

На правах рукописи

Хесуани Юсеф Джоржевич

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ
КОНСТРУКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ТЕХНОЛОГИИ 3D-БИОПРИНТИНГА**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология
(медицинские науки)

Автореферат

диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, частном учреждении «3Д БиопринтингСолюшенс»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Сергеева Наталья Сергеевна

Официальные оппоненты:

Скалецкий Николай Николаевич - доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплатологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России, отделение подготовки научных и медицинских кадров с аккредитационно-стимуляционным центром, главный специалист

Ярыгин Константин Никитьевич – член. - корр РАН, доктор биологических наук, ФГБНУ ИБМХ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», лаборатория клеточной биологии, заведующий лабораторией.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военная медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «16» ноября 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАО ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119991, г. Москва, ул. Трубецкая д.8 стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАО ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.м.н., доцент



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Старение населения, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, а также высокий травматизм являются основными причинами острой или постепенно развивающейся структурной и функциональной неполноценности ряда жизненно важных органов и тканей. Внедрение в хирургическую практику, и, в частности, в онкологию, реконструктивно-пластических подходов позволяет при опухолях отдельных локализаций восстановить функцию [Albergo J.I. et al., 2017] или утраченный объем органов [Allen C.J. et al.]. Однако при дефектах большинства других органов восстановления структурно-функциональной целостности, как правило, добиться не удается.

В отдельных случаях эту проблему удастся решить трансплантацией донорских органов. Однако разрыв между потребностью в органах и их доступностью огромен [Lynch R.J. et al., 2019]. Кроме того, аллотрансплантация органов требует постоянной иммуносупрессии с множеством побочных эффектов, что обуславливает низкое качество жизни таких пациентов.

Если же утрачена или снижена функция железы внутренней секреции, то общепринятым подходом сегодня является заместительная гормонотерапия. Однако при длительном ее использовании, ткани становятся недостаточно восприимчивыми к гормональным препаратам [Walsh J.P. et al., 2011].

Все вышесказанное является обоснованием разработки альтернативных технологий восстановления тканей и органов. Одной из них, в частности, является бурно развивающаяся в последнее десятилетие клеточная терапия и тканевая инженерия.

Клеточная трансплантация, несмотря на множество нерешенных пока проблем, демонстрирует в экспериментальных исследованиях ряд преимуществ в сравнении с пересадкой органа [Прохоров А.В., 2002; Третьяк С.И., 2011]. Однако такие клеточные технологии являются в определенной мере «функционально неполноценными» и из-за отсутствия тканевого уровня организации.

Логическим развитием клеточных технологий является тканевая инженерия, в том числе, с использованием 3D-биопринтинга, позволяющая разрабатывать конструкты на основе тканевых сфероидов и/или тканевых эквивалентов [Mironov V. et al., 2003; Gutzweiler L. et al., 2017].

Одним из самых перспективных методов биопечати является экструзионный 3D-биопринтинг [Murphy S. et al., 2014], который позволяет использовать для биопечати спектр гидрогелей из биосовместимых полимеров и неорганических

компонентов, клетки, а также тканевые сфероиды, формируя тканевые трехмерные эквиваленты по заданным программам [Peltola S.M. et al., 2008; Rocca M., 2017]. Технология 3D-биопринтинга пока находится в стадии разработки устройств и методологий создания тканевых эквивалентов. С этих позиций тема настоящей разработки является актуальной.

Степень разработанности темы исследования

В последние десятилетия активно развивается технология 3D-биопечати для создания тканеинженерных конструкций, способных выполнять определенную утраченную функцию того или иного органа или ткани. Представленные новые данные согласуются с имеющимися в литературе данными по возможности применения технологии 3D-биопечати для создания трехмерных живых функциональных ТИК. В работе апробирована технология экструзионного биопринтинга с использованием методов непрерывной (аналоговой) и капельной печати. Полученные в исследовании результаты обработаны с использованием адекватных методов анализа.

Цель исследования: разработка экспериментальных моделей тканеинженерной конструкции щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга для их формирования.

Задачи исследования:

1. Исследовать разные гидрогели для 3D-биопечати и разработать технологию печати гидрогелевой подложки наиболее оптимальным из них.
2. Исследовать свойства, поведение и жизнеспособность тканевых сфероидов из клеток разных типов в динамике культивирования для подбора условий их биопечати.
3. Разработать «турникетную» систему для биопринтера Fabion, позволяющую печатать одиночными тканевыми сфероидными.
4. Разработать технологию получения и исследовать морфологическую и функциональную полноценность эксплантов эмбриональных эксплантов (ЭЭ) щитовидной железы (ЩЖ) и аллантоисов (АЛЛ) мыши как биологических объектов для последующей биопечати.
5. Изучить *in vivo* на модели мышей с I^{131} -нокаутированной ЩЖ органозамещающие свойства и гистологические особенности тканеинженерной конструкции ЩЖ мыши, созданной по разработанной технологии.
6. Разработать методики выделения и культивирования одиночных тиреоцитов (ТЦ), тиреоидных фолликулов (ТФ) и микроорганных культур (МО) ЩЖ человека и исследовать возможности их использования для создания путем 3D-биопечати тканеинженерной конструкции (ТИК).

Научная новизна исследования

Исследованы условия экструзионной 3D-биопечати на биопринтере Fabion различными биосовместимыми гидрогелями и тканевыми сфероидными структурами различного состава, в том числе с использованием сконструированной «турникетной» системы; на основании полученных данных предложена методология 3D-биопринтинга.

Впервые с использованием разработанной технологии экструзионного 3D-биопринтинга сформирована ТИК ЩЖ на основе сфероидов ЭЭ ЩЖ и АЛЛ мышцы, трансплантация которого под капсулу почки мышей с нокаутированной I^{131} ЩЖ обеспечила синтез тиреоидных гормонов на уровне ~ 50% от исходного.

С использованием геля на основе лизата тромбоцитов (ЛТ) доноров разработаны методики долгосрочного 3D-культивирования ТЦ и ТФ человека с сохранением их функциональной активности и показан фолликулогенез из стволовых клеток ЩЖ человека.

Разработана методика 3D-культивирования МО ЩЖ человека на границе раздела сред и выявлено развитие их структуры за счет пролиферации ТЦ и синтеза внеклеточного матрикса фибробластоподобными клетками. Показана принципиальная возможность использования МО ЩЖ человека для 3D-биопринтинга.

Научно-практическая и теоретическая значимость исследования

Разработанная технология 3D-биопринтинга, включающая: методику 3D-биопечати коллагеном (с разными температурными режимами емкости форсунки и платформы), методику экструзионной 3D-биопечати тканевыми сфероидными структурами и условия их последующего созревания и слияния в конструкторе, а также применение геля на основе ЛТ доноров, богатого факторами роста и другими биологически активными веществами, для 3D-культивирования, может быть использована как этап формирования конструкторов разных органов и тканей.

Методология и методы исследования

В качестве модельной системы для апробации технологии 3D-биопринтинга была выбрана ЩЖ ввиду сравнительной простоты как структуры самого органа, так и возможности оценки функциональной полноценности конструктора путем иммунохимического анализа способности захватывать йод (I) из среды, синтезировать тиреоглобулин (ТГ) и тиреоидные гормоны.

