

РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА (ФГБОУ ВО
РНИМУ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА МИНЗДРАВА РОССИИ), МОСКОВСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
ИМ. П.А. ГЕРЦЕНА – ФИЛИАЛ ФГБУ «НМИЦ РАДИОЛОГИИ»
МИНЗДРАВА РОССИИ, ЧАСТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ЛАБОРАТОРИЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
«3D БИОПРИНТИНГ СОЛЮШЕНС»

На правах рукописи

Хесуани Юсеф Джоржевич

**Моделирование функциональной тканеинженерной конструкции
щитовидной железы с использованием технологии 3D-биопринтинга**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Сергеева Н.С.

Москва - 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1.....	14
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Введение в 3D-биопринтинг: история формирования направления, принципы технологии, этапы процесса биопечати	14
1.2. «Классические» методы биопринтинга и типы используемого программного обеспечения.....	18
1.3. Компоненты (гидрогели и клеточный материал) для 3D-биопечати	22
1.4. Некоторые новые подходы к биопринтингу (акустическая, магнитная, биопечать <i>in situ</i>)	30
1.5. ЩЖ как объект для биопринтинга.....	35
ГЛАВА 2.	54
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	54
2.1. Методы получения тканевых сфероидов.....	54
2.2. Количественная оценка жизнеспособности клеток в тканевых сфероидах	55
2.3. Метод визуализации живых и мертвых клеток в тканевых сфероидах ...	57
2.4. Подготовка тканевых сфероидов для изучения сканирующей электронной микроскопии	57
2.5. Оценка механических свойств тканевых сфероидов методом сжатия.....	59
2.6. Методика исследования распластывания и слияния тканевых сфероидов	61
2.7. Выделение эмбриональных эксплантов ЩЖ мыши	62
2.8. Выделение аллантаоиса из 8.5-дневных эмбрионов мыши	64

2.9. Получение тканевых сфероидов из эмбриональных эксплантов ЩЖ и аллантаиса мыши линии CD-1 методом «висячей капли» и их подготовка к биопечати	65
2.10. Выделение коллагена из крысиных хвостов и приготовление гидрогеля на его основе	66
2.11. Методика 3D-биопринтинга конструктов ЩЖ из эмбриональных эксплантов ЩЖ в коллагеновом геле	66
2.12. Методика иммунофлуоресцентного анализа ТИК ЩЖ, полученных путем 3D-биопринтинга	68
2.13. Методика <i>in vivo</i> оценки функциональной активности ТИК ЩЖ, полученных путем 3D-биопринтинга из эмбриональных эксплантов ЩЖ, аллантаиса и коллагена.....	69
2.14. Методика выделения и культивирования тиреоцитов, тиреоидных фолликулов и микроорганов ЩЖ человека	71
2.15. Оборудование для 3D-биопринтинга – биопринтер Fabion	74
2.16. Основные материалы, используемые в работе	76
2.17. Измерение диаметра и округлости сфероидов.....	79
2.18. Статическая обработка результатов экспериментов	80
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	81
3.1. Разработка методики 3D-биопечати различными гидрогелями и тканевыми сфероидами на биопринтере Fabion	81
3.2. Характеристика тканевых сфероидов на основе клеток разных типов..	100
3.3. Результаты биопечати ТИК ЩЖ на основе эмбриональных эксплантов и аллантаисов ЩЖ мыши.....	115
3.4. Разработка методологии культивирования тканевых и клеточных структур щитовидной ЩЖ и первый опыт их 3D-биопечати	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	148

ВЫВОДЫ.....	156
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	158
СПИСОК ТЕРМИНОВ	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	163

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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 онкологии, в частности, стремительное развитие и совершенствование хирургической техники позволяет сегодня осуществлять оперативные вмешательства у больных с 3-4 стадиями опухолевого процесса, ранее считавшихся неоперабельными. Внедрение в онкологию реконструктивно-пластических подходов позволяет в ряде случаев у больных с опухолями отдельных локализаций восстановить функцию (опорно-двигательная система) [14] или утраченный объем (молочная железа) органов [15]. Однако при дефектах большинства других органов восстановления структурно-функциональной целостности, как правило, добиться не удастся.

В отдельных случаях эту проблему удастся решить трансплантацией донорских органов - печени, почек, легких. Однако разрыв между потребностью в органах и их доступностью огромен и увеличивается с каждым годом [109]. Кроме того, аллотрансплантация органов по определению требует постоянной иммуносупрессии с множеством описанных побочных эффектов, и, соответственно, обуславливает низкое качество жизни таких пациентов и затрудняет их социальную и трудовую реабилитацию.

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 требует изменения тактики лечения [184]. Трансплантация желез внутренней секреции менее распространена, в основном, из-за возможностей заместительной гормонотерапии. 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. К основным из них относится, в частности, возможность предимплантационного снижения иммуногенности донорского материала, что позволяет отказаться от последующей иммуносупрессии [11]. Кроме того, с помощью техники микро- или макроинкапсуляции можно изолировать пересаживаемые клетки от иммунной системы реципиента. Иммуноизолирующие методы основаны на принципе помещения аллогенных эндокриноцитов за биосовместимую и нетоксичную полупроницаемую мембрану, которая, с одной стороны, изолирует клетки от иммунной системы хозяина, а с другой стороны - пропускает низкомолекулярные субстанции (нутриенты, электролиты, кислород и биоактивные продукты секреции). Однако такой прием также имеет ряд недостатков, к которым, в частности, относятся изнашивание и снижение проницаемости изолирующей мембраны, сложность в стандартизации и оптимизации методов инкапсуляции, а также недостаточная плотность клеток в самих капсулах для полноценного восстановления функции органа [5]. Кроме того, такие клеточные технологии являются в определенной мере «функционально неполноценными» и из-за отсутствия у трансплантированных клеток адекватного микроокружения, в частности, внеклеточного матрикса, то есть, тканевого уровня организации, обеспечивающего их «социальное» поведение и адекватную реакцию на гуморальную регуляцию.

Логическим развитием клеточных технологий является тканевая инженерия, в том числе, с использованием 3D-биопринтинга, и позволяющая разрабатывать конструкторы на основе 3D-организованных микротканей (тканевых сфероидов) и/или тканевых эквивалентов, полученных при их

использовании [121].

Сегодня одним из самых перспективных методов трехмерной биопечати считается экструзионный 3D-биопринтинг, в котором используется механическая платформа, передвигающаяся в двух измерениях на плоскости, и подвижный экструдер (форсунка), передвигающийся по вертикали, то есть в третьем измерении [128]. Такой подход позволяет использовать спектр разнообразных материалов для биопечати - гидрогели из биосовместимых полимеров и неорганических компонентов, клетки, а также тканевые сфероиды, формируя тканевые трехмерные эквиваленты с заданной скоростью и по заданным программам [145]. Интенсивность (скорость печати) также может задаваться программным обеспечением.

Технология 3D-биопринтинга пока находится в стадии разработки устройств и методологий создания тканевых эквивалентов. С этих позиций тема настоящей разработки является актуальной.

Степень разработанности проблемы

При тестировании 3D-биопринтинга используют разные типы клеток, в частности, кератиноциты, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), фибробласты на коллагеновой подложке для создания кожных эквивалентов [93]. Опубликованы результаты экспериментов по биопечати эквивалентов печени с использованием человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [72], эквивалентов ткани легких и нервной ткани с использованием клеток Шванна и ММСК, полученных из костного мозга [138].

Таким образом, настоящий этап развития 3D-биопринтинга – это разработка подходов и устройств, позволяющих создавать тканевые эквиваленты на основе разнообразных биоматериалов и клеток разных типов.

Цель работы

Целью данного исследования является 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 сфероидами.
4. Разработать технологию получения и исследовать морфологическую и функциональную полноценность эксплантов эмбриональных эксплантов (ЭЭ) щитовидной железы (ЩЖ) и аллантаисов (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 сфероидами разного 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 мыши, 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 (ВКМ) фибробластоподобными клетками. Показана принципиальная возможность использования МО ЩЖ человека для 3D-биопринтинга.

Практическая значимость исследования

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 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, ММСК 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 конструктора с использованием коллагена 1-го типа. Для этого биопринтер Fabion был оснащен системами подогревания/охлаждения для полимеризации коллагена при физиологическом рН (7,2-7,4) и разработана специальная «турникетная» система, позволяющая производить 3D-биопечать одиночными сфероидами.

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

Морфологическая и функциональная полноценность конструкторов ЩЖ мышей была оценена *in vitro* иммуноцитохимическими методами, а далее – *in*

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 конструктор ЩЖ человека с использованием разработанной технологии, коллагеновой подложки и решетки, в каждую ячейку которой были помещены МО ЩЖ.

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 тканевой конструктор, что было доказано на модели ЩЖ мышей, 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.

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, изучал модели слияния и распластывания тканевых сфероидов из разных типов клеток, проводил оценку жизнеспособности клеток в тканевых сфероидах, подготовку сфероидов для последующей сканирующей электронной микроскопии, выделял эмбриональные экспланты щитовидной железы и аллантаисов мыши, коллаген из крысиных хвостов, выделял и культивировал тиреоциты, тиреоидные фолликулы и микроорганов щитовидной железы человека. 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).

Степень достоверности и апробация результатов

Представленные новые данные согласуются с имеющимися в литературе данными по возможности применения технологии 3D-биопечати для создания трехмерных живых функциональных ТИК. Полученные в исследовании результаты обработаны с использованием адекватных методов анализа.

Апробация диссертационной работы проведена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 5 от 29 ноября 2019 года.

Результаты данного 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).

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 21 научная работа, из них: 3 оригинальные статьи – в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки России, 9 статей – в журналах, индексируемых международными системой цитирования Scopus, 8 статей в Web of Science, и 2 патента на изобретение: патент Российской Федерации и Евразийский патент.

Объем и структура 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.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение в 3D-биопринтинг: история формирования направления, принципы технологии, этапы процесса биопечати

Трехмерная печать — это технология быстрого прототипирования и аддитивного производства, используемая для создания сложной архитектуры высокой точности посредством поэтапного процесса построения изделия согласно заданной цифровой модели [133]. В 1986г. С. Hull получил патент на технологию стереолитографии на основе фотополимеризации. Эта работа стала первой на пути к методам трехмерной печати. На сегодняшний день под термином трехмерная печать используют ряд различных технологий: послойное наплавление (FDM); стереолитография (SLA, DLP); метод послойного склеивания (CJP); многоструйное моделирование (MJM); селективное лазерное спекание (SLS); селективное лазерное плавление (SLM) и прямое лазерное спекание металлов. В 2003 году Т. Boland предложил метод биопечати, основанный на традиционной двумерной струйной технологии [192]. В том же году V. Mironov, G. Forgacs и Т. Boland предложили метод экструзионной трехмерной биопечати с использованием тканевых сфероидов в качестве «строительных блоков» [121]. И, наконец, в 2016 году Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) выпустило проект руководства под названием «Технические решения для устройств, созданных с использованием аддитивных технологий», которое содержало рекомендации по использованию технологий трехмерной печати и изделий, полученных с использованием этих технологий [198].

Применение автоматизированного аддитивного процесса облегчает изготовление трехмерных изделий благодаря высокоточному контролю их архитектуры - внешней формы, внутренней геометрии пор и взаимосвязи высокой воспроизводимости и повторяемости [42, 50, 185]. Ввиду этих особенностей технология трехмерной биопечати представляется крайне

перспективным подходом в изготовлении биомиметических скаффолдов (подложек), содержащих клеточный материал, как основу для создания трехмерных живых функциональных конструкторов в интересах регенеративной медицины.

Таким образом, трехмерная биопечать (3D-биопечать или 3D-биопринтинг) — это технология послойного производства трехмерных тканевых и органных конструкторов согласно заданной цифровой модели с использованием живых клеток в качестве печатного материала. Для запуска процесса биопечати требуется, как минимум, три составляющие: 1) биопринтер – роботическое устройство, позволяющее послойно создавать трехмерные биологические объекты согласно заданным характеристикам; 2) клеточный материал; 3) материалы природного, синтетического или смешанного происхождения как основа 3D-скаффолда.

В технологии 3D-биопечати разделяют следующие основные этапы: 1) этап «предподготовки» (pre-processing), 2) этап «производства» (processing) и 3) этап «постпринтинга» (post-processing) (Рис. 1) [122].

Этап «пред-подготовки» включает в себя трехмерное моделирование будущего объекта, выбор и культивирование клеточного материала, а также подбор материала для скаффолдов, пригодный для конкретного типа трехмерной биопечати (экструзионная/струйная/лазерная и др.) [128]. Проектирование объекта печати может происходить: а) *de novo*, когда оператор задает размеры, геометрию, количество слоев и другие характеристики модели в соответствии с решаемыми задачами; б) на основе данных, полученных путем МРТ или КТ планируемой зоны имплантации конкретного организма с постобработкой в специальных программах. Rengier и соавторы [150] подробно описали варианты использования оцифрованной информации о разных трехмерных изображениях для последующей печати. Желаемую структуру цифровых трехмерных моделей можно точно воссоздать с использованием трехмерного проектирования в САПР или CAD-системах, после чего трехмерная модель может быть сохранена в STL

или AMF-форматах. STL-формат свое название получил от термина «Stereolithography», поскольку изначально был использован именно в этой технологии аддитивного производства. Данные форматы файлов в настоящее время широко используются для хранения данных в трехмерных объектах, для аддитивных технологий [136]. Информация об объекте хранится как список треугольных граней (которые описывают его поверхность) и их нормалей [32].

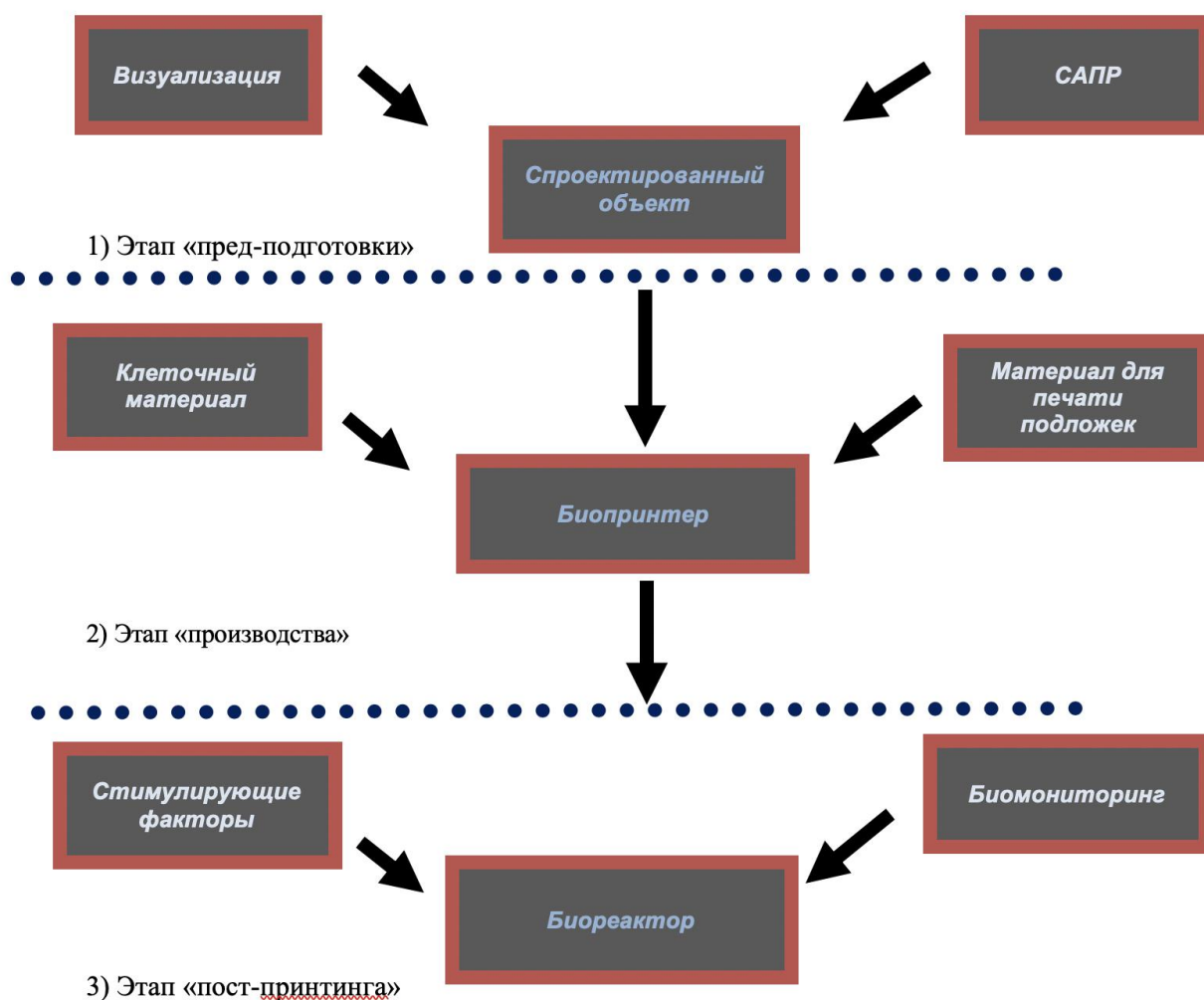


Рисунок 1 – Этапы технологии трехмерной биопечати. (цит. по [122])

Этап «производства». Трехмерную структуру формируемого конструкта производят путем послойного нанесения различных биоматериалов и живых клеток. Файлы трехмерных моделей непосредственно

загружают в биопринтер или используют управляющую программу для биопечати в системе автоматизированного программирования (САМ) [17]. Современные САМ системы, обладая большим функционалом, обеспечивают, в частности, «нарезку» 3D-модели на тонкие горизонтальные слои, задавая траектории движения инструментов печати по двумерным сечениям, каждое из которых воспроизводится с интеграцией различных шаблонов заполнения в соответствии с запрограммированными параметрами. Симуляция движения форсунок до процесса печати дает возможность в ряде случаев адаптировать управляющую программу к конкретному биопринтеру при помощи постпроцессора, который приводит ее к необходимому стилистическому виду [116]. Биопринтер, согласно кадрам управляющей программы, последовательно наносит различные материалы в область будущего трехмерного конструкта. На этом этапе оператор может применять дополнительные корректировки, связанные с оптимизацией процесса печати [151]. Методы трехмерной печати предполагают использование нескольких форсунок, что дает возможность наносить серию материалов, используя разные технологии наслоения [69]. Также на этом этапе в специальную камеру биопринтера вводят клеточный материал, который затем наносится через форсунку в трехмерное пространство формируемого скаффолда в соответствии с заданной цифровой моделью. Некоторые биопринтеры дополнительно оснащены системой лазерного позиционирования, которая перед процессом запуска биопечати соотносит координаты «носика» форсунки (точки Z) с поверхностью печатной платформы (т.е. точками X и Y). Данная система позволяет снизить количество ошибок позиционирования в процессе биопечати. Как правило, на этом этапе запускают систему видеофиксации, которая в режиме реального времени позволяет наблюдать за процессом формирования трехмерных функциональных тканевых и органных конструктов [69].

Этап «пост-принтинга». Данный этап необходим для стабилизации структуры напечатанного биологического объекта и включает в себя

«дозревание» последнего в биореакторах [12]. Для контроля этого процесса в ряде случаев используют неинвазивный и неdestructивный его мониторинг, так как на этом этапе формируются такие базовые его характеристики, как механическая прочность, структурная целостность, а также биологические функциональные возможности [122].

1.2. «Классические» методы биопринтинга и типы используемого программного обеспечения

В настоящее время описано три основных метода биопринтинга (рис.2, цит. по [128])

- 1) Струйная печать,
- 2) Печать с применением лазера,
- 3) Печать, основанная на методе экструзии

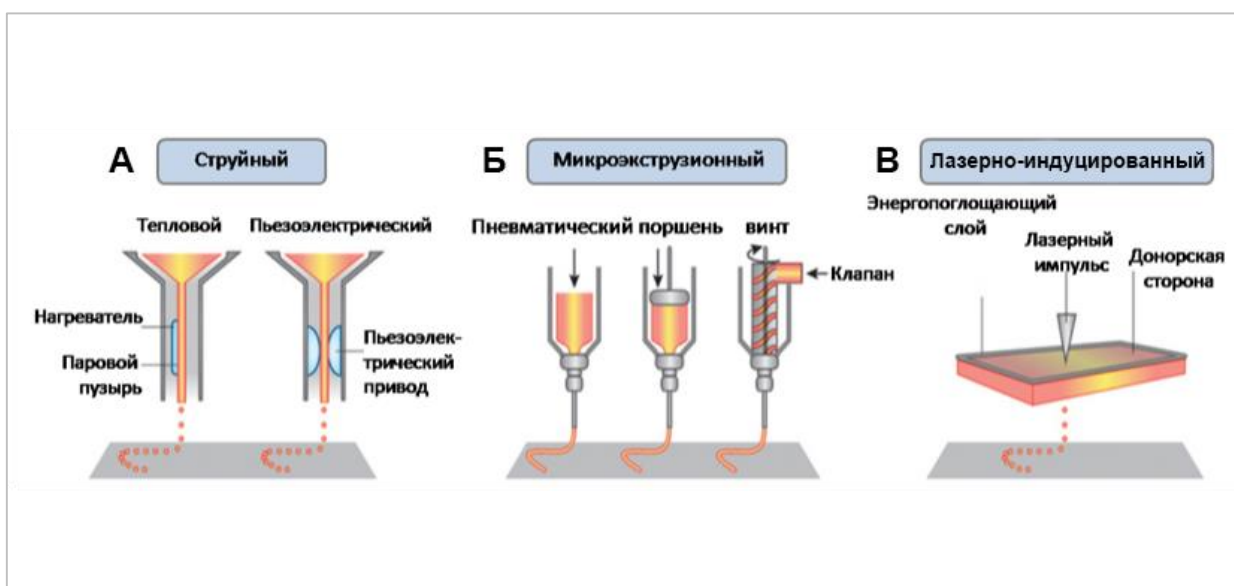


Рисунок 2 - Типы биопечати (цит. по [128])

Струйный биопринтинг осуществляется с использованием видоизмененных струйных принтеров. Механическая головка принтера формирует капли геля, содержащие клетки [159]. Преимущества данного метода заключаются в невысокой стоимости принтеров, а также в возможности одновременной печати несколькими типами клеток из нескольких форсунок за один сеанс печати по заданной программе. Для

струйной печати был апробирован целый спектр нетоксичных, биodeградируемых гидрогелей с «температурным» типом полимеризации - переходящих из жидкого в гелеобразное состояние при повышении температуры с +15 С до +21 С [39]. Данные гидрогели использовались в качестве «биобумаги», на которую наносили клеточные агрегаты на расстоянии, не препятствующем их слиянию. Процесс экструзии гидрогелей происходил последовательно слой за слоем. К недостаткам данного метода относят невозможность использования гелей с высокой вязкостью, частое слипание и осаждение клеток в картридже, засорение отверстий в форсунках принтера [42,100,139,156].

Биопечать с применением лазера. В данном методе чаще всего используется лазер-индуцированный прямой перенос на подложку полимеров и клеток (laser-induced forward transfer (LIFT) [20]. Лазерный импульс перемещает одиночные клетки с подложки-донора на подложку-субстрат, что позволяет с высокой точностью располагать клетки в пространстве, не используя форсунки (nozzle-free подход), а также использовать биополимеры с любой вязкостью [119]. Основным лимитирующим фактором данного метода считается цитотоксическое воздействие лазера на клетки и связанная с этим невысокая выживаемость клеток в трехмерной конструкции. Также лазерное воздействие неблагоприятно воздействует и на тканевые сфероиды, изменяя их структуру, что является препятствием для печати структурами с высокой клеточной плотностью [139].

Биопечать, основанная на методе экструзии. Самым перспективным методом трехмерной биопечати сегодня считается экструзионный биопринтинг, в котором используется механическая платформа, передвигающаяся в двух измерениях на плоскости, и подвижный экструдер (форсунка), передвигающийся по вертикали, то есть в третьем измерении [152]. Такой подход позволяет использовать спектр разнообразных материалов для биопечати - гидрогели из биосовместимых полимеров и

неорганических компонентов, клетки, а также тканевые сфероиды, формируя тканевые трехмерные эквиваленты с заданной скоростью и по заданным программам [85,152]. Интенсивность (скорость печати) задается программным обеспечением. В экструзионной биопечати чаще всего применяются пневматические [141] или механические (поршневой или винтовой) механизмы печати [145]. К преимуществам данного подхода можно отнести возможность использования для печати гидрогелей с большим диапазоном вязкости, и, главное, структурную целостность сформированных конструкторов, вследствие прецизионной точности печати благодаря специализированному программному обеспечению и автоматизированному конструированию (CAD-формат) [31,197]. Данный метод биопечати был апробирован с использованием гидрогелей на основе альгината [118,183], желатина [50,161,183], желатин метакриламида [24], коллагена [107] и фибрина [102], то есть полимеров на основе гидрофильных макромолекул, способных к равновесному и обратимому набуханию в водных растворах [103]. Тип полимеризации этих гелей различен: ионная (альгинат в присутствии ионов кальция), химическая (реакция при смешивании двух и более химических агентов, например, фибриноген и тромбин), физическая (с воздействием на гидрогели УФ-излучения), pH (например, коллаген), температурная полимеризация (Pluronic F 127) [185]. Сравнение описанных технологий с использованием литературы, процитированной выше, представлено в Табл. 1.

Каждый тип биопринтеров требует наличия специального программного обеспечения для создания моделей печатаемых конструкторов и контроля печати. Это означает, что в связи с отсутствием стандартного формата компьютерных файлов, продукт, произведенный в одной лаборатории, трудно воспроизвести в другой лаборатории. Следовательно, необходимым условием широкого распространения трехмерной биопечати является максимальное упрощение всего процесса и превращение компьютерного 3D-дизайна в готовый физический объект.

Таблица 1 – Сравнение методов биопечати

Свойство	Лазерная печать	Струйная печать	Экструзионная печать
Диапазон вязкости материала	1–300 мПа·с	3,5–12,0 мПа·с	$30,0 - 60,0 \times 10^7$ мПа·с
Механическая/структурная целостность	низкая	низкая	высокая
Разрешение	10–100 мкм	75 мкм	100 мкм – 1 мм
Принцип работы	бесконтактный	бесконтактный	контактный
Размер иглы (сопла)	любой	20–150 мкм	20 мкм – 1 мм
Объем загрузки	от микролитров до миллилитров	миллилитры	миллилитры
Дешевые / легко взаимозаменяемые резервуары	да	нет (при использовании коммерческих картриджей)	да
Преимущества метода	высокая точность	доступность, универсальность	печать больших конструкций в диапазоне «см»
Недостатки метода	при изготовлении слоя-донора, содержащего металл, микрочастицы металла могут попадать в напечатанный конструкт	возможность засорения сопла	низкая точность

Решение этой задачи представляется реальным благодаря своей неотъемлемой характеристике трехмерной биопечати - способности

«нарезать» и «соединять» между собой двухмерные слои. Тем не менее, нарезка на слои с компьютерно-цифровой системой контроля (КЦКН) пока представляется сравнительно сложной технологией среди пользователей стандартной квалификации. Сложность состоит в том, что программное обеспечение планирования биопечати должно быть «гибким», то есть давать возможность использовать различные технические подходы с различными характеристиками материалов. Так, например, если используется биопринтер, способный печатать одновременно методом экструзии (аналоговая печать), с послойным распределением тканевых сфероидов, и в этот же момент требуется использовать, к примеру, ультрафиолетовую полимеризацию, то и программное обеспечение должно быть таким же гибким и модульным. При этом программное обеспечение должно учитывать кинематическую схему биопринтера и легко адаптироваться под изменения в конструкции машины.

Таким образом, представляется целесообразным разработку единого стандартизированного программного обеспечения, позволяющего создавать трехмерные модели и управлять элементами биопринтера в независимости от модели прибора.

1.3. Компоненты (гидрогели и клеточный материал) для 3D-биопечати

Очевидно, что для биопечати определенных тканеинженерных конструктов необходим соответствующий выбор как клеточного материала, так и биоматериалов для создания 3D-подложек. Как правило, такие биоматериалы варьируют от мягких гидрогелей до жестких керамических скаффолдов [113,140,185]. В тканевой инженерии скаффолды служат своеобразными биомиметическими структурами, имитирующими ВКМ. В процессе изготовления твердых скаффолдов методом трехмерной биопечати необходимо учитывать такие факторы, как пористость материалов, взаимосвязь и размеры пор, внутренняя геометрия подложки, скорость биодеградации, механические свойства и биосовместимость [33,153]. Из

твердых биоматериалов, таких как керамика, гидроксиапатиты и термопластичные полимеры можно изготавливать механически прочные и, соответственно, долго сохраняющиеся конструкции [68].

Однако для использования таких материалов обычно требуются высокие температуры или токсичные растворители, поэтому они не подходят для печати с одновременным нанесением клеточного материала. Клеточный материал, как правило, высевают на напечатанные конструкции после изготовления, избегая неблагоприятных для клеток условий [197].

Мягкие биоматериалы на основе гидрогелей лишены этих недостатков, что обеспечивает наличие благоприятной среды для печати клетками. В то же время при изготовлении мягких скаффолдов на основе гидрогелей должны учитываться их реологические свойства, способность к набуханию, коэффициент поверхностного натяжения и динамика полимеризации [66,142,186]. Гидрогели являются наиболее изученными материалами в аспекте использования в 3D-биопринтинге ввиду их цитосовместимости *in vitro*, отсутствия реакции отторжения *in vivo*, а также подходящих механических свойств.

Используемые гидрогели делятся на натуральные и синтетические полимеры с разными типами полимеризации (Табл. 2, Табл. 3)

Таблица 2 - Гидрогели на основе синтетических материалов для 3D-биопринтинга

Базовый полимер	Модификации	Метод полимеризации
Полиэтиленгликоль (ПЭГ)	Полиэтиленгликоль-диакрилат (ПЭГДА)	Фотоиндуцируемая
	ПЭГ диметакрилат (ПЭГДМА)	Фотоиндуцируемая
Мультицепочечный (ПЭГ)	ПЭГ пептид	Фотоиндуцируемая
	ПЭГ- акрилат	Фотоиндуцируемая; химическая (рекция Михаэля)

	ПЭГ-азид	Химическая
	ПЭГ-тиол	Химическая (рекция Михаэля)
Полиакриламид (ПАм)		Фотоиндуцируемая
Полиизопропилакриламид (ПНИПААм)		Фотоиндуцируемая
Полигидроксиэтилметакрилат (ПЕМА)		Фотоиндуцируемая

Таблица 3 - Гидрогели на основе натуральных полимеров для 3D-биопринтинга

Базовый полимер	Преимущества	Недостатки	Тип полимеризации
Агароза	Доступность	Недостаточная биосовместимость; сложность биопечати ввиду вязкости заподимеризованного материала	Температурная
Альгинат	Биосовместимость; простота получения заданных свойств	Быстрая полимеризация	Ионочувствительная
Коллаген	Доступность; биосовместимость; приемлемая скорость биodeградации;	Недостаточные механические свойства	Температурная, рН
Фибрин	Биосовместимость; приемлемая скорость биodeградации;	Быстрая полимеризация; недостаточные механические свойства	Химическая (Фибриноген+ тромбин)
Желатин	Отличная биосовместимость;		Температурная, рН

	доступность	Требует модификаций для полимеризации	Фотоиндуцируемая
Гиалуроновая кислота	Биосовместимость	Требует дополнительных химических модификаций для полимеризации и создания хороших механических свойств	Химическая, (требуется перекрестно-сшивающий агент)
			Фотоиндуцируемая

В литературе последних лет отмечено создание гидрогелей на основе белков/пептидов, в основном шёлкоподобных, рекомбинантных коллагеновых/коллагеноподобных, эластиноподобных, резилиноподобных (резилин - эластомерный белок, имеющийся у многих насекомых), а также гибридных на их основе [26,40,41,71,87,193]. Учитывая наличие целого спектра гидрогелей, подбирать подходящий под определенный метод трехмерной биопечати с заданными физическими характеристиками (вязкостью, пластичностью, скоростью полимеризации) представляется реальным [71,185]. Опыт использования разных гидрогелей для различных приложений и методов биопечати суммирован в Табл. 4.

Таблица 4 - Гидрогели, используемые в разных методах трехмерной биопечати

Гидрогель	Клеточный материал	Технологии использования	Биомедицинские приложения
Альгинат	Скелетные миобласты, ММСК, АМСК, ВМСК, хондроциты, кардиомиоциты	Струйная биопечать, экструзионная биопечать	Восстановление тканей сердца, замещение нервной ткани, мышечной ткани, тканей хряща и кожи.

Данные Табл. 4 свидетельствуют о том, что при тестировании технологии

Хитозан	ММСК, хондроциты	Экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани
Агароза	ММСК, BMSC	Экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани
Метилцеллюлоза	Хондроциты	Экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани
Гиалуроновая кислота	Хондроциты, фибробласты	Экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани, кожи
Хондроитина сульфат	Хондроциты	Струйная биопечать	Восстановление хрящевой ткани
Коллаген	Эндотелиальные клетки, кератиноциты, хондроциты, фибробласты ММСК, ТЦ.	Струйная печать, экструзионная биопечать	Восстановление тканей кожи, кровеносных сосудов, хряща, нервной ткани, ЦЖ
Желатин	Хондроциты, гепатоциты, фибробласты	Экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани, ткани печени, кожи
Фибрин/фибриноген	Хондроциты, HUVES, нейрональные клетки, гепатоциты, фибробласты	Струйная биопечать, экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани, ткани печени, кожи кровеносных сосудов, нервной ткани
ПЭГ	ММСК, BMSC, HUVES	Экструзионная биопечать	Восстановление кровеносных сосудов
Pluronic F127	Фибробласты, гепатоциты	Экструзионная биопечать	Восстановление ткани печени
Матригель	Гепатоциты, ММСК, BMSC, хондроциты	Экструзионная биопечать	Восстановление хрящевой ткани ткани печени

3D-биопринтинга используют разные типы клеток, в частности, кератиноциты, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК),

фибробласты на коллагеновой подложке для создания кожных эквивалентов [93]. Описаны попытки создания эквивалентов поджелудочной железы с эндокринной функцией в перспективе для создания инсулин-продуцирующего конструктора [115]. Опубликованы результаты экспериментов по биопечати эквивалентов печени с использованием человеческих ИПСК с последующей их дифференцировкой в гепатоциты [56]. Известны работы по биопечати эквивалентов ткани легких с использованием Матригеля, эпителиальных (A549) и эндотелиальных (EA.hy 926) клеток [72], а также эквивалентов нервной ткани с использованием клеток Шванна и ММСК, полученных из костного мозга с использованием агарозной подложки [138].

Еще одним из перспективных подходов в технологии трехмерной биопечати является печать не одиночными клетками, а клеточными трехмерными агрегатами, так называемыми, тканевыми сфероидами [3,74,124]. Фундаментальным биологическим принципом данного варианта технологии биопечати является феномен тканевого слияния [146]. Предполагается, что тканевые сфероиды, находящиеся близко друг к другу, будут сливаться в результате действия сил поверхностного натяжения [83]. Для удержания тканевых сфероидов рядом друг с другом в трехмерном пространстве предложено использовать напечатанные синтетические каркасы [34,74], гидрогели [157], и, в ряде случаев, металлические стержни [80]. Тканевые сфероиды по результатам некоторых исследований [82,99], имеют ряд значимых преимуществ перед трансплантацией клеточной суспензии. Так, высокая плотность клеток внутри сфероидов, синтез клетками сфероидов внеклеточного матрикса, способность сфероидов к слиянию в органоподобные структуры с формированием тканевой архитектоники, а также возможность автоматизированного получения сфероидов разного диаметра, в том числе из различных типов клеток, обосновали перспективность этого направления клеточно-тканевой инженерии [65]. Кроме того, показано, что клетки в сфероидах имеют высокую резистентность к стрессу, радиации и другим “неблагоприятным” факторам, что снижает

опасность изменения кариотипа этих клеток на *ex vivo* этапе [80]. Сегодня известно несколько методов изготовления тканевых сфероидов: метод «висячей капли» [195], метод с использованием плашек с неадгезивной поверхностью [88], метод с использованием вращающейся колбы [132], метод с использованием неадгезивных микромолдов [129], метод с использованием микрофлюидных систем [30], трехмерных подложек [34] и другие [105]. Возможность слияния сфероидов друг с другом с последующим образованием эквивалентов тканевых и органных структур привела к идее использования сфероидов в качестве «биочернил» для 3D-биопечати (биопринтинга) [25]. В последние несколько лет стало появляться все большее количество работ, описывающих использование тканевых сфероидов *in vivo*. Данные по этим работам суммированы в Табл. 5.

