

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Скалецкого Николая Николаевича на диссертационную работу Хесуани Юсефа Джоржевича на тему «Моделирование функциональной тканеинженерной конструкции щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность избранной темы

Основной задачей регенеративной медицины, бурно развивающейся в последние годы, является разработка технологий, способных восстанавливать структуру и функции органов и тканей, нарушающихся при различных патологических состояниях. Одними из самых распространенных хронических заболеваний являются те, которые связаны с нарушением функции эндокринных органов. Медикаментозная коррекция эндокринопатий не является полноценной заместительной терапией и не способна предотвратить развитие осложнений, снижающих качество жизни и уменьшающих ее продолжительность. Эта проблема касается и лечения гипофункциональных состояний щитовидной железы, развивающихся чаще всего вследствие аутоиммунного тиреоидита, а также в результате тиреоидэктомии или обширной резекции органа. Лечение синтезированными тиреоидными гормонами не приводит к полноценной компенсации гипотиреоза из-за нестабильной чувствительности к препаратам тироксина и трийодтиронина и невозможности обеспечить ими организм пациента в соответствии с текущими его потребностями.

Золотым стандартом заместительной терапии гипотиреоза могла бы стать пересадка донорской щитовидной железы или клеточного препарата, состоящего из гормонально-активных тиреоцитов, однако неразрешимая

проблема дефицита донорских органов и необходимость проведения иммуносупрессивной терапии при выполнении аллотрансплантации делает такое лечение невозможным или нецелесообразным.

Наиболее реальным выходом из создавшейся ситуации стало бы использование в качестве неограниченного донорского материала щитовидной железы животных, тем более что предварительное культивирование тиреоидной ткани может значительно снизить ее иммуногенность и позволит не применять иммуносупрессии. Однако существующее подозрение о возможности переноса зоонозной инфекции препятствует активному применению клеточной ксенотрансплантации в клинике. Поэтому вместо использования созданных природой и функционирующих по принципу обратной связи эндокринных структур приходится создавать тканеинженерные конструкции (ТИК), состоящие из неиммуногенного клеточно-тканевого компонента, полученного обычно путем дифференцировки стволовых клеток, и каркасного компонента, имитирующего внеклеточный матрикс. Роль матричной части ТИК должна состоять в обеспечении в той или иной степени связи клеточного имплантата с организмом пациента с целью достижения длительного его выживания и адекватного функционирования. Выполнению этой сложной, но актуальной задачи и посвящена настоящая работа, основной целью которой явилась разработка экспериментальных моделей тканеинженерной конструкции щитовидной железы (ЩЖ) с использованием технологии 3D-биопринтинга.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Результаты исследований, которые были получены в ходе выполнения поставленных задач, вполне оправдали усилия, которые были затрачены диссертантом. Для упрощения оценки полноты и результативности проведенных исследований, определения степени обоснованности научных

положений, выводов и рекомендаций целесообразно как бы перекинуть мостик между задачами и выводами настоящей работы.

Итак, первая задача, состояла в исследовании разных гидрогелей для 3D-биопечати и разработке наиболее оптимальной технологии печати гидрогелевой подложки. Полученные результаты позволили сделать соответствующий вывод о том, что разработанная методика 3D-биопечати с применением высокоочищенного коллагена позволяет послойно печатать сложные геометрические фигуры с необходимой точностью.

Задачей № 2 было исследовать свойства, «поведение» и жизнеспособность тканевых сфероидов из клеток разных типов в динамике культивирования для подбора условий их биопечати. В результате выполнения этой задачи был сделан вывод о том, что с использованием 5 типов клеточных культур удалось исследовать свойства и «поведение» тканевых сфероидов, полученных тремя методами, и показана жизнеспособность не менее 80% клеток в течение 3 суток после формирования сфероидов, способность клеток к миграции из сфероидов (особенно выраженная у клеток соединительнотканного происхождения) и способность сфероидов к слиянию в течение 5-7 суток; полученные данные обосновали условия для биопечати и сроки созревания напечатанных 3D-конструкций.

Следующая задача (№ 3) состояла в разработке «турникетной» системы для биопринтера Fabion, позволяющей печатать одиночными тканевыми сфероидами. Эта задача была также успешно решена, что полностью отражено в выводе.

Четвертая задача состояла в разработке технологии получения и исследовании морфологической и функциональной полноценности эмбриональных эксплантов щитовидной железы и аллантаисов мыши как биологических объектов для последующей биопечати. При этом с целью изучения функции ТИК ЩЖ мыши *in vivo* было проведено (в рамках пятой задачи) определение свойств и гистологических особенностей тканеинженерной конструкции ЩЖ мыши, имплантированной мышам с ЩЖ

нокаутированной введением I^{131} . Результаты, полученные при решении этих двух задач (№ 4 и № 5) позволили сделать 4-й вывод о морфологической и функциональной полноценности ТИК щитовидной железы мышей, полученных путем 3D-биопечати из сфероидов эмбриональных эксплантов щитовидной железы, аллантаисов мыши и коллагена.