На первом этапе работы при использовании культур клеток первичных фибробластов человека, миобластов крысы линии L6, иммортализованного эпителия почки линии НЕК293, ММСЖ жировой ткани человека и первичных хондроцитов барана были изучены свойства и поведение тканевых сфероидов – способность к слиянию и

распластыванию, а также исследована возможность миграции клеток из тканевых сфероидов. Сфероиды были получены методами «висячей капли», в агарозных репликах с использованием силиконовых форм и в 96-луночных плашках с малоадгезивной поверхностью. Также была разработана методика 3D-биопечати тканеинженерного конструкта с использованием коллагена 1-го типа. Для этого биопринтер Fabion был оснащен системами подогревания/охлаждения для полимеризации коллагена при физиологическом pH (7,2-7,4) и разработана специальная «турникетная» система, позволяющая производить 3D-биопечать одиночными сфероидами.

В качестве «строительных блоков» для создания тканеинженерной конструкции ЩЖ мышцы были использованы сфероиды из эмбриональных эксплантов (ЭЭ) и АЛЛ мышцы.

Морфологическая и функциональная полноценность конструктов ЩЖ мышцей была оценена *in vitro* иммуноцитохимическими методами, а далее – *in vivo* – на модели их имплантации под капсулу почки мышам линии CD-1 с нокаутированной радиоактивным йодом (I^{131}) ЩЖ.

На следующем этапе были разработаны методики получения и 3D-культивирования ТФ, ТФ и МО ЩЖ человека с применением геля на основе ЛТ доноров, а также среды культивирования, обогащенной лизатом. Данный подход позволил сохранять функциональную активность компонентов ЩЖ человека в течение длительного времени.

На заключительном этапе работы был сформирован конструкт ЩЖ человека с использованием разработанной технологии, коллагеновой подложки и решетки, в каждую ячейку которой были помещены МО ЩЖ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика 3D-биопечати коллагеном с разным температурным режимом емкости форсунки и платформы и тканевыми сфероидными с последующим дозреванием тканевого эквивалента в течение 5-7 дней позволяет сформировать с высокой точностью функционально активный ТИК, что было доказано на модели ЩЖ мышцей, сформированной на основе ЭЭ ЩЖ и АЛЛ.
2. Как этап формирования технологии 3D-биопринтинга ЩЖ человека разработаны методики долгосрочного культивирования ТЦ, ТФ и МО в среде, обогащенной ЛТ, на границе раздела фаз гель/воздух или жидкость/воздух, обеспечивающие реализацию морфогенетических потенциалов этих структур.

Достоверность результатов и апробация работы

Представленные новые результаты согласуются с имеющимися в литературе данными по возможности применения технологии 3D-биопечати для создания трехмерных живых

функциональных ТИК. Полученные в исследовании данные обработаны с использованием адекватных методов анализа.

Результаты исследования были многократно представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, таких как International Conference on Biofabrication 2015 (Утрехт, Голландия, 2015), 2nd National Congress on Regenerative Medicine (Москва, Россия, 2015), International Symposium «New Directions in 3D Bioprinting» (Москва, Россия, 2016), Tissue Engineering, Biofabrication & 3D-Bioprinting in Life Sciences (Бостон, США, 2016), 2nd International Conference on 3D Printing in Medicine (Майнц, Германия, 2017), Bioprinting & 3D printing in the Life Sciences (Сингапур, 2017), Международный биомедицинский саммит (Москва, Россия, 2018).

Личный вклад автора

Анализ данных протоколов ведения экспериментов, компьютерных баз данных и статистического анализа выполнен лично автором. При активном участии Хесуани Ю.Д. были проведены эксперименты по трансплантации тканеинженерных конструкций щитовидной железы мышей с последующим анализом лабораторных показателей и гистологического исследования после терминирования лабораторных животных. Исследователь лично проводил эксперименты по созданию тканеинженерных конструктов с использованием технологии 3D-биопечати, формировал трехмерную модель, проводил культивирование клеток, формирование тканевых сфероидов с использованием разных методов. Автор провел статистический анализ результатов исследования. Статистическая обработка результатов измерений была произведена с использованием методов описательной статистики. Определено среднее значение и стандартная ошибка среднего. Для установления статистической достоверности использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа выполнена в соответствии с паспортом специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 3,5,7.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 21 печатная работа, 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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 186 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием

использованных материалов и методов, главы «Результаты», заключения и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 198 отечественных и зарубежных источников. Полученные данные сведены в 16 таблиц и проиллюстрированы 70 рисунками.

Содержание диссертационной работы

Материалы и методы исследования

1.Использованные методы получения тканевых сфероидов:

- метод «висячей капли» с использованием Hangingdropplate [Raghavan Sh., et al., 2016].
- метод получения тканевых сфероидов в агарозных репликах с использованием силиконовых форм [Napolitano A., et al., 2007].
- метод получения тканевых сфероидов с использованием 96-луночных плашек с малоадгезивной поверхностью(Pawan N., et al., 2017].

Подробно процедуры формирования сфероидов из клеток разных типов описаны в диссертационной работе.

2. Количественную оценку жизнеспособности клеток осуществляли с использованием реагента CellToxGreenDye (Promega, США), содержащего краситель, не способный проникать в живые клетки, однако проникающий в мертвые клетки через поврежденную мембрану. При этом наблюдается флуоресценция, интенсивность которой пропорциональна количеству мертвых клеток.

3. Визуализацию живых и мертвых клеток в тканевых сфероидах осуществляли с использованием набора Cell stain double staining Kit (Sigma, США) для одновременной флуоресцентной окраски живых (с помощью кальцеин-ацетоксиметила и мертвых (с помощью пропидия йодида (PI)) клеток.

4. Подготовку тканевых сфероидов для изучения сканирующей электронной микроскопии осуществляли на электроспиннинговом матриксе по стандартной методике совместно с сотрудниками Центра Коллективного Пользования электронной микроскопии института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (Борок, Россия).

5. Оценку механических свойств тканевых сфероидов методом сжатия осуществляли на микротензиометре MicroSqusher (CellScale, Canada). Обработка полученных данных включала расчет модуля Юнга на участке кривой до деформации 20%.

Измерение диаметра и округлости сфероидов осуществляли с помощью программы Image J 1.48v (NIH, Bethesda, MD, США), используя формулу: $4 \cdot \text{area} / (\pi \cdot \text{major axis}^2)$, где

area – площадь эллипса, в который вписывается сфероид; major axis – большая ось эллипса. Значение округлости, равное 1, соответствует правильному кругу. Чем меньше значение округлости, тем более вытянутой формой обладает сфероид.

6. Методики исследования распада слияния тканевых сфероидов

6.1. Анализ слияния тканевых сфероидов проводили с использованием микропланшетов для формирования сфероидов (Corning Spheroid Microplates, Corning, кат. США). Пары хондросфер, полученных из первичных культур хондроцитов барана после 1-21 дня культивирования, помещали в ячейки микропланшета таким образом, чтобы сфероиды в каждой паре контактировали друг с другом, и инкубировали в течение 5 дней.

6.2. Анализ распада слияния тканевых сфероидов проводили с использованием 24-луночных культуральных планшетов из адгезивного пластика (Corning, кат. # CLS3527). Изображения получали путем световой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E, Япония), архивируя с помощью цифровой камеры, через 0-32 часа инкубации.

6.3. Методика исследования кинетики слияния тканевых сфероидов на примере ЭЭ ЦЖ мышцы.

Сформированные сфероиды из ЭЭ ЦЖ мышцы помещали в коллагеновый гидрогель в ряд так, чтобы сфероиды находились в непосредственном контакте друг с другом и инкубировали в CO₂ инкубаторе (37°C и 5% CO₂) до тех пор, пока процесс слияния не завершился. Ежедневно контролировали процесс слияния сфероидов с помощью инвертированного микроскопа.

