для приготовления биочернил порошок альгината натрия стерилизовали под ультрафиолетовым светом в боксе биологической безопасности в течение 40 мин. Затем компоненты растворяли DPBS без кальция и магния в концентрации 30 мг/мл. 3 мл получившегося гидрогеля переносили в шприц объемом 5 мл и вносили фибробласты и липобласты в соотношении 1:1 в количестве 2×10^6 клеток на 1 мл гидрогеля путем смешивания между двумя шприцами с гидрогелем, соединенными адаптером.

Получившиеся биочернила переносили в инжектор 3D-биопринтера, собранного на базе Anet A8 (*Anet*, Китай) и доработанного самостоятельно, как описано ранее в [21], и осуществляли процесс печати по заданной цифровой модели со следующими параметрами: размеры объекта 30×40×3 мм, высота слоя — 0,2 мм, количество периметров — 0, количество сплошных слоев снизу — 0, количество сплошных слоев сверху — 0, заполнение — 8 %, тип заполнения — прямолинейное, угол заполнения — 90°, скорость заполнения — 10 мм/с, диаметр сопла — 0,2 мм, диаметр прутка — 1,2 мм, множитель подачи экструдера — 1,3. Печать проводилась в боксе микробиологической безопасности при комнатной температуре в чашках Петри. После печати получившиеся скаффолды заливали раствором $CaCl_2$ (100 мг/мл) на 10 мин для стабилизации альгината. После отвердевания скаффолды переносили в чашки Петри со средой DMEM и помещали в CO_2-инкубатор при 37 °С на 72 ч со сменой среды каждые 12 ч.

После 72 ч инкубации из рандомных участков тканевых эквивалентов были отобраны образцы для микроскопического анализа и проведена их соответствующая пробоподготовка. Морфологические свойства полученных тканевых эквивалентов были изучены при помощи светового микроскопа Olympus BX53 (*Olympus*, Япония), конфокального лазерного сканирующего микроскопа Infinity Line (*Abberior Instruments*, Германия) и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (*Jeol*, Япония).

Результаты исследования. Использованные протоколы выделения и дифференцировки клеток позволили нам получить стабильные клеточные культуры, которые сохраняли фенотип и динамику роста при субкультивировании в течение 25 пассажей для фибробластов и липобластов и 12 пассажей для миосателлитных клеток (рис. 1).

Внешний вид стабилизированного ионами Ca^{2+} конструкта после 3D-биопечати представлен на рис. 2.

На рис. 3 представлена микрофотография полутонких срезов фрагмента конструкта после 72 ч культивирования. В его составе видны равномерно распределенные в матриксе клетки округлой и веретенообразной формы с вытянутыми отростками и выростами цитоплазмы.