Судя по количеству выводов (их оказалось четыре), сделанных диссертантом, исследования, посвященные решению последней, 6-й задачи, оказались наиболее плодотворными. Она состояла в разработке методики выделения и инкубации одиночных тиреоцитов, тиреоидных фолликулов и получения микроорганных культур ЩЖ человека, а также исследовании возможности их использования при создании путем 3D-биопечати тканеинженерной конструкции. На основании результатов, полученных при решении этой задачи, были сделаны следующие выводы: а) При разработке методики получения материала для 3D-биопринтинга прототипа щитовидной железы человека показан медленный фолликулогенез из минорной популяции тиреоцитов при их 3D-культивировании в геле на основе лизата тромбоцитов на границе раздела воздух-гель; б) Разработана методика выделения тиреоидных фолликулов из ткани щитовидной железы человека и показана возможность их сохранения в функциональном состоянии в геле на основе лизата тромбоцитов не менее 4,5 месяцев; в) Установлено, что микроорганные 3D-культуры щитовидной железы человека *in vitro* в среде, обогащенной лизатом тромбоцитов человека, на границе раздела фаз жидкость-воздух в течение 21 суток сохраняют фолликулярную структуру, способность захватывать йод и синтезировать тиреоглобулин и активизировать эти процессы в ответ на стимуляцию ТТГ; г) И, наконец, последний вывод, который состоит в том, что были показаны: развитие *in vitro* структуры микроорганных 3D-культур щитовидной железы человека за счет формирования внеклеточного матрикса (коллагена), пролиферация тиреоцитов и принципиальная возможность получения функциональных конструкций щитовидной железы путем 3D-биопечати.

Итак, 6 поставленных задач позволили сделать 8 выводов, которые естественным путем следуют из результатов проведенных исследований, выполненных в достаточном объеме, и позволяют дать ценные рекомендации.

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов

Так как для достижения цели диссертации автором были решены задачи, в ходе решения которых были проведены оригинальные исследования и получены убедительные результаты, их научная новизна и достоверность не вызывают сомнений.

Так, впервые с использованием разработанной технологии экструзионного 3D-биопринтинга создана экспериментальная модель тканеинженерной конструкции щитовидной железы на основе сфероидов, полученных из эмбриональных эксплантов щитовидной железы и аллантаисов мыши, трансплантация которой под капсулу почки мышей с нокаутированной I^{131} ЩЖ обеспечила синтез и продукцию тиреоидных гормонов в организме подопытных животных.

С использованием геля на основе лизата тромбоцитов доноров разработаны методики долгосрочного 3D-культивирования тиреоцитов и тиреоидных фолликулов человека с сохранением их функциональной активности и показана реальность фолликулогенеза из стволовых клеток щитовидной железы человека.

Разработана методика получения микроорганных 3D-культур из щитовидной железы человека на границе раздела сред и выявлено развитие их структуры за счет пролиферации тиреоцитов и синтеза внеклеточного матрикса фибробластоподобными клетками. Показана принципиальная возможность использования таких культур для 3D-биопринтинга.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Помимо научной ценности, диссертация Ю.Д.Хесуани имеет несомненную практическую значимость, учитывая то, что в процессе выполнения поставленных задач ставились и решались вопросы методического характера. Так, разработанная технология 3D-биопринтинга, включающая методику 3D-биопечати с использованием коллагена, методику экструзионной 3D-биопечати тканевых сфероидов, обеспечивающую условия для их последующего созревания и слияния в ТИК, а также применение геля на основе лизата тромбоцитов для 3D-культивирования, может быть использована для создания ТИК различных органов и тканей.

Оценка содержания и оформления диссертации

Обсуждаемая работа написана по традиционной форме, изложена на 186 страницах машинописного текста, что для кандидатской диссертации является довольно большим объемом. Она состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием использованных материалов и методов, главы «Результаты», заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 198 отечественных и зарубежных источников. Полученные данные сведены в 16 таблиц и проиллюстрированы 70 рисунками, которые, безусловно, украсили работу и облегчили ее понимание.

В порядке оценки содержания диссертации хотелось бы остановиться на обзоре литературы и описании материалов и методов. Содержание этих разделов диссертации позволяет оценить аналитические способности автора и его умение правильно организовать процесс научного исследования.

Обзор литературы производит самое благоприятное впечатление. Интересен экскурс в историю создания трехмерной печати, хотя слово «история» звучит в данном случае несколько пафосно, та как первый патент по этой технологии был получен Халлом недавно - в 1986 году, то

есть немногим более 30 лет назад, и был посвящен разработке метода стереолитографии на основе фотополимеризации. В обзоре, как в хорошем учебнике, дается определение термина «трехслойная печать», описываются основные ее этапы, приводятся различные варианты этой технологии. По мнению автора, важная роль принадлежит программному обеспечению планирования биопечати, которое должно быть «гибким», то есть применять различные технические подходы в соответствии с особенностями используемых материалов. Специальный раздел обзора посвящен описанию различных гидрогелей (как на основе синтетических, так и натуральных материалов), пригодных для выполнения биопечати. Приведены новейшие данные по разработке некоторых новых подходов к биопринтингу (акустический, магнитный), а также биопечать *in situ*.