7. Выделение ЭЭ ЦЖ мышцы осуществляли из эмбрионов половозрелых самок мышей линии CD-1. Для получения эмбрионов самок мышей спаривали с самцами той же линии и того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях вивария МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» «МЗ РФ». Все эксперименты на животных соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных. Диссекцию ЭЭ ЦЖ мышцы проводили по методу, описанному Pierreux C. с соавторами (2014 г.) на сроке беременности 14.5-дней, на котором начинался эмбриональный фолликулогенез и васкуляризация ЦЖ.

8. Выделение АЛЛ мышечной ткани осуществляли из 8.5-дневных эмбрионов мышей CD-1, так как на этом сроке АЛЛ содержит значительное количество прогениторных эндотелиальных клеток и происходит активное формирование сосудов.

9. Выделение коллагена из крысиных хвостов и приготовление гидрогеля на его основе осуществляли по методу Pulverta соавторами (1959 г.). Для приготовления коллагенового геля 890 µl раствора коллагена (3.12 мг/мл) перемешивали с 60 µl NaOH (1M), 250 µl 7,5% NaCO₃ и 300 µl PBS.

10.3D-биопринтингТИК ЩЖ из ЭЭ и АЛЛЩЖ в коллагеновом геле был осуществлен с использованием биопринтера Fabion, оснащенного специальной форсункой с устройством, позволяющим печатать по одному сфероиду (производство 3Д Биопринтинг Солюшенс, Россия) - Рис.1. Данное устройство включает в себя поршневой насос, микрофлюидный чип, поршень для загрузки сфероидов, захватывающий шприц, трубку для размещения сфероидов с желобком для отвода жидкости.

Платформа для печати двигалась в координатах ХУ с шагом в 5 мкм была оснащена устройством для нагрева. Для печати коллагеном была разработана система охлаждения/нагрева шприцов с контролируемым нагревом (диапазон нагрева от комнатной температуры до 200 °С с шагом нагрева 0.1 °С) и системой охлаждения (-4 °С и ниже с шагом охлаждения 0.1 °С).

11. ИнкубациюТИК ЩЖ проводили в течение 4 суток в биореакторе на поверхности прозрачной мембраны из ПТФЭ, покрытой тонким слоем коллагена. Для снабжения ткани кислородом питательную среду наливали до уровня ПТФЭ мембраны. Далее осуществляли иммуногистохимическое окрашивание и/или имплантацию конструкторов (в соответствии с целями экспериментов).

12. Иммунофлуоресцентный анализ ТИК ЩЖ осуществлен на тонких гистологических срезах с использованием моноклональных мышинных антител к Е-кадгерину (BDBiosciences, США), крысиных антител к PECAM (BD Biosciences, США), моноклональных мышинных антител к эзрину, (ThermoFisher Scientific, США) кроличьих антител к каспазе-3а, (CellSignaling, США) антител кролика к рННЗ, (CellSignaling, США), моноклональных антител к TTF-1 (Dako, Дания). Клеточные ядра окрашивали Hoechst (Sigma-Aldrich, США).

13. Инактивация функции ЩЖ. Части животным (n=11) за 4 месяца до имплантации было введено внутривенно $150\mu\text{Ci}^{131}\text{I}$. Данный этап работы был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. Далее проводилась передержка животных в течение четырех месяцев. Доказательством полной инактивации служил нулевой (неопределяемый) уровень тироксина (T_4) в сыворотке крови этих животных.

14. Методика *in vivo* оценки функциональной активности ТИК ЩЖ, полученных путем 3D-биопринтинга из ЭЭ ЩЖ и АЛЛ мыши.

Животных разделили на 3 группы: I группа (контрольная), n=6 – этим животным была выполнена имплантация коллагенового геля под капсулу почки; через 4 недели животных вывели из эксперимента. II группа (n=15) – контрольная (интактные животные). III группа

(n=11) – мыши через 4 месяца после инактивации ЩЖ внутрибрюшинным введением I^{131} ; эта группа была разделена на 2 подгруппы: IIIa (n=6) – без дополнительных оперативных вмешательств; IIIб (n=5) – животным были подсажены ТИК размерами 1,5x1,5x1,0 мм ЩЖ под капсулу почки. Этапы имплантации ТИК под капсулу почки мышей описаны ранее [Bulanova et al., 2017]. На всех этапах экспериментов контролировали температуру тела животных и уровень T_4 в сыворотке крови). Почки с имплантатами были исследованы гистологическим методом через 5 недель после операции.

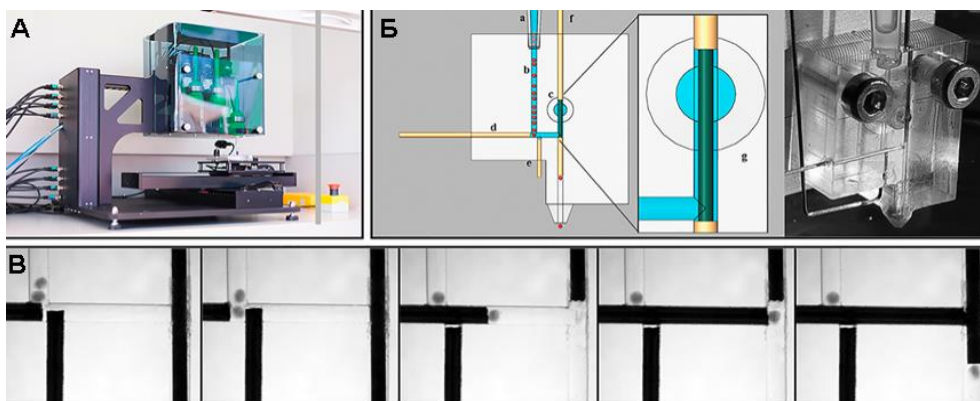


Рисунок 1 - Схема турникетной системы печати одиночными тканевыми сфероидами биопринтера. А - общий вид биопринтера; Б - турникетная система: В – последовательное изображение стадий подачи сфероидов.

15. Выделение и культивирование ТЦ, ТФ и МО ЩЖ человека осуществляли из фрагментов здоровой ткани ЩЖ, полученных после тиреоидэктомии по поводу рака ЩЖ, путем их механической дезагрегации с последующей сепарацией на серии стальных и нейлоновых сит. Культивирование МО, ТФ и ТЦ проводили в трансвеллах (Costar, США) в геле на основе ЛТ доноров на границе раздела воздух-гель, по принципу, описанному TodaS. (2011 г.). В сроки 0 сут., 1-4 сут., 5-7 сут., 11-14 сут., 1 мес., 2,5 мес., 4,5 мес. проводили фотодокументирование геля с ТФ/МО/ТЦ путем прижизненной микроскопии (микроскоп Nikon Eclipse Ti, Япония) и забор проб для определения жизнеспособности ТФ, МО и ТЦ (микротетразолиевый тесттест и прижизненное окрашивание с помощью флуоресцентного красителя Live-Dead (Molecular Probes, США)) и для приготовления гистологических препаратов. Оценку доли пролиферирующих ТЦ производили с помощью АТ: к Ki-67 (Dako, США), натрий-йодид симпортеру (NIS) (GeneTex, США)-NIS-позитивных клеток (способных захватывать I из внешней среды), к тиреоглобулину (ТГ) (Dako, США).

