

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
доктор биологических наук, профессор РАН
Д.В. Ребриков

20 19 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по диссертации «Моделирование функциональной тканеинженерной конструкции щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертация «Моделирование функциональной тканеинженерной конструкции щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга» выполнена на кафедре биологии им. академика В.Н. Ярыгина педиатрического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ЧУ «Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», отделении

прогноза эффективности консервативной терапии опухолей Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

В период подготовки диссертации соискатель Хесуани Юсеф Джоржевич работал в должности научного сотрудника Лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс». В 2017 г Хесуани Ю.Д. был прикреплен в качестве соискателя к Федеральному государственному бюджетному образовательному учреждению высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации для выполнения диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология (договор № 5 от 30.10.2017 года), с 2016 года выполнял работы на базе отделения прогноза эффективности консервативного лечения Федерального государственного бюджетного учреждения «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России в рамках Соглашения о сотрудничестве между ЧУ «Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс» и ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России от 14.05.2016.

Хесуани Юсеф Джоржевич окончил с отличием факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в 2007 году по специальности «Лечебное дело».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2018 году Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор кафедры биологии им. академика В.Н. Ярыгина педиатрического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель отделения прогноза эффективности консервативного лечения «Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена» - филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Сергеевна Наталья Сергеевна.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность исследования

Исследование посвящено актуальной проблеме восстановления утраченных функций тканей и органов. 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. В отдельных случаях эту проблему удастся решить трансплантацией донорских органов: печени, почек, легких. Тем не менее разрыв между потребностью в органах и их доступностью огромен и увеличивается с каждым годом. Если же утрачена или снижена функция железы внутренней секреции, то общепринятым подходом сегодня является заместительная гормонотерапия. Однако при длительном ее использовании, органы и ткани пациентов становятся недостаточно восприимчивыми к гормональным препаратам, что также требует изменения тактики лечения. Одним из новых направлений по восстановлению утраченных функций эндокринных органов является тканевая инженерия, в том

числе, с использованием 3D-биопринтинга, и позволяющая разрабатывать конструкты на основе 3D-организованных микротканей и/или тканевых эквивалентов, полученных при их использовании. Такой подход позволяет использовать спектр разнообразных материалов для биопечати - гидрогелей из биосовместимых полимеров и неорганических компонентов, клеток, а также тканевых сфероидов, формируя тканевые трехмерные эквиваленты с заданной скоростью и по заданным программам.

Связь с планом научных работ.

Диссертационная работа ФИО выполнена в соответствии с основными направлениями программы научных исследований федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Конкретное личное участие автора в получении научных результатов

Работа выполнена автором с использованием материалов и специализированной научной аппаратуры (биопринтер Fabion) Лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Автором разработана методика 3D-биопечати трансеинженерных конструктов с использованием различных гидрогелей, исследованы свойства, поведение и жизнеспособность тканевых сфероидов из клеток разных типов в динамике культивирования для подбора условий их биопечати, разработана технология получения и исследования морфологической и функциональной полноценности эксплантов эмбриональной щитовидной железы и аллантаисов мыши, изучены *in vivo* на модели мышей с I^{131} -нокаутированной ЩЖ органозамещающие свойства и гистологические особенности тканеинженерной конструкции

щитовидной железы мыши, созданной по разработанной технологии, разработаны методики выделения и культивирования одиночных тиреоцитов, тиреоидных фолликулов и микроорганных культур щитовидной железы человека и исследованы возможности их использования путем 3D-биопечати для создания тканеинженерной конструкции.

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 2 главы в книге и 10 статей в журналах, рецензируемых ВАК и рекомендованных для изложения результатов научных исследований.

Степень достоверности научных положений, выводов, рекомендаций.

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Методическое построение исследования отвечает принципам доказательной медицины, дизайн исследования обеспечивает обоснованность научных положений и выводов. Результаты исследования изложены в диссертационной работе подробно и обстоятельно, их достоверность определена выбором современных критериев оценки эффективности и статистической обработки данных. Полученные результаты научного труда документированы достаточным количеством рисунков и таблиц, что помогает в восприятии материала. Выводы и практические рекомендации убедительно аргументированы, последовательно и закономерно вытекают из анализированного материала, отражают содержание диссертации и полностью соответствуют поставленным задачам.

Степень научной новизны.

В научной работе Хесуани Юсефа Джоржевича впервые с использованием разработанной технологии экструзионного 3D-биопринтинга сформирован конструктор щитовидной железы на основе сфероидов

эмбриональной щитовидной железы и аллантаисов мыши, трансплантация которого под капсулу почки мышей с нокаутированной I^{131} щитовидной железой обеспечила синтез тиреоидных гормонов на уровне $\sim 50\%$ от исходного. С использованием геля на основе лизата тромбоцитов доноров разработаны методики долгосрочного 3D-культивирования тиреоцитов и тиреоидных фолликулов человека с сохранением их функциональной активности, а также показан фолликулогенез из стволовых клеток щитовидной железы человека.

Разработана методика 3D-культивирования микроорганных культур щитовидной железы человека на границе раздела сред. Показана принципиальная возможность использования микроорганных культур щитовидной железы человека для 3D-биопринтинга.

Практическая значимость.

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

Ценность научных работ.