https://www.vetpat.ru

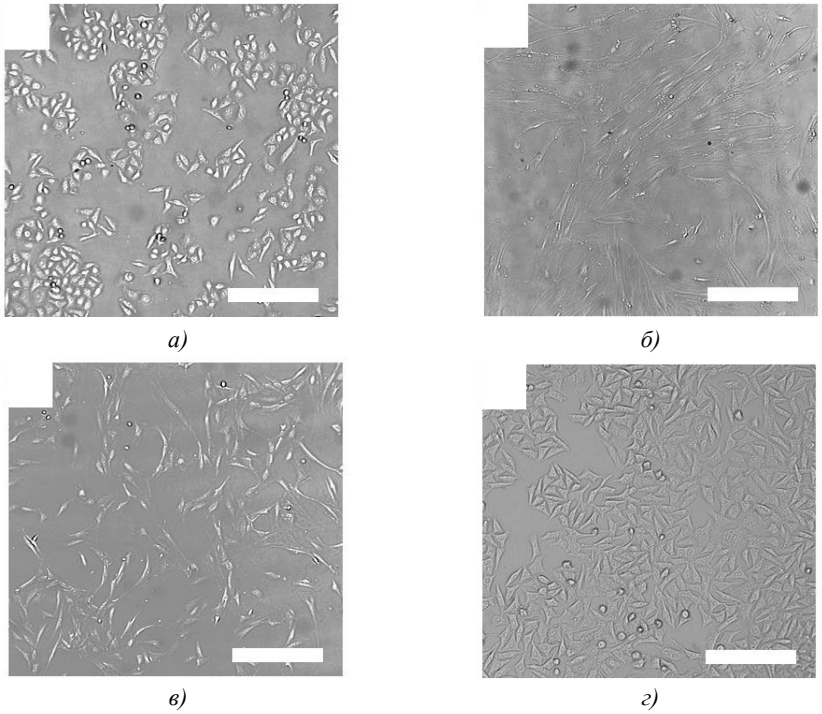


Рис. 1. Светооптическая микроскопия полученных культур клеток, шкала соответствует 200 мкм: *а* — ММСК, *б* — миосателлитные клетки; *в* — фибробласты; *г* — липобласты

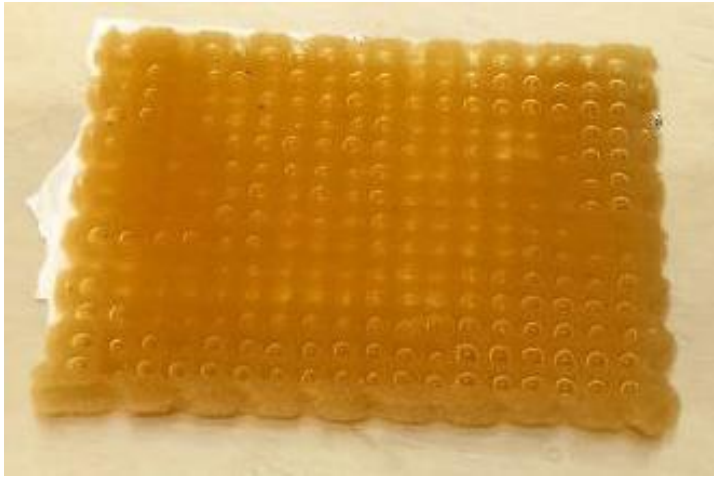


Рис. 2. Внешний вид 3D-бионапечатанного конструкта, стабилизированного Ca^{2+}

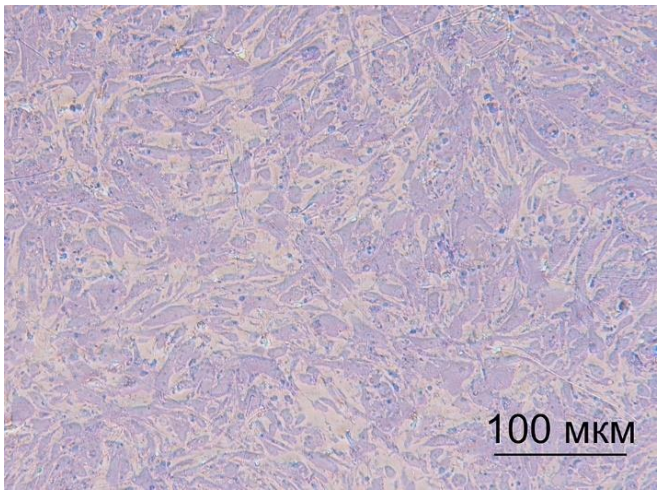


Рис. 3. Полутонкий срез тканевого эквивалента после 72 ч культивирования, окраска метиленовым синим

Трехмерная реконструкция окрашенного SYTOX® Green фрагмента тканевого эквивалента после 72 ч культивирования (рис. 4) демонстрирует целостность ядер клеток и нормальную плотность хроматина.

Данные трансмиссионной электронной микроскопии показывают ультраструктуру клеток в составе тканевого эквивалента и их межклеточное взаимодействие (рис. 5–6). На электронграммах визуализируются клетки двух типов с ультраструктурными признаками фибробластов и липобластов. Оба типа клеток имеют веретенообразную или треугольную, с разветвленными тонкими отростками, направленными преимущественно вдоль тел клеток, форму. Помимо отростков клетки имеют выросты цитоплазмы неправильной формы.