Данный этап работы был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории прогноза эффективности консервативной терапии опухолей МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ.

16. Оборудование для 3D-биопринтинга – биопринтер Fabion был произведен лабораторией биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс». В состав этого аппаратного комплекса, кроме описанных выше компонентов, вошли: система печати и позиционирования носиков дозаторов по осям x, y, z, которая включает систему управления печатью.

17. Статистическую обработку результатов производили с использованием методов описательной статистики, определяя среднее значение и стандартную ошибку среднего. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для установления статистической достоверности использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты исследований

1. Разработка методики 3D-биопечати гидрогелями и тканевыми сфероидными на биопринтере Fabion

Для оценки возможности печати разными материалами методом экструзии использована тестовая структура, которая объединяет наиболее часто встречающиеся при печати геометрические элементы и позволяет оценить, насколько конкретный гидрогель подходит для 3D-биопечати данной тестовой структуры. После печати тестовой структуры анализировали ее размеры и четкость печати. По отклонению измеренных значений от заданных в программе оценивалась точность печати.

Наилучшие результаты были выявлены при апробации 3D-биопечати тестовых структур гидрогелем на основе коллагена I типа.

Установлено, что при печати гидрогелем на основе коллагена I типа наблюдается небольшое различие между толщиной линий первого слоя и последующих слоев, точность печати углов сравнительно высока, в местах соприкосновения геометрических элементов происходит слияние материала, что приводит к неразличимости отдельных слоев и созданию однородной конструкции, следовательно позволяет печатать сложные геометрические формы с необходимой точностью. Кроме того, коллаген является органическим полимером природного происхождения, химически очищенным от примесных белков и гликопротеидов, что исключает развитие аллергических и воспалительных реакций в отношении напечатанных конструкторов после их имплантации *in vivo*.

Оценку цитосовместимости 3D-конструктов, напечатанных гидрогелем на основе коллагена I типа, протестировали для immortalized фибробластов мыши (линия NIH 3T3), меченых зеленым флуоресцентным белком (GFP), и тканевых сфероидов, полученных из этих клеток. Показано, что immortalized фибробласты сохраняют жизнеспособность в напечатанной ТИК по крайней мере до 7 суток после биопечати, что свидетельствует о его цитосовместимости (Рис.2).

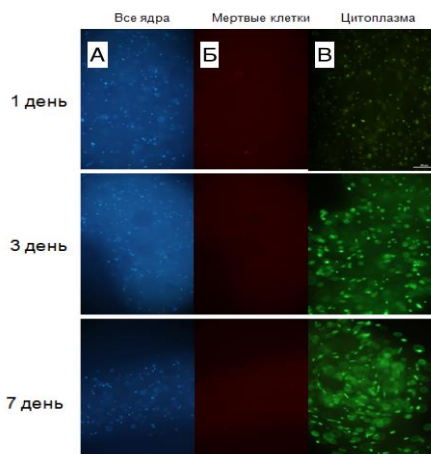


Рисунок 2 - Визуализация фибробластов линии NIH 3T3 в напечатанной ТИК на основе коллагена I типа: А- окраска ядер Hoechst 33342, Б- окраска мертвых клеток PI, В-визуализация GFP-меченые клетки, х40

2. Характеристика тканевых сфероидов на основе клеток разных типов

Исследование диаметров сфероидов, сформированных различными методами, а также их округлости в динамике культивирования до 9 дней было осуществлено для первичных фибробластов человека, миобластов крысы линии L6, immortalized эпителия почки линии HEK293, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани человека и первичных хондроцитов барана. Исходно сфероиды содержали от 1 тыс. до 27 тыс. клеток.

Установлено, что сфероиды на протяжении 9 суток культивирования вне зависимости от метода их биофабрикации сохраняли сферическую или приобретали несколько вытянутую (эллипсовидную) форму. Для одних клеточных линий выявлено увеличение диаметра сфероидов в процессе культивирования, для других – его уменьшение. Эти процессы могут быть связаны как с констрикцией или разрыхлением сфероидов, так и с пролиферацией или гибелью части клеток в сфероидах.

Показано, что изменение доли жизнеспособных клеток при культивировании зависит как от их типа, так и от исходного их количества в сфероидах (Рис.3). Во избежание появления некротического ядра в центре сфероидов в процессе культивирования нами

были выбраны сфероиды, исходное количество клеток в которых не превышало 8 тыс. на сфероид. В целом же на протяжении первых трех дней культивирования доля жизнеспособных клеток всех типов в сфероидах превосходила 80%.

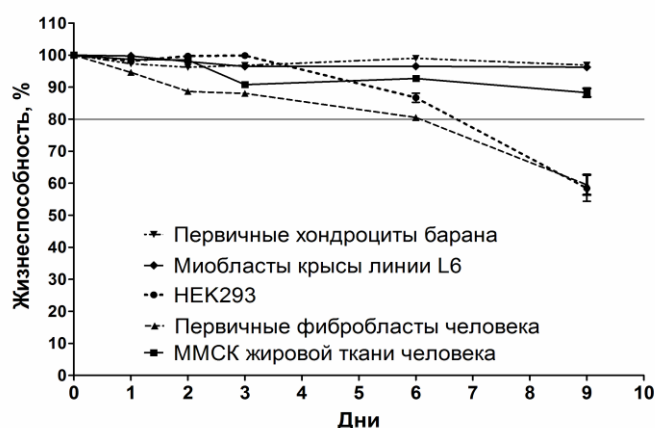


Рисунок 3 - Изменение доли жизнеспособных клеток в сфероидах в динамике культивирования (первичные хондроциты барана – 8000 клеток/сфероид; миобласты крысы линии L6 – 1000 клеток/сфероид; НЕК293 – 1000 клеток/сфероид; первичные фибробласты человека – 8000 клеток/сфероид, ММСК жировой ткани человека – 8000 клеток/сфероид); результат типичного эксперимента

3. Результаты биопечати ТИК ЩЖ на основе ЭЭ и АЛЛ ЩЖ мыши

Для печати были использованы округленные ЭЭ ЩЖ мыши (в качестве источника фолликулов ЩЖ) и округленные экспланты АЛЛ (в качестве источника эндотелиальных клеток), которые почти полностью сливались между собой в течение 96 часов.

На первом этапе была напечатана коллагеновая подложка, затем в печатающую головку загружали три ЭЭ и путем печати размещали их в центре коллагеновой подложки в непосредственной близости друг от друга линейно, согласно заданной цифровой модели. Далее в печатающую головку загружали 6 мышинных АЛЛ и печатали ими, располагая их по три с обеих сторон от ЭЭ, также согласно заданной цифровой модели. Последним этапом было запечатывание конструкта тонким слоем коллагена толщиной. В конструктах ЩЖ сфероиды сливались (Рис. 4 А, Б) и наблюдалось распространение эндотелиальных клеток вокруг эпителиальных клеток по периферии ТИК (Рис. 4, В).

Для валидации доказательства функциональности напечатанных ТИК ЩЖ их помещали под капсулу почки мышей линии CD-1 с индуцированным введением I^{131} гипотиреозом. Показана полная депривация функции ЩЖ через 8 недель после введения I^{131} и восстановление синтеза тироксина (T_4) еще через пять недель после имплантации

ТИК в среднем до 50% от исходного уровня. Гистологическая оценка области под капсулой почки через пять недель после трансплантации напечатанных ТИК ЩЖ продемонстрировала успешное приживание. В месте трансплантации наблюдалась фолликулярная структура ЩЖ с накоплением коллоида в полости фолликулов и с формированием между ТФ новых капилляров (Рис.5 А, Б).