Таблица 5 - Применение тканевых сфероидов в экспериментах

Система органов	Тип клеток	Метод формирования сфероидов	Размер сфероидов (мкм)	Ссылки
Сердечно-сосудистая система	Человеческие кардиомиоциты из ИПСК; HUVECs; фибробласты сердца человека	Использование систем с низкоадгезивной поверхностью	100	Ong, 2017
	ММСК крысы	Метод «висячей капли»	200	Kelm, 2012
	МСК жировой ткани человека	Метод вращающихся культуральных флаконов	100-350	Bhang, 2014

	HUVECs; аортальные гладкомышечные клетки человека; фибробласты кожи человека	Использование систем с низкоадгезивно й поверхностью	560-670	Itoh, 2015
Система органов пищеварения	Гепатоциты человека; HUVECs; ММСК человека	Использование систем с низкоадгезивно й поверхностью	500-600	Yanagi, 2017
Эндокринная/экзо кринная системы	TDMSCs (МСК миндалин человека)	Метод вращающихся флаконов	500	Park, 2016
Кожа	МСК жировой ткани человека; ММСК	Метод вращающихся флаконов	Н/Д	Kwon, 2015
Костно-мышечная система	ММСК крысы	Использование систем с низкоадгезивно й поверхностью	200	Yamaguc hi, 2014
	ММСК кролика	Использование систем с низкоадгезивно й поверхностью	50	Ishihara, 2014
	МСК жировой ткани кролика	Использование систем с низкоадгезивно й поверхностью	Н/Д	Huang, 2013
	ММСК человека	Использование систем с низкоадгезивно й поверхностью	170-220	Chatterjea 2013

	МСК жировой ткани кролика	Использование систем с низкоадгезивной поверхностью	700	Murata, 2015
	Эмбриональные эпителиальные и мезенхимальные клетки зуба мыши	Комбинированный подход метода «висячей капли» с последующим культивированием на системах с низкоадгезивной поверхностью	400	Kuchler-Bopp, 2016
Нервная система	МСК клеток жировой ткани крысы	Использование систем с низкоадгезивной поверхностью	90-110	Tseng and Hsu, 2014
	МСК человека, выделенные из плаценты	Метод «висячей капли»	25	Guo, 2014

1.4. Некоторые новые подходы к биопринтингу (акустическая, магнитная, биопечать *in situ*)

В описанных выше аддитивных технологиях при послойном нанесении биоматериалов используются различные диспенсеры (nozzle), при этом для удержания клеточного материала, например тканевых сфероидов, в определённых точках пространства необходимы различные «удерживающие» структуры (scaffolds), такие как гидрогели, полимеры, металлические стержни и др. Однако использование поддерживающих каркасов сопряжено с рядом существенных недостатков, связанных с соответствующим увеличением продолжительности процесса печати, невозможностью располагать сфериды вплотную друг к другу и отсутствием технологий биопечати сети ветвящихся

каналов в тканеинженерном конструкте. Альтернативой такой технологии биопечати является **магнитная биофабрикация** тканевых конструктов.

Применение магнитных сил в тканевой инженерии началось с серии исследований А. Ito с соавторами [79]. Разработанный подход получил определение «тканевая инженерия с применением магнитных сил» (magnetic force-driven tissue engineering). В начальных сериях экспериментов магниты и создаваемые ими магнитные поля использовались для нанесения клеток, содержащих магнитные наночастицы, на различные подложки. Следующим этапом в развитии данного подхода стало использование магнитных сил для управления перемещением тканевых сфероидов, содержащих магнитные наночастицы, в двумерном пространстве (2D) [27,70,106,108,191]. В недавних работах было показано, что суперпарамагнитные наночастицы оксида железа в умеренных концентрациях не токсичны и утилизируются в организме путем связывания ионов железа [117].

Группа S. Tasoglu одной из первых применила принцип магнитной левитации клеток без насыщения их магнитными наночастицами [171]. В данных экспериментах авторы управляли диамагнитными объектами размерами от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров. В специальной парамагнитной среде, в градиенте магнитного поля, создаваемого специальными магнитами, и в отсутствие прямых контактов между компонентами, их равновесная конечная конфигурация зависела от баланса действующих магнитных и гравитационных сил. Данный подход позволяет управлять живыми блоками в парамагнитных средах для сборки трехмерных конструктов [52,170]. В своих экспериментах авторы добавляли соли гадолиния в качестве дополнительного агента для усиления парамагнитных свойств среды [21,120,166]. Соли гадолиния входят в состав некоторых контрастных препаратов, используемых при магнитно-резонансной томографии (например, в препарат «Омнискан»), и, таким образом, разрешены для клинического использования. Тем не менее в высоких концентрациях соли гадолиния могут проявлять токсичность в отношении

клеток и тканевых сфероидов. При таком подходе, кроме того, возникает определенный риск дисбаланса осмотического давления из-за избыточного содержания ионов в парамагнитной среде.

Другим подходом в разработке «бесскаффолдной» (scaffold-free) технологии является управление клеточным материалом, в том числе тканевыми сфероидами, путем использования ультразвуковых волн, то есть так называемой **акустической биопечати** [64]. Одним из подходов к акустической биопечати является управление клетками с использованием так называемого «акустического пинцета» [21].

Принцип действия «акустического пинцета» заключается в следующем: пьезоэлектрическая подложка и две взаимно перпендикулярные пары встречно-гребенчатых преобразователей генерируют стоячие поверхностные акустические волны, которые захватывают и перемещают клетки. Изменение положения клетки происходит при изменении амплитуды звука и фазы пар преобразователей. Поскольку фаза и амплитуда — задаваемые, легко изменяемые параметры, точность перемещения клетки будет ограничена только разрешающей способностью оборудования. При этом скорость перемещения клетки может достигать 2,5 микрометров в секунду [63]. В ряде работ показано, что данный вид манипуляции клеточными объектами не влияет на их жизнеспособность, функциональность и экспрессию генов. [48,104]. Более того, он имеет ряд преимуществ в сравнении с описанными выше подходами, таких как, возможность управлять клетками в закрытых системах, что значительно снижает риск возможной микробной и грибковой контаминации, и также позволяет не использовать различного рода метки для манипуляции клеточным материалом, и не подвергать клетки механическим воздействиям. При этом «акустические пинцеты» используют мощность приблизительно в 10^6 раз ниже, чем оптические пинцеты [154]. Так «акустические пинцеты» работают в диапазоне частот, аналогичном используемому в медицинском ультразвуковом оборудовании, в частности, в аппаратах ультразвуковой диагностики для визуализации плода в утробе

матери [61]. Платформа, состоящая из «акустических пинцетов», может быть встроена в единый программно-аппаратный комплекс без использования форсунок и других дорогостоящих элементов классических биопринтеров, необходимых для управления биоматериалом (nozzle-free approach).

Не исключено одновременное использование **магнитного и акустического полей** для управления клеточным материалом при использовании неоднородного магнитно-акустического поля. Суть этого метода заключается в быстрой **левитационной** сборке в неоднородном магнитном поле конструкта из хаотично распределенных в рабочем объеме жидкой питательной среды клеток и/или тканевых сфероидов. Конструкт формируется в той области пространства, где в результате совместного действия гравитационного, магнитного и акустического полей в образуется «магнито-акустическая ловушка», в которой гравитационные силы скомпенсированы, а тканевые сфероиды испытывают действие сил, приближающих их друг к другу. Образующийся в результате конструкт может иметь шарообразную, тороидальную, эллипсоидальную и другие формы, задаваемые конкретным выбором конфигурации магнитно-акустического поля [196]. Описанный подход включает в себя разработку сложного дизайна акустических и магнитных волн и, таким образом, требует специальных навыков и компетенций в области экспериментальной физики, а также наличия специализированного оборудования. Поэтому данный метод биопечати пока не получил широкого применения, находясь в стадии технологической разработки. Особенностью этого метода является и то, что создается модель не самого конструкта, а конфигурация поля (или нескольких полей), которая будет определять форму создаваемого объекта.

Еще одним из новых, разрабатываемых подходов в трехмерной биопечати является, **биопечать *in situ***, то есть замещение дефектов тканей и органов с использованием биопринтеров непосредственно в рамках оперативного вмешательства. Этот метод считается перспективным в виду возможного «физиологического» решения проблемы васкуляризации за счет

миграции прогениторных эндотелиальных клеток в напечатанную тканеинженерную конструкцию и прорастания в нее капилляров из окружающей дефект ткани реципиента. Идея *in situ* биопринтинга впервые была предложена Вайссом с соавторами в 2007 году [29]. Однако с того времени было проведено лишь несколько экспериментов по биопечати *in situ* ввиду сложности формирования конструкта непосредственно в раневом дефекте, то есть на негоризонтальных поверхностях, и, как следствие, необходимости иметь интерактивное программное обеспечение для сканирования формы и глубины тканевого дефекта с немедленным последующим учетом этой информации при биопечати [2]. Кроме того, в этом случае нужны специальные требования к экструдированным биологическим материалам, которые, в частности, должны моментально полимеризоваться в раневом дефекте без воздействия дополнительных факторов таких как, УФ-излучение или химические сшивающие агенты. Тем не менее считается, что *in situ* биопринтинг имеет ряд значимых преимуществ перед другими методами биопечати. Так, прямая биопечать непосредственно в тканевой дефект исключает необходимость предварительного формирования подложки, что минимизирует риски контаминации *in vitro*. Кроме того, для дефектов критических или крупных размеров, биопечать *in situ* может исключить необходимость индукции дифференцировки стволовых или прогениторных клеток *in vitro*, что сокращает время и трудозатраты при изготовлении. При печати стволовыми или прогениторными клетками *in situ* стволовые клетки сразу размещаются в естественное, богатое факторами роста микроокружение, которое обеспечит их органотипическую дифференцировку. Более того, при биопечати *in situ* можно достичь требуемой иерархии в расположении клеток разных типов внутри дефекта, в отличие от технологий трансплантации готовых подложек, которые могут изменить форму в процессе набухания, сжатия и других деформаций.

Эксперименты *in situ* биопечати пока немногочисленны, но подтверждают ее преимущества, сформулированные выше. Так, А. Скардал со

соавторами продемонстрировали возможность струйной биопечати *in situ* с использованием фибробластов и кератиноцитов для замещения ожоговых ран [163]. В. Керикел с соавторами опубликовали результаты удачных экспериментов по замещению костной ткани с использованием лазерной биопечати *in situ* [89].

Таким образом, технологии 3D-биопринтинга активно развиваются и усложняются с привлечением новых физических воздействий, призванных обеспечить формирование органотипических тканевых эквивалентов, исходно наиболее близких к природным или легко ремоделируемых организмом.

I.5. ЩЖ как объект для биопринтинга

Общепринятым подходом при утрате или снижении функции железы внутренней секреции сегодня является заместительная гормонотерапия. Однако при длительном ее использовании, органы и ткани пациентов становятся недостаточно восприимчивыми к гормональным препаратам [184], что также требует изменения тактики лечения.

Создание полноценных конструкторов ЩЖ требует культур функционально активных ТЦ, способных формировать ТФ, культур ТФ или МО ЩЖ. Разработка таких культур (моделей) является предметом исследований целого ряда лабораторий. В настоящем разделе систематизированы основные итоги этих исследований.

Структурной единицей ЩЖ являются ТФ, состоящие из ТЦ и единичных С-клеток [13,175]. Полость ТФ заполнена коллоидом, основу которого составляет ТГ – предшественник тиреоидных гормонов: трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) при наличии I и тирозина [13].

ТЦ в ТФ имеют специфическую полярность (рис.3 цит. по [165]). Апикальный край ТЦ имеет микровилле (микрорсевдоподии), обращенные в просвет ТФ. Их функция – пиноцитоз капелек коллоида с ТГ и гормонами в

цитоплазму ТЦ [13,175]. Противоположная поверхность ТЦ прилегает к базальной мембране. Структура ТФ, поддерживается внеклеточным матриксом, в состав которого входит базальная мембрана и небольшое количество стромы между ТФ, содержащей единичные фибробласты и клетки лейкоцитарного ряда (Рис. 4). Снаружи каждый ТФ оплетен сетью капилляров. ТЦ обладают низкой пролиферативной активностью и обновляются за жизнь всего 5-6 раз [1].

Основным активатором синтетической активности ТЦ ЩЖ является тиреотропный гормон гипофиза (ТТГ). Кроме того, метаболизм ЩЖ регулируется и нейротрансммитерами (ацетилхолином, норэпинефрином), местными гормонами (простагландинами), факторами роста (ФР-эпидермальным, инсулиноподобным и др.) и цитокинами (интерлейкинами, фактором некроза опухолей и др.) [13].

В последние годы было установлено, что и женские половые гормоны (в частности прогестерон) усиливают синтетическую активность ТЦ в присутствии ТТГ, активируя экспрессию тиреоидной пероксидазы (ТП) [22]. Антагонист прогестероновых рецепторов Мифепристон предотвращал этот процесс [22].

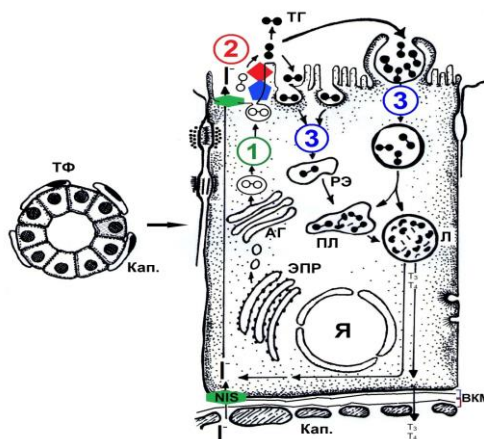
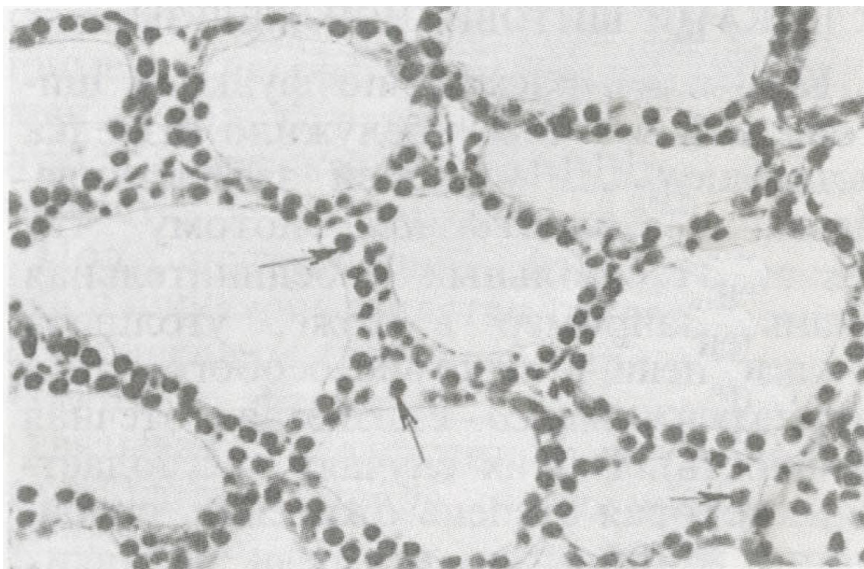


Рисунок 3 - Схема строения тиреоцита: Кап.-капилляры, ТФ- тиреоидный фолликул, ВКМ-внеклеточный матрикс, ТГ- тиреоглобулин, ЭПР-эндоплазматический ретикулум, Я-ядро, АГ-

**аппарат Гольджи, Л-лизосомы, ПЛ-прелизосомы (поздние эндосомы,
РЭ-ранние эндосомы [цит. по [165]**



**Рисунок 4 - Микрофотография ТФ в ткани ЩЖ. Стрелками показаны
С-клетки, увеличение 200 [цит. по [13]**

ТТГ сложным образом включен в сигналинг гомеостаза ЩЖ. Так, ТТГ стимулирует экспрессию NIS (натрий-йод симпортера) в нативной ЩЖ [13] и в 2D- и 3D культурах ТЦ в присутствии ЭФР [94], а также в культурах ТФ [94], способствуя, таким образом, захвату I ТЦ. Причем этот захват увеличивается более, чем в 12 раз при возрастании уровня мРНК NIS в 4,4 раза [94]. ТТГ, кроме того, в организме [13] и на культурах ТЦ *in vitro* [189] активирует синтез ТГ и стимулирует образование гормонов ЩЖ. То есть ТТГ - стимулятор синтетической активности ТЦ, но не ростовой фактор [125,189]. В то же время, в единичных работах встречаются данные о стимулирующем влиянии ТТГ на пролиферацию ТЦ [144] и негативной регуляции *in vitro* экспрессии генов, вовлеченных в гормоногенез в ТЦ [78]. Кроме того, ТТГ считается промотором поляризации ТЦ *in vitro* [131].

Участие ТТГ в поддержании дифференцировки ТЦ подтверждается данными о том, что в сочетании с IGF-1 он увеличивает аккумуляцию β -катенина в ядрах ТЦ, что приводит (в взаимодействии с Рах8 геном) к увеличению экспрессии NIS гена, и как следствие – к стимуляции захвата I из

внешней среды [155]. Интересно, что в отсутствие ТТГ в среде культивирования ТЦ удлиняются, а в отсутствие ТТГ и эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) - приобретают звездчатую форму [57].

Предшественник тиреоидных гормонов - ТГ, напротив, является негативным регулятором биосинтеза гормонов по принципу обратной связи: высокие концентрации ТГ снижают экспрессию NIS, и, как следствие, захват I [77].

Разработкой условий 2D-культивирования ТЦ, исследованием их морфологических особенностей и функциональной активности занимаются уже несколько десятилетий. Объектом изучения являются первичные культуры ТЦ собак, свиней, крыс, человека. Не так давно была получена первая стабильная клеточная линия ТЦ крыс Фишера-FRTL-5 [84]. Описаны и другие линии ТЦ ЩТ- WRT, PC, C13 [92]. При выделении ТЦ из ткани ЩЖ крыс было использовано сочетание механической и ферментативной обработки (коллагеназа А, диспаза II), которое исследователи применяют и в настоящее время. Для культивирования этой линии рекомендуется среда Хэма-F12, обогащенная 5-ью гормонами: глицилгистидил-лизинном, инсулином, соматостатином, трансферрином и гидрокортизоном (5H) [47,149] или 6-ю гормонами (5H+ТТГ=6H) [16]. Кроме того, при получении этой чистой линии был использован супрессор асимметрии клеточной кинетики - пуриновый нуклеозид SACK [101].

Однако до сих пор многие авторы сомневаются в адекватности FRTL-5 для изучения физиологических и моделирования патологических процессов в ЩЖ. Обоснование - клетки бессмертной линии утратили контроль над базовыми механизмами регуляции клеточного цикла [84,137]. Кроме того, FRTL-5 из ATCC CRL8305 проявляла клональную гетерогенность, и, в конечном итоге, оказалась тетраплоидной [169]. А при инокуляции иммунодефицитным мышам nude формировала рак ЩЖ [137]. Поэтому интерес к получению первичных культур ТЦ (особенно в аспекте создания

тканеинженерных конструкций), не смотря на их краткосрочность, не убывает.

Первые работы по 2D-культивированию ТЦ были выполнены Pulvertaft в 1959 году [148]. Сравнительно быстро было установлено, что в 2D-монослоях у ТЦ отсутствует полярность [148,168,178].

За последние десятилетия было апробировано много культуральных добавок (включая 5Н и 6Н) и сред культивирования для получения морфологически и функционально зрелых ТЦ в 2D –монослое. В результате был установлен целый ряд интересных фактов, приоткрывающих завесу над регуляцией функции ЩЖ.

Так, установлен синергизм в действии гормонов инсулина, гидрокортизона и ТТГ на захват I ТЦ в краткосрочных 2D-культурах [75,127]. Инсулин (равно как и ТТГ) стимулирует выработку ТГ тироцитами [57], причем этот стимулирующий эффект гормонов реализуется через экспрессию NIS [94] с участием аденилатциклазной системы [189]. Эта стимуляция секреции ТГ идет параллельно со снижением их пролиферативной активности [189]. Сегодня наиболее удачной для краткосрочного 2D-культивирования считается среда, обогащенная 6Н и 5-10% ЭТС [127]. Эти условия в определенной мере дают «привилегии» для функционирования ТЦ (как эндокринных клеток), обеспечивая спонтанную элиминацию из культуры стромальных и антиген – презентующих клеток [57,96,164]. Пара ТТГ-инсулин в 6Н-добавке к среде культивирования считается облигатной [57]. ТТГ обеспечивает не только захват I ТЦ по механизмам, описанным выше, но и, в определенном смысле, поддерживает дифференцировку ТЦ [144], образование межклеточных контактов в монослое и поляризацию ТЦ (с формированием микровилле на апикальном крае) [131]. В бессывороточной среде большая часть ТЦ погибает, а оставшиеся дедифференцируются до стволовых клеток, способных дифференцироваться в соответствующих индукционных коктейлях до нейронов или адипоцитов [167]. Мы не

исключаем, что происходит не процесс дедифференцировки, а гибель всех клеток, кроме стволовых.

Но даже в среде с 5Н (или 6Н) добавками ТЦ первичных культур постепенно снижают синтез ТГ и экспрессию маркеров дифференцировки [187] и к 28 дню культивирования большая их часть погибает: жизнеспособными остаются лишь 5-10% клеток [84]. Группа ученых под руководством Третьяка С.И. предложила стабилизировать первичные культуры ТЦ, медленно (в течение 3-х суток) охлаждая их до 28⁰С, а потом так же медленно доводя их до 37⁰ [10,11]. Такой прием позволил удлинить время жизни первичной культуры.

Еще одним приемом, с помощью которого удастся дольше сохранить правильно поляризованную первичную культуру ТЦ в монослое, способную захватывать I и синтезировать Т₃ и Т₄, является помещение ее на полупроницаемую мембрану культуральной вставки Трансвелл [160].

Еще более прогрессивным, вероятно, следует признать другой прием стабилизации первичных культур - перевод их в системы для 3D-культивирования, в частности, в гидрогели [75,175]. S. Toda и соавт. [175] при 3D-культивировании удалось получить из первичной культуры ТЦ фолликулы, правда, они оказались инвертированными: микровилле были обращены не в полость ТФ, а во внешнюю среду (Рис. 5). Развивая технологии ведения первичных культур, эти авторы создали классификацию культуральных систем (Рис. 6). 2D-культивирование в водной среде авторы считают оптимальным, например, для эндотелия, на границе водной и воздушной сред – для эпидермиса и эпителия респираторного тракта, а 3D-культивирование в геле в слое, примыкающем к воздушному - для паренхиматозных и стромальных типов клеток – Рис. 6.

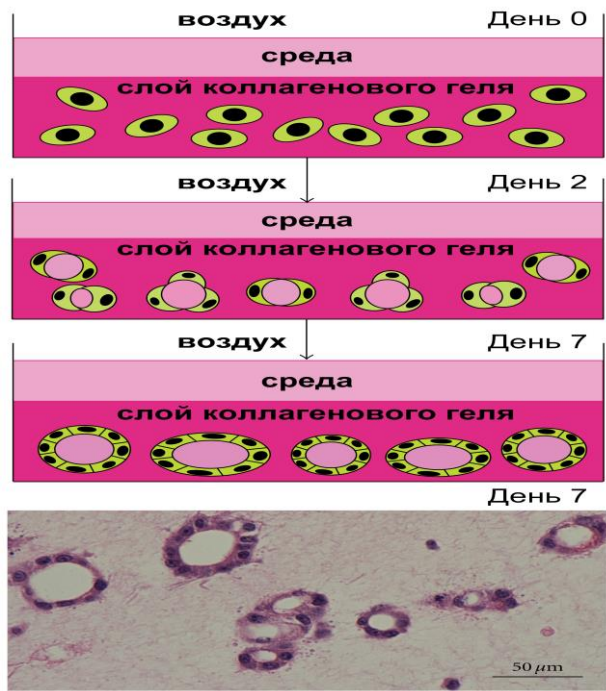


Рисунок 5 - Схема формирования инвертированных ТФ из первичной культуры ТЦ при 3D- культивировании [цит. по [175]

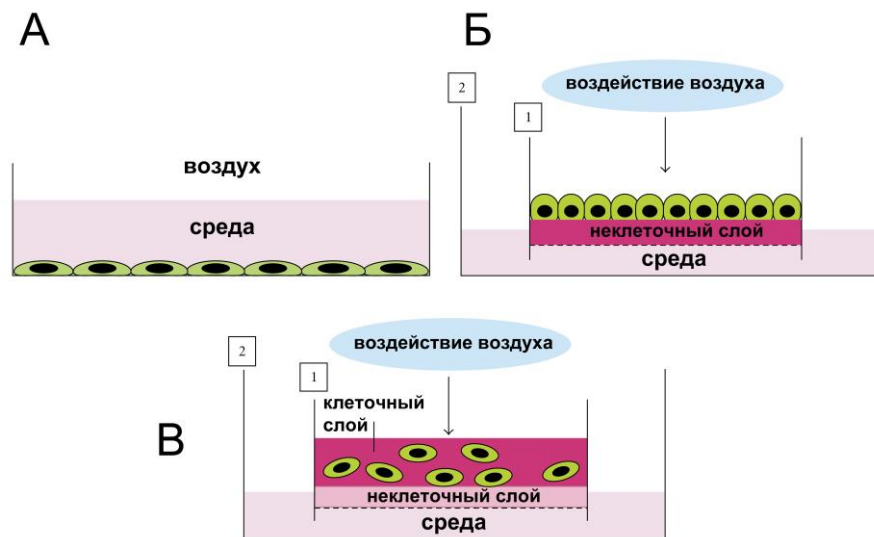


Рисунок 6 - Классификация культуральных систем: А- в водной среде; Б- 2D на границе раздела среда-воздух, В –3D на границе раздела двух сред [цит. по [175]

Учитывая тот факт, что структурной и функциональной единицей ЩЖ является ТФ, стремление сформировать из первичной культуры ТЦ являлось закономерным.

Фолликулогенез из монослоя (2D) первичных культур ТЦ наблюдали многие авторы. Так Kerkof (1964), Lissitky (1971), Fayet (1971) [цит. по [127]] показали возможность формирования фолликулоподобных структур из монослоя ТЦ при сохранении способности захватывать I. Однако в этих ранних исследованиях было показано, что через 7-10 дней (при периодической смене среды) ТФ распадаются, вновь образуя 2D-монослой, в котором ТЦ теряют дифференцировку и погибают. О. Connor в 1980 г. [цит. по [127]] сумел пролонгировать культивирование ТФ до 20 дней, не меняя среду их культивирования. Описано также пролонгирование жизни культуры ТФ, путем добавления к ним кондиционной среды, полученной с начальных сроков культивирования, предварительно обогащая ее глюкозой [цит. по [127]].

В более поздних работах, когда расширился спектр добавок к средам культивирования, а также самих этих сред, был выявлен ряд регуляторных влияний, позволяющих индуцировать образование ТФ из 2D- культур и стабилизацию (в течение некоторого времени) ТФ. Так, в частности было показано, что переход от 5Н к 6Н культуральным добавкам в сочетании с 10% ЭТС стимулирует образование ТФ [149]. Показана активирующая фолликулогенез роль хронической стимуляции 2D-культуры с помощью ТТГ [23,149]. Образующиеся ТФ были функционально активны - способны захватывать I из внешней среды благодаря активации NIS [94]. Инсулин и гидрокортизон, синергично с ТТГ, также стимулировали захват I клетками ТФ. Тип базовой среды культивирования (при наличии описанных выше добавок) играл меньшую роль в фолликулогенезе. Так, сходные результаты были получены при использовании богатой аминокислотами среды 199, содержащей смесь нутриентов и глюкозу среды Хэма-F12, базовой среды Игла и среды EMEM [23,94,127,131]. Морфологически процесс образования ТФ из

2D–первичной культуры описывают как «кратерообразную десквамацию» из конфлуэнтного монослоя [11].

Формирование ТФ из монослоя ТЦ требует и реорганизации базальной мембраны. Установлено, что этот процесс контролируется Smad1, Smad5 и Vegfra [182]. Так, у мышей, нокаутированных по этим генам, в эмбриогенезе формировались дефектные ТФ (кластеры клеток). Кондиционная среда из-под эмбриональных эндотелиальных прогениторов устраняла *in vitro* дефекты формирования ТФ из монослоя, стимулируя образование компонентов базальной мембраны - ламининов $\alpha 1$, $\beta 1$ и $\gamma 1$ [182].

В то же время микроскопия высокого разрешения показала, что (как описано ранее), формирующиеся из 2D–монослоя в водный раствор ТФ часто бывают инвертированными (с микровилле-наружу). Причем их конверсию, как оказалось, можно осуществить не только с помощью ТТГ, но и перенести их в 3D-коллагеновый гель [цит. по [10]. Следует отметить, что впервые коллагеновый гель для культивирования ТЦ был предложен еще в 1972 г. Т. Elsdabe [53]. ТЦ в геле не только формировали ТФ, но и организовывали вокруг себя базальную мембрану, что обеспечивало их стабильность и гомеостаз [цит. по [10]. Однако С-клетки в их структуре отсутствовали. Спонтанное образование ТФ было описано и при культивировании ТЦ в коллагеновом слое, нанесенном на миллиметровый фильтр, на границе раздела гель-воздушная среда (третий тип культуральной системы (рис. 5).

Исследования условий и механизмов формирования ТФ из ТЦ шли параллельно с изучением возможностей выделения из ткани ЩЖ ТФ (содержащих как ТЦ, так и С-клетки) и их культивирования *in vitro*.

ТФ, выделенные из ЩЖ мышей в водной культуральной системе, прикреплялись ко дну, на 2-ой день теряли 3D-конфигурацию, образуя многослойные структуры с формированием межклеточных контактов, к 14-ым суткам теряли способность синтезировать ТГ - основное функциональное свойство и признак дифференцировки [84]. В то же время при культивировании в 3D-коллагеновом геле фолликулярно-клеточной фракции

(состоящей из ТФ, с примесью одиночных ТЦ, эндотелия и клеток стромы) уже через 1 сутки наблюдали выселение отдельных ТЦ из ТФ, миграцию их в гель, формирование зон роста, состоящих из отдельных ТЦ и микро ТФ, постепенно увеличивающихся в размерах [1,84,190]. В этих дочерних фолликулах ТЦ имели правильную полярность и образовывали между собой *junct*-контакты [190]. Показано, что транскрипционный фактор Pax8 и его мишень кадгерин 16 играют ключевую роль в образовании правильно поляризованных ТФ-подобных структур: супрессия кадгерина 16 приводит к формированию ТФ с нарушенной поляризацией и низким уровнем экспрессии ламинина, то есть с недостаточной активностью формирования базальной мембраны [95]. Показано, что EGF активирует миграцию ТЦ из ТФ в гель и формирование новых ТФ [76]. Сочетание ингибиторов сигнальных путей MEK (UO126) и PI3K (LY294002) блокирует этот процесс. Вопрос о возможности длительного сохранения функциональности ТФ пока остается открытым. Наиболее обнадеживающие результаты получены в последние годы при культивировании нативных ТФ (содержащих как ТЦ, так и С-клетки) в 3D-коллагеновом геле на границе раздела воздух-гель [174,175,177,179].

В последние годы опубликовано несколько работ по 3D-культивированию первичных МО ЩЖ человека в коллагеновом геле [130,174,175,177,179]. Авторы считают такой подход к масштабированию ткани ЩЖ перспективным вследствие исходной комплексности ткани.

Гистологически МО представлены ТФ (состоящими из ТЦ и С-клеток) и одиночными ТЦ. На периферии таких МО (в области низкой плотности клеток и хорошей оксигенации) был выявлен фолликулогенез – путем «отшнуровки» дочерних ТФ от материнских (Рис. 7, цит. по [175]). Авторы расценили этот процесс как ремоделирование ЩЖ, открывающее перспективы для увеличения ее массы *in vitro*.

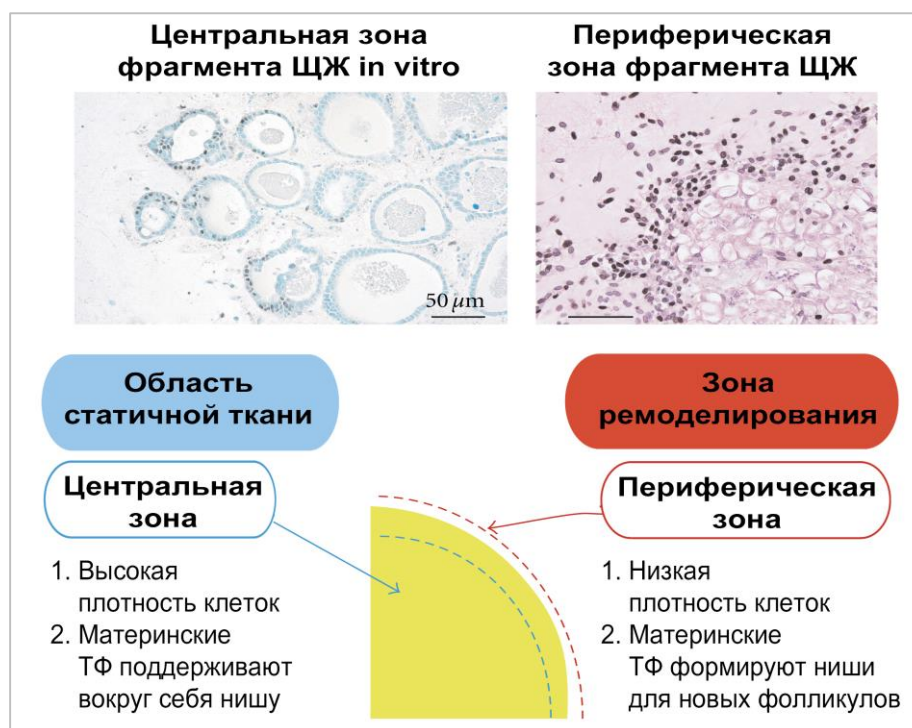


Рисунок 7 - Ремоделирование фрагмента щитовидной железы *in vitro* в 3D-культуральной системе (адапт. по [175])

Еще одним подходом для увеличения количества клеток ЩЖ *in vitro* является использование стволовых клеток. Так, было установлено, что в норме клетки ЩЖ за жизнь обмениваются около 5 раз [44,180]. При частичной тиреоидэктомии ЩЖ, как и печень, в ряде случаев регенерирует до исходного объема [51]. При гемитиреоидэктомии остаточная ЩЖ гипертрофируется по механизму обратной связи [38]. Доказательством способности ЩЖ к обновлению являются и гиперпластические процессы в ЩЖ, например, при зобе [86]. Эти факты закономерно привели к предположению о наличии в ткани ЩЖ стволовых клеток (СК).

Фундаментом этого направления стали эмбриологические исследования, систематизированные в ряде обзоров. Так, в частности, T.F.Davis et al. [44] изучал клеточные и молекулярные механизмы, обеспечивающие развитие ЩЖ мыши и человека. На основе накопленных знаний авторами сформирована схема последовательной экспрессии в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) ряда транскрипционных факторов, обеспечивающих миграцию, активацию дифференцировки и

функционализацию потомков ЭСК - то есть каскада событий, приводящих в эмбриогенезе к формированию ТФ ЩЖ (Рис. 8, цит. по [44]).

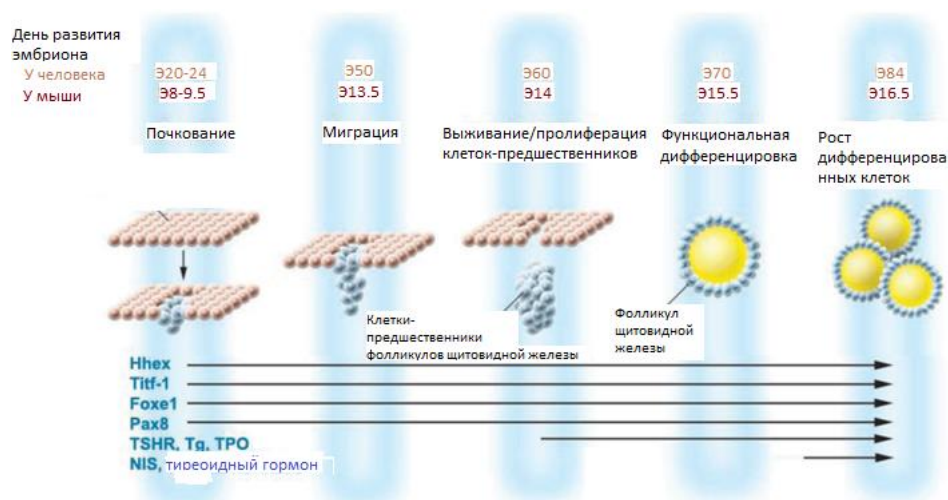


Рисунок 8 - Последовательность и сроки экспрессии генов, вовлеченных в эмбриогенезе в формировании фолликулов ЩЖ мыши и человека [цит. по [44]]

Так, миграцию и пролиферацию прогениторов, согласно этой схеме, обеспечивает экспрессия *Nhex*, *Titf 1*, *Foxe-1* и *Pax8*. Активация рецептора (R) ТТГ индуцируется экспрессией транскрипционного фактора *NIS*. А присоединение ТТГ к активному рецептору на поверхности прогениторов приводит к активации синтеза ТП, ТГ и, как следствие – к появлению у дифференцирующихся клеток способности захватывать I и синтезировать тиреоидные гормоны. Эти процессы сопровождаются формированием фолликулов и дозреванием в них прогениторов до ТЦ. Автор полагает, что часть ЭСК остаются в сформированной в эмбриогенезе ЩЖ в так называемых «гнездах» - небольших скоплениях тиреоцито-подобных клеток между ТФ [44].

В 2012-2013 г.г. несколькими группами ученых [18,110,111] из ЭСК мыши и далее из ЭСК человека *in vitro* удалось получить ТЦ и ТФ. Протоколы дифференцировки ЭСК, использованные в обоих случаях, были сходными. Так, R.Ma et al. [110] показано, что для дифференцировки ЭСК мыши в тиреоидном направлении необходимы 2 транскрипционных фактора – *NKX2-*

1 и Pax8 (paired box gene), который был описан группой под руководством P.Cruss [114]. Данные гены синергично активируются с генами NIS, ТГ и ТП, если при индукции тиреоидифференцировки использовали активин А и ТТГ. Экспрессия генов ТЦ в ЭСК начиналась после их трансфекции Pax8 и NKX2-1. При 3-D культивировании ТЦ спонтанно формировали фолликулы [110]. Однако функциональность этих фолликулов доказана не была.