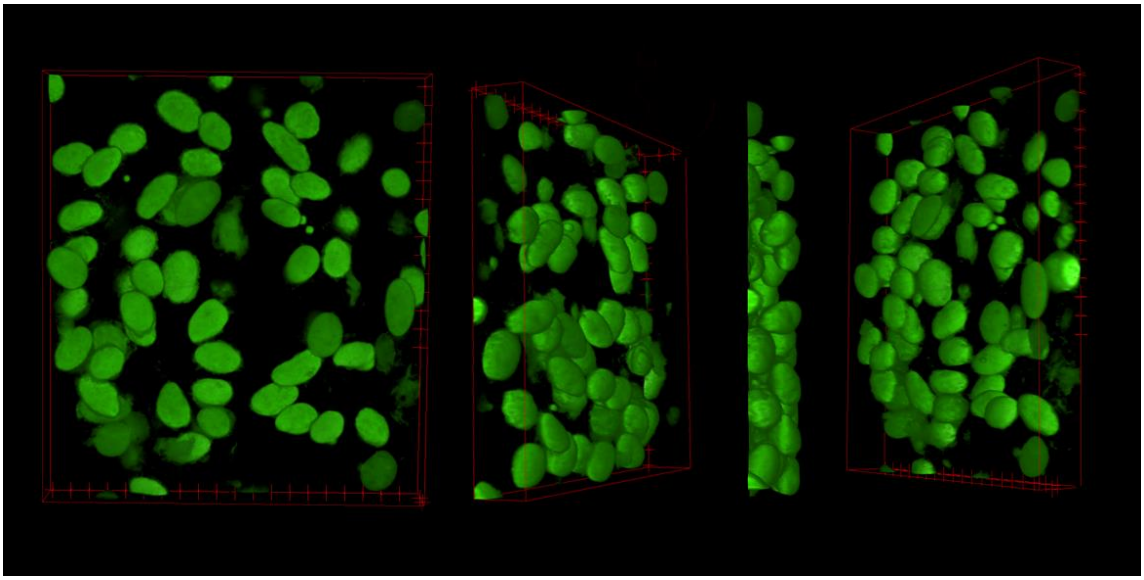


Рис. 4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия фрагмента конструкта, окрашенного SYTOX® Green. Трехмерная реконструкция выполнена в программе ImageJ (Rasband, 1997–2018)

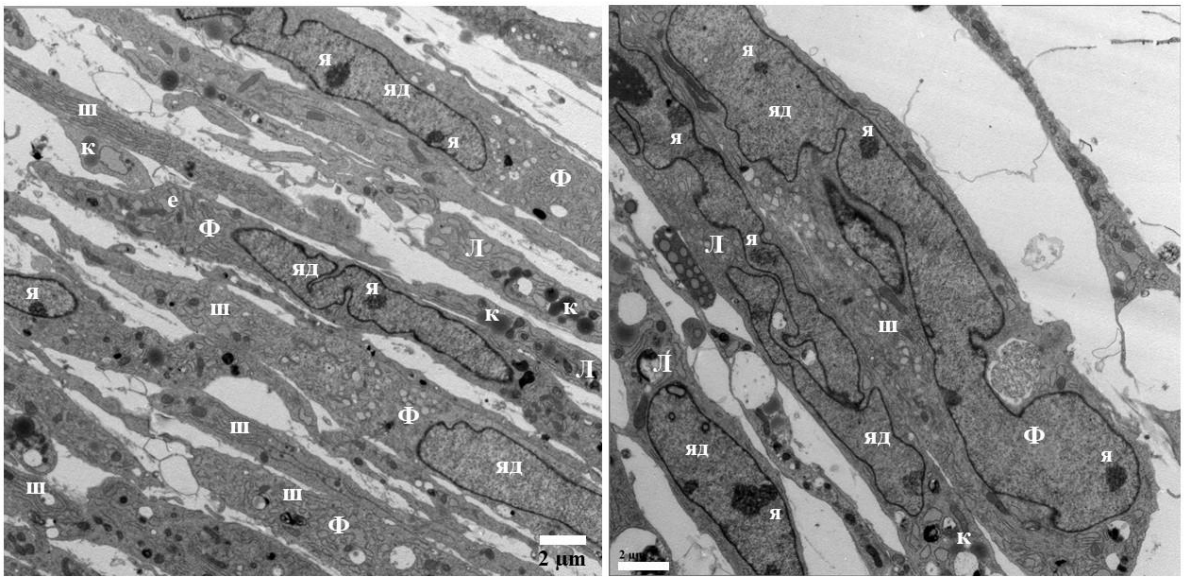


Рис. 5. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток в составе тканевого эквивалента, контрастирование тетраоксидом осмия, цитратом свинца и уранилацетатом, шкала соответствует 2 мкм: Ф — фибробласт; Л — липобласт; яд — ядро; я — ядрышко; ш — шероховатый эндоплазматический ретикулум; к — липидные капли