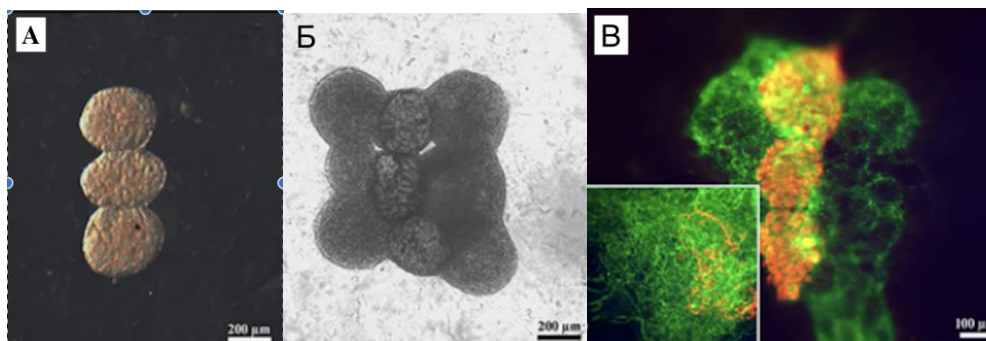


Рисунок 4 – Формирование ТИК ЩЖ мыши: А - конструктор ЩЖ мыши из 3 сфероидов, сформированных из 3-х ЭЭ; Б – ТИК из 3 сфероидов ЭЭ и 6 сфероидов АЛЛ мыши; В - 1-ые сутки культивирования ТИК после печати; окраска АТ к РЕСАМ (зеленый) и кЕ-кадгерину (красный) для визуализации эндотелиальных и эпителиальных клеток, соответственно, x200

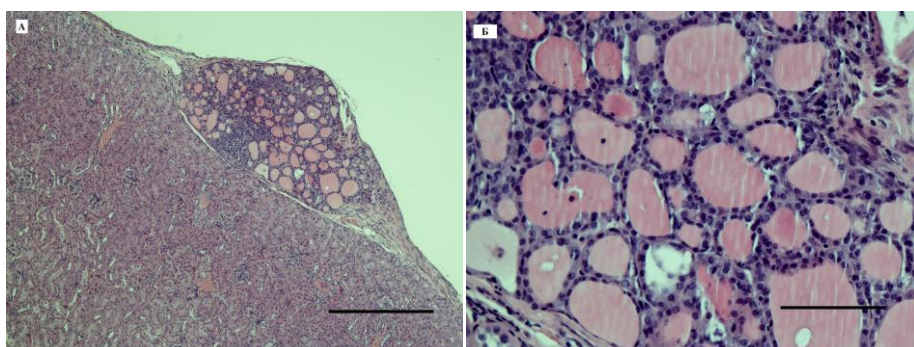


Рисунок 5 –А (x40), Б (x200) - участок почки мыши с трансплантированнойТИК ЩЖ (окраска Г-Э)

Таким образом, эксперименты *in vivo* продемонстрировали, что напечатанная ТИК ЩЖ из ЭЭ и АЛЛ обладает сильным функциональным потенциалом для компенсации недостатка естественной ткани ЩЖ. Кроме того, данный эксперимент показал принципиальные возможности разработанной технологии 3D-биопечати, что позволило перейти к биопринтингу функциональной ТИК ЩЖ человека.

4. Разработка методологии культивирования тканевых и клеточных структур щитовидной ЩЖ и первый опыт их 3D-биопечати

На первом этапе были исследованы возможности сохранения в культуре и/или масштабирования ТЦ, ТФ и МО ЩЖ человека.

К 4-м суткам культивирования количество наблюдаемых ТЦ резко сократилось, а среди оставшихся появились Ki-67 положительные клетки (Рис.6, Б). Начиная с 7-х суток оставшиеся ТЦ начали формировать ассоциаты (гнезда) из нескольких клеток, часть из которых оказалась Ki-67 и Oct-3/4-положительными (Рис.6, В), что свидетельствует об их принадлежности к компартменту стволовых или прогениторных клеток.

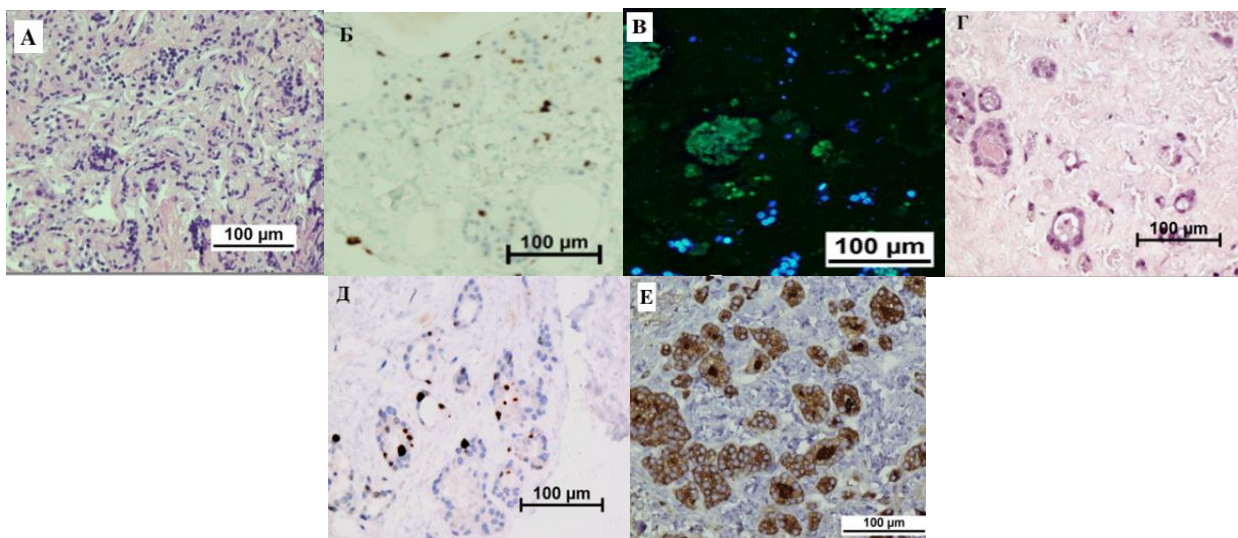


Рисунок 6 - Первичная 3D–культура ТЦ человека, А - 1-е сутки культивирования (окраска Г-Э); Б – 4-е сутки культивирования (реакция с АТ к Ki-67); В – реакция с антителами к Oct3/4 (зеленая окраска – Oct 3/4 синяя окраска – ядра ТЦ, DAPI); Г, Д - 2,5 месяца культивирования (окраска Г-Э); Д - реакция с антителами к Ki-67; Е - 4,5 месяца культивирования (реакция с АТ к ТГ); Е – 4-е сутки культивирования (увеличение x200)

Через 2,5 месяца культивирования на основе значительной части ассоциатов сформировались фолликулоподобные структуры (Рис.6, Г), в стенках которых визуализировались Ki-67-позитивные клетки (Рис.6, Д). Цитоплазма клеток и содержимое фолликулов давали положительную реакцию с антителами к ТГ (Рис.6, Е).