В сходных условиях из ЭСК человека удалось получить *in vitro* ТФ, в клетках которых были экспрессированы гены ТГ и ТП [18,35,36,43,54,60,90,114,123,162]. Позднее с помощью трансфекций генетических конструкций было доказано, что и для тиреоидной дифференцировки человеческих ЭСК необходима активация тех же транскрипционных факторов - Pax8 и NKX2-1. Авторы показали, что в клетках сформированных ТФ экспрессирован и NIS, что в сочетании с экспрессией ТГ и ТП косвенно свидетельствует об активации I-захватывающего каскада.

Данные об эмбриогенезе ЩЖ в сочетании с данными о возможности *ex vivo* дифференцировать ЭСК в тиреоидном направлении, а также клинические наблюдения физиологической и репаративной регенерации ЩЖ закономерно привели к поиску резидентных СК ЩЖ человека как возможному биоматериалу для ее биофабрикации.

Идентификация тиреоидных СК была почти одновременно осуществлена несколькими группами ученых [59,97,173]. Источником клеток служила ткань ЩЖ, полученная после оперативных вмешательств по поводу зоба Хашимото или гипертиреоза. Общими генетическими маркерами этих клеток были Oct 4, Pax8, Sox2 и NANOG, а дополнительными - GATA-4, HNF4 α (энтодермальные маркеры комитированных СК) и ABC – транспортеры (в частности, ABCG2), то есть все те же гены и транскрипционные факторы, которые активированы в ЭСК и в индуцированных плюрипотентных клетках. По иммунофенотипу СК ЩЖ идентифицировались как CD34⁺CD45⁻. Уникальных (для ЩЖ) маркеров СК пока не найдено. Данные по маркерам стволовых/прогениторных клеток и

маркерам тиреоидной дифференцировки в клетках нормальной ЩЖ суммированы в Табл. 6.

Количество СК в ЩЖ составляет примерно 1/1000 [44]. СК в ЩЖ по крайней мере 3-потентные [59,143]. В соответствующих индуцирующих коктейлях они способны дифференцироваться не только в «тиреоидном», но и «в адипогенном» направлении, экспрессируя соответствующие маркеры. А при культивировании с клетками нейробластомы в СК из ЩЖ экспрессировался β -тубулин, что косвенно свидетельствует о возможности их нейрональной дифференцировки. Таким образом «стволовость» этих клеток была подтверждена не только экспрессией ансамбля соответствующих генов, но и их пластичностью - способностью давать несколько клеточных линий.

Популяция СК ЩЖ, как и многих других тканей, оказалась фенотипически неоднородной. Так, Hoshi et al. [73] в соответствии с экспрессией гена стволовых клеток Sca 1 разделили ее на 2 субпопуляции - CD45⁻ cKit⁻, Oct 4⁺, Sca 1⁺ и CD45⁻, cKit⁻, Oct 4⁺, Sca 1⁻. Обе эти субпопуляции не экспрессировали маркеры тиреоидной дифференцировки ТГ, ТТГ и транскрипционные факторы - тиреоидный фактор транскрипции (ТТФ-1) и Pax8.

Кроме того, среди СК ЩЖ была выделена минорная популяция клеток -SP (side population), присутствующая среди резидентных СК клеток во многих тканях, и не превышающая 0,3-1,4% всех клеток ЩЖ [67,73,91,135]. SP в ЩЖ, как и общая популяция СК, подразделялась на 2 субпопуляции - Sca1⁺ и Sca1⁻ [67,135]. Отличительной чертой SP популяции является способность выбрасывать прижизненный краситель Хёкст 33342 [148,174,176,178,179], что обусловлено экспрессией в этих клетках кассеты ABC – транспортеров, и, в частности, ABCG2 [73].

При 3D-культивировании в коллагене [91], на децеллюляризованном матриксе [58], в матрикеле [73] или на оригинальном матриксе с повторяющимися полостями при задаваемом механическом векторе [58] СК ЩЖ формируют сфероидные колонии, которые после индукции тиреоидной

дифференцировки реарранжируются в фолликулоподобные структуры, клетки которых позитивны по ТГ, ТП и ТТГ, перестают экспрессировать гены СК и начинают захватывать I. По мнению S.Kimura [91] тиреосферы формируют вокруг себя нишу, в которой СК дифференцируются в ТЦ.

Эта сформированная СК *in vitro* ниша является аналогом естественных ниш СК ЩЖ в межфолликулярном пространстве [91,135]. Данные об участии SP-клеток в морфогенезе *in vitro* противоречивы: одни авторы отводят им ведущую роль [91], другие считают, что SP-клетки не участвуют в образовании фолликулов, оставаясь в межфолликулярных пространствах [44].

Таблица 6 - Предполагаемые маркеры стволовых/прогениторных клеток и маркеры тиреоидной дифференцировки в клетках нормальной ЩЖ и при доброкачественных процессах [цит. по [58]].

Маркеры стволовых/ прогениторных клеток	Маркеры тиреоидной дифференцировки	Источник клеток	Публикации
OCT4 + GATA4 + HNF4a + PAX8 +	Tg —	Зоб щитовидной железы человека	Thomas et al. (2006)
ABCG + ; SP + OCT4 + ; SP + GATA + ; SP — HNF4a + ; SP — PAX8 + ; SP —	TG — ; TSH-R — ; NIS — ; TPO — TG + ; TSH-R + ; NIS + ; TPO +	Тиреосферы, сформированные из клеток, полученных при зобе щитовидной железы	Lan et al. (2007)
OCT4 + NANOG + Nestin + Nestin — CD34 + CD45 —	TG + , TPO + ; NIS — ; TSH-R — (Доля позитивных клеток колеблется в зависимости от используемой линии тиреоцитов)	Тиреосферы, полученные из доброкачественных и злокачественных опухолевых процессов	Fierabracci et al. (2008)
OCT4 + ABCG2 SOX2 NANOG CD133	TG, TPO, TSH-R	Зоб щитовидной железы	Fierabracci et al. (2012)

«+» – позитивны, «-» – негативны; а – данные получены путем FACS анализа,
б – данные получены путем RT-PCR

В моделях химического, вызванного облучением, частичной тиреоидэктомией или аутоиммунизацией гипотиреоза [91,135] «помощь» в восстановлении фолликулов из СК в ЩЖ оказывают и ММСК, также

находящиеся в межфолликулярном пространстве, и, кроме того, возможно, мигрирующие в ЩЖ из костного мозга (Рис. 9, цит. по [91]).

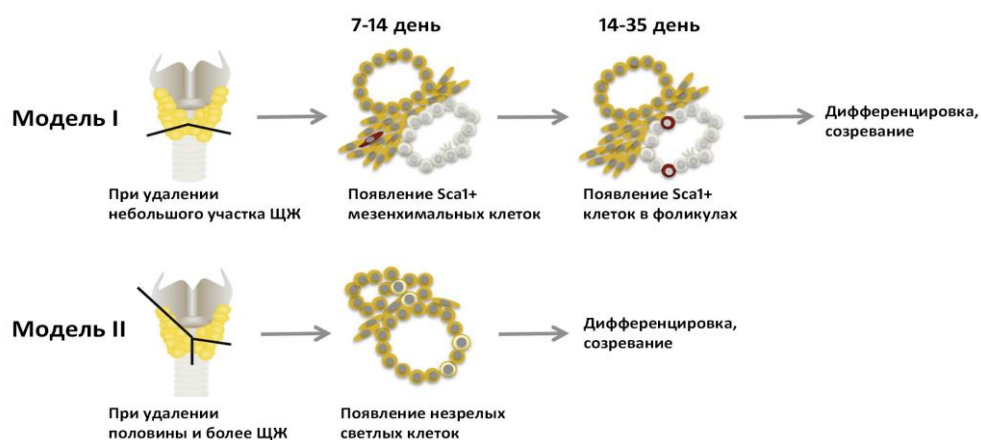


Рисунок 9 - Две модели регенерации ЩЖ мыши [цит. по [91]]

Работы в области молекулярной биологии и биомоделирования с использованием стволовых/прогениторных клеток ЩЖ закономерно привели к проблеме биобезопасности этих клеток, которая и сегодня находится в стадии обсуждения. Ряд важных, накопленных к этому времени сведений, представлены ниже.

В СК ЩЖ, в том числе в SP, экспрессирован ряд общих со стволовыми опухолевыми клетками (СОК) маркеров: Sca1, Oct4, p63 [28,62,98,134,188,194]. И в СК ЩЖ и в СОК ЩЖ активированы сходные сигнальные пути, в частности β -катенин-ассоциированный Wnt сигнальный путь [62]. В SP ЩЖ экспрессирован стагниокальцин, активированный и в опухолевых клетках ЩЖ [67].

Инъекции животным после тиреоидэктомии первичной культуры клеток из ЩЖ приводили к формированию новых фолликулов, количество которых было пропорционально количеству имплантированных клеток, а также зависело от уровней T_3 , T_4 и ТТГ [37,49,126]. Однако в отдельных случаях в графтах развивались аденомы и недифференцированные раки ЩЖ. Таким образом, было сделано заключение, что СОК ЩЖ (как и СОК новообразований других органов) происходят из резидентных СК ЩЖ [182].

В целом, сегодня не вызывает сомнений, что физиологическая и репаративная регенерация ЩЖ – это реальные процессы, обеспечиваемые наличием в ткани ЩЖ резидентных стволовых/прогениторных клеток. Это открывает перспективы клеточной терапии и тканевой инженерии ЩЖ. Однако сегодня биофабрикация эндокринных желез пока находится в «зародышевом» состоянии [58,181]. Требуется разработка подходов по образованию тканеинженерных конструкций ЩЖ с последующей трансплантацией. Одним из таких подходов является создание трехмерной структуры ткани ЩЖ с применением так называемой технологии «клеточных пластов», предложенной группой Arauchi с соавторами [19]. Клетки ЩЖ получали из 4-недельных крыс, отделяли от прилежащей соединительной ткани, измельчали и инкубировали с коллагеназой при 37°C 60 минут. Полученные клетки (в изначальном количестве $1 \cdot 10^6$) культивировали в течение 1 недели (до достижения количества клеток $1 \cdot 10^7$) на 35-миллиметровых чашках, покрытых поли-N-изопропилакриламидом, что позволяло изменять гидрофобность их поверхности в зависимости от температуры. Так, при 37°C поверхность чашек оставалась гидрофобна, вследствие чего клетки прикреплялись к ним и начинали пролиферировать. При 20°C поверхность менялась на гидрофильную и изменяла свою конформацию, что привело к откреплению конфлюэнтного слоя клеток в виде сплошного «клеточного пласта» без применения дополнительных энзиматических ферментов. Далее, «клеточные пласты» были разрезаны хирургическим ножом перед трансплантацией. Диаметр и толщина пластов, культивированных на чашках в течение одной недели, составляли 10 миллиметров и 50 микрометров, соответственно. Через неделю после тиреоидэктомии на коже крысы с левой нижней стороны тела делался надрез и «клеточные пласты» трех различных размеров - 1/4, 1/8 и 1/16 пласта (один пласт одного размера для каждой крысы) имплантировались подкожно.

8-недельные крысы (22 штуки) были разделены на пять групп: контрольная группа (4 шт), группа после тиреоидэктомии (без трансплантации

клеточного пласта – 4 шт), группа с трансплантацией 1/4 части пласта (6 шт), группа с трансплантацией 1/8 части пласта (4 шт), группа с трансплантацией 1/16 пласта (4 шт). Окраску на гематоксилин-эозин и ТТФ-1 проводили через 4 недели после имплантации. Уровень гормонов T_3 и T_4 измеряли после взятия крови из хвостовой вены на шести сроках: перед тиреоидэктомией, через неделю после нее (т.е. сразу перед трансплантацией пластов), спустя 1, 2, 3 и 4 недели. После трансплантации уровни T_3 и T_4 существенно увеличились с течением времени, что говорит о частичном восстановлении функции ЩЖ.

Однако, в то же время многие авторы отмечают, что для трансляции экспериментальных достижений в клиническую практику нужно решить ряд проблем: создать приемлемые (step-by-step) протоколы масштабирования стволовых/прогениторных клеток ЩЖ *ex vivo* и их дифференцировки, формирования тиреосфер и ТФ, контроля их пролиферации и оценки их функциональности, включая способность захватывать I и синтезировать гормоны [58,182]. Кроме того, необходимо автоматизировать и стандартизировать методы создания трехмерных тканеинженерных конструкций. Также требуется подбор органотипических скаффолдов, обеспечивающих формирование в биореакторах или при 3D-биопринтинге тканевых эквивалентов ЩЖ. Открытым остается вопрос об аллотрансплантациях, требующих иммуносупрессивной поддержки в аспекте обеспечения длительного функционирования тканевых эквивалентов ЩЖ в организме реципиента. И, наконец, протоколы биоинженеринга должны исключать/минимизировать риск злокачественной трансформации клеток на этапах *ex vivo*. Тем не менее, клиническая значимость разработки технологии создания персонализированных аутологичных 3D-конструктов ЩЖ не вызывает сомнений, т.к. ксеногенные импланты ЩЖ у человека от новорожденных свиней [10], а также аллогенные импланты ЩЖ, несмотря на усилия по снижению их иммуногенности [172], использование иммуноизолирующих приемов [81] и подсадки в иммунопривилегированные места, оказались короткоживущими - не более 1 месяца.

Таким образом, данные, представленные в настоящем обзоре литературы, свидетельствуют о том, что 3D-биопринтинг является быстро развивающимся научным направлением, не вышедшим пока за рамки лабораторий. Разрабатывается целый спектр методологий биопечати, апробируются и адаптируются разнообразные ее компоненты, в том числе, методы «сборки» клеточных сфероидов и их масштабирования для этапа, предшествующего биопечати и процессы созревания напечатанных имплантатов. Все это обосновывает реальность достижения цели и решения задач настоящей работы.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Методы получения тканевых сфероидов

2.1.1. Метод «висячей капли» с использованием Hanging drop plate

Из флакона, содержащего монослой клеток, удаляли питательную среду. Далее монослой клеток промывали раствором Версена, чтобы удалить следы сыворотки, которые могут содержать ингибиторы трипсина. Затем во флакон добавляли раствор 0.25% Трипсин-ЭДТА (0.3-0.5мл на флакон T75) и инкубировали 3-5мин при комнатной температуре. Далее подсчитывали количество клеток во флаконе, используя камеру Горяева, и разводили суспензию до необходимой концентрации. На следующем этапе по 40 мкл клеточной суспензии вносили в каждую ячейку Hanging drop plate и инкубировали в CO₂ инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Формирование тканевых сфероидов, как правило, начиналось со вторых суток. Смену среды тканевым сфероидам в Hanging drop plate осуществляли каждые 1-2 суток.

Извлечение тканевых сфероидов из Hanging drop plate осуществляли двумя методами: путем центрифугирования в нижний резервуар (96-луночную плашку) при 300g в течение 1-5 минут или путем медленного добавления питательной среды в Hanging drop plate и сбора тканевых сфероидов в висячих каплях в нижнем резервуаре.

2.1.2. Метод получения тканевых сфероидов в агарозных репликах с использованием силиконовых форм

На первом этапе формировали агарозные реплики с силиконовых форм в соответствии с рекомендациями компании-производителя (Microtissues). На втором этапе – формировали в ячейках агарозных реплик тканевые сфероиды. Для этого в каждую из ячеек 12-луночной культуральной плашки помещали

по одной агарозной реплике, добавляли по 2.5 мл питательной среды и оставляли в CO₂ инкубаторе на 20 минут. Затем из углублений в агарозных репликах отбирали питательную среду и вносили по 190 мкл клеточной суспензии (в каждую) и инкубировали в CO₂ инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 60-120 минут). Далее в каждую из ячеек 12-луночной культуральной плашки, содержащей агарозные реплики с клетками, добавляли по 2.5 мл питательной среды. Процесс формирования тканевых сфероидов, как правило, завершался через 3-4 дня. Питательную среду в лунках заменяли каждые два дня. Извлечение тканевых сфероидов из агарозных форм осуществляли путем центрифугирования плашек с перевернутыми агарозными формами в течение одной минуты при 500g.

2.1.3. Метод получения тканевых сфероидов с использованием 96-луночных плашек с малоадгезивной поверхностью

При использовании данного метода по 100 мкл клеточной суспензии вносили в каждую ячейку плашки с малоадгезивным покрытием (Corning, США) и инкубировали в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂), ежедневно меняя среду с помощью микропипеток с отрезанным кончиком. Формирование тканевых сфероидов наблюдали, как правило, к концу первых суток. В зависимости от типа клеток в последующие дни наблюдался либо рост сфероидов, либо их уменьшение.

2.2. Количественная оценка жизнеспособности клеток в тканевых сфероидах

Оценка жизнеспособности клеток в тканевых сфероидах проводилась с использованием реагента CellTox Green Dye (Promega, США). Данный реагент содержит краситель, не способный проникать в живые клетки, однако проникающий в мертвые клетки через поврежденную мембрану. При

связывании красителя с ДНК мертвых клеток наблюдается флуоресценция, интенсивность которой пропорциональна количеству мертвых клеток. Особенностью метода является то, что краситель добавляют к суспензии клеток (в соотношении 1:500) до формирования сфероидов. Сформированные тканевые сфероиды, меченные реагентом CellTox Green Dye, использовали для определения жизнеспособности клеток в течение первых трех дней культивирования. На четвертый день после биофабрикации добавляли реагент CellTox Green Dye к нескольким немеченым тканевым сфероидам, которые также культивировали (но без красителя) в течение трех дней. Эти сфероиды использовали для определения жизнеспособности в течение последующих трех дней культивирования (дни 4-6). На седьмой день после биофабрикации процедуру повторяли, то есть добавляли к нескольким немеченым (предкультивированным в течение 6 дней) сфероидам реагент CellTox Green Dye и использовали их для определения жизнеспособности в течение следующих трех дней культивирования (дни 7-9). На каждый срок культивирования «закладывали» по четыре ячейки со сфероидами. Каждые сутки в одну ячейку с красителем и сфероидами добавляли 4 мкл лизирующего буфера для того, чтобы определить сигнал, соответствующий 0% жизнеспособности клеток в сфероидах. Флуоресцентный сигнал с остальных ячеек регистрировали ежедневно на протяжении 9 дней культивирования с помощью планшетного анализатора Victor X3 (PerkinElmer, США). Полученные данные представляли в виде графика зависимости жизнеспособности тканевых сфероидов от дня культивирования, используя программу GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., США).

Рабочий раствор для окраски приготавливали, добавляя к 5 мл PBS 10мкл раствора «А» из набора и 5 мкл раствора «В». Далее в каждую ячейку (содержащую тканевый сфероид) 96-луночной плашки Corning Spheroid Microplate добавляли по 50-100 мкл рабочего раствора и инкубировали плашку в течение 15 минут при 37°C. Затем оценивали окрашивание клеток под флуоресцентным микроскопом и проводили фотодокументирование. В

качестве негативного контроля в ряде экспериментов использовали мертвые клетки, предварительно проинкубированные с 70% спиртом в течение 30 минут.

2.3. Метод визуализации живых и мертвых клеток в тканевых сфероидах

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

Кальцеин, образующийся при расщеплении Calcein-AM эстеразой живых клеток, обладает зеленой флуоресценцией при $\lambda = 515$ нм. Ядерный краситель PI попадает в ядро только через разрушенные мембраны мертвых клеток и флуоресцирует красным при $\lambda = 617$ нм.

2.4. Подготовка тканевых сфероидов для изучения сканирующей электронной микроскопии

3-4 суточные тканевые сфероиды помещали на электроспиннинговый матрикс и оставляли для прикрепления к нему в течение 6 часов в культуральной среде DMEM при 37°C, 5% CO₂. Далее образцы фиксировали и готовили для анализа по разработанному и описанному ниже протоколу. Кратковременно (не более 1 мин) промывали прикрепленные к матриксу сфероиды (препарат) в теплом (37°C) растворе Хенкса или в среде 199. Далее препарат фиксировали в теплом (комнатная температура) 2.5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на 0.1M натрий-какодилатном буфере в течение 2—3 часов; в ряде случаев фиксацию продолжали в течение суток в холодильнике (5-6°C). Затем препарат отмывали от глутарового альдегида в растворе Хенкса в течение 2-3 минут и завершали фиксацию в 1% растворе четырехоксида осмия (30 минут — 1 час при комнатной температуре), приготовленной на том же буфере, что и глутаральдегидный фиксатор. На

следующем этапе отмывали препараты от осмиевого фиксатора в дистиллированной воде (в двух сменах по 10—15 мин в каждой). Далее проводили поэтапное обезвоживание препаратов путем проводки через ряд водных растворов ацетона восходящей концентрации: 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (по 2-3 минуты в каждом растворе). При выполнении описанных выше процедур тщательно следили за тем, чтобы поверхность препарата не оказалась выше уровня жидкости и не подвергалась высушиванию на воздухе. При перенесении из одного сосуда с жидкостью в другой подложку со сфероидами держали горизонтально, чтобы исключить стекание капли жидкости и «обнажение» поверхности культуры. На следующем этапе клетки высушивали, перенося в предварительно охлажденную камеру Аппарата для высушивания (Hitachi Koki Co., Япония) в соответствии с протоколом компании-производителя. Затем препараты помещали в эксикатор с влагопоглотителем для временного хранения. Непосредственно перед проведением СЭМ препараты покрывали металлом (золотом). Для этого с помощью специального электропроводящего клея их прикрепляли к поверхности алюминиевого столика-держателя и покрывали слоем металла методом термического испарения его в вакууме или путем ионной бомбардировки. На заключительном этапе подготовки образцы (по 6 образцов в серии) помещали на металлический столик с адгезивной поверхностью и напыляли золото, используя аппарат ИВ-3, ЕИКО, Япония. Образцы анализировали, помещая в камеру объектов растрового электронного микроскопа JSM -6510 LV (JEOL, Япония), и подвергая СЭМ при ускоряющем напряжении 10 кВ. Данную методику осуществляли совместно с сотрудниками центра коллективного пользования электронной микроскопии института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской Академии Наук (Борок, Россия).

2.5. Оценка механических свойств тканевых сфероидов методом сжатия

Для оценки механических свойств использовали сфероиды диаметром более 150 мкм, сформированные в плашках с неадгезивным покрытием. Оценка механических свойств осуществляли на микротензиометре MicroSquisher (CellScale, Canada). Общий вид установки представлен на Рисунке 10. Принцип работы устройства основан на измерении прогиба микроинструмента (стержня), закрепленного консольно. Сила, фиксируемая при испытании, рассчитывается по формуле, приведенной в «Руководстве пользователя». В результате испытания регистрируется первичная диаграмма сжатия в координатах «перемещение – сила».



Рисунок 10 - Общий вид микротензиометра MicroSquisher

В состав устройства MicroSquisher (CellScale, Канада) входит контроллер температуры среды, обеспечивающий температуру (37°C) биологического объекта при испытании. До начала экспериментов рабочую камеру заполняли PBS. Далее запускали программу SquisherJoy путем создания нового проекта, задавая сжатие 50% объема от изначального диаметра, время сжатия 20 сек, время выдержки 5сек, время разгрузки 20 сек. Далее выбирали диаметр микроинструмента и приклеивали к нему с помощью оснастки площадку размера, определяемого размерами тестируемого объекта

в соответствии с рекомендациями компании-производителя. В ходе дальнейшей подготовки к испытанию с помощью механической пипетки из 96-ти луночной плашки забирали сфероид и размещали его в испытательный блок на металлический кубик. С помощью панели управления позиционировали пластину точно над тканевым сфероидом. Далее с помощью ручного манипулятора наводили камеру с линзой на сфероид и с помощью передвижения вперед/назад устанавливали ее в фокусе сфероида. Далее в автоматическом режиме выполняли тест на сжатие сфероида. В результате получали диаграммы напряжение-перемещение – Рис. 11.

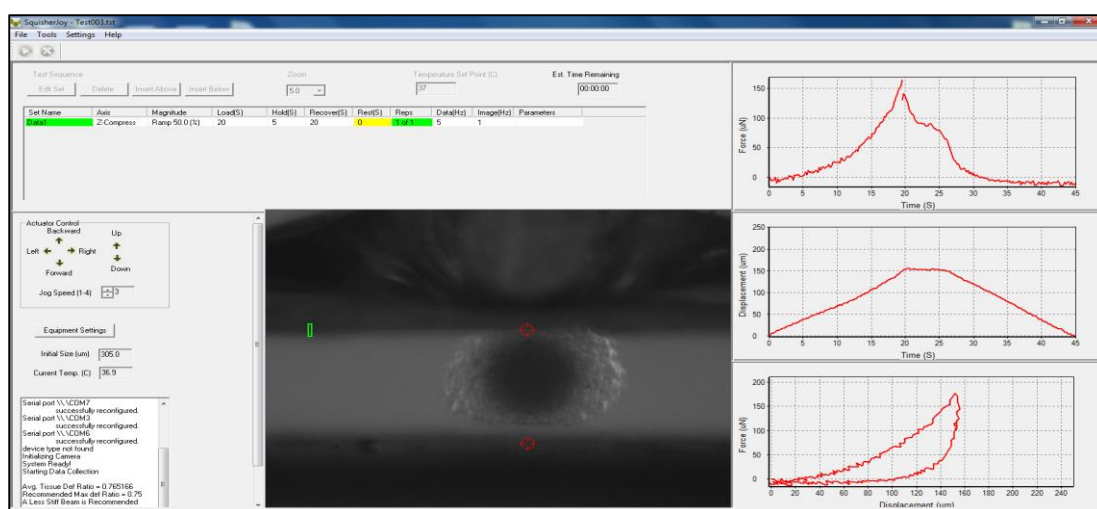


Рисунок 11 - Вид результатов испытаний механических свойств сфероидов

Обработка полученных данных включала расчет модуля Юнга по касательной на участке кривой до деформации 20%.

Напряжение для каждого шага измерения рассчитывали по формуле:

$$\sigma_i = \frac{F_i}{S_0}$$

где F_i - сила на шаге измерения при сжатии; S_0 – изначальная площадь поперечного сечения тканевого сфероидов. Пример наклонной модуля Юнга приведен на Рисунке 12.

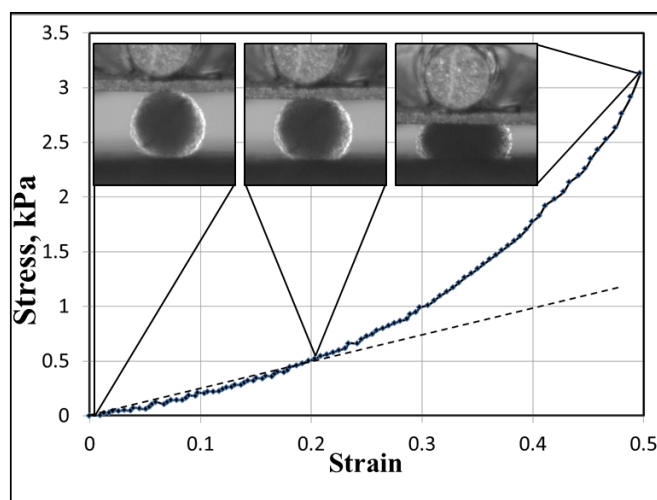


Рисунок 12 - Диаграмма сжатия сфероидов в координатах напряжение - относительная деформация

2.6. Методика исследования распластывания и слияния тканевых сфероидов

2.6.1. Анализ слияния тканевых сфероидов

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, 7, 14, 21 дня культивирования, помещали в ячейки микропланшета таким образом, чтобы сфероиды в каждой паре тесно контактировали друг с другом, и инкубировали в течение 5 дней. Изображения пар сфероидов на этапах культивирования получали при помощи светового микроскопа (Nikon Eclipse Ti-E, Япония), оснащенного цифровой камерой. Размеры сливающихся сфероидов оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ 1.48v (NIH, Bethesda, MD, США).

2.6.1. Анализ распластывания тканевых сфероидов

Анализ распластывания тканевых сфероидов проводили с использованием 24-луночных культуральных планшетов из адгезивного пластика (Corning, кат. # CLS3527). Хондросферы из первичных культур хондроцитов барана после 1-21 дня культивирования (см. выше) помещали на дно лунок и инкубировали в течение 32 часов. Изображения распластывающихся на адгезивной поверхности сфероидов получали путем световой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E, Япония), архивируя с помощью цифровой камеры, через 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 часа инкубации. Площадь распластывания измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ 1.48v (NIH, Bethesda, MD, США).

2.6.2. Методика исследования кинетики слияния тканевых сфероидов на примере эмбриональных эксплантов ЩЖ мыши.

Сформированные сфероиды из ЭЭ ЩЖ мыши 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 с одновременной фотодокументацией. Также оценивали угол слияния в программе ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Полученные данные представляли в виде графика зависимости угла слияния от времени, используя программу GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

2.7. Выделение эмбриональных эксплантов ЩЖ мыши

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок мышей линии CD-1. Для получения эмбрионов самок мышей спаривали с

самцами той же линии и того же возраста. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности. 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 ЩЖ мыши проводили по методу, описанному Pierreux С.Е. с соавторами [45] на сроке беременности 14.5-дней, поскольку на этом сроке начинается эмбриональный фолликулогенез одновременно с васкуляризацией эмбриональной ткани ЩЖ.

Беременную мышь линии CD-1 (срок беременности 14.5 дней) подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков (является допустимым методом эвтаназии). Далее обрабатывали брюшную поверхность 70%-м спиртом и стерильными ножницами, делали надрез кожи и стенки брюшной полости, извлекали матку с эмбрионами и помещали ее в 10-см чашку Петри с раствором Хенкса. Затем вскрывали матку и извлекали все эмбрионы. На следующем этапе отделяли ножницами эмбрионы от плаценты и переносили их в новую 10-см чашку Петри, содержащую раствор Хенкса. У каждого эмбриона удаляли желточный мешок и амнион. Последующие операции осуществляли под стереомикроскопом с подсветкой снизу, увеличивая кратность по мере шагов диссекции. Используя иглы как «нож и вилку», удаляли верхнюю часть головы каждого эмбриона, включая верхнюю челюсть и уши (Рис. 13А). Далее удаляли дополнительный кусок нервной трубки и нижнюю часть эмбриона сразу под конечностями и выше сердца (Рис. 13В). Далее фрагмент эмбриона, содержащий язык и шейный регион, переносили в новую 10-см чашку Петри с раствором Хенкса. На следующем этапе удаляли нервную трубку и ткани за пищеводом/трахеей. Отсекали кусочки ткани по обеим сторонам языка (Рис. 13С). На следующем этапе локализовывали пищевод и трахею в продолжении языка и отсекали язык и ткань по обеим сторонам от пищевода/трахеи (Рис. 13D). Далее удаляли пищевод и тимус (Рис. 13Е). На заключительном этапе визуализировали ЭЭ

ЩЖ с каждой стороны трахеи, вырезали их (Рис. 13F) и переносили в плашку с питательной средой.

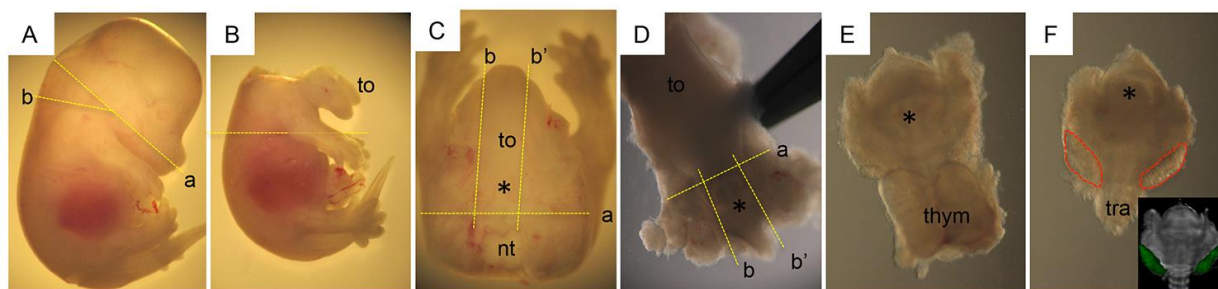


Рисунок 13 - Выделение ЭЭ мыши

2.8. Выделение аллантоиса из 8.5-дневных эмбрионов мыши

Диссекцию АЛЛ мыши проводили на сроке беременности мышей 8,5 дней, так как на этом сроке происходит активное формирование сосудов и АЛЛ содержат значительное количество прогениторных эндотелиальных клеток. Беременную мышь линии CD-1 (срок беременности 8.5 дней) подвергли эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Далее обрабатывали брюшную поверхность 70%-м спиртом, стерильными ножницами делали надрез кожи и стенки брюшной полости и извлекали матку с эмбрионами (Рис. 14А). Матку помещали в 10-см чашку Петри, содержащую раствор Хенкса, и отделяли эмбрионы друг от друга. Далее щипцами вскрывали мышечный слой матки и извлекли децидуальную оболочку, содержащую желточный мешок с эмбрионом (Рис. 14В).

Дальнейшие операции осуществляли под стереомикроскопом с подсветкой снизу, увеличивая кратность по мере шагов диссекции. Децидуальную оболочку переносили в новую 10-см чашку Петри со свежим раствором Хенкса. Затем фиксировали пинцетом децидуальную оболочку вокруг желточного мешка с эмбрионом, а другим пинцетом делали надрез, чтобы освободить желточный мешок (Рис. 14С и 14D). На следующем этапе очищали желточный мешок с эмбрионом от

нежелательных тканей (Рис. 14Е, Рис. 14F). Затем пинцетом вскрывали желточный мешок по бокам, чтобы увидеть эмбрион (Рис. 14G). Далее пинцетом отделяли АЛЛ от места его прикрепления на заднем конце эмбриона, как показано красной пунктирной линией (Рис. 14H) и переносили выделенный АЛЛ в плашку, содержащую питательную среду. Обучение этой методике проходило в лаборатории клеточной биологии de Duvе Institute UCLouvain (Брюссель, Бельгия) под руководством профессора Christophe Pierreux.

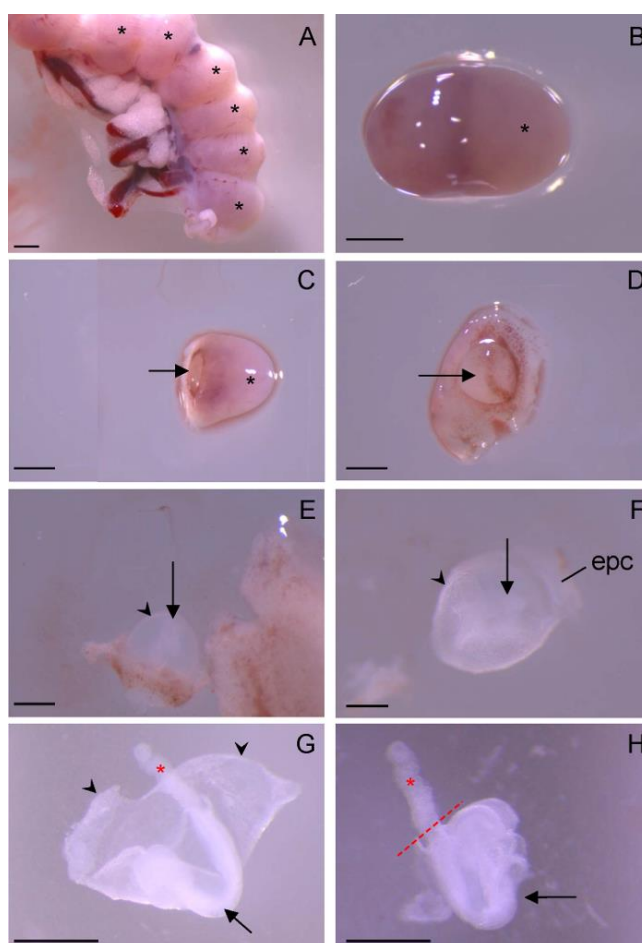


Рисунок 14 - Этапы выделения аллантаоиса мыши

2.9. Получение тканевых сфероидов из эмбриональных эксплантов ЩЖ и аллантаоиса мыши линии CD-1 методом «висячей капли» и их подготовка к биопечати

Выделенные ЭЭ ЩЖ и АЛЛ несколько раз промывали стерильной культуральной средой и помещали в капли объемом 20 мкл на перевернутую

крышку чашки Петри. В каждой капле находился один ЭЭ ЩЖ или один АЛЛ. На дно чашки Петри вносили небольшое количество культуральной среды, чтобы уменьшить испарение жидкости из капель. Далее переворачивали крышку чашки Петри, содержащую капли с ЭЭ ЩЖ или АЛЛ, и закрывали ею чашку Петри и помещали в CO₂ инкубатор (37°C и 5% CO₂) на 18-24 часов. За это время в каплях формировались сфероиды из ЭЭ ЩЖ или АЛЛ.

2.10. Выделение коллагена из крысиных хвостов и приготовление гидрогеля на его основе

Коллаген из крысиных хвостов I типа выделяли по методу, описанному Pulvertaft с соавторами [148]. Установленная концентрация коллагена в растворе составляла 3.12 мг/мл. Для приготовления коллагенового геля 890µl раствора коллагена перемешивали с 60µl одномолярного гидроксида натрия, 250µl 7,5% бикарбоната натрия и 300µl PBS.