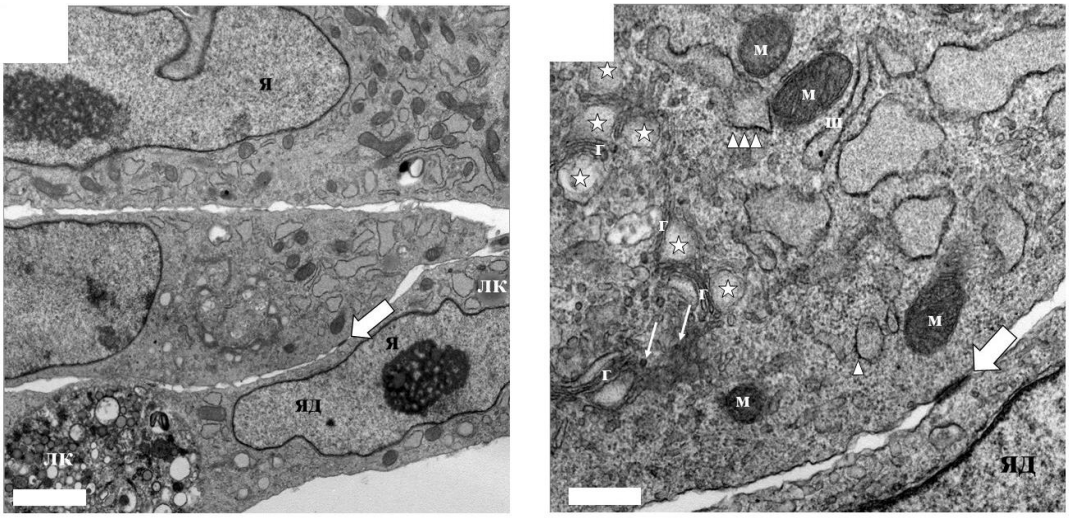
Также отмечается высокая плотность клеток в составе конструкта, которая свидетельствует об увеличении их количества в течение 72 ч культивирования, т.к. такая плотность недостижима в исходной концентрации, использовавшейся при печати (2×10^6 клеток на 1 мл гидрогеля). Клетки в составе конструкта плотно прилегают друг к другу и контактируют мембранами тел и отростков (рис. 5). Клетки содержат ядра правильной формы с мелкодисперсным хроматином, в ядрах визуализируются одно-два крупных ядрышка — признак активности фибробластов [25–27]. В некоторых случаях ядра клеток имели инвагинации и выпячивания кариолеммы. Цитоплазма фибробластов насыщена органеллами, что отражает высокий уровень

https://www.vetpat.ru

внутриклеточного метаболизма. В цитоплазме визуализируются многочисленные митохондрии, шероховатый эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, лизосомы, центриоли, мультивезикулярные тельца. Цитоплазма липобластов содержит множество включений в виде округлых осмиефильных капель, что также подтверждает факт липогенной дифференцировки ММСК. У клеток развитая сеть эндоплазматического ретикулума, он занимает большую часть цитоплазмы и визуализируется как стопки извитых трубочек и продолговатые цистерны, усеянные рибосомами на стороне, обращенной к цитоплазме. Также не прикрепленные к ретикулуму рибосомы равномерно распределены по всей цитоплазме.