Таким образом, в разработанной системе для 3D-культивирования наблюдалась быстрая селекция минорной субпопуляции ТЦ, способных к пролиферации и обогащенной фракцией стволовых/прогениторных клеток, которая спонтанно формировала активные ТФ, о чем свидетельствовала позитивная реакция с АТ к ТГ. Однако, описанные процессы фолликулогенеза, с одной стороны, очень медленные, а, с другой стороны, к ним способна лишь очень небольшая субпопуляция ТЦ человека.

Соответственно, и количество образующихся ТФ столь мало, что использовать их в качестве материала для 3D-биопринтинга ЩЖ не представляется целесообразным

При культивировании в 3D-системе (гель на основе ЛТ человека, на границе раздела воздух-гель) ТФ, также выделенных из фрагментов нормальной ЩЖ, установлено, что они составляли доминантную группу на всех сроках культивирования и имели нормальные размеры (площадь - до 50×10^3 мкм²).

В динамике наблюдения ТЦ в ТФ оставались жизнеспособными и функционально активными: в стенках ТФ идентифицировались отдельные пролиферирующие клетки и ТЦ сохраняли способность захватывать I из окружающей среды (Рис.7)

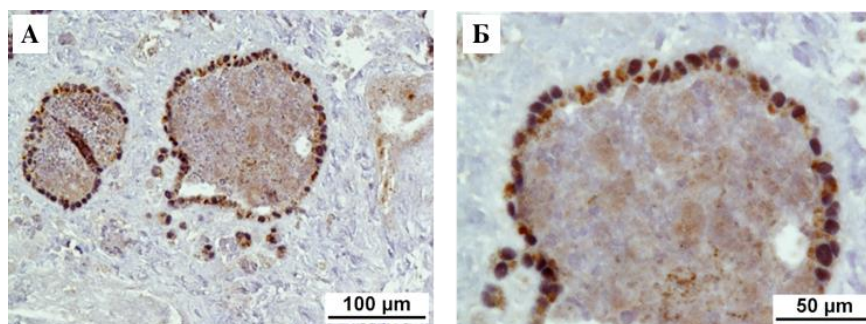


Рисунок 7 – А (x200), Б (x400) - Экспрессия NIS в культуре ТО через 4,5 месяца культивирования в геле на основе ЛТ

Таким образом разработана 3D-система длительного культивирования ТФ, однако, масштабировать их в этой системе не удалось. Далее были исследованы МО ЩЖ в качестве возможного материала для 3D-биопринтинга ЩЖ человека. Исследовали естественную эволюцию МО ЩЖ человека *in vitro*, помещая их на полупроницаемую мембрану Transwell и покрывая ростовой средой, обогащенной 10% ЛТ (культивирование МО происходило в жидкой среде на границе раздела жидкость-воздух). Установлено на протяжении 21 суток культивирования МО сохраняли фолликулярную структуру (Рис.8), между ними визуализировались капилляры и редкие С-клетки. К 14 суткам вокруг МО начинала развиваться малоклеточная соединительная ткань, которая к 21 суткам объединяла все МО в единую структуру (Рис.8 А1-А3). Формирование соединительнотканной стромы вокруг МО, вероятно, происходит благодаря деятельности фибробластов из стромы МО, которые в формирующейся ТИК располагаются по его периферии (Рис.8, В¹). Формирование коллагена вокруг МО доказано гистохимической окраской срезов по Массону. Функциональная сохранность ТФ в МО и формирующейся ТИК ЩЖ на этапах культивирования доказана их способностью захватывать I из окружающей среды (Рис.9) и синтезировать ТГ, а также активизировать этот синтез в

ответ на добавление на 14 сутки естественного стимулятора ТЦ – ТТГ. Таким образом, разработана система для долгосрочного 3D-культивирования фрагментов ЩЖ человека – МО на границе раздела жидкой среды (обогащенной 10% ЛТ) и воздушной среды, в которой происходит спонтанная структурная организация стромы ЩЖ с объединением функционально активных МО в единый конструкт. МО ЩЖ человека, таким образом, могут быть апробированы в качестве материала для 3D-биопринтинга ЩЖ человека.

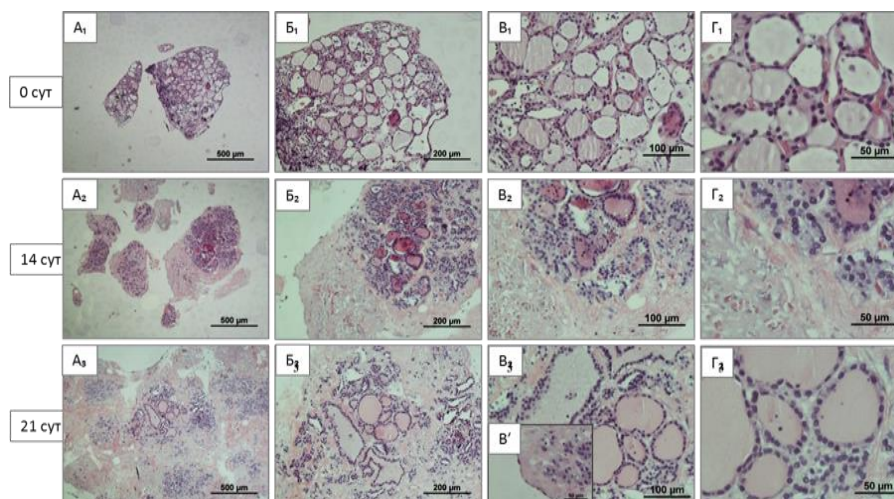


Рисунок 8 - Спонтанное формирование соединительнотканной стромы вокруг МО *in vitro* (окраска – Г-Э); А – х40, Б – х100, В – х200, Г– х400; 0, 14, 21 сутки культивирования.

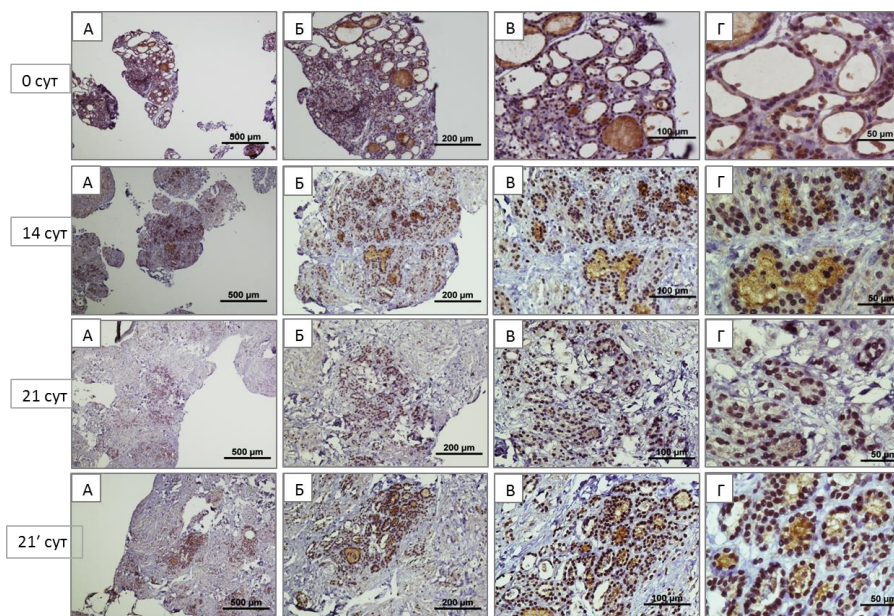


Рисунок 9 - Визуализация NIS-положительных клеток в формирующейся *in vitro* ТИК ЩЖ человека: 0, 14, 21 сутки культивирования, 21' сутки (после добавления на 14 сутки ТТГ); А – х40, Б – х100, В – х200, Г – х400

При 3D-биопринтинге ТИК ЩЖ человека последовательно печатали: тонкую коллагеновую подложку, далее в каждую ее ячейку биопринтер вносил по 1 МО. На следующем этапе напечатанные ТИК «дозревали» в течение 3-х суток в инкубаторе в питательных средах без внешних воздействий. После 3-х дней дозревания таких ТИК в отдельных случаях наблюдали подобие слияния МО (Рис.10). Структура ТФ МО в эти сроки оставалась сохранной.