2.11. Методика 3D-биопринтинга конструкторов ЩЖ из эмбриональных эксплантов ЩЖ в коллагеновом геле

При создании конструктора ЩЖ мыши в коллагене, нанесенном на прозрачную мембрану из политетрафторэтилена (ПТФЭ), использовали мультифункциональный биопринтер Fabion [4], оснащенный специальной форсункой с устройством, позволяющим распределять по одному сфероиду в пространстве одновременно (производство 3Д Биопринтинг Солюшенс, Россия), (Рис. 15). Данное устройство включает в себя поршневой насос, микрофлюидный чип, поршень для загрузки сфероидов (d), захватывающий шприц (e), трубку для размещения сфероидов (f) с желобком для отвода жидкости (g) (Рис. 15). Шприц, наполненный суспензией с тканевыми сфероидными, устанавливали в поршневой насос, соединенный с печатающей головкой. При попадании сфероидов в печатающую головку, автоматизированная система запускает поршневой насос и затем отключает его при контакте тканевых сфероидов с захватывающим шприцом. Трубка,

предназначенная для перемещения сфероидов, двигается вертикально вверх, перекрывая отверстие для отвода жидкости и освобождая канал для доставки сфероидов. Захватывающий шприц перемещается горизонтально вниз, осуществляя осаждение сфероидов. Затем поршень для загрузки сфероидов одновременно перемещает сфериды под отверстие трубки для их размещения. В трубке поршень перемещает сфериды вертикально вниз до контакта с поверхностью печати и затем возвращается в исходное положение, завершая, тем самым, один цикл биопечати. В трубке имеется желобок немного выше основания, служащий каналом для отвода жидкости для снижения ее количества вокруг тканевых сфероидов. Вакуумный насос удаляет жидкость из суспензии, после чего сфериды помещаются в заданное место при помощи помпового механизма.

Платформа для печати двигалась в координатах XY с шагом в 5 мкм с дополнительной возможностью нагрева. Печатающая головка была простерилизована с использованием УФ-излучения и водного раствора этанола. Для печати коллагеном была разработана система охлаждения/нагрева шприцов, состоящая из алюминиевой основы с контролируемым нагревом (диапазон нагрева от комнатной температуры до 200 °C с шагом нагрева 0.1 °C) и системой охлаждения (-4 °C и ниже с шагом охлаждения 0.1 °C).

Температуру шприца поддерживали при помощи охлаждающей системы, основанной на модуле Пелетье. Данный модуль позволяет осуществлять охлаждение путем переноса тепла при рециркуляции жидкости по спирально закрученной бронзовой трубке, опоясывающей шприц. Охлажденный шприц поддерживал температуру коллагена при +4 °C. При помещении на нагретую пластину (28 °C) коллаген полимеризовался, сохраняя напечатанную форму.

После печати конструкты ЩЖ инкубировали в течение 4 суток в коллагене, распределенном на поверхности прозрачной мембраны из ПТФЭ. Для снабжения ткани кислородом питательную среду наливали до уровня

ПТФЭ мембраны, избегая погружения конструкторов целиком. После 4 суток культивирования проводили иммуногистохимическое окрашивание и/или имплантацию образцов. Световую микроскопию осуществляли на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E, снабженном камерой Nikon DS-Qi2 (Япония). Полученные изображения были обработаны при помощи программного обеспечения NIS-Elements D Research версии 4.0. Для изменения яркости, контрастности и размера изображений использовали программу Photoshop CS5 (Adobe).

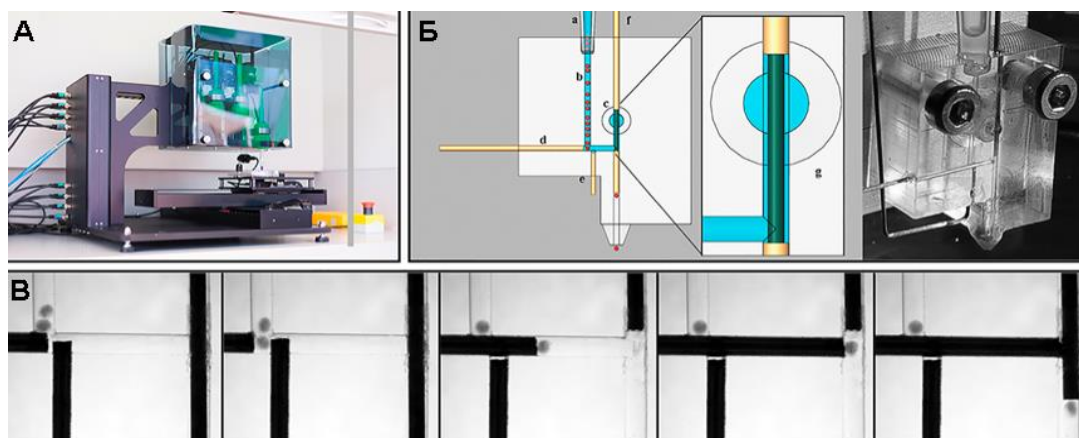


Рисунок 15 - Схема турникетной системы печати одиночными тканевыми сфероидами биопринтера Fabion. А - общий вид биопринтера; Б - турникетная система, место загрузки сфероидов (а), канал со сфероидами, выстроенными в линию друг за другом (b); точка извлечения излишков культуральной среды (с); клапан для загрузки сфероидов (d), захватывающий клапан (е), выталкивающий клапан (f), углубление в клапане для удаления культуральной среды (g). В – последовательное изображение стадий подачи одиночного тканевого сфероида при помощи турникетной системы в ходе биопечати

2.12. Методика иммунофлуоресцентного анализа ТИК ЩЖ, полученных путем 3D-биопринтинга

После инкубирования часть напечатанных образцов фиксировали 4% раствором параформальдегида в натрий-фосфатном буфере в течение 2 часов при температуре +4 °С. Затем образцы помещали в раствор 20 %

сахарозы/натрий-фосфатный буфер, после чего погружали в натрий-фосфатный буфер, содержащий 15% сахарозы и 7,5 % желатина. Далее осуществляли иммуногистохимическую реакцию с требуемыми антителами. Иммунофлуоресценцию тонких гистологических срезов оценивали в соответствии с рекомендациями при помощи инвертированных микроскопов Zeiss Cell Axiovert 200 и Zeiss Cell Observer Spinning Disk (COSD)[168]. Были использованы моноклональные мышиные антитела к Е-кадгерину (рабочее разведение 1:250) (BD Biosciences, США), крысиные антитела к PECAM (1:100) (BD Biosciences, США), моноклональные мышиные антитела к эзрину (1:300), (Thermo Fisher Scientific, США) кроличьи антитела к каспазе-3а (1:200), (Cell Signaling, США) антитела кролика к pHH3 (1:100), (Cell Signaling, США), моноклональные антитела к TTF-1 (1:200) (Dako, Дания). Клеточные ядра окрашивали красителем Hoechst (Sigma-Aldrich, США), разведенном в натрий-фосфатном буфере, в процессе инкубации с вторичными антителами.

2.13. Методика *in vivo* оценки функциональной активности ТИК ЩЖ, полученных путем 3D-биопринтинга из эмбриональных эксплантов ЩЖ, аллантаиса и коллагена

Исследование проведено на инбредных мышах- самцах линии CD-1 (n=32) весом 38-50 г (питомник лабораторных животных «Пушино» - филиал ФГБУН Институт Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Для полной инактивации функции ЩЖ части животным (n=11) за 4 месяца до имплантации было введено внутривентриально $150\mu\text{Ci } I^{131}$. Данный этап работы был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Далее проводилась передержка животных в течение четырех месяцев. Доказательством полной

инактивации служил нулевой (неопределяемый) уровень гормона тироксина T_4 в сыворотке крови этих животных.

Затем животных разделили на 3 группы:

I группа (контрольная), $n=6$ – этим животным была выполнена имплантация коллагенового геля (подложки для клеток ЩЖ) под капсулу почки; через 4 недели животных вывели из эксперимента; почки с имплантатами были зафиксированы в 10% формалине, как этап для последующего гистологического анализа.

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 конструкторы ЩЖ под капсулу почки.

Конструкторы ЩЖ имели размеры = 1,5x1,5x1,0 мм. Этапы имплантации конструкторов под капсулу почки мышей представлены ниже.

Оперативное вмешательство у животных проводили под общим наркозом (внутрибрюшинное введение 0.20-0.25 мл смеси кетамина (5% р-р) и дроперидола (2.5 мг/мл) в соотношении 1:1). 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.

После обработки операционной зоны антисептиком через разрез стенки брюшной полости слева вывихивали почку мыши в операционное поле. Тонким пинцетом приподнимали капсулу почки и острой иглой делали в ней надрез длиной примерно 1мм. Далее тупой иглой проталкивали под капсулу почки конструктор ЩЖ и отпускали капсулу. После операции кожную рану обработали медицинским клеем БФ-6 (ЗАО «Вертекс», Россия). На этапах эксперимента оценивали вес и температуру тела животных в динамике до и после операции. Температуру тела мышей измеряли в паховых складках с помощью термометра «Testo 106» (Германия). Также был произведен 4-х

кратный забор крови у контрольных и опытных мышей (II-III гр.) для определения сывороточных уровней тироксина. Забор крови у мышей осуществляли из хвостовой вены после ампутации кончика хвоста, предварительно обработав эту зону антисептиком. Во избежание свертывания крови во время ее забора наконечники пипетки обрабатывали раствором гепарина. После каждого забора крови рану обрабатывали перекисью водорода. Количество взятой за одну процедуру крови у каждого животного составляло 300 мкл. Сыворотки были получены путем центрифугирования крови при 3000 об./мин. в течение 20 минут. Через 2 месяца после операции животных II и III групп терминировали с применением эфирного наркоза.

2.14. Методика выделения и культивирования тиреоцитов, тиреоидных фолликулов и микроорганов ЩЖ человека

Фрагмент здоровой ткани ЩЖ, полученный после тиреоидэктомии по поводу рака ЩЖ, в условиях операционной помещали в стерильную пластиковую пробирку (Corning, США) с 30 мл среды для забора материала (среда RPMI 1640, 100ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия)) и передавали в лабораторию, где все дальнейшие манипуляции с биоматериалом проводили в стерильных условиях ламинарного бокса.

МО и ТФ и ТЦ из ткани ЩЖ выделяли путем ее механической дезагрегации. Для этого фрагмент полученной ткани (~300-500 мг) ополаскивали в 20 мл холодного (+4°C) буферного раствора DPBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) (ПанЭко, Россия), содержащего 100ед/мл пенициллина, 100мг/мл стрептомицина, а затем переносили в ч. Петри с 10 мл холодного буферного раствора DPBS и на льду освобождали от участков капсулы, фиброза и электрокоагулированной ткани, и далее измельчали глазными ножницами на фрагменты размером до 0,2–1,0 мм. Полученную суспензию пропускали сначала через стальное сито с порами размером 420 мкм (Sigma, США), далее – через нейлоновое сито с диаметром пор 40 мкм (BD Falcon, США).

Фракцию МО (фракция I) размером более 420 мкм собирали с сита, смывая буферным раствором DPBS в чашку Петри, затем переносили в центрифужные пробирки. Фракцию II с сита с порами 40 мкм собирали аналогичным образом. Микроскопически эта фракция была представлена в основном ТФ. Собранные в пробирки фракции дважды отмывали от дебриса в холодном буферном растворе DPBS осаждением, удаляя надосады.

Культуру ТЦ (фракция III) получали путем трехкратной ферментативной дезагрегации ткани после ее механического измельчения. Для этого к осадку фрагментов ткани ЩЖ добавляли теплый (37°) раствор коллагеназы I типа (200ед/мл) и диспазы II типа (1мг/мл) (Sigma, США) в DPBS и проводили инкубацию в термостате (37°C, 40 минут) при постоянном встряхивании на шейкере со скоростью 120 об/мин (Elmi, Латвия). После каждого этапа ферментативной обработки давали осесть крупным фрагментам ткани, супернатант переносили в центрифужные пробирки с 10-кратным объемом холодной среды для отмывки (RPMI 1640, 5% FBS, 2мМ L-глутамин, 100ед/мл пенициллина и 100мг/мл стрептомицина) и ресуспендировали. Полученные порции суспензии выделенных клеток объединяли, дважды отмывали с помощью центрифугирования при +10°C в течение 8 минут при 200g, затем пропускали через сита с размером пор 100 мкм и 40 мкм. Фракцию III, представленную в основном одиночными клетками, собирали в пробирку с полной ростовой средой (ПРС) состава DMEM-F12 (в соотношении 1:1), 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицин, 10% пулированного ЛТ доноров и освобожденной от фибрина.

Культивирование МО, ТФ и ТЦ проводили в трансвеллах (Costar, США) в геле на основе ЛТ доноров на границе раздела воздух-гель, по принципу, описанному Toda S. et al, 2011г. [175] в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂).

При формировании культуральной системы отцентрифугированные осадки ТФ, МО или ТЦ ресуспендировали в 1 мл ПРС. Полученную суспензию немедленно переносили на ПТФЭ-мембрану (диаметр пор 0,4 мкм) вставки-фильтра трансвелла, покрытую смесью бычьего коллагена I и III типов. После

завершения спонтанного процесса формирования тонкого слоя геля на мембране (через 15-20 мин), в нижнюю камеру на дно лунки добавляли 1 мл ПРС с 10 % ЛТ, предварительно освобожденной от фибрина.

Для получения ПРС с 10 % ЛТ без фибрина, в ростовую среду DMEM-F12, содержащую 2 mM L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина, вносили 10% пулированного ЛТ, мягко перемешивали и переносили в термостат на 1-2 часа до формирования плотного сгустка. Далее для стабилизации сгустка пробирку с ПРС помещали в холодильник на ночь (+4°C). По истечении указанного времени пробирку встряхивали, образовавшийся фибриновый сгусток отделяли от среды фильтрованием через нейлоновое сито (диаметр пор 40мкм) и миллипоровый фильтр (диаметр пор 0,22мкм, Millipore, США).

Каждые 5-7 суток в верхнюю камеру трансвелла наслаивали 1 мл свежеприготовленной ПРС с 10% ЛТ для формирования дополнительного слоя геля, а в нижней камере ПРС полностью заменяли на свежую порцию, освобожденную от фибрина.

Кроме этого, 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 (МТТ-тест и прижизненное окрашивание с помощью флуоресцентного красителя Live-Dead (Molecular Probes, США) и для приготовления гистологических препаратов.

В отдельной серии экспериментов через 2 месяца культивирования ТФ изготавливали парафиновые блоки, и далее – гистологические препараты.

Исследование наличия Ki-67 позитивных клеток и экспрессию ТГ и NIS в ТФ/МО/ТЦ оценивали с помощью АТ и системы визуализации EnVision™ FLEX (Dako Inc., Дания), в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Оценку доли пролиферирующих ТЦ производили с помощью АТ к Ki-67 (Dako, США), NIS-позитивных клеток (способных захватывать I из внешней среды) – с помощью антител к NIS (GeneTex, США), ТГ – с

помощью АТ к ТГ (Dako, США), жизнеспособность – с помощью МТТ-теста по стандартной методике и набора «Live-Dead».

Полученные результаты были охарактеризованы с применением базовых статистических показателей – среднего значения, стандартного отклонения (σ), ошибки среднего арифметического (σ/\sqrt{n}). Статистическая обработка производилась в программе Microsoft Office Excel 2010. Для визуализации обзорных гистологических снимков применили ручное сведение микрофотографий в программе Adobe Photoshop 7.0. Для линейных измерений фолликулов на микрофотографиях использовали программы NIS-Elements Basic Research 4.50 и ToupTek ToupView 3.7.

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

2.15. Оборудование для 3D-биопринтинга – биопринтер Fabion

В настоящей работе для 3D-биопринтинга конструкторов ЩЖ использован биопринтер Fabion производства лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс». Сконструированный 3D-биопринтер Fabion является результатом труда инженеров, программистов и биологов лаборатории.

При разработке данного устройства мною был осуществлен подбор и тестирование дозаторов, позволяющих работать с гелями с разными типами полимеризации, а также системы управления трехмерной печатью (лазерное позиционирование носиков форсунок).

Сконструированная рабочая модель (прототип) биопринтера представляет собой программно-аппаратный комплекс, предназначенный для трехмерной печати тканевых и органных конструкторов (Рис. 16).

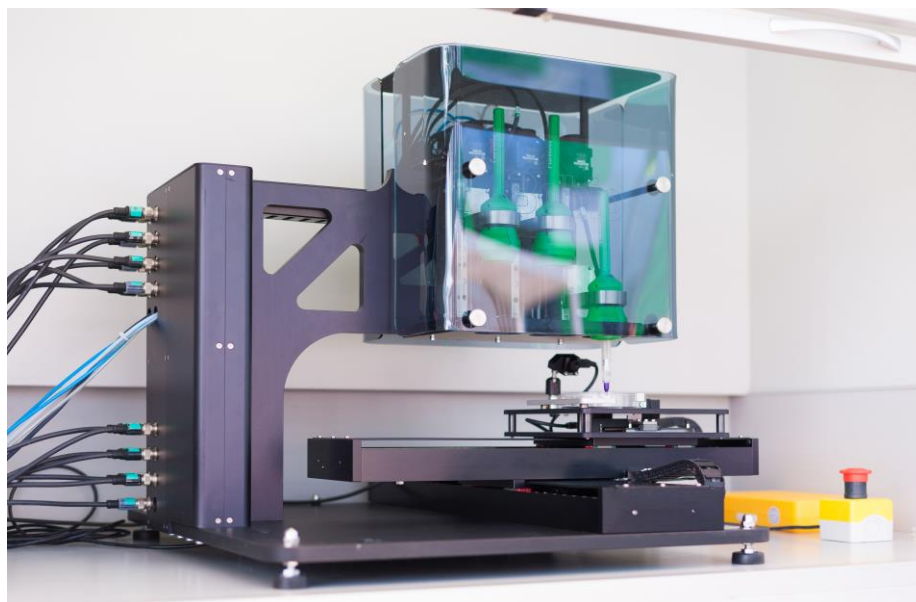


Рисунок 16 - Биопринтер Fabion

В состав этого аппаратного комплекса входит:

1. Система печати и позиционирования носиков дозаторов по осям x, y, z, которая включает:
 - 2 дозатора Fishman (США),
 - дозатор Preeflow (Япония) для печати двухкомпонентных гелей,
 - источник УФ-облучения (Panasonic, Япония)
 - распыляющий клапан,
 - систему лазерного позиционирования Dietz (Германия),
 - платформу для печати (с зажимами для ч. Петри);
2. Система управления печатью, в которую входят контроллеры дозирующего/распыляющего клапанов (Nordson, Германия) и источника УФ-облучения, а также ACS Motion для отработки управляющих программ (G-код);
3. Программное обеспечение Sprut Cam для создания управляющих программ;
4. Система охлаждения шприца (до 1°C);
5. Система подогрева ч. Петри (до 50°C);
6. Система контроля за печатью, в которую входит цифровая видеокамера.

Описанное устройство способно печатать конструкты с размерами по осям x-y-z – 4,5 x 3,5 x 15 см с точностью позиционирования 5,0 мкм, используя гидрогели с диапазоном вязкости 0,001 – 800 Па с разными типами полимеризации (термочувствительной, фоточувствительной, pH-чувствительной), с минимальным размером биологических объектов (сфероидов, микроорганизмов) – 0,1 мм, с максимальной скоростью диспенсирования – 0,771 мс/с.

Принтер помещен в ламинарный шкаф, что обеспечивает стерильность при биопечати.

2.16. Основные материалы, используемые в работе

В настоящей работе были использованы следующие материалы:

1. Гидрогели:

- 1.1. На основе коллагена I типа для биопечати подложки конструкта щитовидной железы человека – производство ООО «Имтэк», Россия.
- 1.2. На основе желатина производства Merck, Германия.
- 1.3. На основе Pluronic F127 производства Merck, Германия.

2. Среды и ростовые добавки:

- 2.1. Для культивирования клеток и сфероидов использовалась среда DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium производства ПанЭко, Россия.
- 2.2. Для обогащения культуральной среды ростовыми факторами использовалась эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) производства – Thermo Fisher Scientific, США.
- 2.3. Для поддержания постоянного pH в культуральной среде использовали 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (буфер) – HEPES производства ПанЭко, Россия.

- 2.4. Для отмывки клеток от среды использовали DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор производства ПанЭко, Россия.
- 2.5. Для культивирования первичных клеточных культур использовали культуральную среду RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) производства ПанЭко, Россия.
- 2.6. Для передержки во время проведения диссекции эмбриональных эксплантов щитовидной железы и аллантаисов использовали культуральную среду EMEM (minimum essential media) производства ПанЭко, Россия.
- 2.7. Для длительного культивирования эксплантов щитовидной железы, аллантаисов и клеточных культур использовали полную ростовую среду, которая включала в себя DMEM, эмбриональную телячью сыворотку, глутамин (ПанЭко, Россия), антибиотики стрептомицин и пенициллин (ПанЭко, Россия).
- 2.8. В качестве культуральной добавки, стандартизированной по функциональной активности и пригодной для культивирования стволовых и дифференцированных клеток был использован лизат тромбоцитов человека, полученный по разработанной технологии в МНИОИ им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ.

3. Антитела для иммуногистохимических методов.

Используемые в настоящей работе антитела и маркеры сведены в Табл. 7.

Таблица 7 – Маркеры и антитела, использованные в гистологических и иммуногистохимических исследованиях

Название маркера/антител	Функция маркера/антигена
CellTox Green Dye	Оценка доли мертвых (флуоресцирующих) клеток: краситель проникает только через поврежденную мембрану и связывается с ДНК.

Cellstain double staining Kit: -кальцеин-ацетоксиметил – пропидия йодид	Визуализация живых и мертвых клеток в сфероидах Предшественник флуоресцентного красителя в живых клетках, который подвергается расщеплению внутриклеточными эстеразами с образованием красителя кальцеина, флуоресцирующего в живых клетках. Ядерный краситель – пропидия йодид, проникает в клетки только через поврежденные мембраны и флуоресцирует, таким образом, в мертвых клетках.
Мышиные антитела к Е-кадгерину	Е-кадгерин – маркер эпителиальных клеток
Крысиные антитела к PECAM	PECAM – маркер эндотелиальных клеток
Моноклональные мышиные антитела к эзрину	Эзрин - маркер микроворсинок апикального края эпителия
Кроличьи антитела к каспазе-3а	Данные антитела использовались как маркер апоптоза
Кроличьи антитела к рННЗ	Фосфогистон НЗ – маркер пролиферации клеток, участвует в конденсации и деконденсации хроматина.
Моноклональные антитела к тиреоидному фактору транскрипции-1 (ТТФ-1)	ТТФ-1 – маркер тиреоцитов – ядерный белок, активатор транскрипции из семейства NKx2 ДНК-связанных белков.
Краситель Hoechst	Маркер живых клеток; флуоресцентный краситель ДНК, специфически окрашивающий пару тимин-аденин.

Флуоресцентный краситель Live-Dead	Смесь флуоресцентного красителя SYTO 9 (маркер живых клеток) и флуоресцентного пропидия йодида – (маркер мертвых клеток).
Антитела к Ki-67	Ki-67 - ядерный маркер пролиферативной активности клеток.
Антитела к натрий-йод симпортеру (NIS)	NIS - трансмембранный белок, маркер способности поглощать йод фолликулярными клетками щитовидной железы
Антитела к тиреоглобулину	Тиреоглобулин – продукт фолликулярных клеток щитовидной железы, предшественных тиреоидных гормонов – накапливается в фолликулах в виде коллоида.
Антитела к белковому транскрипционному фактору (Octamer-binding transcription factor 4 – Oct 3/4)	Oct 3/4 – маркер принадлежности клеток к стволовому/прогениторному компартменту
4',6-диамиидно-2-фенилиндол (DAPI)	Флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот

2.17. Измерение диаметра и округлости сфероидов

Диаметры и округлости сфероидов измеряли с помощью программы Image J 1.48v (НИН, Bethesda, MD, США). Для измерения округлостей использовалась формула: $4 \cdot \text{area} / (\pi \cdot \text{major axis}^2)$, 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.

2.18. Статическая обработка результатов экспериментов

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

3.1. Разработка методики 3D-биопечати различными гидрогелями и тканевыми сфероидами 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 (Рис.17).

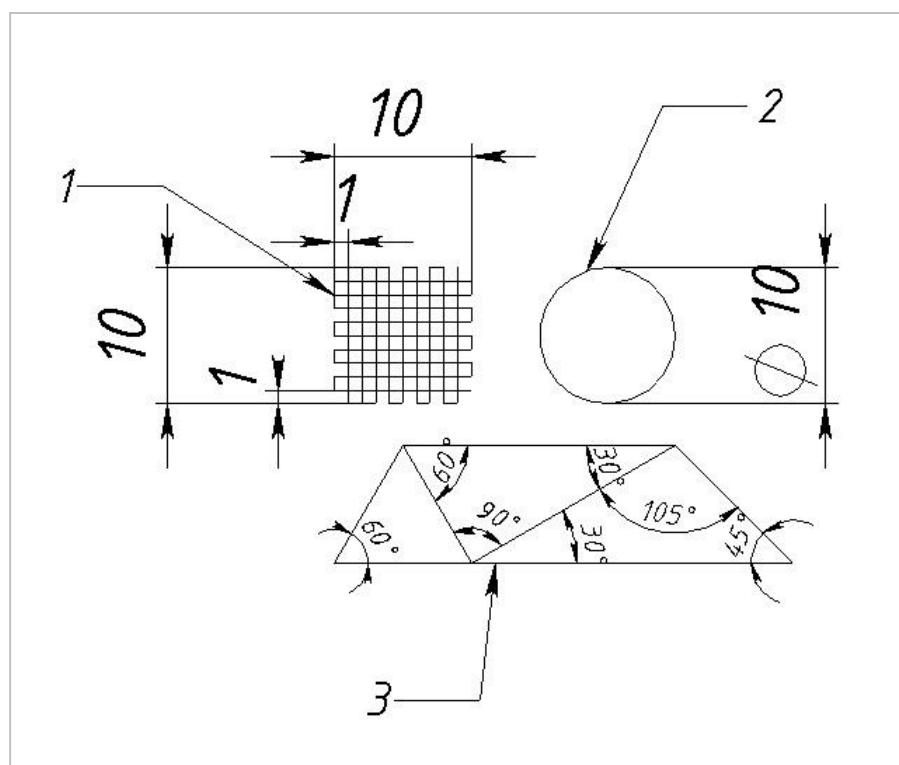


Рисунок 17 - Схема элементов тестовой структуры: 1) решетка размерами 10x10 мм с шагом 1 мм между соседними линиями и высотой в 3 слоя; 2) цилиндр диаметром 10 мм высотой в 3 слоя; 3) многоугольник, объединяющий линии под наклоном 30°, 45°, 60° высотой в 3 слоя

Данная тестовая структура создана в ПО SOLIDWORKS 2015 (Франция, Dassault Systemes). При создании управляющей программы для системы 3D-биопечати использовался ПО SprutCAM 11 (РФ, ООО "СПРУТ-Технология").

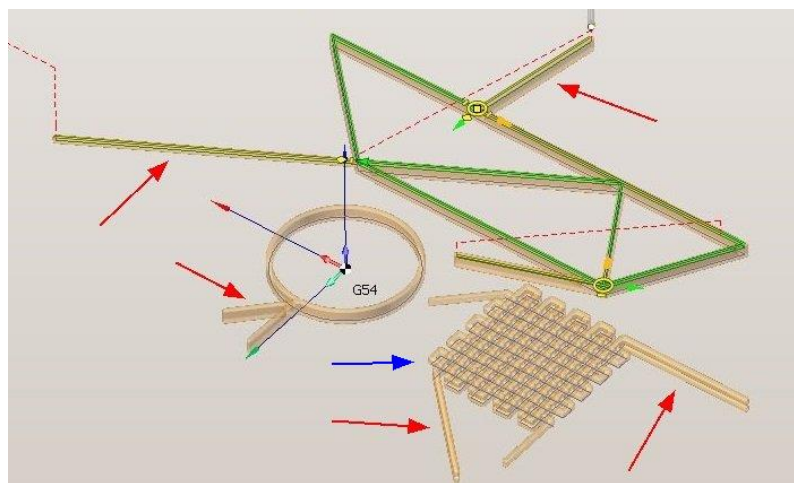


Рисунок 18 - 3D-модель, сгенерированная в программе SprutCAM 11

Для сцепления слоев при печати высота каждого слоя тестовой структуры должна составлять 70-80% от внутреннего диаметра иглы (в данном случае высота слоя составляет 0,3 мм). Размер ячейки в решетке (отмечена синей стрелкой на Рисунке 18) при заданном диаметре иглы составляет 0,5x0,5 мм. Толщина линий при данном диаметре иглы должна составлять 0,4 мм. Дополнительные элементы модели, отмеченные красными стрелками на Рисунке 18, необходимы для установления равномерной подачи гидрогеля при печати. После печати тестовой структуры мы анализировали ее геометрические размеры и четкость печати. По отклонению измеренных значений от заданных в программе оценивалась точность печати.

3.1.1. Апробация 3D-биопечати гидрогелем Pluronic F127.

Материал Pluronic F-127 (Германия, Merck KGaA) относится к полимерам искусственного происхождения. При понижении температуры

вязкость гидрогеля на основе Pluronic уменьшается, а при ее повышении - увеличивается.

При печати раствором Pluronic F-127 в PBS в концентрации 12,5% температура гидрогеля в шприце поддерживалась постоянной и составляла 25°C. Температура поверхности чашки Петри, на которую выдавливался гидрогель, также поддерживалась постоянной и составляла 37°C. Общий вид напечатанной структуры на основе гидрогеля Pluronic F-127 представлен на Рисунке 19.

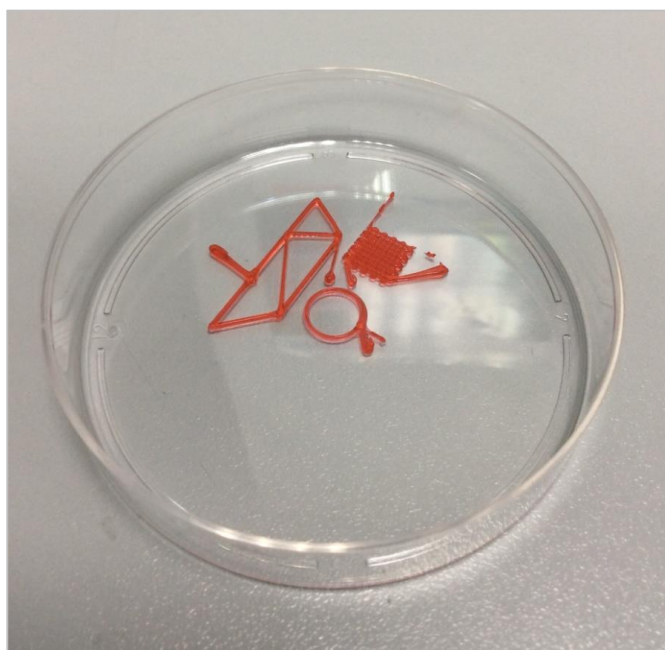


Рисунок 19 - Общий вид напечатанной структуры на основе гидрогеля Pluronic F-127

По завершении 3D-биопечати проанализировали ее результаты для всех фрагментов тестовой конструкции. Для примера представлены модель и микрофотография тестовой решетки, напечатанной гидрогелем Pluronic F127 (Рис. 20, Рис. 21).

Полученные данные о качестве геометрических характеристик тестовой 3D-модели, напечатанной гидрогелем Pluronic F127, представлены в Табл. 8 и Табл. 9.

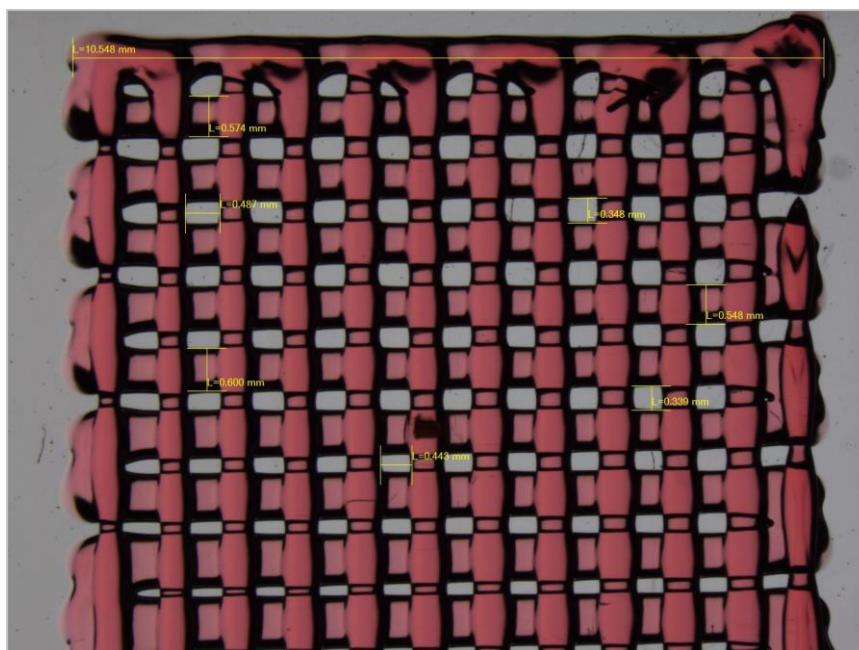


Рисунок 20 - Модель решетки, напечатанной гидрогелем Pluronic F127 x 0,75



Рисунок 21 - Микрофотография решетки, напечатанной гидрогелем Pluronic F127, x4

Таблица 8 - Характеристики тестовой 3D-модели, напечатанной гидрогелем Pluronic F127

Параметр	Решетка	Цилиндр	Многоугольник	Параметры 3D-модели
Толщина линии (первый слой)	0,47 мм	0,65 мм	0,73 мм	0,4 мм
Толщина линии (остальные слои)	0,47 м	0,65 мм	0,73 мм	0,4 мм
Диаметр цилиндра	-	10,26 мм	-	10 мм
Размеры решетки	9,43 мм	-	-	10 мм
Площадь решетки	88,92 мм ²	-	-	100 мм ²
Размеры ячейки в решетке	0,57 мм	-	-	0,5 мм
Площадь ячейки в решетке	0,33 мм ²	-	-	0,25 мм ²
Угол 30°		-	28°	30°
Угол 45°		-	45°	45°
Угол 90°		-	92°	90°

Таблица 9 - Отношение заданных размеров к действительным 3D-модели, напечатанной гидрогелем Pluronic F127

Параметр	Отношение размеров для решетки, в %	Отношение размеров для цилиндра, в %	Отношение размеров к для многоугольника, в %
Толщина линии (первый слой)	137%	208%	223%
Толщина линии (остальные слои)	83%	113%	127%
Диаметр цилиндра	-	100%	-
Размеры решетки	97%	-	-
Площадь решетки	97%	-	-
Размеры ячейки в решетке	103%	-	-
Площадь ячейки в решетке	105%	-	-
Угол 30°	-	-	106%
Угол 45°	-	-	111%
Угол 90°	-	-	103%

В соответствии с представленными данными можно сделать заключение, что гидрогель имел равномерную структуру. Линии, составляющие первый слой, имели большую толщину по сравнению с линиями последующих слоев. Это связано с охлаждением материала по завершению печати, при котором, вероятно, снижается вязкость гидрогеля и напечатанный слой деформируется. Также первый слой при печати деформировался под давлением со стороны последующих слоев. Кроме того, наблюдалась неравномерность толщины линии при печати окружностей, при том, что средний диаметр окружности выдерживался с высокой точностью. Точность печати углов также была сравнительно высока.

В целом же свойства гидрогеля Pluronic F127 позволяют воспроизводить достаточно сложные геометрические формы с точностью порядка 10%. При этом первый слой гидрогеля с большой вероятностью будет деформирован.

3.1.2. Апробация 3D-биопечати гидрогелем на основе желатина

Желатин представляет собой продукт денатурации коллагена животного происхождения. При понижении температуры вязкость гидрогеля увеличивается, а при повышении температуры - уменьшается. Печать производилась раствором желатина (Германия, Merck KGaA) в PBS в концентрации 12,5%. При печати температура гидрогеля в шприце поддерживалась постоянной и составляла 20°C. Температура поверхности чашки Петри, на которую выдавливался гидрогель, также поддерживалась постоянной и составляла 25°C. Различие в скорости печати обусловлено необходимостью воспроизвести сравнительно точную геометрию решетки. Микрофотографии решетки и цилиндра, напечатанных гидрогелем на основе желатина представлены на Рисунке 22 и Рисунке 23.