На электронграммах фибробластов при большем увеличении заметна активность комплексов Гольджи, синтезирующих проколлаген (рис. 6 *а*). В комплексах Гольджи визуализируются диктиосомы, транспортные пузырьки и цистерны. Некоторые цистерны расширены и заполнены осмиефильным электронноплотным веществом, похожим на спутанные нити, что, вероятно, является молекулами проколлагена. Содержимое пузырьков постепенно конденсируется и превращается в транспортные вакуоли, собирающиеся в секреторные гранулы на обращенной к плазматической мембране стороне комплекса Гольджи. Такая картина активности комплексов Гольджи также указывает на высокую секреторную активность клеток в течение 72 ч в составе конструкта.

Еще одним важным визуализируемым элементом межклеточного взаимодействия является наличие плотных контактов (рис. 6 *а, б*), которые выглядят как два осмиефильных уплотнения с межклеточной щелью в месте соприкосновения мембран соседних клеток. Плотный контакт — это высокоспециализированный селективный барьер, обеспечивающий прямое соприкосновение белков двух смежных плазматических мембран и позволяющий группам клеток функционировать в качестве структурных единиц. При этом в образце тканевого эквивалента были выявлены плотные контакты как между клетками одного типа (фибробласт/фибробласт и липобласт/липобласт), так и между клетками разных типов: например, на рис. 6 *а, б* показан плотный контакт между фибробластом и липобластом.



а) *б)*

Рис. 6. Трансмиссионная электронная микроскопия, показывающая признаки пролиферации клеток в составе напечатанного тканевого эквивалента после 72 ч культивирования, контрастирование тетраоксидом осмия, цитратом свинца и уранилацетатом, шкала *а* соответствует 2 мкм, шкала *б* — 0,5 мкм. *а* — ультраструктура участка активного фибробласта. Середину электронограммы занимает область комплекса Гольджи. Звездочками отмечены сферические расширения. Цистерны комплекса Гольджи содержат осмиефильный электронноплотный материал в виде спутанных нитей, которые могут быть молекулами проколлагена. Тонкими стрелками показаны везикулы с конденсированным содержимым: яд — ядро; я — ядрышко; г — комплекс Гольджи; м — митохондрия; ш — шероховатый эндоплазматический ретикулум; лк — липидные капли

Развитая сеть эндоплазматического ретикулума [28], высокая активность аппарата Гольджи [29] и многочисленные рибосомы указывают на активные процессы синтеза белка и подтверждают жизнеспособность и хорошую выживаемость клеток в составе тканевого эквивалента как минимум в течение 72 ч культивирования. Данные трансмиссионной электронной микроскопии также подтверждают наличие маркеров дифференцировки клеток: липидные капли у липобластов и молекулы проколлагена у фибробластов.

Обсуждение и заключение. В рамках исследования был разработан новый тканеинженерный метод для производства культивируемых трехмерных тканевых эквивалентов соединительной ткани с использованием дифференцированных ММСК кролика и 3D-биопечати. Воздействие *in vitro* набора индукторов, включающего

среду DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10 % ФБС, 1 μM дексаметазона, 100 μM индометацина, 500 μM 3-изобутил-1-метилксантина и 10 мкг/мл инсулина, на ММКС кролика обеспечило их адипогенную дифференцировку, функциональным маркером которой явилось образование липидных капель. Воздействие *in vitro* набора индукторов, включающего среду DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10 % ФБС, 10 μM 5-азацитидина и 50 μM гидрокортизона, на ММКС кролика обеспечило их миогенную дифференцировку, функциональным маркером которой явилось образование миотрубочек. Метод экструзионной 3D-биопечати обеспечил формирование трехмерных тканевых эквивалентов соединительной ткани, в составе которых дифференцированные клетки кролика сохраняли жизнеспособность и метаболическую активность, формируя плотные контакты и секреторные везикулы в течение как минимум 72 ч. Морфологический анализ полученного биоэквивалента, включающий конфокальную и просвечивающую электронную микроскопию, подтвердил жизнеспособность и высокую метаболическую активность клеток, что указывает на их потенциал для поддержания функциональности конструкта.