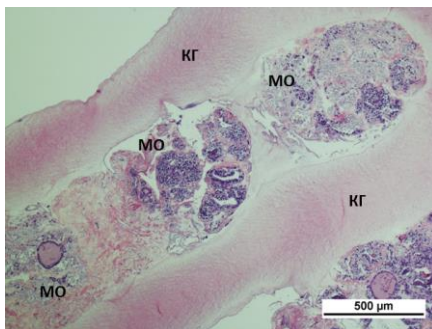


Рисунок 10 - МО ЩЖ человека в 3D-конструктах с часто расположенными ячейками; КГ– коллагеновый гель, МО – микроорганичные структуры, x40

К сожалению, проводить более длительные эксперименты после 3D-биопечати ТИК ЩЖ человека не представилось возможным, так как отсутствие их кровоснабжения *in vitro* приведет к естественной гибели клеток. Не представлялось возможным и трансплантировать эти ТИК (для проверки их функциональной полноценности) иммунодефицитным животным, так как этого необходимо было подавить функцию их собственной ЩЖ с помощью I^{131} , что, по данным литературы, эти животные не перенесут. Именно поэтому функциональную полноценность ТИК ЩЖ человека, полученных путем 3D-биопечати, показали косвенно, исследовав их способность захватывать I (по экспрессии NIS), синтезировать ТГ (по экспрессии ТГ) и способность синтезировать тиреоидные гормоны (по концентрации T_4 в окружающей среде).

Заключение

В настоящем исследовании представлены результаты разработки и оптимизации технологии трехмерного биопринтинга и ее апробации путем создания функционального органного конструкта щитовидной железы. Трехмерная биопечать является одним из наиболее быстро развивающихся направлений регенеративной медицины, так как в перспективе может позволить автоматизировать и, соответственно, стандартизировать получение трехмерных тканеинженерных конструктов. Однако полученные данным методом трехмерные конструкты, пока трансплантируются исключительно лабораторным

животным. То есть эта технология находится на стадии доклинических биомедицинских исследований. Очевидно, что все компоненты для биопечати, 3D-модель объекта и условия дозревания напечатанных конструкторов должны быть разработаны с учетом базовых характеристик замещаемого органа. Эти обстоятельства и обосновали цель настоящей работы - разработку и оптимизацию технологии трехмерного биопринтинга на модели создания функционального органного конструктора щитовидной железы.

Работа была проведена с применением оригинального биопринтера Fabion, разработанного в компании «3Д Биопринтинг Солюшенс», для которого в рамках диссертационного исследования и осуществлен подбор необходимых материалов для биопечати гидрогелями как натурального, так и синтетического происхождения, тканевых сфероидов и т.д. Был применен экструзионный тип биопечати с использованием механической платформы, передвигающейся в двух измерениях на плоскости, и подвижным экструдером (форсункой), передвигающейся по вертикали, то есть в третьем измерении. Из всех методов трехмерного биопринтинга, данный метод считается сегодня одним из наиболее перспективных ввиду возможности использования спектра биоматериалов с различными физико-химическими и биологическими свойствами.

Практические рекомендации

1. Разработанную методику 3D-биопечати коллагеном с разными температурными режимами емкости форсунки и платформы рекомендуется использовать при 3D-биопринтинге разных типов ТИК.
2. При использовании для экструзионной 3D-биопечати тканевых сфероидов рекомендуемое время созревания ТИК составляет 5-7 суток, в течение которых происходит слияние сфероидов.
3. Использование в качестве 3D-матрикса для клеток/сфероидов/ микроорганных культур геля на основе лизата тромбоцитов позволяет сохранять функциональные свойства этих культур и реализовать их морфогенетические потенции.

Выводы

1. Разработана методика 3D-биопечати тканеинженерного конструктора с использованием различных гидрогелей и установлено, что применение высокоочищенного коллагена позволяет послойно печатать сложные геометрические фигуры с необходимой точностью согласно заданной 3D-модели при охлаждении емкости форсунки до 4⁰С и подогреве (до 23⁰ С) платформы, что обеспечивает полимеризацию коллагена при физиологическом pH (7,2-7,4).

2. С использованием 5 типов клеточных культур исследованы свойства и поведение тканевых сфероидов, показана жизнеспособность не менее 80% клеток в течение 3-х суток после формирования сфероидов, способность клеток к миграции из сфероидов и способность сфероидов к слиянию в течение 5-7 суток.
3. Разработана специальная «турникетная» система для биопринтера Fabion, позволяющая производить 3D-биопечать одиночными сфероидными.
4. Показана морфологическая и функциональная полноценность тканеинженерных конструкторов щитовидной железы мышей, полученных путем 3D- биопечати из сфероидов эмбриональных эксплантов щитовидной железы, аллантаисов мыши и коллагена, на модели имплантации под капсулу почки мышам с нокаутированной радиоактивным йодом щитовидной железой.
5. 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.
6. 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.
7. Установлено, что микроорганные 3D-культуры щитовидной железы человека *invitro* 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.

Показаны: развитие *invitro* структуры микроорганных 3D-культур щитовидной железы человека, пролиферация тиреоцитов и принципиальная возможность получения функциональных тканеинженерных конструкторов щитовидной железы путем 3D-биопечати.

Опубликованные работы по теме исследования

1. Кудан Е.В., Перейра Ф. Д. А. С., Парфенов В.А., Касьянов В. А., **Хесуани Ю. Д.**, Буланова Е. А., Миронов В. А. Распластывание тканевых сфероидов, сформированных из первичных фибробластов человека, на поверхности микроволокнисто гоэлектроспиннингового полиуретанового матрикса (сканирующее электронно-микроскопическое исследование) // **Морфология.** – 2015- №6 -С. 70-74.
2. Миронов В. А., **Хесуани Ю. Д.**, Островский А.Ю. Биопечать органов – прорывная биомедицинская технология XXI века // Интеграл. – 2014 - №4 (77), С. 32-35.