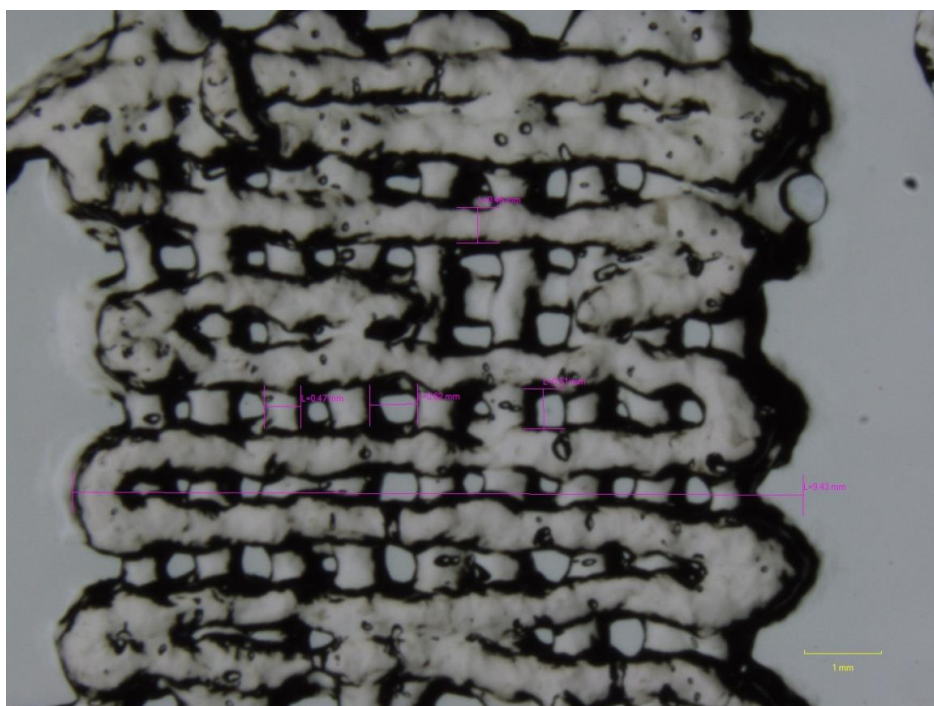


Рисунок 22 - Микрофотография решетки, напечатанной гидрогелем на основе желатина, $\times 0,75$

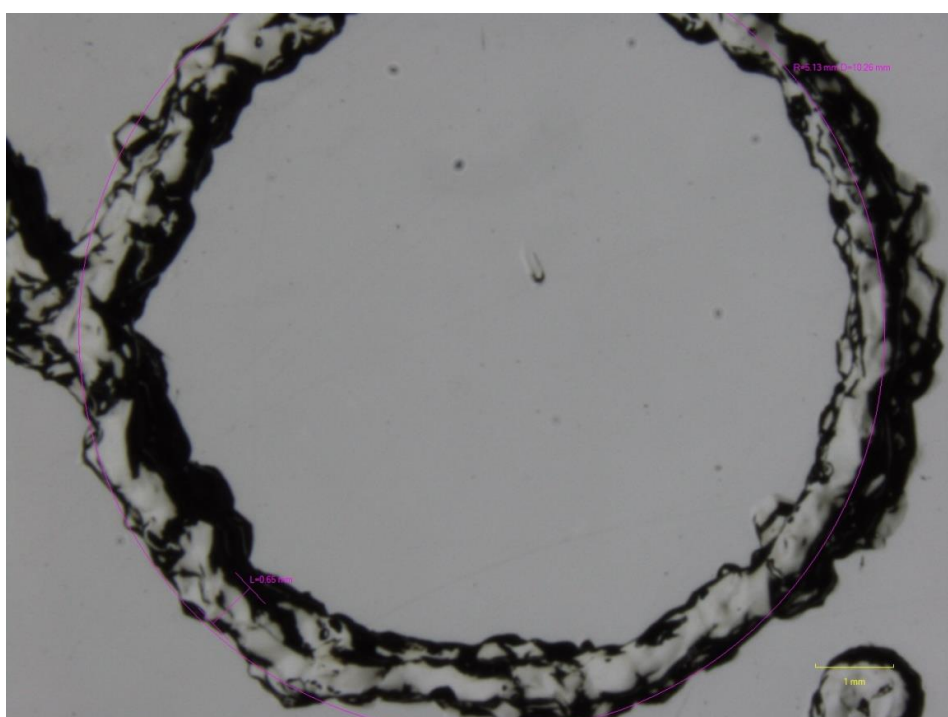


Рисунок 23 - Микрофотография цилиндра, напечатанного гидрогелем на основе желатина, $\times 0,75$

Все геометрические характеристики компонентов тестовой 3D-модели, напечатанной гидрогелем на основе желатина, представлены в Табл.10 и Табл. 11.

Таблица 10. Характеристики тестовой 3D-модели, напечатанной гидрогелем на основе желатина

Параметр	Решетка	Цилиндр	Многоугольник	Параметры 3D-модели
Толщина линии (первый слой)	0,47 мм	0,65 мм	0,73 мм	0,4 мм
Толщина линии (остальные слои)	0,47 м	0,65 мм	0,73 мм	0,4 мм
Диаметр цилиндра	-	10,26 мм	-	10 мм
Размеры решетки	9,43 мм	-	-	10 мм
Площадь решетки	88,92 мм ²	-	-	100 мм ²
Размеры ячейки в решетке	0,57 мм	-	-	0,5 мм
Площадь ячейки в решетке	0,33 мм ²	-	-	0,25 мм ²
Угол 30°		-	28°	30°
Угол 45°		-	45°	45°
Угол 90°		-	92°	90°

Таблица 11. Отношение заданных размеров к действительным 3D-модели, напечатанной гидрогелем на основе желатина

Параметр	Отношение размеров для решетки, в %	Отношение размеров для цилиндра, в %	Отношение размеров к для многоугольника, в %
Толщина линии (первый слой)	118%	163%	183%
Толщина линии (остальные слои)	118%	163%	183%
Диаметр цилиндра	-	103%	-
Размеры решетки	94%	-	-
Площадь решетки	89%	-	-
Размеры ячейки в решетке	114%	-	-
Площадь ячейки в решетке	132%	-	-
Угол 30°	-	-	93%
Угол 45°	-	-	100%
Угол 90°	-	-	102%

Очевидно, что различие между толщиной линий первого слоя и последующих оказалось незначительным. В то же время наблюдалась

неравномерность толщины линии при печати окружностей, при этом средний диаметр окружности выдерживается с высокой точностью. В среднем, толщина всех линий была больше, чем в модели, что привело к уменьшению размера ячеек в решетке. Точность печати углов была сравнительно высокой. В соответствии с представленными данными высокая неоднородность структуры гидрогеля на основе желатина, а также высокая клейкость не позволяют воспроизводить сложные геометрические формы с необходимой точностью.

3.1.3. Апробация 3D-биопечати гидрогелем на основе коллагена I типа

Коллаген I – фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма. Печать производилась нейтральным 4% раствором коллагена. При печати температура гидрогеля в шприце поддерживалась постоянной и составляла 15°C. При понижении температуры вязкость этого гидрогеля уменьшается, а при повышении температуры – увеличивается. Температура поверхности чашки Петри, на которую выдавливался гидрогель, также поддерживалась постоянной и составляла 37°C.

Ниже приведены микрофотографии некоторых напечатанных структур тестовой 3D-модели, полученные при 0,75-кратном и 4-х кратном увеличении.

Все полученные данные о качестве и геометрии слоев тестовой 3D-модели, напечатанной гидрогелем на основе коллагена I типа, систематизированы в Табл. 12 и Табл. 13.

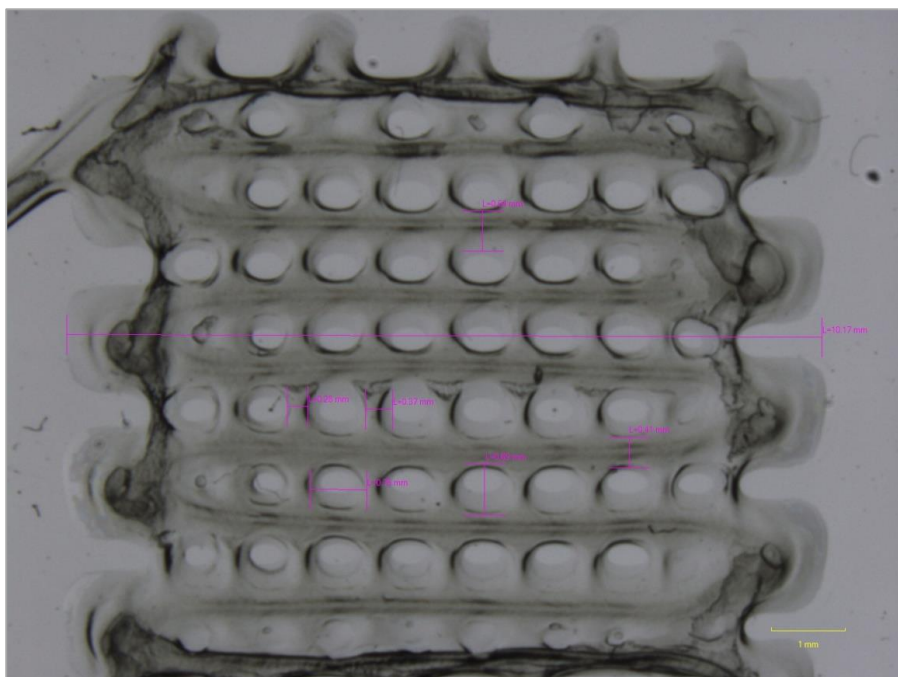


Рисунок 24 - Микрофотография решетки, напечатанной гидрогелем основе коллагена I типа, x0,75

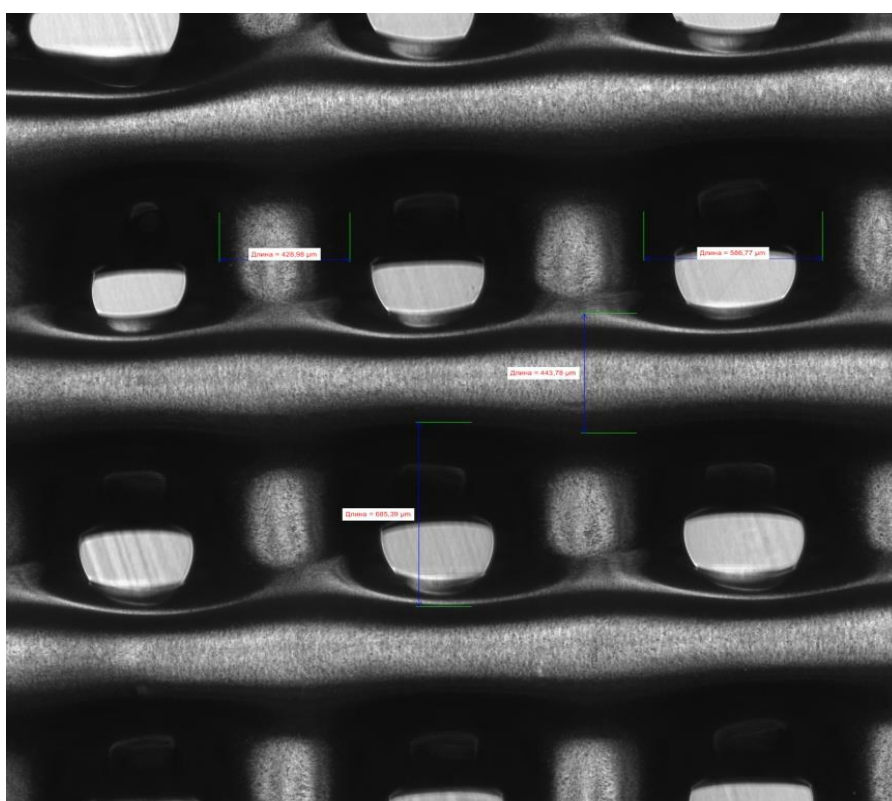


Рисунок 25 - Микрофотография решетки, напечатанной гидрогелем на основе коллагена I типа, x4

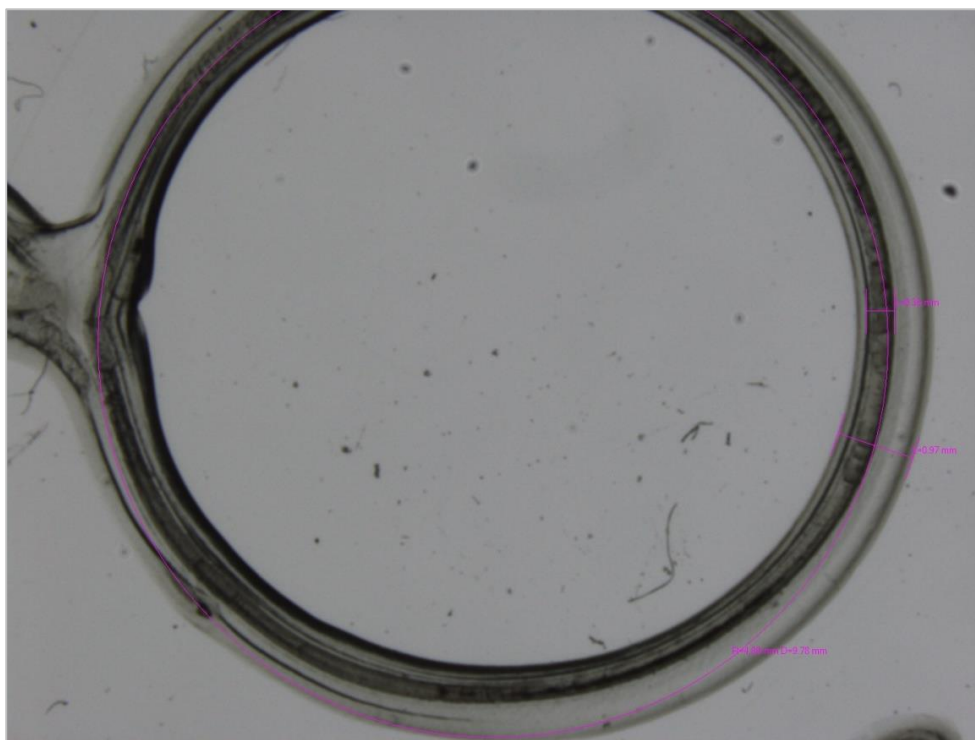


Рисунок 26 - Микрофотография цилиндра, напечатанного гидрогелем на основе коллагена I типа, $\times 0,75$.

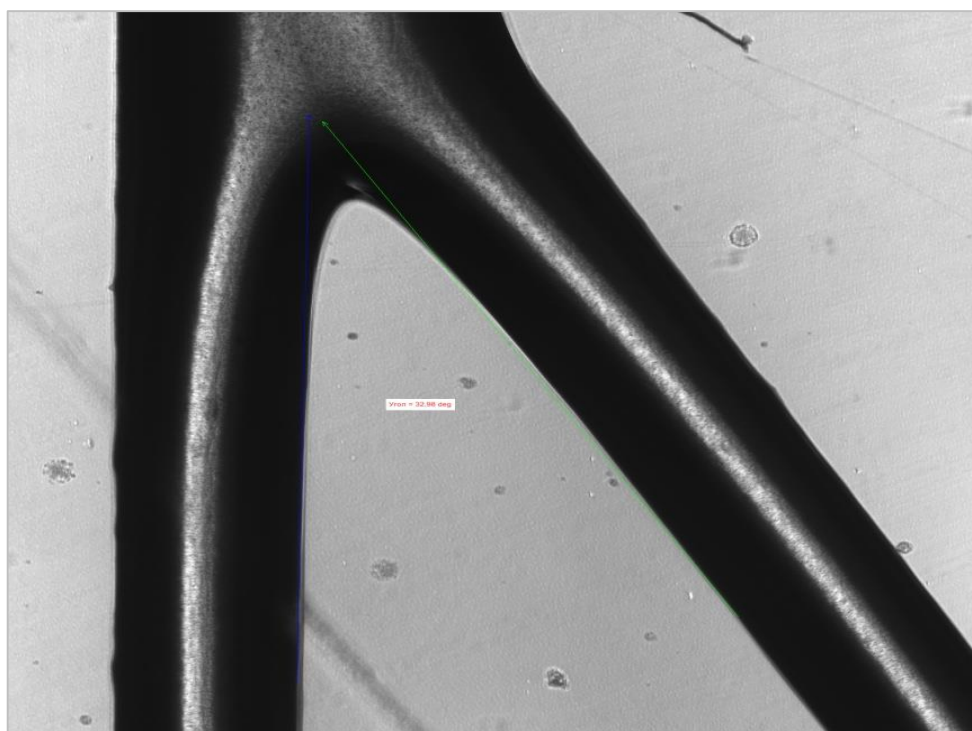


Рисунок 27- Микрофотография многоугольника, напечатанного гидрогелем на основе коллагена I типа, $\times 4$

Таблица 12. Характеристики тестовой 3D-модели, напечатанной гидрогелем на основе коллагена I типа

Параметр	Решетка	Цилиндр	Многоугольник	Параметры 3D-модели
Толщина линии (первый слой)	0,48 мм	0,97 мм	0,52 мм	0,4 мм
Толщина линии (остальные слои)	0,34 м	0,35 мм	0,23 мм	0,4 мм
Диаметр цилиндра	-	9,78 мм	-	10 мм
Размеры решетки	10,17 мм	-	-	10 мм
Площадь решетки	103,43 мм ²	-	-	100 мм ²
Размеры ячейки в решетке	0,72 мм	-	-	0,5 мм
Площадь ячейки в решетке	0,52 мм ²	-	-	0,25 мм ²
Угол 30°		-	31°	30°
Угол 45°		-	45°	45°
Угол 90°		-	93°	90°

Таблица 13. Отношение заданных размеров к действительным 3D-модели, напечатанной гидрогелем на основе коллагена I типа

Параметр	Отношение размеров для решетки, в %	Отношение размеров для цилиндра, в %	Отношение размеров к для многоугольника, в %
Толщина линии (первый слой)	120%	243%	130%
Толщина линии (остальные слои)	85%	88%	58%
Диаметр цилиндра	-	98%	-
Размеры решетки	102%	-	-
Площадь решетки	103%	-	-
Размеры ячейки в решетке	144%	-	-
Площадь ячейки в решетке	208%	-	-
Угол 30°	-	-	103%
Угол 45°	-	-	100%
Угол 90°	-	-	103%

Установлено, что при печати гидрогелем на основе коллагена I типа наблюдается небольшое различие между толщиной линий первого слоя и последующих слоев, связанное с деформацией под давлением со стороны последующих слоев. Точность печати углов была сравнительно высока. Толщина линий слоев выше первого оказалась в среднем меньше, чем в модели, что приводило к незначительному увеличению размера ячеек в решетке. Установлено, что в местах соприкосновения геометрических элементов происходило слияние материала, что приводило к неразличимости отдельных слоев и созданию однородной конструкции, что 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 конструктов после их имплантации *in vivo*.

Таким образом, установлено, что наиболее подходящими для 3D-биопечати на биопринтере Fabion являются два из трех протестированных гидрогелей – один синтетического (Pluronic F127) и один – натурального происхождения, на основе коллагена I типа.

3.1.4. Оценка цитосовместимости напечатанных 3D-конструктов.

Оценку цитосовместимости 3D-конструктов, напечатанных гидрогелем на основе коллагена I типа, протестировали для иммортализованных фибробластов мыши (линия NIH 3T3), меченых зеленым флуоресцентным белком (GFP), и тканевых сфероидов, полученных из этих клеток. Визуализацию и распределение клеток в напечатанном 3D-конструкте осуществляли по GFP, а жизнеспособность (в данной серии экспериментов) - путем оценки доли мертвых клеток (окрашенных PI) среди всех клеток (ядра которых окрашены Hoechst 33342) по описанному протоколу.

В качестве структуры для печати гидрогелем с клетками была выбрана решетка размером 10x10 мм, состоящая из 5 слоев по 0,2 мм каждый, с шагом между линиями 1мм. Суспензию клеток вносили непосредственно в гидрогель для печати, а тканевые сфероиды вносили в ячейки решетки по завершении ее печати. Общий вид напечатанной 3D-структуры с использованием гидрогеля на основе коллагена I типа, содержащим клетки, представлен на Рисунке 28.



Рисунок 28 - Общий вид напечатанной 3D-структуры с использованием гидрогеля на основе коллагена I типа, содержащего клетки, х0,75

Показано, что иммортализованные фибробласты сохраняют жизнеспособность в напечатанном конструкте по крайней до 7 суток после биопечати, что свидетельствует о его цитосовместимости (Рис. 29). Более того, количество клеток в конструкте при его дозревании *in vitro* нарастает.

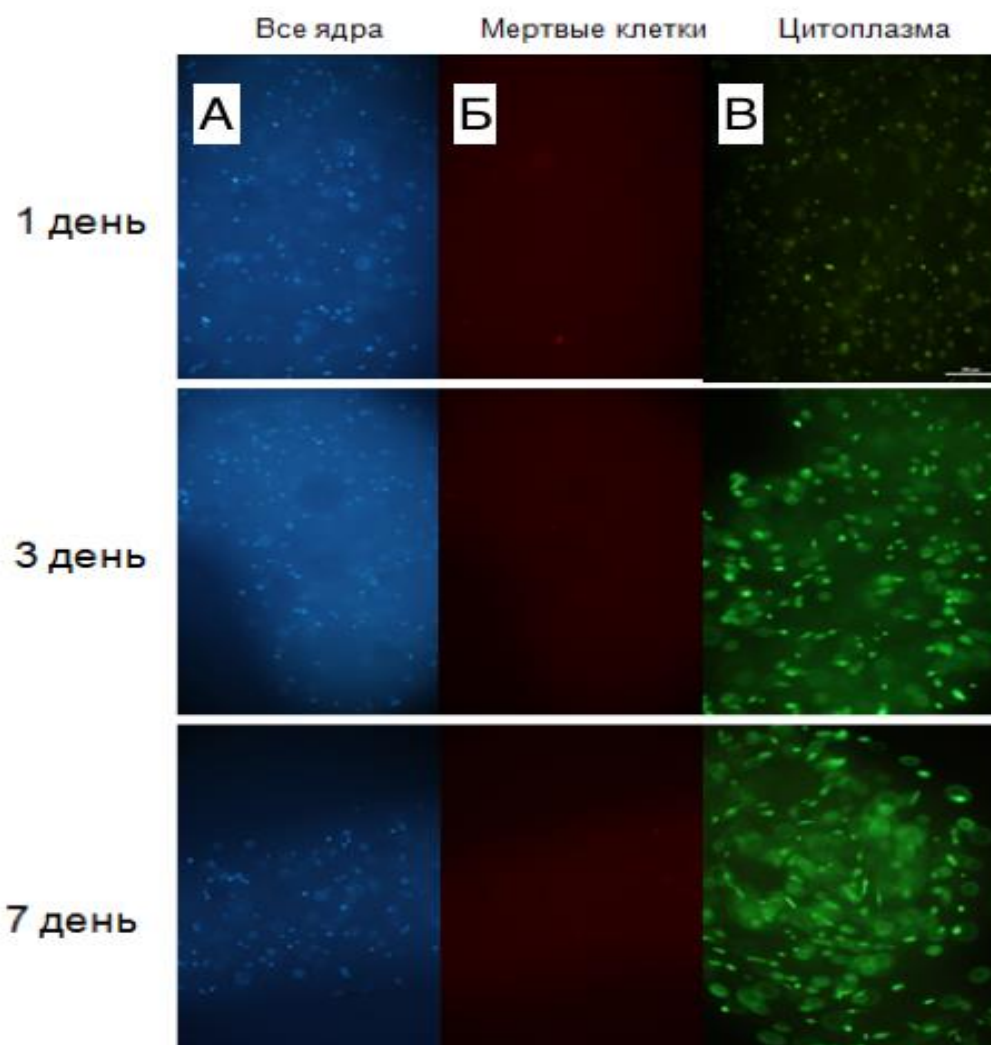
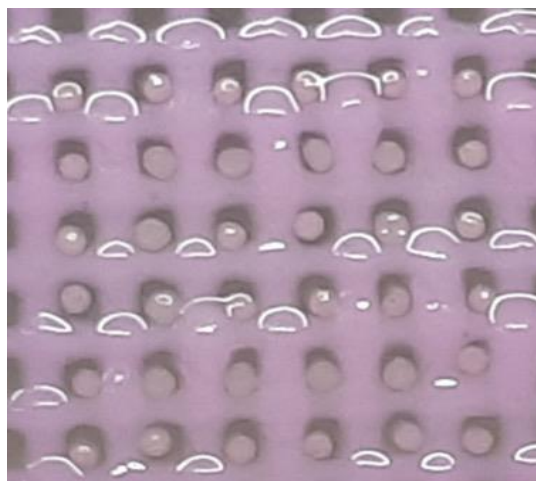
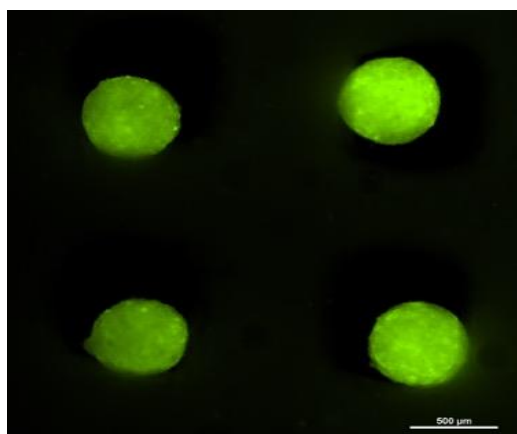


Рисунок 29 - Визуализация фибробластов линии NIH 3T3 в напечатанном конструкте на основе коллагена I типа: А- окраска ядер Hoechst 33342, Б- окраска мертвых клеток PI, В-визуализация GFP- меченых клеток x40

Сфероиды из фибробластов NIH 3T3, помещенные в ячейки, напечатанной гидрогелем на основе коллагена I типа решетки, соприкасались с окружающим гидрогелем (Рис. 30). Клетки в сфероидах сохраняли жизнеспособность на протяжении, как минимум, 7 дней культивирования (Рис. 31).



**Рисунок 30 - Общий вид напечатанной структуры с помещенными
внутри сфероидами, x4**



**Рисунок 31 - Сфероиды, полученные из клеток линии NIH 3T3, меченые
GFP, сохраняют жизнеспособность и (флуоресцентный сигнал) через 7
дней после культивирования, x40**

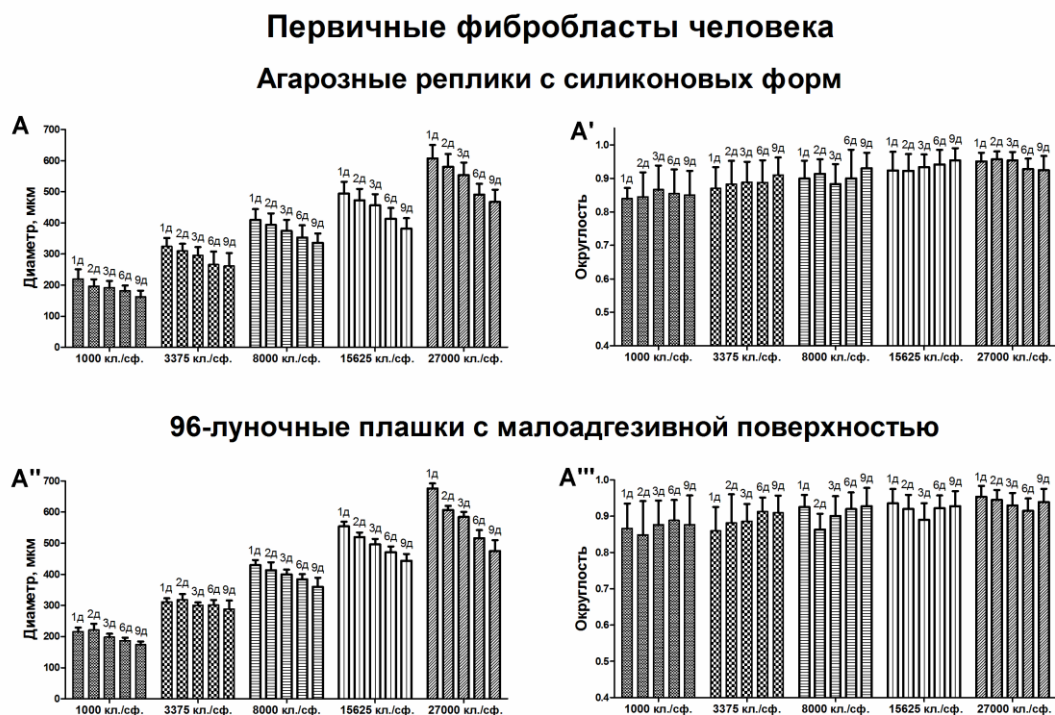
Таким образом, в настоящем разделе работы осуществлен подбор гидрогеля и условий 3D-биопечати на биопринтере Fabion и показана цитосовместимость напечатанных конструкторов на основе этого гидрогеля с клетками и тканевыми сфероидами на их основе.

3.2. Характеристика тканевых сфероидов на основе клеток разных типов

Использование тканевых сфероидов для 3D-биопечати требует детального изучения свойств этих сфероидов для понимания возможных сценариев их поведения в тканевых конструктах, полученных с использованием технологии 3D-биопечати.

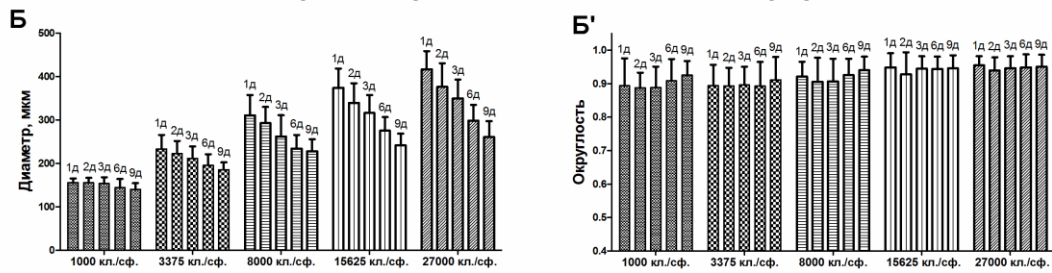
3.2.1. Исследование формы и размеров сфероидов в динамике культивирования.

Исследование диаметров сфероидов, сформированных из разного количества клеток различными методами, а также их округлости (программа ImageJ, NIH, Bethesda, MD, США) в динамике культивирования до 9 дней было осуществлено для первичных фибробластов человека, миобластов крысы линии L6, иммортализованного эпителия почки линии HEK293, ММСК жировой ткани человека и первичных хондроцитов барана. При построении графиков была использована программа GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) (Рис. 32).

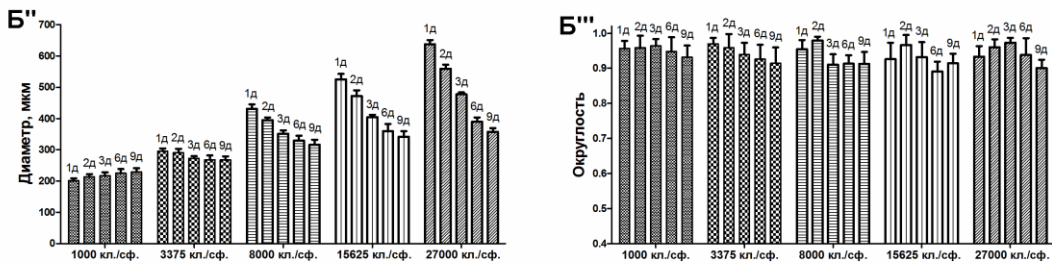


Первичные хондроциты барана

Агарозные реплики с силиконовых форм

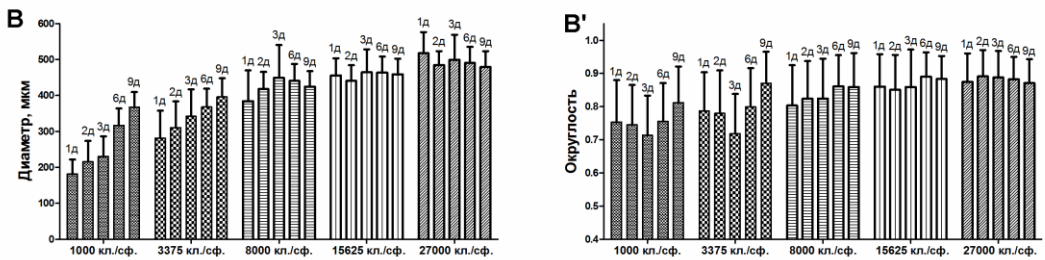


96-луночные плашки с малоадгезивной поверхностью

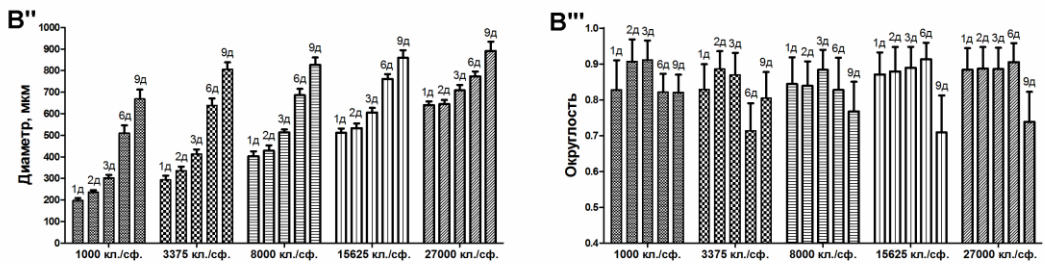


Миобласты крысы линии L6

Агарозные реплики с силиконовых форм

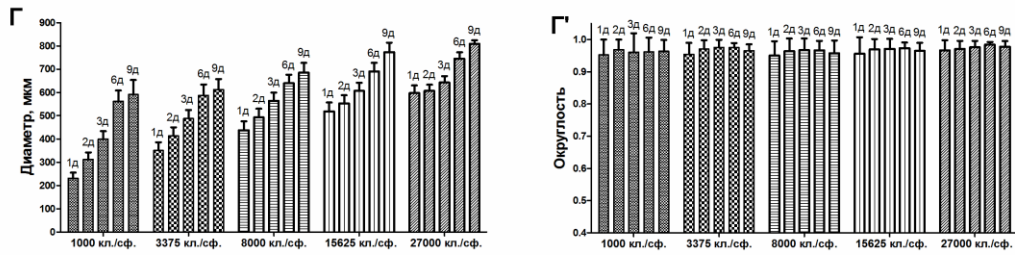


96-луночные плашки с малоадгезивной поверхностью

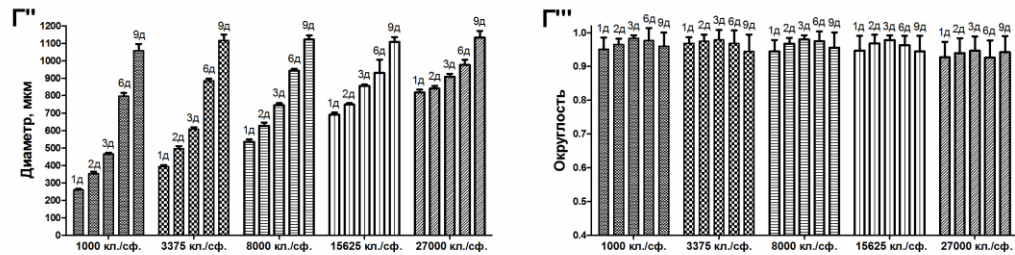


НЕК293

Агарозные реплики с силиконовых форм

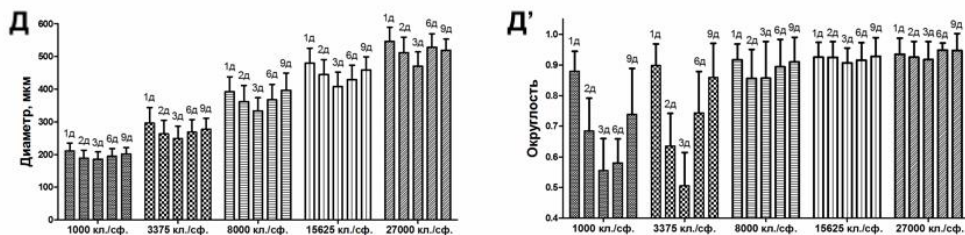


96-луночные плашки с малоадгезивной поверхностью



ММСК жировой ткани человека

Агарозные реплики с силиконовых форм



96-луночные плашки с малоадгезивной поверхностью

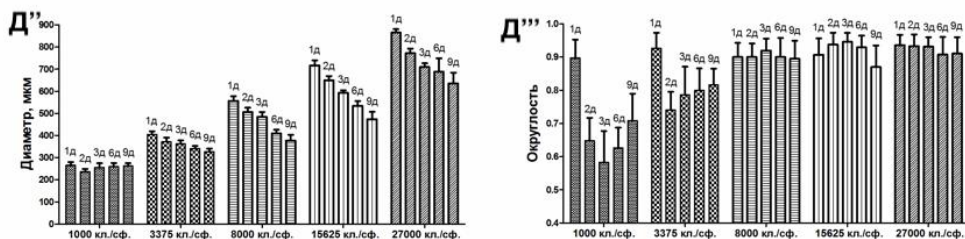


Рисунок 32. Изменение диаметра и формы сфероидов, сформированных из разного количества клеток с использованием 2-х методов биофабрикации, в динамике культивирования. Типы клеточных культур: А – первичные фибробласты человека; Б – первичные хондроциты барана; В – миобласты крысы L6; Г - иммортализованный эпителий почки человека НЕК 293; Д – ММСК жировой ткани человека. В каждом столбце представлено значение 95% доверительный интервал.

Диаметр сфероидов из первичных фибробластов человека и первичных хондроцитов барана на 1 сутки культивирования был пропорционален количеству клеток в них (до 27000 клеток). В динамике культивирования размеры этих сфероидов уменьшались (Рис. 32, А, А'). Сфероиды сохраняли округлость на протяжении 9 суток вне зависимости от метода их биофабрикации (Рис. 32 А'', А''').

Сфероиды из миобластов крысы линии L6 имели разную динамику изменения размеров и формы при разных методах биофабрикации. Так, диаметры сфероидов, сформированных с помощью плашек с малоадгезивной поверхностью, на протяжении 9 суток культивирования увеличивались в размерах при всех исходных концентрациях клеток (Рис. 32 В''). Эти сфероиды имели округлую форму на протяжении 3-6 дней культивирования, а далее начинали вытягиваться, приобретая эллипсоидную форму (Рис. 32 В'''). Сфероиды, сформированные с использованием агарозных реплик силиконовых форм с низкоадгезивной поверхностью, постепенно увеличивали диаметр при исходной концентрации клеток – 1000 и 3375 на 1 сфероид. В остальных случаях существенного изменения диаметров со временем не происходило (Рис. 32 В', В''). Все сфероиды, сформированные с помощью агарозных реплик, имели слегка вытянутую форму (Рис. 32 В').

Динамика изменения при культивировании диаметров сфероидов, сформированных из НЕК293, была сходной при исходно разной концентрации клеток: сфероиды постепенно увеличивались в размерах, причем сфероиды больших размеров увеличивались медленнее, чем сфероиды меньших размеров. Сфероиды сохраняли идеальную округлую форму на протяжении всего срока культивирования (Рис. 32 Г-Г''').