Предложенный метод создания тканевых эквивалентов может быть широко использован: в клинической ветеринарии — для лечения дефектов и повреждений соединительной ткани; в экспериментальной ветеринарии — в качестве модели для изучения закономерностей морфогенеза, цито-, гисто- и органогенеза, дифференцировки клеток и внутриклеточных структур, межклеточных взаимодействий, регенераторных процессов в индивидуальном развитии, их адаптации к воздействию экзогенных и эндогенных факторов у животных на макро-, микро- и ультраструктурном уровне с использованием морфологических и других методов исследования, скрининга новых лекарственных соединений, а также в качестве фантомов для разработки подходов в лучевой терапии и диагностике. Кроме того, данный метод может быть транслирован в область разработки культивируемых мясных продуктов, так как позволяет получить конечный продукт со свойствами, тождественными тканям продуктивных животных, включая структурную целостность и органолептические свойства.

Явным недостатком технологии является ее высокая стоимость и технологическая сложность крупномасштабного клеточного культивирования в типовых лабораториях. Высокая стоимость определяется, в первую очередь, самым дорогим компонентом культуральной среды — сывороткой плодов коров. Несмотря на многочисленные попытки производства бессывороточных сред и поиска заменителей сыворотки, на данный момент эффективность их при культивировании уступает сыворотке. Для удешевления и оптимизации крупномасштабного культивирования клеток целесообразно использовать биореакторы, что, в совокупности с применением 3D-биопринтера, повышает требования к компетенциям операторов.

К технологическим преимуществам данного метода относится возможность стандартизации и высокая воспроизводимость, что обеспечивается условиями 3D-биопечати: концентрация клеток в гидрогеле и их распределение в конструкте будут одинаковы при воспроизведении, так как печать проводится по заданному цифровому шаблону и ее параметры контролируются на аппаратном и программном уровнях, а применение алгоритмов на основе искусственного интеллекта для контроля клеточного культивирования значительно нивелирует влияние человеческого фактора на конечный результат.

Список литературы / References

1. Sharun K, El-Husseiny HM, Muthu S. Editorial: Advances In Veterinary Tissue Engineering: Unlocking Potential with Cell-Free and Cell-Based Methods. *Frontiers in Veterinary Science*. 2025;12:1591272. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1591272

2. Yun SH, Lee DY, Lee J, Mariano EJ, Choi Yeongwoo, Park Jinmo, et al. Current Research, Industrialization Status, and Future Perspective of Cultured Meat. *Food science of animal resources*. 2024;44(2):326–355. https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e13

3. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals*. 2019;9(10):754. https://doi:10.3390/ani9100754

4. Sulakhiya K, Paliwal R, Kisku A, Sahu M, Aditya S. Soni P, et al. Experimental Tools as an “Alternative to Animal Research” in Pharmacology. In book: Singh D, Tiwari P (Eds.). *Software and Programming Tools in Pharmaceutical Research*. Bentham Science Publishers; 2024. P. 170–206. https://doi.org/10.2174/97898152230191240101

5. Amelian A, Wasilewska K, Megias D, Winnicka K. Application of Standard Cell Cultures and 3D in Vitro Tissue Models as an Effective Tool in Drug Design and Development. *Pharmacological Reports*. 2017;69:861–870. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014

6. Мелешина А.В., Быстрова А.С., Роговая О.С., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Загайнова Е.В. Тканеинженерные конструкты кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (обзор). *Современные технологии в медицине.* 2017;9(1):198–220. https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.24

Meleshina AV, Bystrova AS, Rogovaya OS, Vorotelyak EA, Vasiliev AV, Zagaynova EV. Skin Tissue-Engineering Constructs and Stem Cells Application for the Skin Equivalents Creation (Review). *Sovremennyetehnologii v medicine (Modern Technologies in Medicine).* 2017;9(1):198–218. https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.24

7. Шкурупий В.А., Ким Л.Б., Ковнер А.В., Черданцева Л.А. Соединительная ткань и проблемы ее патологических состояний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(4):75–85. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-75–85

Shkurupy VA, Kim LB, Kovner AV, Cherdantseva LA. Connective Tissue and the Problems of Its Pathological Conditions. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16(4):75–85. (In Russ.) https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-75–85

8. Zushin PH, Mukherjee S, Wu JC. FDA Modernization Act 2.0: Transitioning beyond Animal Models with Human Cells, Organoids, and AI/ML-Based Approaches. *The Journal of Clinical Investigation*. 2023;133(21):e175824. https://doi.org/10.1172/JCI175824