Само собой разумеется, что особое внимание в обзоре, почти 20 страниц, уделено щитовидной железе как объекту для биопринтинга. Автор напоминает читателю, что структурной единицей ЩЖ являются тиреоидные фолликулы (ТФ), состоящие из тиреоцитов и единичных С-клеток. Для создания полноценных ТИК ЩЖ необходимо, чтобы в ее состав входили гормонально-активные тиреоциты, которые можно получить, прежде всего, путем культивирования тиреоидной ткани. Поэтому диссертант проводит тщательный анализ методов получения культур из щитовидной железы, начиная с первых работ по 2D-культивированию тиреоцитов, выполненных Pulvertaft в 1959 году. С тех пор опробовано много культуральных сред и добавок к ним для получения морфологически и функционально зрелых тиреоцитов в 2D-монослое. При этом объектом изучения явились первичные культуры ТЦ собак, свиней, крыс, человека. Одним из наиболее эффективным способом стабилизации первичных культур, получаемых из ЩЖ, следует признать перевод их в системы для 3D-культивирования, в частности, в гидрогели, из которых наиболее подходящими для формирования ТИК щитовидной железы являются коллагенсодержащие гидрогели.

Чрезвычайно перспективным подходом в технологии трехмерной биопечати является, по мнению автора, печать с использованием не одиночных клеток, а клеточных трехмерных агрегатов, так называемых тканевых сфероидов. Тканевые сфероиды имеют ряд значимых преимуществ по сравнению с клеточной суспензией. Они обусловлены высокой плотностью клеток внутри сфероидов, синтезом клетками сфероидов внеклеточного матрикса, способностью сфероидов к слиянию в органоподобные структуры с формированием характерной тканевой архитектоники.

Анализ литературных данных, представленных в обзоре, позволил автору настоящей диссертации определить наиболее перспективные направления исследования и не тратить время на ненужное подтверждение уже известных истин и доказанных фактов и избежать проведения экспериментов по тупиковым направлениям.

Теперь об описании использованных **материалов и методов**. Этот раздел довольно большой, он занимает целых 27 страниц, но при его прочтении не возникает ощущение монотонности изложения и перегруженности информацией, так как представленные методические приемы прекрасно иллюстрированы и являются конкретным и понятным руководством к действию. Так, детально описаны методы получения тканевых сфероидов, способы оценки их жизнеспособности, технология 3D-биопринтинга ТИК ЩЖ, их функциональной активности *in vitro* и *in vivo*, а также способы получения культур из ЩЖ человека. Ценность этого раздела диссертации состоит также в том, что он может стать основой для написания в последующем полноценных методических рекомендаций.

Количество работ по теме диссертации (всего их 21) более чем достаточное, в том числе – 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 9 - в международных базах цитирования Scopus и WoS, а также 1 патент РФ и 1 Евразийский патент, что

подтверждает основательность методического и аналитического подходов автора к исследовательской работе.

В процессе прочтения диссертации возникло несколько замечаний, которые не носят принципиального научного характера, а являются рекомендациями по литературной коррекции текста. Так, описывая сфероиды, автор как бы одушевляет их, говоря об их «поведении», которое, как известно, может быть свойственно только живым организмам. Лучше назвать это динамикой изменения морфофункциональных свойств сфероидов при их инкубации *in vitro*. Другое замечание: когда сообщается, что биопринтер Fabion «печатает одиночными тканевыми сфероидами», это придает такому процессу какой-то физиологический оттенок. Правильнее писать, что осуществляется печать сфероидов, а не сфероидами. Ведь, например, фотопринтер печатает фотографии, а не печатает фотографиями. Также вызывает сомнение правильность применения в контексте диссертации таких понятий, как «конструкт» и «терминировать».

Однако, помимо этих и некоторых других стилистических и терминологических поправок, существенных замечаний и возражений в процессе ознакомления с диссертацией не возникло, что свидетельствует о ее полноценности и достаточно высоком научном и литературном уровне.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертация Хесуани Юсефа Джоржевича на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи создания экспериментальной модели тканеинженерной конструкции щитовидной железы, имеющей существенное значение для регенеративной медицины, клеточной биологии, цитологии и гистологии, что соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении

высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0094/Р от 31.01.2020 года, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Главный специалист отделения подготовки научных и медицинских кадров с аккредитационно-симуляционным центром ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, доктор медицинских наук (14.01.24 – трансплантология и искусственные органы), профессор



Скалецкий Николай Николаевич



Адрес юридический и фактический: 123182, г. Москва, Щукинская улица, дом 1

Тел. служ.: 8(499)190-42-66

Эл. почта: NSkaletsky@mail.ru