Сфероиды из ММСК жировой ткани человека демонстрировали различную динамику изменения диаметров при культивировании при разных методах биофабрикации. Так, диаметры сфероидов, сформированных с помощью плашек с малоадгезивной поверхностью, постепенно уменьшались со временем (Рис. 32 Д''), в то время как диаметры сфероидов,

сформированных с помощью агарозных реплик силиконовых форм с низкоадгезивной поверхностью, уменьшались на протяжении первых трех дней, после чего начинали расти (Рис. 32 Д). Независимо от метода биофабрикации сфероиды с исходной концентрацией 1000 клеток и 3375 клеток (на сфероид) имели овальную форму в первый день, а затем начинали вытягиваться, приобретая эллипсоидную форму. Остальные сфероиды имели сферическую форму на протяжении всего периода культивирования (Рис. 32 Д', Д'').

Необходимо отметить, что сфероиды, сформированные из одинакового количества клеток одного типа продемонстрировали распределение по размерам, близкое к нормальному (Рис. 33). Поэтому при последующем анализе использовали средний размер с учетом ошибки среднего.

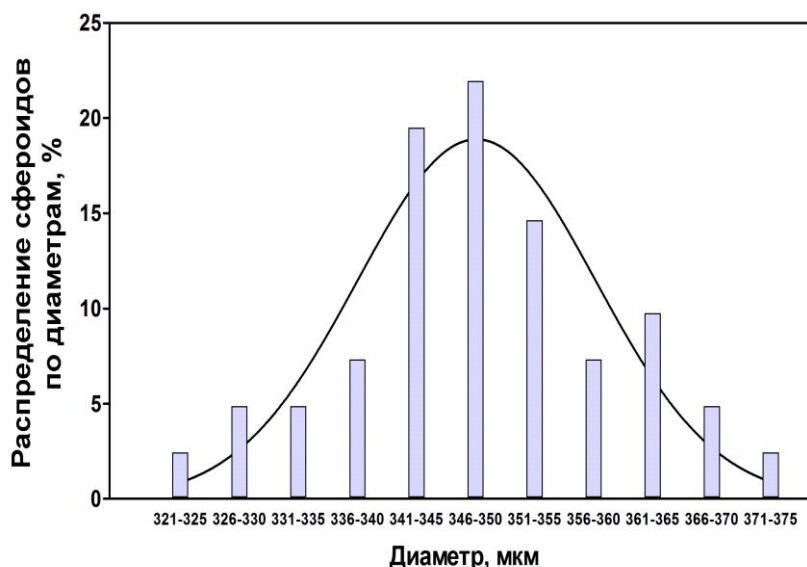


Рисунок 33 - Распределение сфероидов из хондроцитов барана по диаметрам; количество клеток в каждом сфероиде – 1000, метод формирования – агарозные реплики силиконовых форм с низкоадгезивной поверхностью

Наиболее выраженные и разнонаправленные изменения размеров сфероидов в динамике культивирования продемонстрированы на Рис. 34.

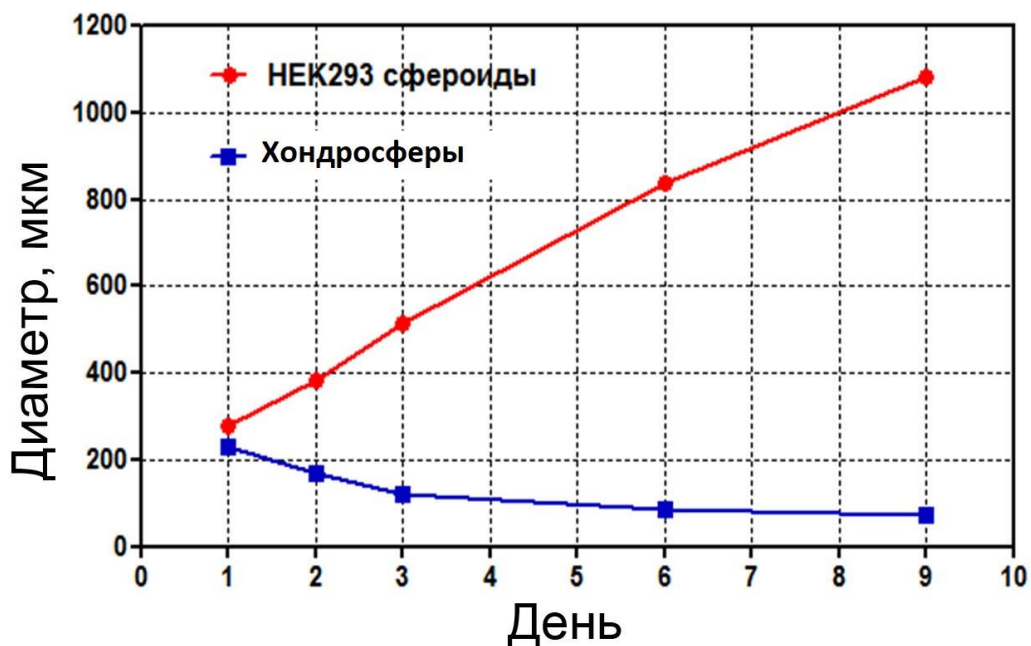


Рисунок 34 - Изменение размеров сфероидов в динамике культивирования до 9 суток. Результат типичного эксперимента

Таким образом, сфероиды из разных типов клеток, сформированные из 1000 - 27000 клеток, на протяжении 9 суток культивирования вне зависимости от метода их биофабрикации сохраняли сферическую или приобретали несколько вытянутую (эллипсовидную) форму. Для одних клеточных линий показано 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. Поэтому на следующем этапе работы мы исследовали жизнеспособность клеток в сфероидах в динамике культивирования.

III.2.2. Исследование жизнеспособности клеток в сфероидах в динамике культивирования

Исследование жизнеспособности клеток в сфероидах имеет своей целью получение ответа на вопрос – как долго можно осуществлять передержку клеток в сфероидах *in vitro* до их использования в 3D-биопечати

для формирования тканеинженерных конструкций. Оценку доли жизнеспособных клеток осуществляли с помощью описанных в разделе «Материалы и методы» красителей.

Показано, что изменение доли жизнеспособных клеток при культивировании зависит как от типа клеток, так и от исходного количества клеток в сфероиде (Рис. 35). Во избежание появления некротического ядра в центре сфероидов в процессе культивирования нами были выбраны сфероиды, исходное количество клеток, в которых, не превышало 8000 на сфероид. В целом же на протяжении первых трех дней культивирования доля жизнеспособных клеток всех типов в сфероиде превосходила 80% (Рисунки 35, 36, 37).

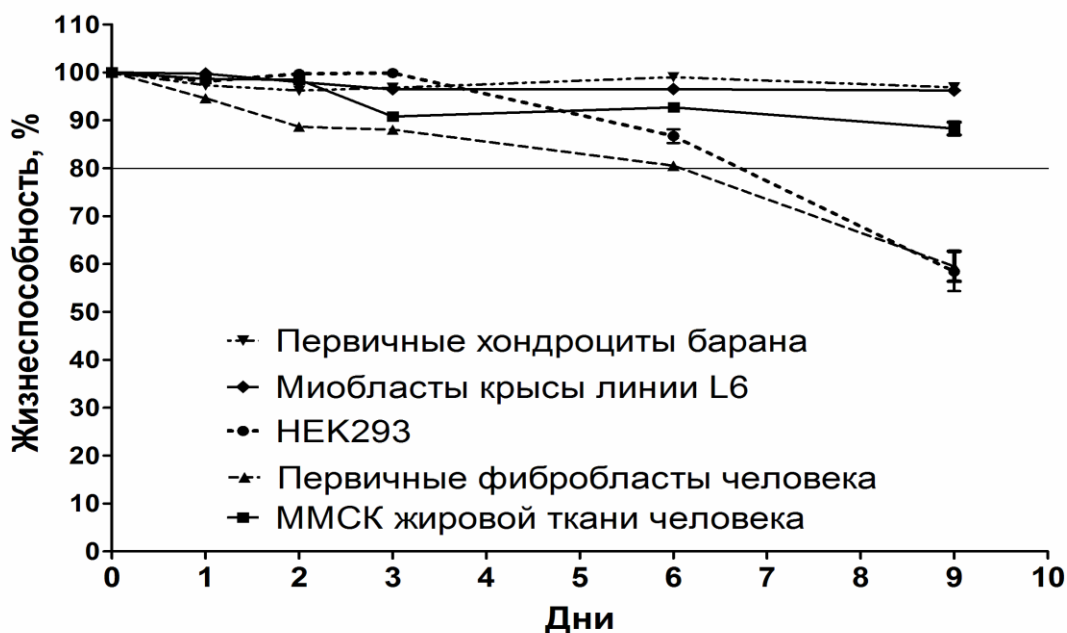


Рисунок 35 - Изменение доли жизнеспособных клеток в сфероиде в динамике культивирования (первичные хондроциты барана – 8000 клеток/сфероид; миобласты крысы линии L6 – 1000 клеток/сфероид; HEK293 – 1000 клеток/сфероид; первичные фибробласты человека – 8000 клеток/сфероид, ММСК жировой ткани человека – 8000 клеток/сфероид). Результат типичного эксперимента

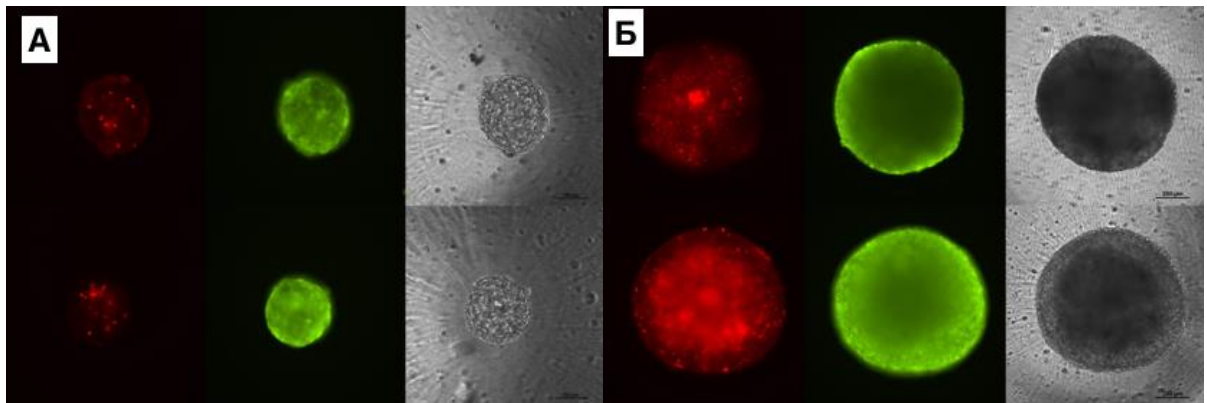


Рисунок 36 - Окраска 3-дневных сфероидов из: А - человеческих фибробластов (1000 клеток/сфероид); Б - человеческих фибробластов (27000 клеток/сфероид). Красный – PI; зеленый – Calcein-AM

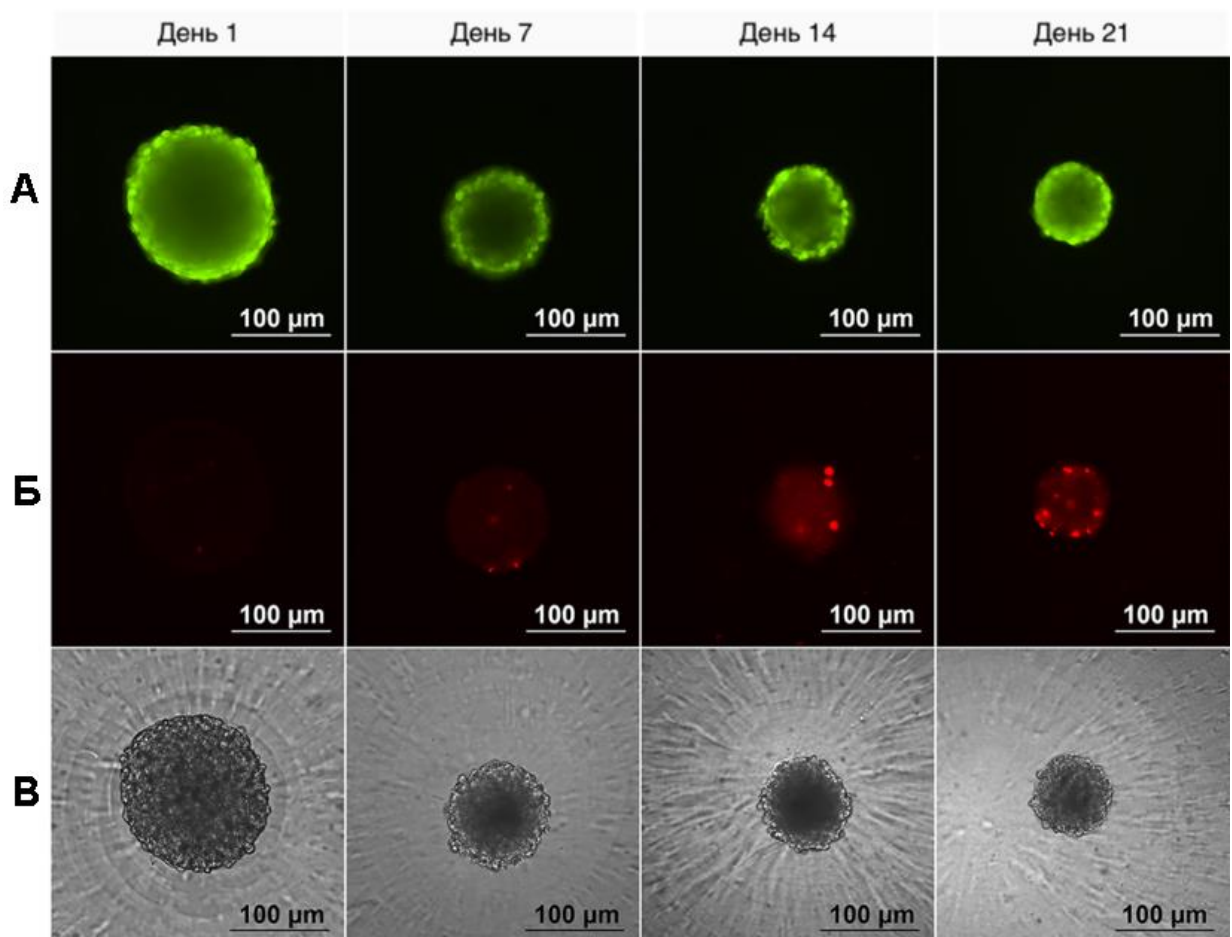


Рисунок 37 - Окраска сфероидов, сформированных из первичных хондроцитов барана, в динамике культивирования (8000 клеток/сфероид). А - зеленый Calcein-AM; Б - красный – PI; В – фазовый контраст

3.2.3. Анализ морфологии и «поведения» сфероидов, образованных разными типами клеток, в динамике культивирования на электроспиннинговом матриксе

Тканевые сфероиды, сформированные из первичных хондроцитов барана, обладали округлой формой, что хорошо согласуется с количественными данными по измерению округлости, приведенными ранее. Гладкая поверхность хондросфер была образована небольшими уплощенными клетками. На неровной поверхности хондроцитов были различимы многочисленные микроворсинки (Рис. 38, А).

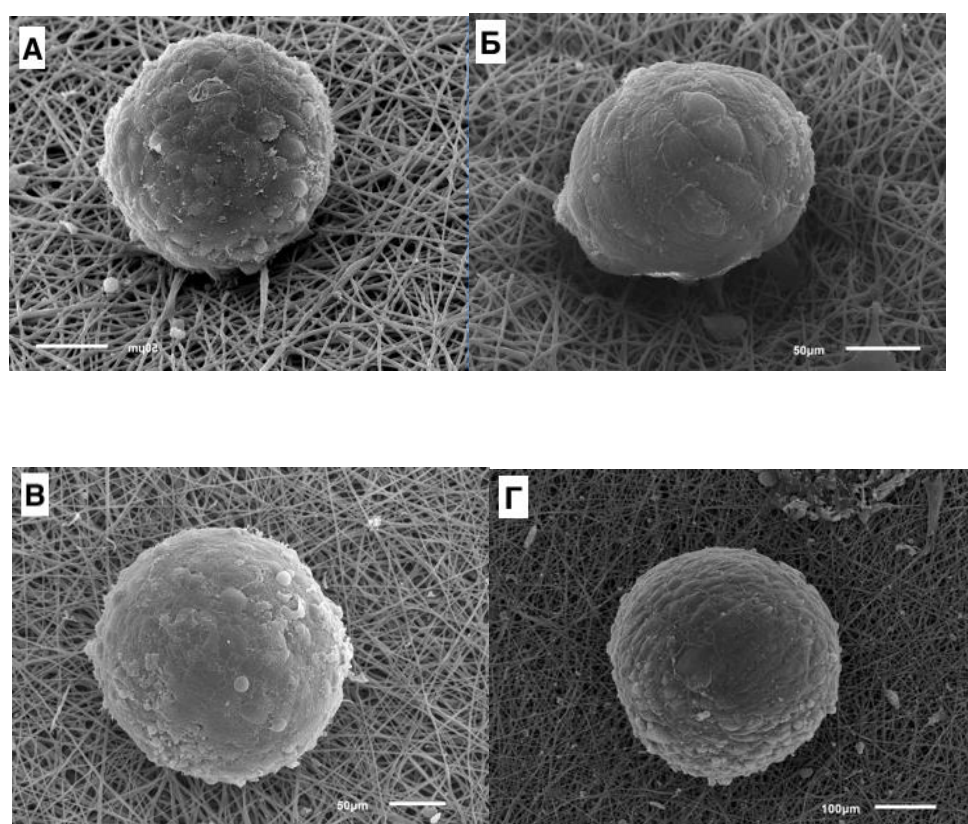


Рисунок 38 - Морфология сфероидов, сформированных из клеток разных типов на электроспиннинговом матриксе, 2-й день культивирования. А - хондроциты барана, Б – первичные фибробласты человека, В – эпителий почки человека НЕК293, Г – ММСК из жировой ткани человека

Сфероиды, сформированные из первичных фибробластов человека, были образованы удлиненными веретенообразными клетками, «уложенными» в сфероиде подобно ниткам в клубке (Рис. 38, Б).

Тканевые сфероиды, сформированные из эпителиальных клеток почки НЕК293, обладали округлой формой, что совпадает с количественными данными по измерению округлости, приведенными ранее (Рис. 38, В). Поверхность сфероидов была гладкой, сформированной полигональными «плотно уложенными» клетками.

Тканевые сфероиды, сформированные из ММСК, также имели округлую форму (Рис. 38, Г). Поверхность этих сфероидов была образована полигональными компактно уложенными клетками.

Таким образом «упаковка» клеток на поверхности сфероидов была различна для клеток разных типов.

3.2.4. Оценка механических свойств сфероидов из клеток разных типов в динамике культивирования

Прочность (упругость) разных типов сфероидов в динамике культивирования оценивали по модулю Юнга. Тканевые сфероиды из первичных хондроцитов барана, первичных фибробластов человека, миобластов крысы линии L6, иммортализованного эпителия почки человека линии НЕК293 и ММСК жировой ткани человека были сформированы с помощью 96-луночных плашек с малоадгезивной поверхностью. Исходные концентрации клеток на сфероид: 1000 для НЕК293 и L6 и 8000 клеток для остальных типов клеток. Для каждого типа клеток было сформировано и проанализировано не менее 40 сфероидов.

Прочность сфероидов определяется как силами межклеточных взаимодействий, так и взаимодействием клеток с внеклеточным матриксом. Как показано на Рис. 39, исходное значение модуля Юнга и динамика его изменения при культивировании зависели от типа клеток в сфероидах и сроков их культивирования.

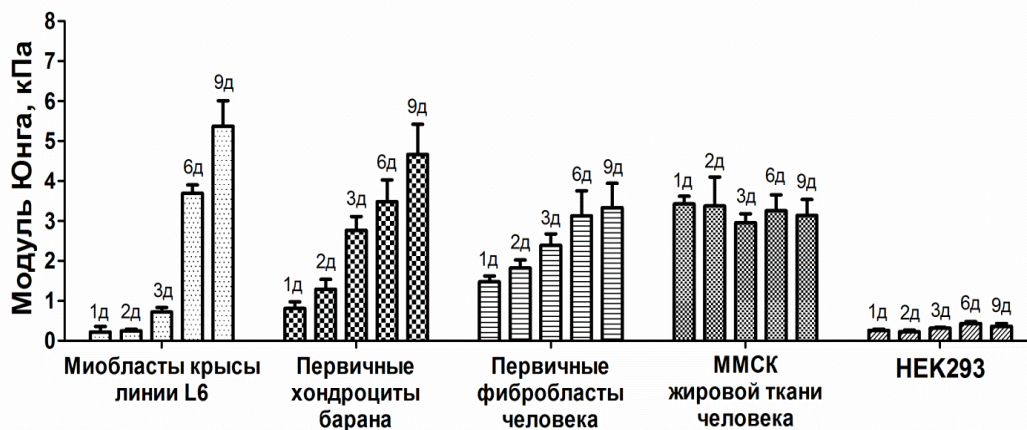


Рисунок 39. Изменение модуля Юнга сфероидов из разных типов клеток в динамике культивирования (в каждом столбце представлено среднее значение и 95% доверительный интервал и отмечена продолжительность культивирования в днях).

В соответствии с представленными данными можно выделить два типа изменения прочности сфероидов в процессе культивирования: увеличение (характерно для сфероидов из миобластов крысы линии L6, первичных хондроцитов барана и первичных фибробластов человека) и стабилизацию (характерно для сфероидов из ММСК жировой ткани человека и эпителиальных клеток почки - НЕК293).

Наименее прочными оказались сфероиды из эпителиальных клеток почки - НЕК293: их модуль Юнга практически не изменялся со временем, не превышая 0.4 кПа.

Прочность сфероидов из миобластов крысы линии L6 в первые два дня культивирования была сопоставима с таковой у сфероидов из эпителиальных клеток почки - НЕК293. Однако их модуль Юнга постепенно увеличивался и на девятый день культивирования достигал значения 5.4 кПа.

Для хондросфер и сфероидов из первичных фибробластов человека также было характерно постепенное увеличение прочности со временем: их модули Юнга нарастали от 0.8 до 4.7 кПа и от 1.5 до 3.3 кПа, соответственно, с 1-го по 9-й день культивирования.

Сфероиды из ММСК жировой ткани обладали достаточно высокой прочностью (3.0-3.4 кПа) уже с первого дня культивирования, и их модуль Юнга практически не изменялся со временем.

Таким образом, прочность сфероидов (модуль Юнга) исходно составляет 0,2-3,0 кПа, и может возрасти до 5,4 кПа или не измениться при их созревании. Снижения прочности (упругости) сфероидов в процессе их культивирования не зарегистрировано.

3.2.5. Анализ слияния и распластывания тканевых сфероидов

Способность тканевых сфероидов к распластыванию и слиянию является необходимым условием формирования (дозревания) органотипической тканеинженерной конструкции после ее формирования путем 3D-биопечати. Этот процесс исследовали на/в разных матриксах: на культуральном адгезивном пластике, на адгезивном матриксе, полученном из полиуретана путем электроспиннинга, и в коллагеновом геле. После помещения сфероидов из фибробластов на адгезивную поверхность (полиуретановый матрикс) на расстояние, превышающее диаметр одного сфероида, в течение первых нескольких часов происходила их фиксация, после чего наблюдалось открепление единичных клеток с поверхности сфероидов и их равномерное расселение. Через сутки несколько сотен клеток равномерно покрывали значительную площадь вокруг исходного сфероида (Рис. 40). Динамика распластывания практически не зависела от сроков предварительного культивирования сфероидов.

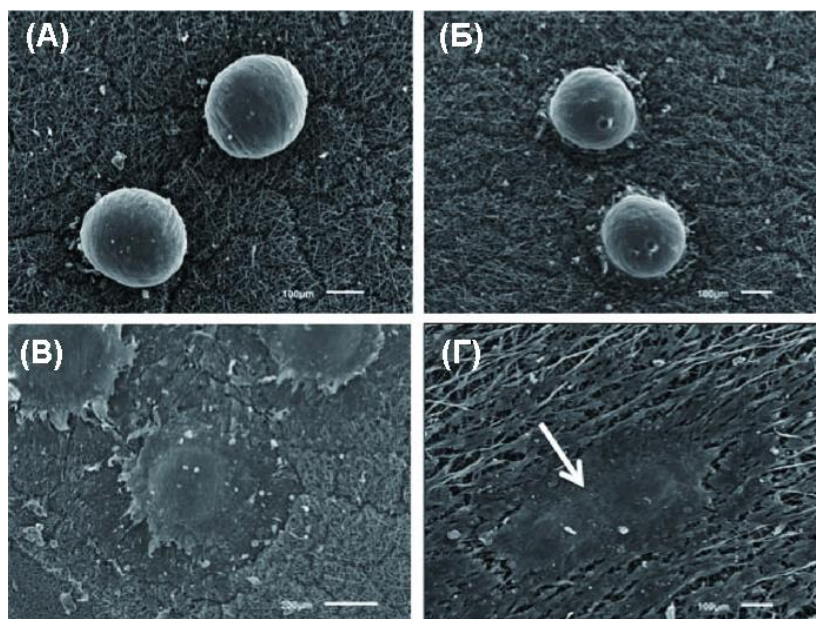


Рисунок 40 - Распластывание сфероидов из первичных фибробластов человека на адгезивной поверхности полиуретанового матрикса, полученного методом электроспиннинга: А – 4 часа, Б – 24 часа, В – 4 суток, Г - 7 суток культивирования)

На модели сфероидов, полученных из первичных хондроцитов барана и размещенных на культуральном пластике в контакте друг с другом, происходит их распастьвание и постепенное слияние (2 суток) (Рис. 41 А, Б). Скорость (продолжительность) слияния зависела от прочности сфероидов, в частности, от продолжительности их созревания, при котором, как показано выше, их прочность нарастала. Так сфериды, которые до слияния дозревали 21 сутки, распастьвались медленнее, чем сфериды, дозревавшие 1 сутки (Рис. 41, В).

Процесс слияния сфероидов из первичных хондроцитов барана на адгезивном матриксе, полученном из полиуретана путем электроспиннинга, был сходным с таковым на культуральном пластике.

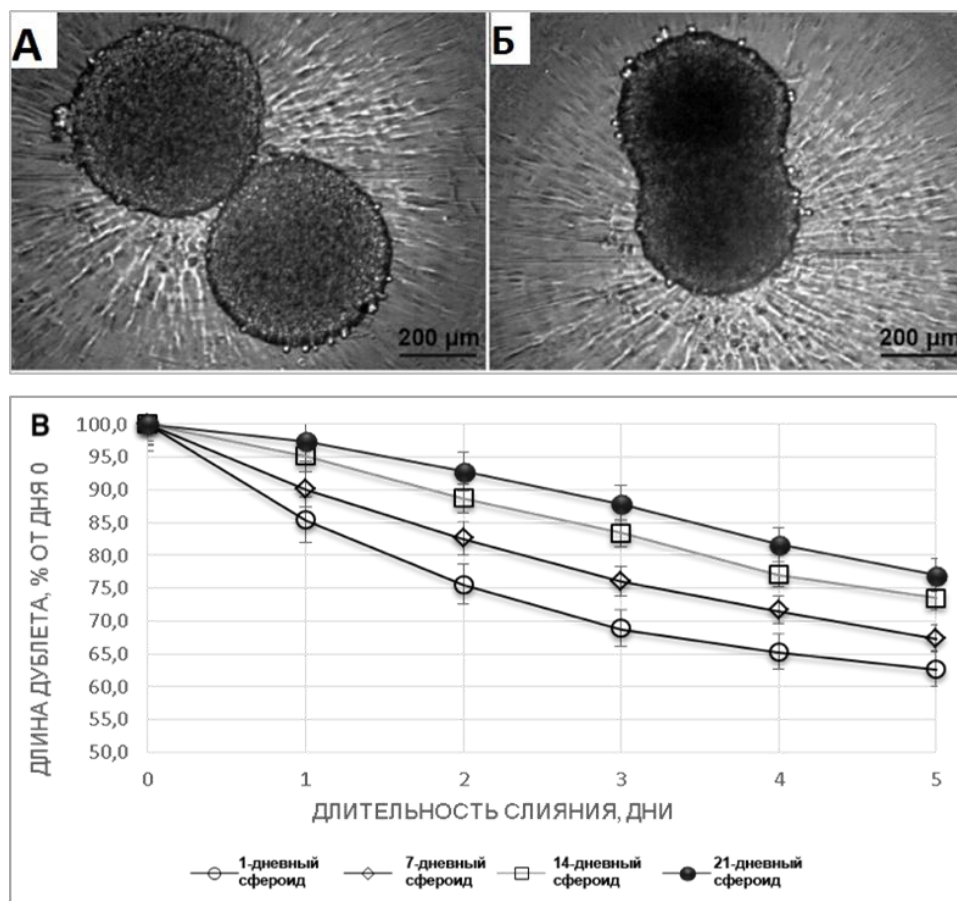


Рисунок 41 - Динамика распластывания сфероидов, сформированных из первичных хондоцитов барана на культуральном пластике: А – 0 часов, Б – 24 часа культивирования, В – суммированные данные распластывания сфероидов из первичных хондроцитов барана. Каждая точка – среднее значение; отмечена ошибка среднего.

С целью моделирования микроокружения сфероидов в среде, в которой они окажутся после 3D-биопечати, исследовали их слияние и распластывание в коллагеновом геле на модели сфероидов из эмбриональных эксплантов ЩЖ мыши (Рис. 42).

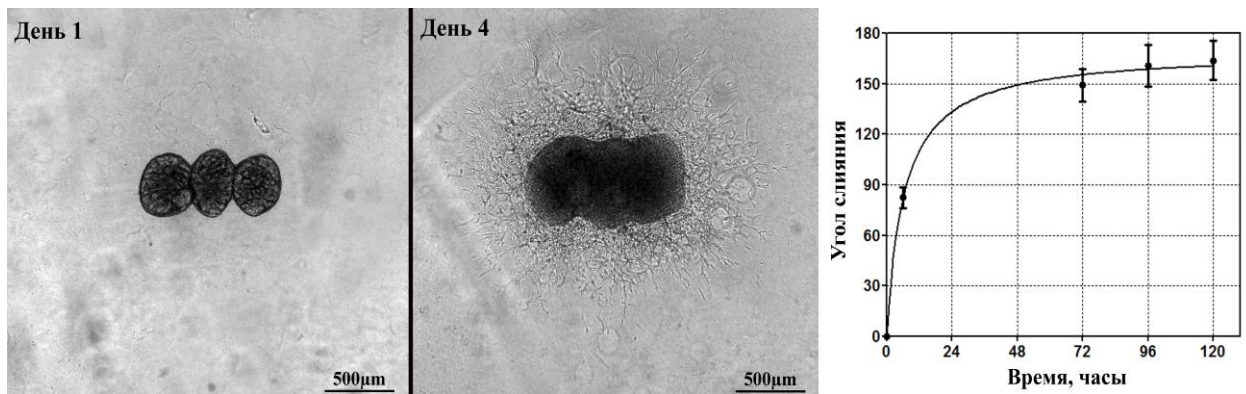


Рисунок 42 -Динамика распластывания и слияния сфероидов из эксплантов эмбриональной ЦЖ мышцы в коллагеновом геле на 1-е и 4-е сутки. Каждая точка – среднее значение; отмечена ошибка среднего.

При слиянии сфероидов из эксплантов ЦЖ мышцы в коллагеновом гидрогеле на 4-е сутки образовывалась структура вытянутой формы. По ее периферии можно было наблюдать миграцию клеток в коллагеновый гидрогель. Угол слияния сфероидов постепенно увеличивался и достиг 162° на четвертый день культивирования, что свидетельствует о практически полном слиянии сфероидов.

Таким образом, в настоящем разделе работы апробировано два способа формирования сфероидов, содержащих от 1000 до 27000 клеток одного из пяти типов. Показано, что при последующем культивировании этих сфероидов до 6 суток, более 80% клеток в них сохраняют жизнеспособность; сфероиды в эти сроки сохраняют сферическую или приобретают несколько вытянутую (овальную) форму. В зависимости от вида клеток и способа формирования сфероидов их размеры в динамике культивирования могут увеличиваться или уменьшаться, прочность – нарастать или не изменяться. Клетки соединительнотканного происхождения имели тенденцию мигрировать из сфероидов на адгезивную поверхность полиуретанового матрикса, сформированного методом электроспиннинга, а клетки эпителиального происхождения в эти же сроки оставались в структуре сфероидов. Исследована динамика распластывания и слияния сфероидов на модельном полиуретановом матриксе, полученном методом

электроспиннинга и в коллагеновом геле, отобранном в предыдущем разделе исследований для 3D-биопринтинга. Эффективное слияние сфероидов в сроки до 4-5 суток и миграция из них клеток в матрикс позволили выбрать это время в качестве продолжительности дозревания тканеинженерной конструкции после принтинга.

3.3. Результаты биопечати ТИК ЩЖ на основе эмбриональных эксплантов и аллантоисов ЩЖ мыши

3.3.1. Получение тканевых сфероидов из эмбриональных эксплантов ЩЖ и аллантоиса мышей

Разработанная нами концепция печати конструкта ЩЖ мыши основывается на принципе самосборки (self-assembly) биологических объектов. Для печати были использованы округленные ЭЭ ЩЖ мыши (в качестве источника фолликулов ЩЖ) и округленные экспланты АЛЛ - в качестве источника эндотелиальных клеток. При культивировании как ЭЭ ЩЖ, так и АЛЛ с использованием метода «висячей капли», они принимали сферическую форму и округлялись в среднем в течение 12 часов с финальными показателями размера внешнего диаметра $388,2 \text{ мкм} \pm 45,3$ ($n = 168$) и $493,6 \text{ мкм} \pm 114,3$ ($n = 28$) соответственно. При оценке степени округлости сфероидов из АЛ и ЭЭ ЩЖ были получены значения, приближенные к 1,0 ($0,92 \pm 0,06$ ($n = 28$)) и $0,90 \pm 0,05$ ($n = 168$), соответственно, что указывает на практически идеальную округлость (Рис. 43 А, Б, В). Данное исследование проводили, используя программное обеспечение Image J (Bethesda, США). При помещении сфероидов в непосредственной близости друг от друга происходило их слияние (Рис. 43, Г), что дополнительно подтверждается возрастанием угла сращения между ними до 62° (Рис. 43 Д).

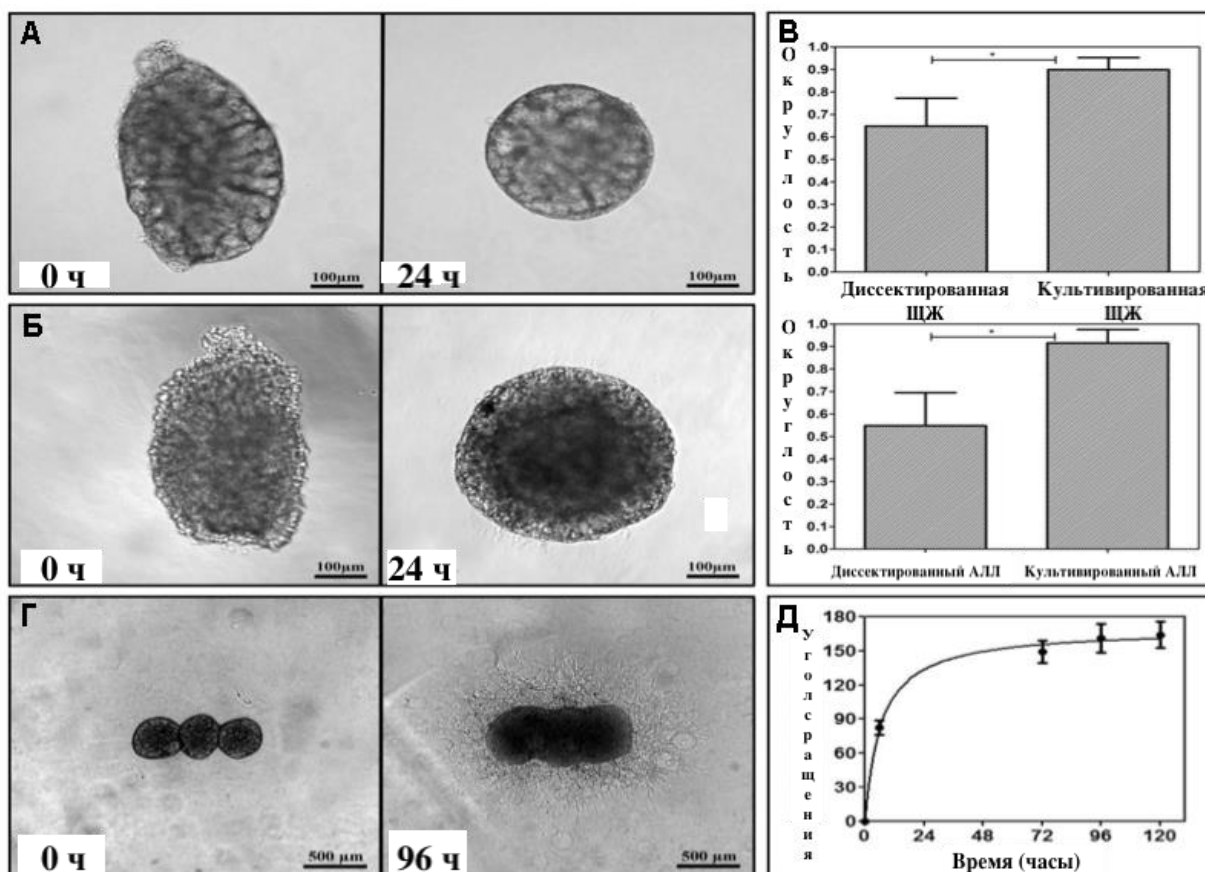


Рисунок 43 - Культивирование ЭЭ ЩЖ (А) и АЛЛ (Б) по методу «висячей капли»; коэффициент округлости до и после культивирования сфероидов (В); слияние трех сфероидов ЭЭ ЩЖ в коллагеновом геле (Г); изменение угла сращения между отдельными сфероидами при слиянии (Д). в графике «В» – в столбцах - среднее значение и 95% доверительный интервал; в графике «Д»– среднее значение и ошибка среднего

В настоящей работе для 3D-биопринтинга конструктов ЩЖ использовался, как было описано в разделе «Материалы и методы» биопринтер Fabion с двумя уникальными отличительными характеристиками: 1) «турникетной» системой, позволяющей последовательно наносить сфероиды в заданной точке пространства; 2) системой охлаждения/нагрева для улучшения полимеризации коллагенового гидрогеля (Рис. 44 А, Б, В).