В опубликованных по материалам диссертации печатных работах в полном объеме отражены результаты проведенного исследования по подбору гидрогелей, культивированию клеточных культур, тканевых сфероидов, фолликулов и микроорганных культур щитовидной железы в качестве

материалов для технологии 3D-биопринтинга тканеинженерных конструкций с последующей трансплантацией лабораторным животным. Данные результаты имеют большую значимость для практического здравоохранения, ввиду нерешенной до настоящего времени проблемы восстановления утраченных функций тканей и органов.

Внедрение полученных результатов исследования в практику.

Результаты научного исследования Хесуани Юсефа Джоржевича, могут быть внесены в практическое применение для формирования конструкторов различных тканей и органов.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

Промежуточные и окончательные результаты, а так же основные положения научного труда были представлены и доложены в рамках работы конференций, съездов и конгрессов: 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).

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 2 главы в книге и 10 статей в журналах, рецензируемых ВАК и рекомендованных для изложения результатов научных исследований.

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 микроволокнистого электроспиннингового полиуретанового матрикса (сканирующее электронно-микроскопическое исследование). Морфология. 2015. №6, стр. 70-74.

2. Кудан Е.В., Гладкая И.С., Буланова Е.А., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Как напечатать щитовидную железу. Природа. 2015. №2, стр. 56-63.

3. Koudan E.V., Bulanova E.A., Pereira F.D., Parfenov V.A., Kasyanov V.A., Hesuanı Yu. 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, pp: 1-8.

4. Hesuanı 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, pp.: 65-68.

5. Гавриленко А.В., Хесуани Ю.Д., Калинин В.Д.

Возможности и перспективы трехмерного биопринтинга в сосудистой хирургии. Ангиология и сосудистая хирургия. 2016. Том 22, №2, стр. 40-45.

6. 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): 127-131.

7. 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., Khesuanı Y.D.,

Pierreux C.E., Mironov V.A.

Bioprinting of functional vascularized mouse thyroid gland construct.

Biofabrication. 2017. 9(3):034105, pp: 1-13.

8. 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* тиреоцитов (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), стр.: 105-106.

9. 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):034104, pp: 1-28.

10. Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S., Parfenov V.A., Sivogrivov D.E., Pereira F.D., Gryadunova A.A., Koudan E.V., Khesuani Y.D., Kasyanov V.A., Belousov S.I., Krasheninnikov 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):31, pp: 1-12.

11. 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. Журнал «Гены и клетки». 2018. Том XIII №2, стр.: 22-24.

12. Сергеева Н.С., Хесуани Ю.Д., Кирсанова В.А., Свиридова И.К., Никифорович П.А., Поляков А.П. На пути к биофабрикации тканеинженерных

конструктов (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, стр.:441-442.

13. 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. 2018. Молекулярная медицина. Том 16, №5, стр.: 9-14.

14. 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. 2018. Журнал «Гены и клетки». Том XIV. №3, стр.:40-47.

15. Pereira F.D., Parfenov V.A., Khesuani Yu.D., Ovsiannikov A., Mironov V.A. Commercial 3D Bioprinters. 3D Printing and Biofabrication. 2018. Chapter in Book, pp: 535-549.

16. Balakhovsky Y., Ostrovskiy A., Khesuani Yu.D. Emerging Business Models Towards Commercialization of Bioprinting Technology. 3D Printing and Biofabrication. 2018. Chapter in Book, pp: 1-22.

Рекомендации диссертации к защите с учётом научной зрелости соискателя.

Диссертационная работа Хесуани Юсефа Джоржевича представляет большой интерес, как в научном плане, так и в практическом здравоохранении.

Положительная оценка диссертации, вытекающая из ее актуальности, достоверности полученных данных, обоснованных выводов и практических

рекомендаций позволяют отметить теоретическую и практическую значимость исследования. Хесуани Юсеф Джоржевич является исследователем, проявившим при выполнении работы глубину теоретических знаний, творческий подход к решению поставленных задач. По своим профессиональным и моральным качествам Хесуани Юсеф Джоржевич заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук.

Диссертационная работа соответствует специальностям 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология и 14.01.24 - Трансплантология и искусственные органы.

Постановили:

Таким образом, диссертационная работа Хесуани Юсефа Джоржевича «Моделирование функциональной тканеинженерной конструкции щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора Сергеевой Натальи Сергеевны, содержащей новое решение задачи восстановления утраченных функций органов и тканей.

Диссертация «Моделирование функциональной тканеинженерной конструкции щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга» Хесуани Юсефа Джоржевича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология и 14.01.24 - Трансплантология и искусственные органы.

Заключение принято на заседании сотрудников кафедры биологии им. академика В.Н. Ярыгина педиатрического факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Присутствовало на заседании 35 человек. Результаты голосования: "за" – 35, "против" - нет, "воздержалось" - нет, протокол № 5 от "29" ноября 2019 г.

Председатель конференции:

д.м.н., профессор, заведующий

кафедрой биологии им. академика

В.Н. Ярыгина педиатрического факультета

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова

Минздрава России

А.Г. Мустафин

Подпись заверяю:

Ученый секретарь

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова

Минздрава России,

Д.м.н., доцент



О.Ю. Милушкина