9. Ravikumar B, Cichońska A, Sahni N, Aittokallio T, Rahman R. Advancements in Rational Multi-Targeted Drug Discovery: Improving the Efficacy-Safety Balance of Small Molecule Cancer Therapeutics. In book: Peters JU (Ed.). *Polypharmacology: Strategies for Multi-Target Drug Discovery*. John Wiley & Sons, Inc.; 2025. P. 109–125. https://doi.org/10.1002/9781394182862.ch9

10. Hu J, Lin YY, Chen PJ, Watashi K, Wakita T. Cell and Animal Models for Studying Hepatitis B Virus Infection and Drug Development. *Gastroenterology*. 2019;156(2):338–354. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.093

11. Harb A, Fakhreddine M, Zaraket H, Saleh FA. Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19. *Biomimetics*. 2021;7(1):3. https://doi:10.3390/biomimetics7010003

12. Головин С.Н. Кириченко Е.Ю., Седова Д.А., Ермаков А.М. Перспективы применения клеточной терапии в ветеринарии. *Международный вестник ветеринарии*. 2025;4. (в печати).

Golovin SN, Kirichenko EYu, Sedova DA, Ermakov AM. Prospects of Cell Therapy Application in Veterinary Medicine. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2025;4. (In Russ.) (in print).

13. Armitage AJ, Miller JM, Sparks TH, Georgiou AE, Reid J. Efficacy of Autologous Mesenchymal Stromal Cell Treatment for Chronic Degenerative Musculoskeletal Conditions in Dogs: A Retrospective Study. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023;9:1014687. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1014687

14. Goel S, Gandhi S, Dubey S, Shah M, Saini S, Arora P, et al. Stem Cell Therapy: Promises and Challenges in Treating Animal Diseases. In book: Mukhopadhyay CS, Choudhary RK, Panwar H, Malik YS (Eds.). *Biotechnological Interventions Augmenting Livestock Health and Production. Livestock Diseases and Management*. Singapore: Springer; 2023. P. 13–38. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2209-3_2

15. Voga M, Kovač V, Majdic G. Comparison of Canine and Feline Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells/Medicinal Signaling Cells with Regard to Cell Surface Marker Expression, Viability, Proliferation, and Differentiation Potential. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;7:610240. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.610240

16. Fraile AP, González-Cubero E, Martínez-Flórez S, Olivera ER, Villar-Suárez V. Regenerative Medicine Applied to Musculoskeletal Diseases in Equines: A Systematic Review. *Veterinary Sciences*, 2023;10(12):666. https://doi.org/10.3390/vetsci10120666

17. Vickram AS, Infant SS, Manikandan S, Sowndharya BB, Gulothungan G, Chopra H. 3D Bio-Printed Scaffolds and Smart Implants: Evaluating Functional Performance in Animal Surgery Models. *Annals of Medicine and Surgery* 2025;87(6):3618–3634. https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000003333

18. Gallivanone F, D'Ambrosio D, Carne I, D'Arcangelo Micol, Montagna P, Giroletti E, et al. A tri-modal tissue-equivalent anthropomorphic phantom for PET, CT and multi-parametric MRI radiomics. *Physica Medica*. 2022;98:28–39. https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2022.04.007

19. Tello LH. *Burns in Small Animals. Proceedings of 38th World Congress of World Small Animal Veterinary Association (WSAVA), Auckland, New Zealand. March 2013.* https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=5709840&pid=11372& (accessed: 16.08.2023).