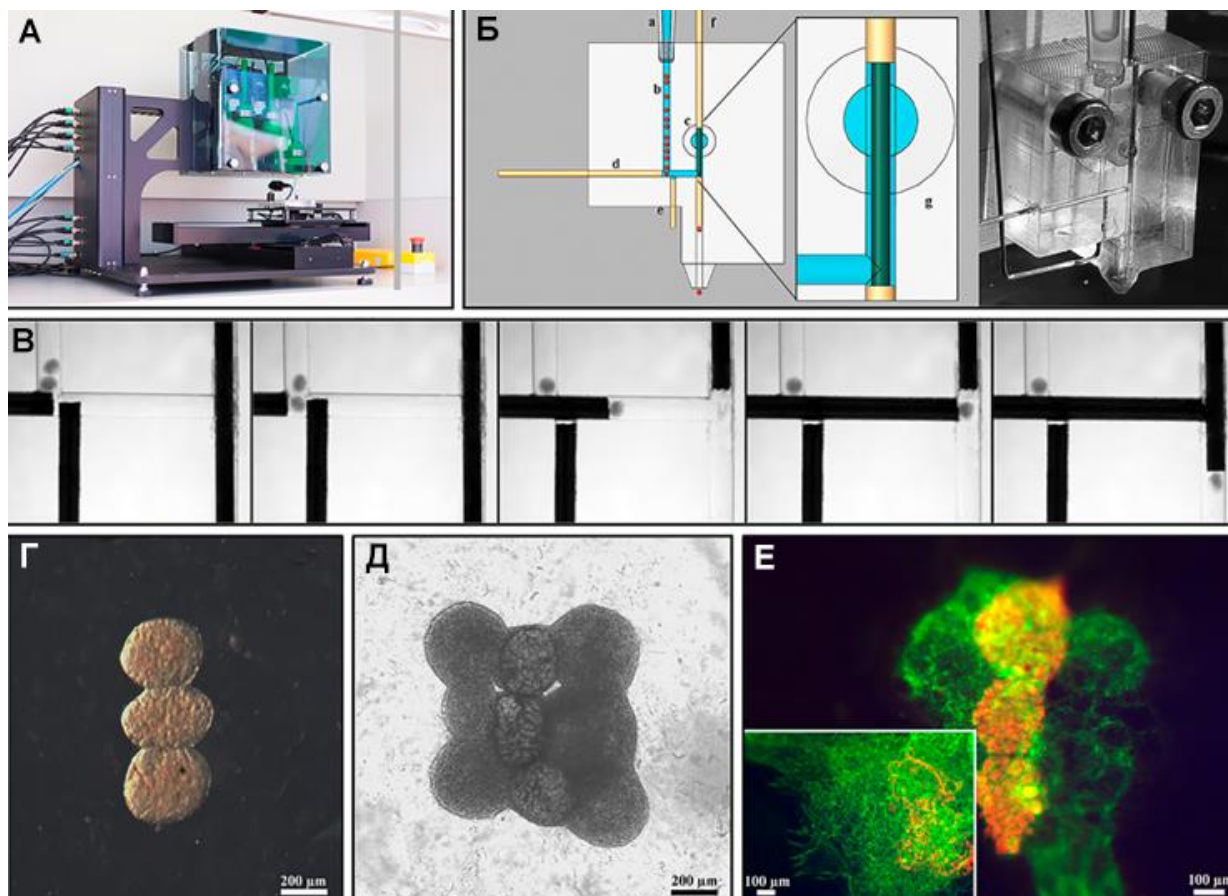


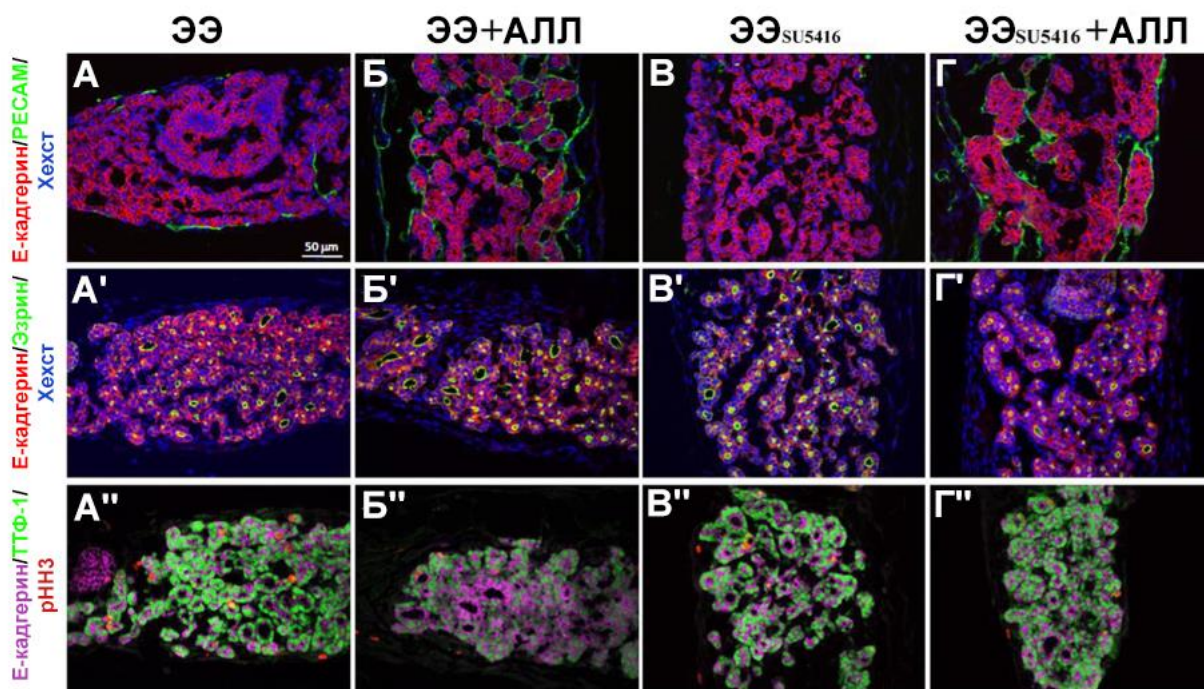
Рисунок 44 - Схема биопечати конструкта ЩЖ мышцы: А - общий вид биопринтера Fabion; Б - турникетная система, В - изображение стадий подачи одиночного тканевого сфероиды; Г - ТИК ЩЖ мышцы из 3 сфероидов, сформированных из 3-х ЭЭ; Д – ТИК из 3 сфероидов ЭЭ и 6 сфероидов, АЛЛ мышцы; Е - 1-ые сутки культивирования конструкта после печати; (окраска АТ к PECAM (зеленый) и к E-кадгерину (красный) для визуализации эндотелиальных и эпителиальных клеток, соответственно). Фотовставка демонстрирует широкое распространение PECAM-положительных эндотелиальных клеток в напечатанной ТИК ЩЖ мышцы на 4-е сутки культивирования после печати.

Первым этапом биопечати конструкта ЩЖ являлась печать основы конструкта – коллагеновой подложки размерами 2 x 2мм и толщиной 2 мм. После полимеризации коллагена загружали в печатающую головку 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 0,2 мм (Рис. 44 Д, Е).

Данная система позволила использовать коллагеновый гидрогель с физиологическим рН = 7.2 – 7.4 и предотвращала преждевременное затвердевание коллагена за счет охлаждения емкости форсунки (4°C). Полимеризация гидрогеля начиналась при изменении температуры после попадания его на поверхность ч. Петри, находившейся на специальной подогреваемой платформе (23°C), что приводило к образованию стабильной заданной коллагеновой структуры.

Васкуляризация напечатанного конструкта ЩЖ – один из самых важных и критических вопросов для его функционирования, а именно захвата I и последующей доставки синтезированных гормонов в кровоток. Для оценки возможной васкуляризации конструкта из эндотелиальных прогениторов АЛЛ после 4-х дней культивирования конструкты фиксировали и окрашивали антителами к ТТФ-1 (маркер тиреоцитов), Е-кадгерину (маркер эпителия), эзрину (маркер микроворсинок апикального края эпителия) и рННЗ (маркер пролиферации) – Рис. 45. Напечатанные конструкты ЩЖ оставались жизнеспособными и обладали положительной реакцией на маркер пролиферации рННЗ (Рис. 45А''). Конструкты ЩЖ продемонстрировали обильную локализацию эндотелиальных клеток вокруг эпителиальных клеток по периферии конструкта (Рис. 44Е). Визуализация с использованием эзрина и ТТФ-1 выявила развивающуюся фолликулярную структуру в конструкте ЩЖ (Рис. 45Б', Б'')



**Рисунок 45 - Иммуногистохимическое исследование конструкторов ЩЖ
мышцы.**

Эти данные могут свидетельствовать о том, что эндотелиальные клетки-предшественники, присутствующие в АЛЛ были привлечены ангиогенным фактором VEGF-A, секретируемым предшественниками ТЦ, содержащимися в ЭЭ ЩЖ. Чтобы доказать возникновение васкуляризации именно за счет эндотелиальных клеток АЛЛ, ЭЭ ЩЖ культивировали в течение 24-х часов в висячих каплях в присутствии специфического ингибитора киназ VEGFR2/Flk-1 SU5416 (ЭЭ_{SU5416}). Поскольку сигнализация VEGFR2 необходима для выживаемости ЭЭ ЩЖ, ингибирование этого сигнального пути приводит к прогрессирующей смерти последних (Рис. 45 В''). Добавление SU5416 к культуральной среде конструкторов ЩЖ действительно приводило к исчезновению всех PECAM-положительных эндотелиальных клеток (Рис. 45 В), что указывает на эффективность обработки SU5416. В напечатанных конструкторах была обнаружена плотная капилляроподобная сеть, окружающая эпителиальные клетки, образованная из эндотелиальных клеток аллантаоиса. Добавление SU5416 не влияла на пролиферацию ТЦ (Рис. 45 В'', Г'') или формирование предшествующих фолликулам структур (Рис. 45

В', Г', В'', Г''). Эти данные позволяют предположить, что срастание АЛЛ с ЭЭ ЩЖ сопровождается процессом васкуляризации напечатанных конструкторов. Косвенным подтверждением наличия предшественников капилляров в напечатанном конструкторе является подтвержденное в дальнейшем гистологическими методами наличие капилляров в микрооргане щитовидной железы после созревания под капсулой почки.

Для валидации доказательства функциональности напечатанных конструкторов ЩЖ их помещали под капсулу почки мышей линии CD-1 с индуцированным гипотиреозом после введения I^{131} (Рис. 46).

Трансплантация напечатанных конструкторов ЩЖ под васкуляризованную почечную капсулу является стандартным и хорошо изученным подходом для испытаний *in vivo*. Эксперименты на животных с индуцированным гипотиреозом проводили через 8 недель после введения I^{131} , когда у всех мышей экспериментальной группы не удавалось обнаружить T_4 в крови (рис. 46 Б). Уровень гормона щитовидной железы T_4 в крови измеряли в качестве специфического и наиболее информативного маркера. Через пять недель после трансплантации мыши-реципиенты продемонстрировали значительное повышение уровней T_4 в крови, что указывает на функциональное восстановление после трансплантации конструктора ЩЖ (Рис. 46 В). Также была проанализирована температура тела у мышей из разных групп. Снижение температуры тела наблюдалось у мышей с индуцированным гипотиреозом (Рис. 46 Г). У мышей экспериментальной группы после трансплантации наблюдалась постепенная нормализация температуры тела, что является достоверным примером симптоматического улучшения (Рис. 46 Д).

Гистологическая оценка области под капсулой почки через пять недель после трансплантации напечатанного конструктора 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. 46 Е, Ж).

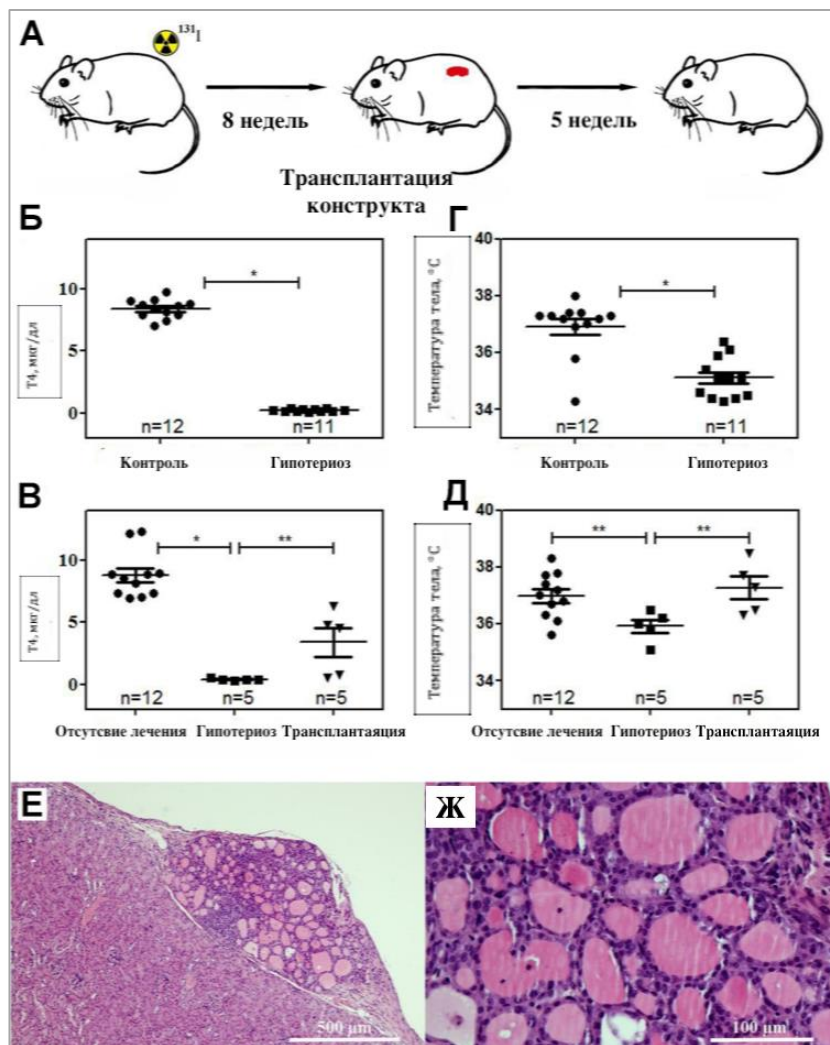


Рисунок 46 - Восстановление функции ЩЖ у мышей после имплантации напечатанных ТИК ЩЖ: А – схема эксперимента, Б, В – сывороточные уровни тироксина (T_4) через 8 недель после I^{131} -индуцированной абляции ЩЖ мышей еще через 5 недель после трансплантации соответственно; Г, Д – температура тела мышей через 8 недель после I^{131} -индуцированной абляции и через 5 недель после трансплантации, соответственно; Е, Ж – участок почки мыши с трансплантированной ТИК ЩЖ (окраска Г-Э).

В настоящем разделе работы представлены данные по исследованию возможностей восстановления функции ЩЖ у I^{131} -нокаутированных животных. Конструкт ЩЖ был напечатан на биопринтере с использованием двух типов округлых сфероидов эмбриональной ткани: ЭЭ ЩЖ и АЛЛ с внесением в коллагеновый гидрогель. В течение 4 суток после печати

тканевые сфероиды созревали, сливаясь в единый неделимый конструктор ЩЖ, в котором эндотелиальные клетки из АЛЛ проникали в ЭЭ ЩЖ с последующим образованием капиллярной сети вокруг развивающихся фолликулов. Напечатанный конструктор ЩЖ являлся функциональным, так как продемонстрировал после трансплантации под капсулу почки повышение уровня тироксина у мышей с индуцированным гипотиреозом.

Данный эксперимент показал принципиальные возможности разработанной технологии 3D-биопечати и переходу к биопринтингу функциональной ткани ЩЖ человека.

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

В предыдущем разделе работы была показана принципиальная возможность получить путем 3D-биопринтинга функционально активный конструктор ЩЖ на модели ЭЭ ЩЖ мыши.

Логичным следующим этапом является разработка технологии 3D-биопринтинга ЩЖ человека с использованием в качестве биологических компонентов ТЦ, ТФ или МО ЩЖ человека.

Соответственно, на первом этапе нами были исследованы возможности сохранения в культуре и/или масштабирования ТЦ, ТФ и МО ЩЖ человека. Мировой опыт культивирования этих структур был описан в разделе «Обзор литературы». Очевидно, что значительная часть исследований такого рода была осуществлена на моделях ЩЖ лабораторных животных. Тем не менее, накопленный опыт позволяет выявить несколько тенденций и закономерностей, которые мы учли, начиная настоящую работу.

Так, в частности, наиболее часто поддержание жизнеспособности культур ТЦ, ТФ или МО удавалось в богатых гормонами средах (5Н или 6Н). Определенных успехов в поддержании жизнеспособности ТФ, удалось достичь путем переноса их в 3D-коллагеновый гель [10], культивируя на

границе раздела гель-воздух [175]. Ряд авторов показали возможность формирования новых ТФ в такой системе [1,75,84,190], а также культивирования нативных ТФ, выделенных из ткани ЩЖ [174,177,179]. Вопрос о длительном сохранении функциональности таких ТФ пока остается открытым.

Ранее в МНИОИ им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ была разработана оригинальная технология получения ЛТ человека как культуральной добавки, стандартизированной по функциональной активности и пригодной (как нексеногенный supplement) для культивирования стволовых, дифференцированных и опухолевых клеток человека [9]. ЛТ, полученный по разработанной методике, содержал целый спектр факторов роста (ФР) (PDGF, IGF-1, TGF β 1, VEGF, FGF), гормонов и других биологически активных веществ, нормальных компонентов плазмы крови и тромбоцитов [6]. Далее была разработана технология формирования геля на основе ЛТ для 3D культивирования. Этот гель, богатый ФР и гормонами, был использован в настоящей работе в качестве 3D среды для культивирования ТЦ, ТФ и МО из ЩЖ человека по методологии, описанной в разделе «Материалы и методы».

Одиночные ТЦ, ТФ и МО ЩЖ выделяли из фрагментов нормальной ЩЖ (n=23), полученной после тиреоидэктомии у больных раком ЩЖ, путем ее механической дезагрегации с последующим фракционированием на одиночные ТЦ, ТФ или МО с помощью серии сит с уменьшающимся размером пор («Материалы и методы»).

3.4.1. 3D-культивирование первичных культур ТЦ человека

Вид первичной культуры ТЦ человека в геле на основе ЛТ представлен на Рисунке 47 (А). Доминантная популяция клеток была представлена ТЦ типичной для эпителия формы. Между ТЦ – небольшое количество фибробластоподобных клеток и островков из эритроцитов. Целые ТФ отсутствовали. Кроме одиночных ТЦ в геле визуализировались цепочки ТЦ,

соответствующие по форме остаткам ТФ. Среди ТЦ не было пролиферирующих клеток - реакция на Ki-67 отрицательная (Рис. 47 Б).

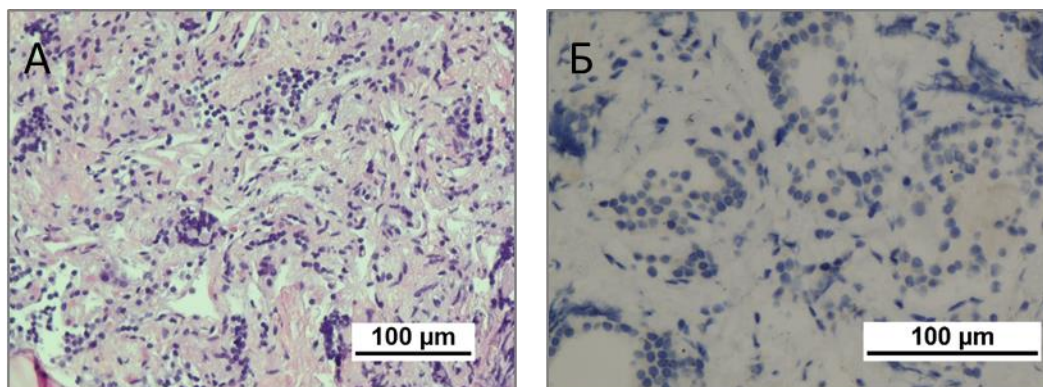


Рисунок 47 - Первичная 3D-культура ТЦ человека, 1-е сутки культивирования; А - окраска гематоксилин-эозином; Б – отрицательная реакция с АТ к Ki-67.

Из этих ТЦ были сформированы сфероиды (Рис. 48). Однако они оказались нестабильными и через 1-2 суток распадались на отдельные клетки.

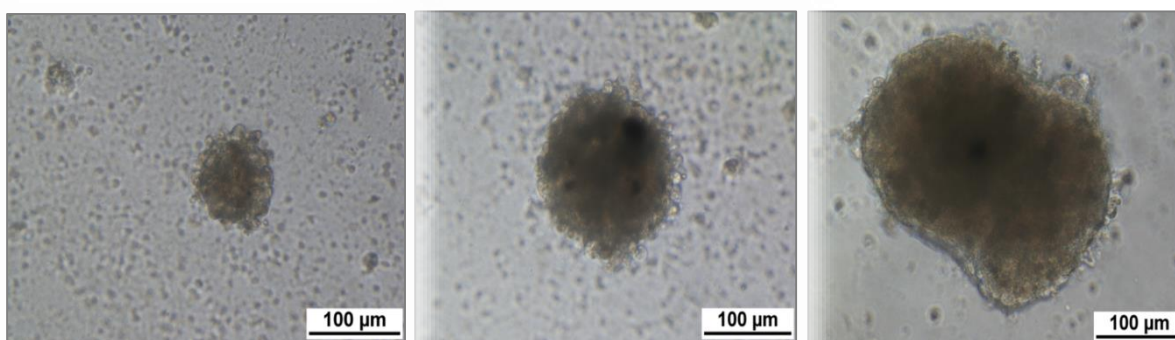


Рисунок 48 - Сфероиды из одиночных ТЦ человека (1 сутки культивирования)

С помощью набора Live/Dead было показано, что через 1 сутки культивирования часть сфероидов состояла из живых ТФ, а в части – в состав сфероидов входили как живые, так и мертвые клетки (Рис. 49).

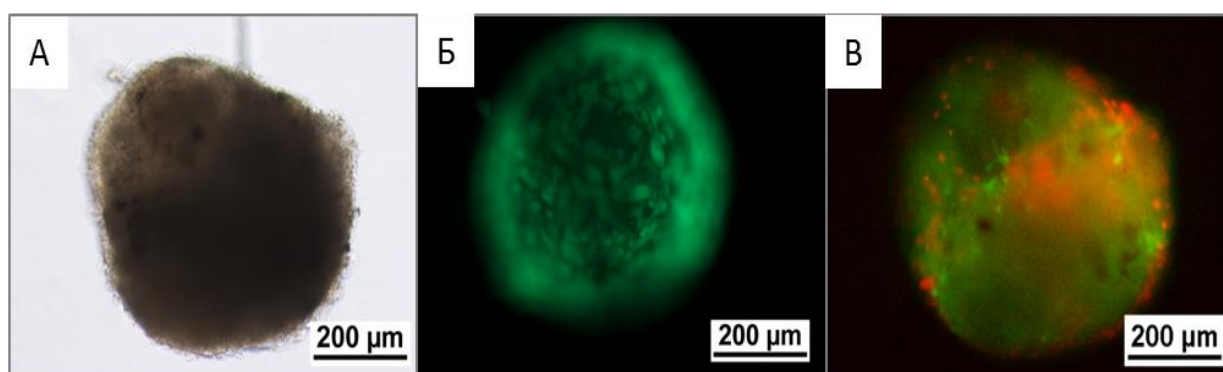


Рисунок 49 - Окраска сфероидов из одиночных ТЦ человека через 1 сутки после культивирования набор (Live/Dead). А - сфероид в светлом поле; Б-сфероид из живых ТЦ (зеленый цвет); В- сфероид из живых (зеленый цвет) и мертвых (красный цвет) ТЦ.

К 4-м суткам культивирования количество наблюдаемых ТЦ резко сократилось, а среди оставшихся появились Ki-67 положительные клетки (Рис. 50 А, Б). Начиная с 7-х суток оставшиеся ТЦ начали формировать ассоциаты (гнезда) из нескольких клеток (Рис. 50 В), часть из которых оказалась Ki-67 и Oct-3/4-положительными (Рис. 50 Г, Д), что свидетельствует об их принадлежности к компартменту стволовых или прогениторных клеток.

Через 2,5 месяца культивирования на основе значительной части ассоциатов сформировались фолликулоподобные структуры (Рис. 51, А), в стенках которых визуализировались Ki-67-позитивные, то есть пролиферирующие клетки (Рис. 51, Б).

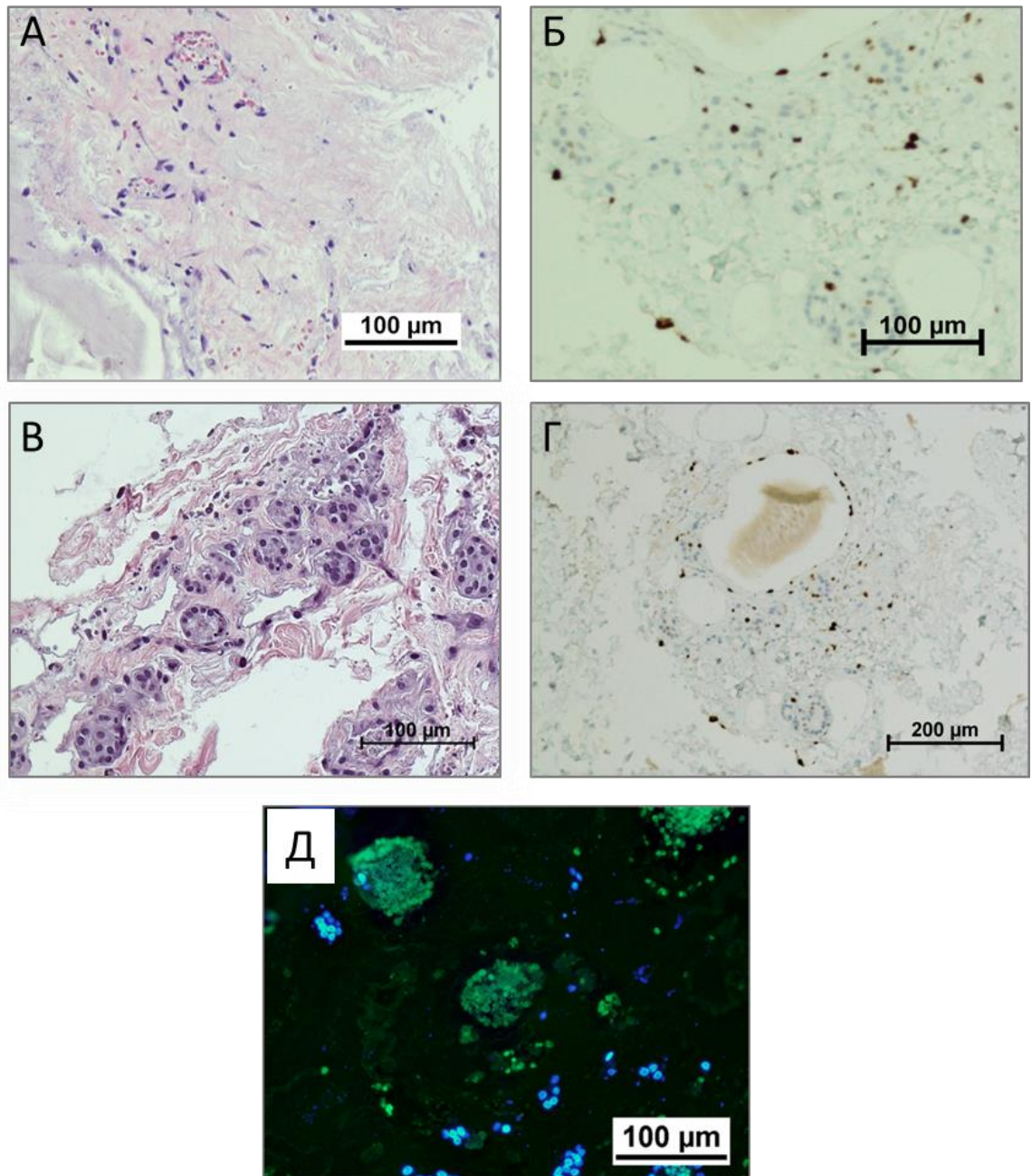


Рисунок 50 - Первичная 3D-культура ТЦ человека, А, Б – 4-е сутки культивирования; В, Г, Д – 7-е сутки культивирования; А, В – окраска Г-Э; Б, Г – реакция с антителами к Ki-67, Д – реакция с АТ к Oct3/4 (зеленая окраска – Oct 3/4, синяя окраска – ядра ТЦ, DAPI).

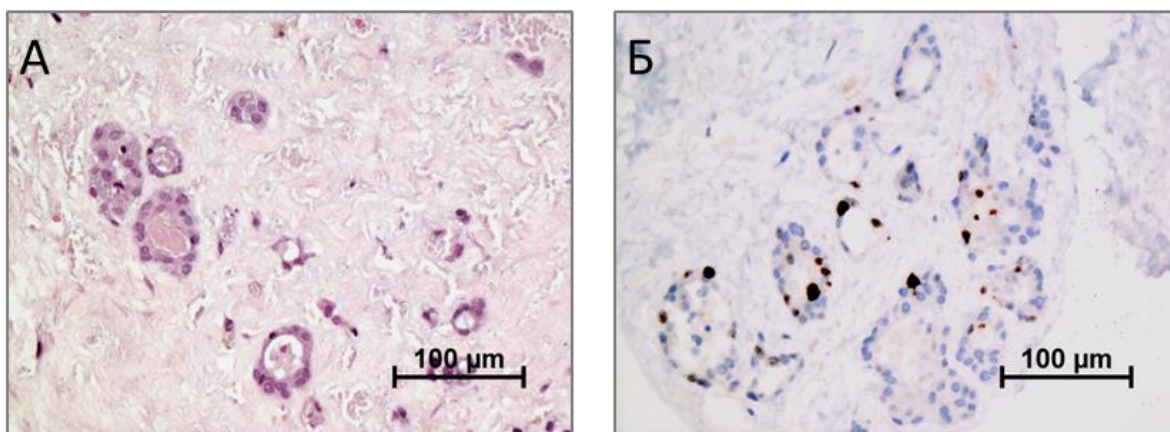


Рисунок 51. Первичная 3D–культура ТЦ человека, 2,5 мес. культивирования; А – окраска Г-Э, Б – реакция с АТ к Ki-67.

Через 4,5 месяца культивирования на уровне рутинной гистологии картина не изменилась – в геле все так же визуализировались клеточные ассоциаты и фолликулоподобные структуры, однако, в отличие от предыдущих сроков, цитопlasма клеток и содержимое фолликулов давали положительную реакцию с антителами к ТГ (Рис. 52).

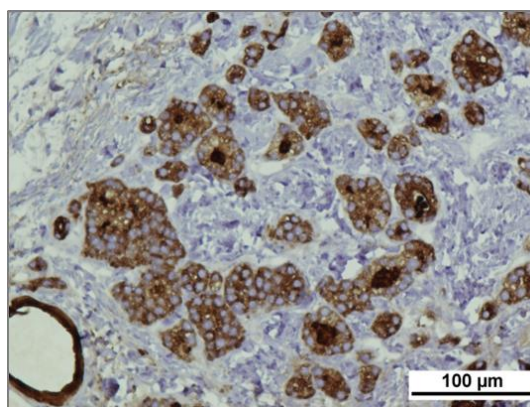


Рисунок 52 - Первичная 3D–культура ТЦ человека; 4,5 мес. культивирования; реакция с АТ к ТГ.

Таким образом, в разработанной системе для 3D-культивирования в фибриновом геле на основе ЛТ человека наблюдается быстрая (за 7 дней) селекция минорной субпопуляции ТЦ, способных к пролиферации и обогащенной фракцией стволовых/прогениторных клеток. При 3D-

культивировании эта субпопуляция спонтанно формирует активные ТФ, о чем свидетельствует 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 [7]. Соответственно, и количество образующихся ТФ столь мало, что использовать их в качестве материала для 3D-биопринтинга ЩЖ не представляется целесообразным [8].

Учитывая полученные результаты, на следующем этапе были предприняты попытки культивирования в 3D-системе (гель на основе ЛТ человека, на границе раздела воздух-гель) функциональных единиц ЩЖ человека – ТФ, также выделенных из фрагментов нормальной ЩЖ, полученной при оперативных вмешательствах по поводу РЩЖ.

3.4.2. 3D-культивирование ТФ человека на границе раздела гель-воздух

Представленные ниже данные – результат систематизации исследований, динамики роста ТФ, изолированных из образцов нормальной ткани ЩЖ пациентов. Общий вид ТФ, выделенных из ткани ЩЖ и очищенных на серии сит от крупных фрагментов ЩЖ и одиночных ТЦ (раздел «Материалы и методы») представлен на Рис. 53.

Видно, что ТФ сепарированы друг от друга, имеют округлую или близкую к таковой форму и различаются по размерам. Далее исследовали «поведение» и функциональную активность ТФ человека в динамике культивирования (до 4-х месяцев) в геле на основе ЛТ, осуществляя визуальный контроль, оценку общего количества и размеров ТФ, а также количество их контактов друг с другом.

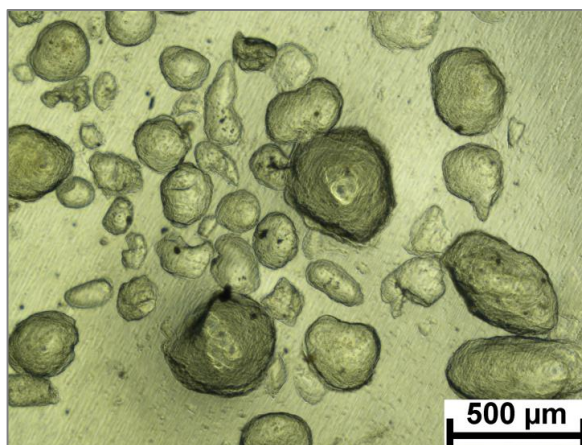
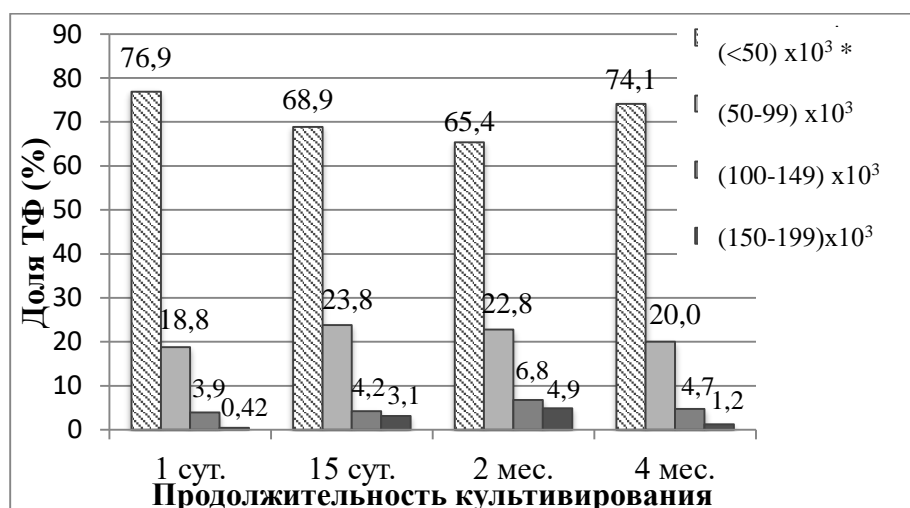


Рисунок 53 - Общий вид ТФ на первые сутки культивирования в геле на основе ЛТ

Доминантную группу на всех сроках культивирования составляли ТФ с площадью до 50×10^3 мкм². ТФ с размерами, превышающими 100×10^3 мкм², были единичными (Рис. 54). Диаметр ТФ здорового взрослого человека находится в диапазоне 200-300 мкм. Поэтому мы более детально проанализировали распределение ТФ по площади в первом диапазоне (до 50×10^3 мкм²), учитывая тот факт, что размеры ТФ нормальной ЩЖ человека также находятся в этом диапазоне.