3. Кудан Е.В., Гладкая И.С., Буланова Е.А., **Хесуани Ю.Д.**, Миронов В.А. Как напечатать щитовидную железу // **Природа**. – 2015- №2, С. 56-63.
4. Касьянов В.А., Перейра Ф.Д.А.С., Парфенов В.А., Кудан Е.В., Буланова Е.Б., **Хесуани Ю.Д.**, Миронов В.А. Разработка и имплантация биосовместимого протеза ушной раковины // Медицинская техника. – 2015 - №6 (294), С. 1-3.
5. Koudan E.V., Bulanova E.A., Pereira F.D., Parfenov V.A., Kasyanov V.A., **Hesuani Y.D.** and Mironov V.A. Patterning of tissue spheroids biofabricated from human fibroblasts on the surface of electrospun polyurethane matrix using 3D bioprinter // **International Journal of Bioprinting**. – 2016 - Vol.2, Issue 1, P. 1-8
6. **Hesuani Yu.D.**, Pereira F.D, Parfenov V.A., Koudan E.V., Mitryashkin A.N., Replyanski N.S., Kasyanov V.A., Knyazeva A.A., Bulanova E.A. and Mironov V.A. Design and Implementation of Novel Multifunctional 3D Bioprinter // **3D Printing and Additive Manufacturing**. – 2016 - Vol. 3, № 1, P. 65-68.
7. Гавриленко А.В., Хесуани Ю.Д., Калинин В.Д. Возможности и перспективы трехмерного биопринтинга в сосудистой хирургии // **Ангиология и сосудистая хирургия**. – 2016 – Т. 22, №2, С. 40-45. Переводная версия: Gavrilenko A.V. A.B., **Khesuani Yu. J.**, Kalinin V.D. Possibilities and prospects of three-dimensional bioprinting in vascular surgery // **Angiol Sosud Khir.** – 2016- Vol. 22, №2, P: 40-45.
8. Буйнов М.А., Воротников А.А., Климов Д.Д., Малышев И.Ю., В.А. Миронов В.А., Парфенов В.А., Перейра Ф.Д.А.С., Подураев Ю.В., **Хесуани Ю.Д.** Роботические технологии в медицине и биопринтинге: состояние проблемы и современные тенденции // Вестник МГТУ «Станкин». – 2017 - № 1 (40), С. 127-131.
9. Bulanova E.A., Koudan E.V., Degosserie J., Heymans C., Pereira F.D., Parfenov V.A., Sun Y., Wang Q., Akhmedova S.A., Sviridova I.K., Sergeeva N.S., Frank G.A., **Khesuani Y.D.**, Pierreux C.E., Mironov V.A. Bioprinting of functional vascularized mouse thyroid gland construct // **Biofabrication**. – 2017 - 9(3), P. 1-13.
10. Сергеева Н.С., **Хесуани Ю.Д.**, Кирсанова В.А., Свиридова И.К., Поляков А.П., Никифорович П.А. Морфообразующая способность биоактивного гидрогеля на основе компонентов крови доноров при культивировании *in vitro* тироцитов (ТЦ) из микроорганных культур и тиреоидных фолликулов (ТФ) человека: шаги в направлении биофабрикации тканеинженерных конструкторов (ТИК) щитовидной железы (ЩЖ). Сборник тезисов V междисциплинарного конгресса по заболеваниям органов головы и шеи с международным участием. Голова и шея. Май №2. 2017. (Приложение), С. 105-106.
11. Parfenov V.A., Koudan E.V., Bulanova E.A., Karalkin P.A., Pereira F.D., Norkin N.E., Knyazeva A.D., Gryadunova A.A., Petrov O.F., Vasiliev M.M., Myasnikov M.I., Chernikov

- V.P., Kasyanov V.A., Marchenkov A.Y., Brakke K, **Khesuani Y.D.**, Demirci U., Mironov V.A. Scaffold-free, label-free and nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly // **Biofabrication**. – 2018 - 10(3), P. 1-28.
12. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., **Khesuani Y.D.**, Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation *In Vitro* // **Cartilage**. – 2018-I-II, P. 1-11.
13. Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S., Parfenov V.A., Sivogriov D.E., Pereira F.D., Gryadunova A.A., Koudan E.V., **Khesuani Y.D.**, Kasyanov V.A., Belousov S.I., Krashennnikov S.V., Grigoriev T.E., Chvalun S.N., Bulanova E.A., Mironov V.A., Domogatsky S.P. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D-bioprinting. **J Mater Sci Mater Med.** – 2019 - 30(3), P. 1-12.
14. Сергеева Н.С., Хесуани Ю.Д., Свиридова И.К., Поляков П.Ю., Миронов В.А., Каприн А.Д. Стволовые и (или) прогениторные клетки щитовидной железы и возможности их использования в тканевой инженерии // **Гены и клетки**. – 2018 -Т. XIII №2, С. 22-24. Переводная версия: Sergeeva N.S., **Hesuani Yu. D.**, Poljakov A.P., Mironov V.A., Kaprin A.D. Stem (progenitor) thyroid cells and their probable applications in tissue engineering // **Genes and Cells**. – 2018 -Vol. XIII №2, P. 22-24.
15. Сергеева Н.С., **Хесуани Ю.Д.**, Кирсанова В.А., Свиридова И.К., Никифорович П.А., Поляков А.П. На пути к биофабрикации тканеинженерных конструкторов (ТИК) щитовидной железы (ЩЖ): формирование и «почкование» тиреоидных фолликулов (ТФ) *in vitro* в 3D-гидрогеле на основе лизата тромбоцитов (ЛТ) человека // Международный форум: «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни». 2018 год. Материалы форума, С. 441-442.
16. Сергеева Н.С., **Хесуани Ю.Д.**, Свиридова И.К., Каралкин П.А., Поляков А.П., Миронов В.А., Каприн А.Д. Культивирование тиреоцитов тиреоидных фолликулов и микроорганных культур щитовидной железы как первый этап создания тканеинженерных конструкций // **Молекулярная медицина**. - 2018. Т. 16, №5, С. 9-14.
17. **Хесуани Ю.Д.**, Сергеева Н.С., Миронов В.А., Мустафин А.Г., Каприн А.Д. Введение в 3D-биопринтинг: история формирования направления, принципы и этапы биопечати // **Гены и клетки**. – 2018 -Т. XIV. №3, С. 40-47.
18. Pereira F.D., Parfenov V.A., **Khesuani Yu.D.**, Ovsiannikov A., Mironov V.A. Commercial 3DBioprinters // 3D Printing and Biofabrication. – 2018 -(chapter in book), P. 535-549.

19. Balakhovsky Y., Ostrovskiy A., **KhesuaniYu.D.** Emerging Business Models Towards Commercialization of Bioprinting Technology // 3D Printing and Biofabrication. – 2018 - (chapter in book), P. 1-22.
20. Устройство и способы печати биологических тканей и органов: **Евразийский патент № 028039/** Миронов В.А., **Хесуани Ю.Д.**, Митряшкин А.Н., Гладкая И.С., Островский А.Ю., Новоселов С.В. Патентообладатель Частное учреждение «Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс». Заявка № 201401046 от 05.09.2014, дата выдачи: 29.09.2017.
21. Устройство для биопечати одиночными тканевыми сфероидными и используемая в нем печатающая головка: **Патент РФ № 2701330/** Парфенов В.А., **Хесуани Ю.Д.**, Перейра Д.А.С.Ф., Миронов В.А., Петров С.В., Кудан Е.В., Нежурина Е.К., Буланова Е.А., Грядунова А.А., Островский А.Ю., Каралкин П.А. Патентообладатель Частное учреждение «Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс». Заявка № 2701330 от 28.11.2018, дата выдачи: 25.09.2019.

Список сокращений

АТ – антитела
АЛЛ – аллантоис
Г-Э - гематоксилин-эозин
ЛТ – лизат тромбоцитов
МО - микроорганичные культуры
Т₄ – тироксин
ТГ – тиреоглобулин
ТИК - тканеинженерная конструкция
ТТГ- тиреотропный гормон гипофиза
ТФ - тиреоидные фолликулы
ТЦ – тиреоциты
ЩЖ - щитовидная железа
ЭЭ - эмбриональные экспланты;
I – йод
I¹³¹ – радиоактивный йод
NIS - natrium-iodidesymporter (натрий-йод симпортер)
PECAM - platelet endothelial cell adhesion molecule (молекула клеточной адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток)