20. Chogan F, Chen Y, Wood F, Jeschke MG. Skin Tissue Engineering Advances in Burns: A Brief Introduction to the Past, the Present, and the Future Potential. *Journal of Burn Care & Research*. 2023;44(Suppl_1):S1–S4. https://doi.org/10.1093/jbcr/irac127

21. Golovin SN, Kirichenko EY, Khanukaev MM, Logvinov AK. 3D Bioprinting of Hybrid Cultured Meat from Rabbit Cells and Sunflower Protein. *Foods and Raw Materials.* 2026;14(1):52–60. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2026-1-659

22. Lund P, Pilgaard L, Duroux M, Fink T, Zachar V. Effect of Growth Media and Serum Replacements on the Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Cytotherapy*. 2009;11(2):189–197. https://doi.org/10.1080/14653240902736266

23. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* John Wiley & Sons, Inc. 2010; 732 p. https://doi.org/10.1002/9780470649367

24. Nabiullina R, Golovin S, Kirichenko E, Petrushan M, Logvinov A, Kaplya M, et al. 3D Bioprinting of Cultivated Meat Followed by the Development of a Fine-Tuned YOLO Model for the Detection and Counting of Lipoblasts, Fibroblasts, and Myogenic Cells. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2025;30(3):36266. https://doi.org/10.31083/FBL36266

25. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DL. The Nucleolus: Structure/Function Relationship in RNA Metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2010;1(3):415–431. https://doi.org/10.1002/wrna.39

26. Grummt I. The Nucleolus—Guardian of Cellular Homeostasis and Genome Integrity. *Chromosoma*. 2013;122(6):487–497. https://doi.org/10.1007/s00412-013-0430-0

27. Dubois ML, Boisvert FM. The Nucleolus: Structure and Function. In book: Bazett-Jones D, Dellaire G (Eds.). *The Functional Nucleus*. Cham: Springer; 2016. P. 29–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-38882-3_2

28. Csala M, Bánhegyi G, Benedetti A. Endoplasmic Reticulum: A Metabolic Compartment. *FEBS Letters*. 2006;580(9):2160–2165. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.050

29. Wang H, Zhang X, Xiu T, Wang H, Li P, Tang B. Fluorescence Probes for Sensing and Imaging within Golgi Apparatus. *Coordination Chemistry Reviews*, 2024;502:215618. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.21

Об авторах:

Сергей Николаевич Головин, научный сотрудник лаборатории медицинских цифровых изображений на основе базисной модели Донского государственного технического университета (344003, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1), SPIN-код, ORCID, ScopusID, labbiobez@yandex.ru

Евгения Юрьевна Кириченко, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биоинженерии Донского государственного технического университета (344003, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1), SPIN-код, ORCID, ResearcherID, kiriche.evgeniya@yandex.ru

Дарья Андреевна Седова, научный сотрудник лаборатории медицинских цифровых изображений на основе базисной модели Донского государственного технического университета (344003, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1), SPIN-код, ORCID, ScopusID, dased0va@yandex.ru

Заявленный вклад авторов:

С.Н. Головин: разработка концепции, разработка методологии, проведение исследования, валидация результатов, написание черновика рукописи.

Е.Ю. Кириченко: научное руководство, визуализация, валидация результатов, написание черновика рукописи.

Д.А. Седова: написание рукописи, редактирование.

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

About the Authors:

Sergey N. Golovin, Research Associate of the Laboratory “Digital Medical Imaging Using the Basic Model”, Don State Technical University (1, Gagarin Sq., Rostov-on-Don, 344003, Russian Federation), SPIN-code, ORCID, ScopusID, labbiobez@yandex.ru

Evgeniya Yu. Kirichenko, Dr.Sci. (Biology), Professor, Head of the Bioengineering Department, Don State Technical University (1, Gagarin Sq., Rostov-on-Don, 344003, Russian Federation), SPIN-code, ORCID, ResearcherID, kiriche.evgeniya@yandex.ru

Darya A. Sedova, Research Associate of the Laboratory “Digital Medical Imaging Using the Basic Model”, Don State Technical University (1, Gagarin Sq., Rostov-on-Don, 344003, Russian Federation), SPIN-code, ORCID, ScopusID, dased0va@yandex.ru

Claimed Contributorship:

SN Golovin: developing the concept and methodology, conducting research, validating results, writing a draft manuscript.

EYu Kirichenko: scientific supervision, visual representation, validating results, writing a draft manuscript.

DA Sedova: writing a manuscript, editing.

Conflict of Interest Statement: **the authors declare no conflict of interest.**

All authors have read and approved the final manuscript.

Поступила в редакцию / Received 05.08.2025
Поступила после рецензирования / Reviewed 01.09.2025
Принята к публикации /Accepted 05.09.2025