* площадь ТФ, мкм²

Рисунок 54. Распределение ТФ по размерам в динамике культивирования в геле на основе ЛТ на границе раздела сред

Для наглядности представления результатов на Рис. 54 кривые распределения ТФ по размерам даны попарно – в предыдущий и в последующий сроки наблюдения. Мы обозначали «мелкими» ТФ, диаметр которых не превышал $9,9 \times 10^3$ мкм, «средними» - с диаметром в диапазоне $(10,0 - 34,9) \times 10^3$ мкм и «крупными» - с диаметрами, превышающими $35,0 \times 10^3$ мкм Рис. 55). Для упрощения восприятия всем размерам ТФ были присвоены ранги - с 1 по 11 (Табл. 14).

Таблица 14 - Распределение ТФ по размерам в динамике культивирования

Ранг размера ТФ (рис. 2)	Площадь ТФ, ($\times 10^3$) мкм ²	Доля ТФ (в %) с данным размером в разные сроки культивирования				Примечание
		1 сут.	15 сут.	2 мес.	4 мес.	
1	$\leq 4,9$	8,1	1,5	2,7	6,4	Мелкие ТФ
2	5,0 - 9,9	19,6	18,1	9,7	17,6	
3	10,0 - 14,9	14,6	15,0	18,6	13,6	Средние ТФ
4	15,0 - 19,9	11,8	9,0	9,7	8,0	
5	20,0 - 24,9	12,7	10,5	8,0	6,4	
6	25,0 - 29,9	12,3	10,5	7,1	12,0	
7	30,0 - 34,9	9,1	14,3	11,5	9,6	
8	35,0 - 39,9	5,0	6,0	12,4	9,6	Крупные ТФ
9	40,0 - 44,9	5,0	9,0	6,2	8,8	
10	45,0 - 49,9	1,8	6,0	9,7	8,0	
11	$\geq 50,0$	0,0	0,0	4,5	0,0	

Детальный анализ Рис. 54 и Табл. 10 показал, что на протяжении двух месяцев культивирования количество мелких ТФ убывает (15 дней vs 1 день для 1 и 2 диапазонов размеров и 2 мес. vs 15 дней для 2 диапазона). Количество крупных ТФ (ранги размеров 8 - 11) первые два месяца возрастает (за исключением ранга 9); кроме того, появляются ТФ в диапазоне 11. В «среднем» диапазоне размеров (3 – 7 ранги) наблюдается рост количества ТФ в третьем, падение в четвертом, пятом и шестом, и рост в начале и далее снижение количества ТФ в седьмом диапазоне.

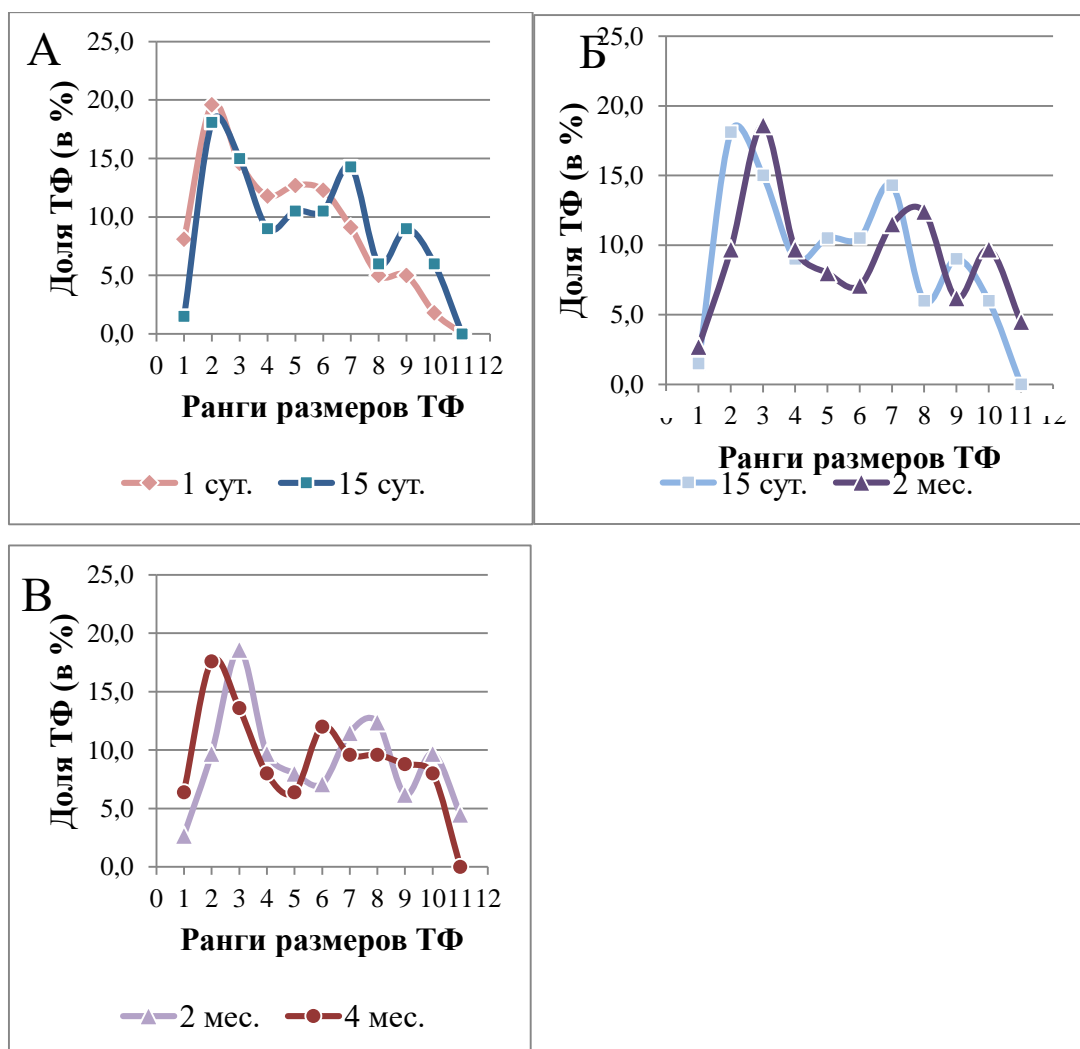


Рисунок 55 - Изменение распределения ТФ по размерам в динамике культивирования

Таким образом, в целом динамику ТФ на протяжении двух первых месяцев культивирования можно представить себе как постепенное увеличение размеров ТФ, которые вследствие этого «переходят» из разряда «мелких» в разряд «средних», и, далее – в разряд «крупных». Косвенным подтверждением правомерности такой интерпретации представленных результатов служат данные иммуногистохимического исследования Ki-67, свидетельствующие о наличии пролиферирующих клеток в стенках ТФ через 2 месяца культивирования. Как правило, в стенке ТФ на срезе выявлялось от 1 до 5 пролиферирующих клеток. Некоторые ТФ были Ki-67 – негативными (Рис. 56).

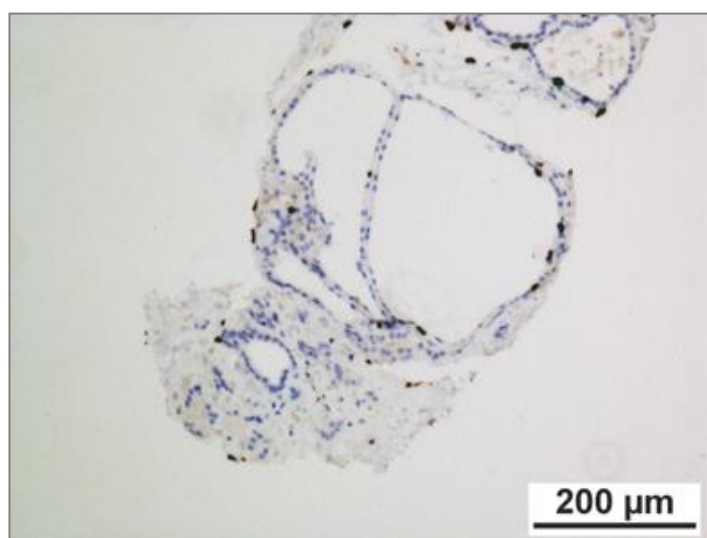


Рисунок 56 - Визуализация Ki-67 - позитивных клеток в стенке ТФ через 2 месяца культивирования.

Иная картина наблюдалась в последующие 2 месяца культивирования (рис. 55, табл. 12). Для этого этапа суммарно было характерно снижение доли крупных (размеры 8 ранга и выше) и средних (размеры 3 - 7 рангов) ТФ. При этом доля мелких (1 - 2 ранги размеров) ТФ возрастала. Такая динамика не противоречит предположению о почковании ТФ. Действительно, изменение распределения ТФ по размерам в динамике культивирования можно было бы объяснить почкованием крупных ТФ с образованием средних и мелких и почкованием средних – с образованием мелких.

Однако это предположение оказалось неверным. Так, при соединении сфотографированных полей зрения на разных сроках культивирования ТФ, и их сопоставлении удалось идентифицировать все ТФ на трех сроках культивирования - 15 суток, 2 месяца и 4 месяца (Рис. 57, А-Г). Установлено, что абсолютно все ТФ сохраняются на всех сроках культивирования до 4 месяцев, и новых ТФ не образуется. Изменение же распределения ТФ по размерам в динамике культивирования вероятно обусловлено тем, что по крайней мере часть из них увеличивается в размерах в сроки культивирования до 2 месяцев, сохраняя достигнутые размеры в сроки до 4 месяцев культивирования. Действительно, большая часть (52 из 60) ТФ в период с 15 суток до 2 месяцев культивирования увеличили свою площадь в среднем на $13,9 \pm 0,92\%$ (Табл. 15). Прирост отдельных ТФ существенно различался – от 1,29% до 30,89%; небольшая часть ТФ (8 из 60) несколько (в среднем на $4,71 \pm 1,5\%$) уменьшилась в размерах.

Иная картина наблюдалась при культивировании ТФ в более поздние сроки – с 2 до 4 месяцев (Табл. 15). Лишь около половины ТФ (42 из 77) увеличили свои размеры, притом незначительно – в среднем на $4,21 \pm 0,44\%$, максимальный прирост диаметра – 11,63%. Оставшиеся ТФ (35 из 77) уменьшились в среднем на $4,79 \pm 0,77\%$.

Визуальный анализ Рис. 57, подтвержденный сравнением фотографий на большем увеличении (Рис. 58), свидетельствует о том, что ТФ при длительном культивировании, кроме того, приближаются друг к другу с формированием тесных контактов.

Реальность этого процесса демонстрируется увеличением количества контактов между ТФ в динамике культивирования (Табл. 16): количество контактов на 1ТФ увеличивается с 0,175 (при «0» сроке культивирования) до 0,54 – после 120 суток эксперимента.

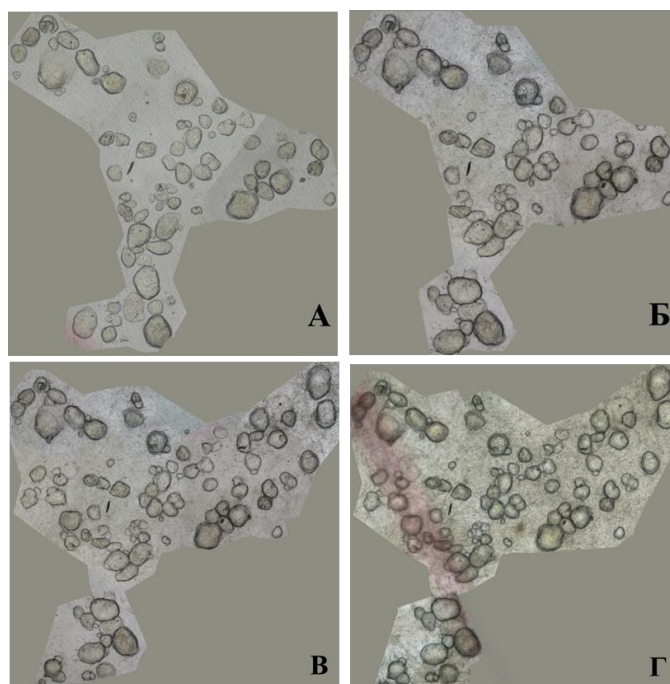


Рисунок 57 - Сопоставленные поля зрения с ТФ в разные сроки культивирования в геле на основе ЛТ: А – 0 суток; Б - 15 суток; В – 2 месяца; Г – 4 месяца.

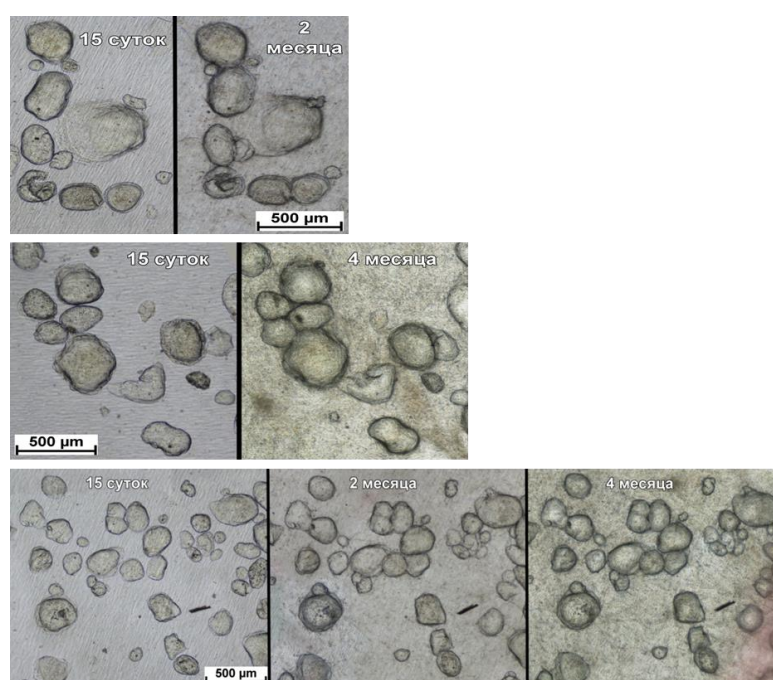


Рисунок 58 - Изменение взаимного расположения ТФ при длительном культивировании в геле на основе ЛТ.

Таблица 15 - Изменение площади ТФ в динамике культивирования в геле на основе ЛТ в сроки: 15 суток – 2 месяца и 2 - 4 месяца

Ранг размеров ТФ	Изменение площади ТФ (в %) при культивировании (в скобках – min и max прирост или убыль (с минусом))					
	Культивирование с 15 суток до 2 месяцев			Культивирование с 2 месяцев до 4 месяцев		
	Количество наблюдаемых ТФ	Уменьшение	Неизменение или увеличение	Количество наблюдаемых ТФ	Уменьшение	Неизменение или увеличение
1	29	-7,15±2,31 (-11,87 – -1,41) n=4	13,90±1,29 (1,29 – 24,68) n=25	30	-6,41±1,46 (-17,88 – -0,19) n=14	5,59±0,67 (2,23 – 11,79) n=16
2	17	-1,33±0,28 (-1,84 – -0,68) n=3	16,05±1,96 (2,92 – 30,89) n=14	30	-3,26±0,79 (-12,46 – -0,59) n=15	4,17±0,76 (0,34 – 11,63) n=15
3-5	14	-5,09 (-5,09) n=1	11,59±1,47 (3,03 – 19,19) n=13	17	-4,84±1,52 (-9,01 – -0,45) n=6	2,24±0,42 (0,43 – 4,47) n=11
Всего	60	-4,71±1,50 (-11,87 – -0,68) n=8	13,90±0,92 (1,29 –30,89 n=52	77	-4,79±0,77 (-17,88 – -0,19) n=35	4,21±0,44 (0,34 – 11,79) n=42

Таблица 16 - Количество контактов фолликулов ЩЖ в динамике культивирования в геле на основе ЛТ на границе раздела геля и воздуха

Учитываемые параметры	Сроки культивирования (сутки)			
	1	15	60	120
Количество обсчитанных полей зрения	7	10	10	10
Общее количество ТФ в полях зрения	234	193	162	170
Общее количество контактов ТФ	41	45	82	92
Количество контактов на 1 ТФ	0,175	0,23	0,51	0,54

Культивирование ТФ данной системе – в геле на основе ЛТ на границе раздела сред – сохраняет их жизнеспособность (Рис. 59) и функциональность, в частности, способность захватывать I из окружающей среды (о чем свидетельствует положительная реакция с NIS – Рис. 60).

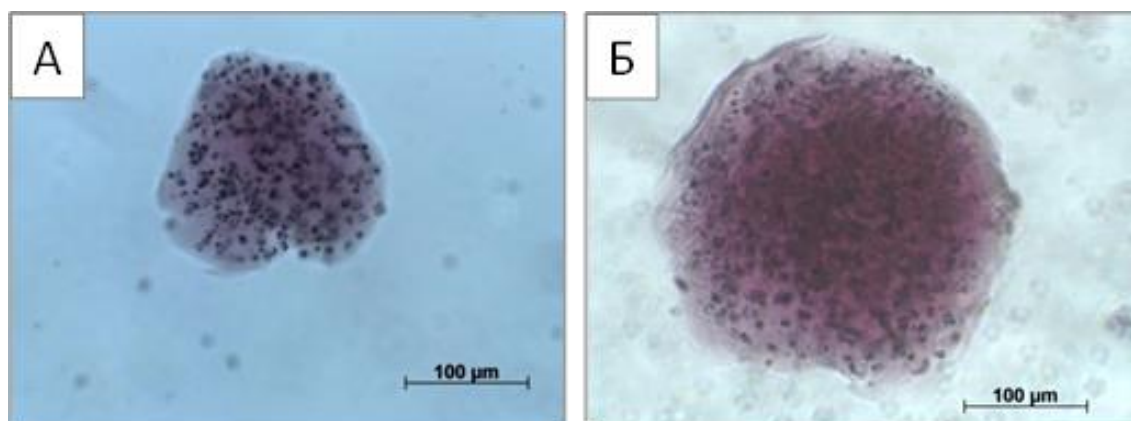


Рисунок 59 - Жизнеспособные ТЦ в ТФ при культивировании в покрытых агарозой плашках (МТТ-тест): А – 3 суток культивирования, Б – 2 месяца культивирования

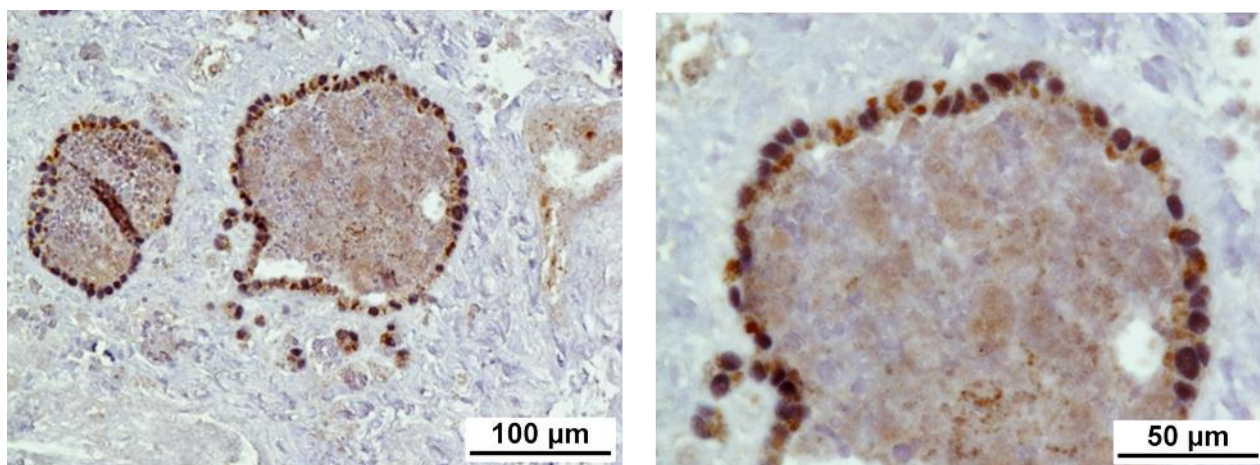


Рисунок 60 - Экспрессия NIS в культуре фолликулов ЩЖ через 4,5 месяца культивирования на мембране трансвелла в геле на основе 10% ЛТ

Таким образом, в настоящем разделе работы представлены результаты долгосрочного (до 4-х месяцев) 3D-культивирования ТФ человека в геле на основе ЛТ на границе раздела сред (гель-воздух) по разработанной методике.

Большая часть (>90%) выделенных ТФ имели «нормальные» размеры – диаметр до 300 мкм; минорная популяция ТФ была представлена более крупными ТФ. Анализ изменения распределения основной популяции ТФ в динамике культивирования не позволил исключить возможность их почкования. Однако визуальная идентификация и пересчет всех наблюдаемых ТФ в сроки культивирования до 4-х месяцев показал, что ни одного нового ТФ не образовалось, но и ни один из идентифицированных на старте эксперимента ТФ не разрушился. При этом за период до 2 месяцев культивирования большая часть (87%) ТФ увеличивалась в размерах (в среднем на 14% по площади). В период с 2 до 4 месяцев культивирования рост ТФ приостанавливался: увеличение в среднем на ~ 4% выявлено лишь у 55% ТФ, а оставшиеся 45% ТФ несколько (в среднем на ~ 5%) уменьшились.

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.

Кроме того, нами обнаружен интересный факт сближения ТФ в динамике культивирования с образованием кластеров, что подтверждено увеличением количества контактов между ними. Нельзя исключить, что описанный процесс является этапом структурной организации паренхимы ЩЖ при 3D-культивировании в геле на границе раздела сред.

Таким образом, 3D-культивирование ТФ человека в геле на основе ЛТ является адекватным подходом для сохранения их структуры и функциональности *in vitro* на протяжении по крайней мере 2-х месяцев. С этих позиций выделенные ТФ, как структурная и функциональная единица ЩЖ, вероятно, могут быть использованы в качестве материала для 3D-биопринтинга ЩЖ. Кроме того, вероятно, что данный подход можно будет использовать для «сохранения» ТФ (выделенных из участков здоровой ткани ЩЖ) после тиреоидэктомии по поводу рака ЩЖ на период лечения больного радиоактивным I. Учитывая, с одной стороны, выявление *in vitro* в ТФ пролиферирующих ТЦ, и, с другой стороны, описанную уже много лет назад физиологическую регенерацию ЩЖ после резекции [55], нельзя исключить возможности увеличения объема тиреоидной ткани после возвращения ТФ в организм больного, в частности, в составе биоинженерного конструкта ЩЖ, полученного путем 3D-биопринтинга.

3.4.3. МО ЩЖ как возможный материал для 3D-биопринтинга ЩЖ человека

МО в настоящее время рассматриваются в качестве адекватных биологических моделей для тестирования новых лекарственных препаратов, персонализированного подбора химиотерапии (если МО - из клеток опухолевой ткани), а также механизмов физиологической и репаративной регенерации тканей и органов в аспекте функционирования стволовых клеток [147,158].

Предполагается, что тканевой уровень МО обеспечивает в этой модели реакцию на внешние воздействия, сходную с таковой на уровне организма

[112]. Определенным ограничением МО культур является отсутствие кровеносной системы и, как следствие, процессы диффузии в обеспечении обмена веществ являются основными, что ограничивает размер МО до 500-600 мкм. МО, кроме того, культивируют в объеме – 3D в жидких или в гелевых полужидких средах на основе, как правило, натуральных (коллаген, фибрин и т.д.) полимеров. В то же время МО могут использоваться в технологии 3D-биопринтинга в качестве материала с исходной тканевой организацией.

Учитывая вышесказанное, была исследована возможность получения МО из ткани нормальной ЩЖ человека и их культивирования в течение нескольких суток с сохранением структуры и функциональной активности с целью последующего использования в качестве материала для 3D-биопечати конструкта ЩЖ. В качестве 3D системы для культивирования был использован гель на основе ЛТ, на поверхности которого были размещены МО. То есть культивирование МО осуществлялось на границе раздела сред гель-воздух.

Для получения МО образцы нормальной ткани ЩЖ человека измельчали ножницами, а для сепарации фрагментов заданного размера размельченную ткань фильтровали через серию сит с уменьшающимся размером пор, как описано в разделе “Материалы и методы”. Фракцию диаметром 500-600 мкм помещали на поверхность геля на основе ЛТ. Выделенные МО, таким образом, имели заданные размеры и содержали примерно 20-40 ТФ (Рис. 61, А).

Видно, что при таком способе сепарации сохранными остаются базальные мембраны ТФ, и между ТФ визуализируются фрагменты капилляров (с эритроцитами), оплетающих их в норме. Гистологические препараты (Рис. 61, Б) подтверждают сохранность структуры ЩЖ в МО.

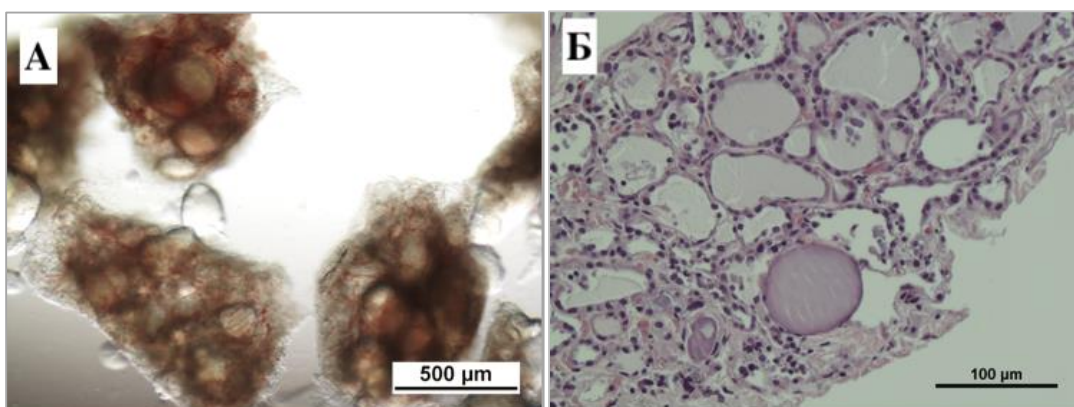


Рисунок 61 - Исходный вид МО ЩЖ человека: А – неокрашенные образцы МО в белом свете, Б – гистологический срез МО ЩЖ, окрашенный гематоксилин-эозином

3D-биопринтинг предполагает необходимость сохранения биоматериала функционально полноценном виде в течение 1-2 суток до печати. Поэтому была оценена жизнеспособность ТЦ в ТФ в составе МО культур через 2 суток культивирования. Показано, что МО сохраняли внешний вид, сходный с таковым сразу после выделения (Рис. 62 А). Окраска с использованием набора реагентов Live-Dead показала, что большая часть ТЦ в ТФ в составе МО - живые; отдельные мертвые клетки выявлены лишь по периферии МО (Рис. 62 Б, В).

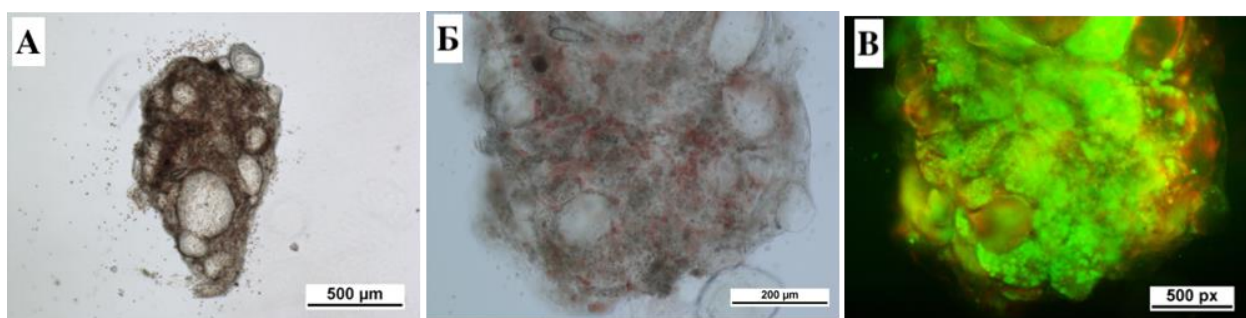


Рисунок 62 - МО из ЩЖ человека через 2 суток культивирования в ЛТ геле на границе раздела сред; А – образец МО при фазовом контрастировании; Б – образец МО в белом свете; В – образец МО, окрашенный с использованием набора Live-Dead (зеленая окраска – живые клетки, красная – мертвые клетки, флуоресценция)

Параллельно мы исследовали естественную эволюцию МО ЩЖ человека *in vitro*. В этих сериях экспериментов МО помещали на полупроницаемую мембрану культуральной вставки Transwell, далее заполняли нижнюю камеру и покрывали МО ростовой средой, обогащенной 10% ЛТ, то есть культивирование МО происходило в жидкой среде на границе раздела жидкость-воздух.

Было установлено (Рис. 63), что на протяжении 21 суток культивирования МО сохраняют фолликулярную структуру. Между ТФ визуализируются многочисленные капилляры и редкие С-клетки. Уже к 14 суткам вокруг МО начинает развиваться малоклеточная соединительная ткань, которая к 21 суткам объединяет все МО в единую структуру (Рис. 63 А1-А3). Формирование соединительнотканной стромы вокруг МО, вероятно, происходит благодаря деятельности фибробластов из стромы МО, которые в формирующемся конструкторе располагаются по его периферии (Рис. 63, В¹).

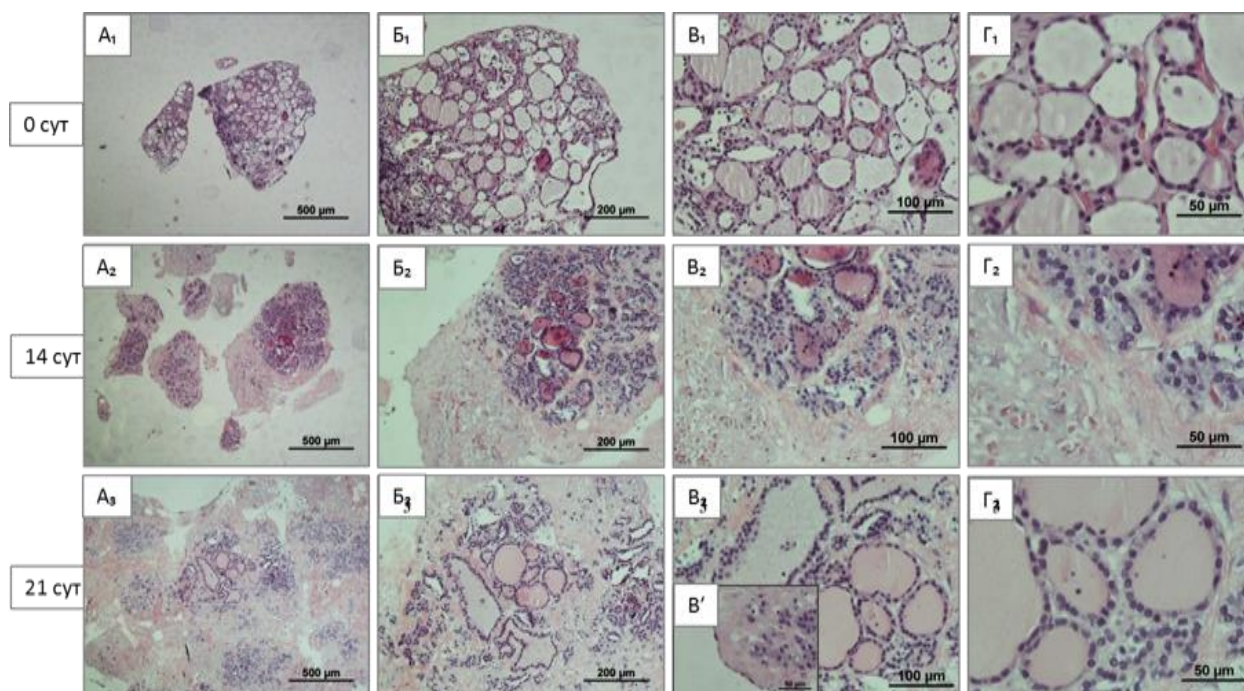


Рисунок 63 - Спонтанное формирование соединительнотканной стромы вокруг МО *in vitro* на мембране трансвелла на границе раздела жидкой и воздушной сред; окраска – гематоксилин-эозин; А – х40, Б – х100, В, В' – х200, Г– х400; 0, 14, 21 сутки культивирования.

Формирование коллагена вокруг МО доказано гистохимической окраской по Массону (Рис. 64). Очевидно, что количество соединительной ткани вокруг МО ЩЖ со временем нарастает, визуализируется ее волокнистый характер и малоклеточность.

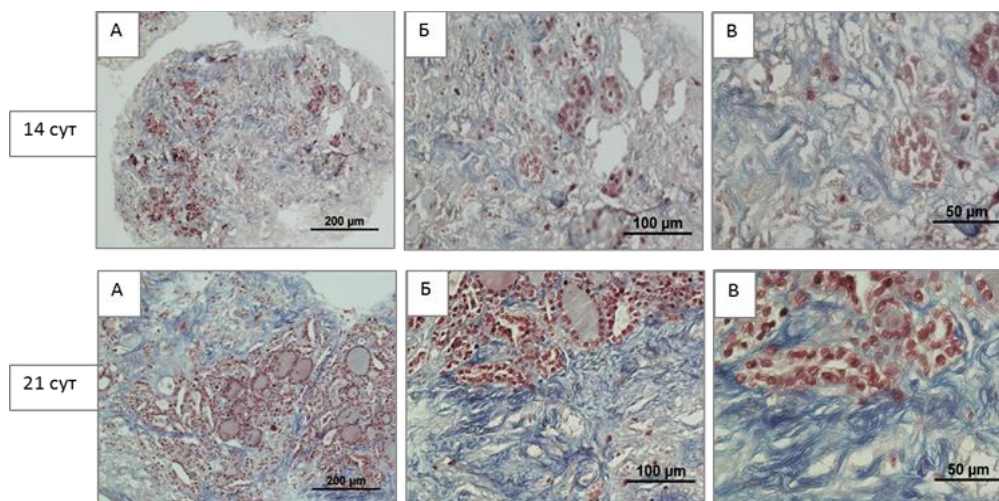


Рисунок 64 - Формирование соединительнотканной стромы вокруг МО ЩЖ в процессе культивирования. Окраска: по Массону с анилиновым синим. Сроки культивирования: 14, 21 сутки; А – х100, Б – х200, В – х400.

Исходно в МО Кі 67 – позитивные клетки не визуализировались (рис.65, 0 суток). Однако к 14 суткам среди ТЦ в составе ТФ выявлялись Кі-67–позитивные пролиферирующие клетки (Рис. 65, 14 суток), количество которых к 21 суткам несколько увеличивались (Рис. 65, 21 сутки). Интересно, что пролиферирующими оказались и фибробластоподобные клетки по периферии формирующегося конструкта ЩЖ (Рис. 65, 21сутки').

Функциональная сохранность ТФ в МО и формирующемся конструкте ЩЖ доказывается их способностью захватывать I из окружающей среды (Рис. 66) и синтезировать ТГ (Рис. 67). Действительно ТЦ в ТФ оказались NIS положительными (Рис. 66), что позволило им синтезировать ТГ (Рис. 68), а также активизировать этот синтез в ответ на добавление на 14 сутки естественного стимулятора ТЦ – ТТГ (Рис. 67, 21' сутки).

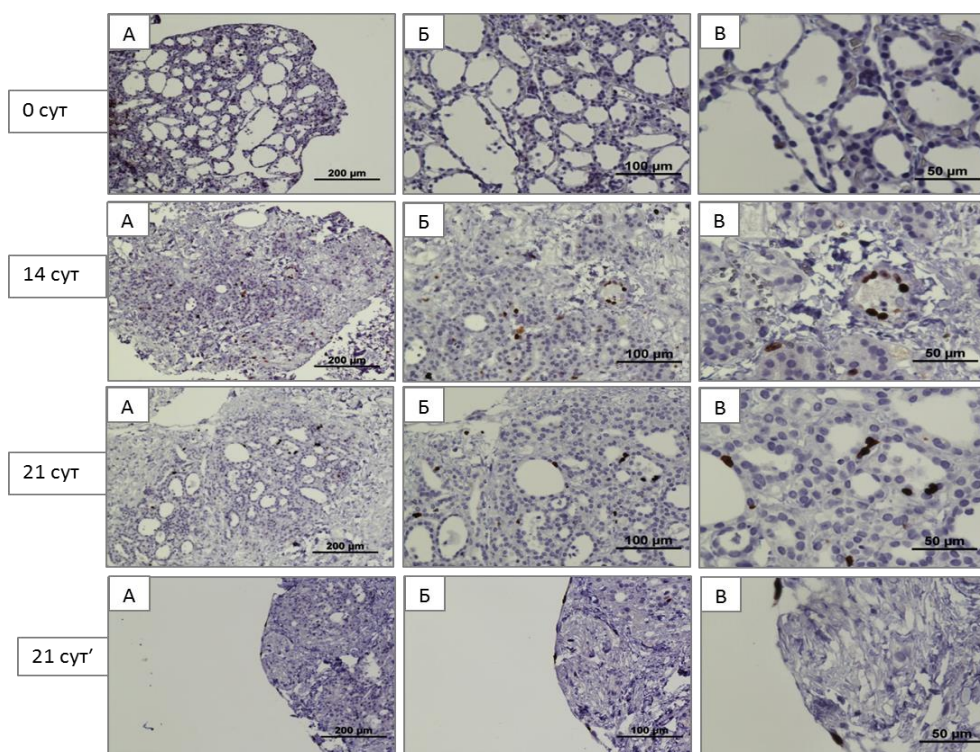


Рисунок 65 - Визуализация пролиферирующих (Ki67+) клеток в формирующемся *in vitro* конструкте ЩЖ человека. Сроки культивирования – 0, 14, 21 сутки; А – x100, Б – x200, В – x400.

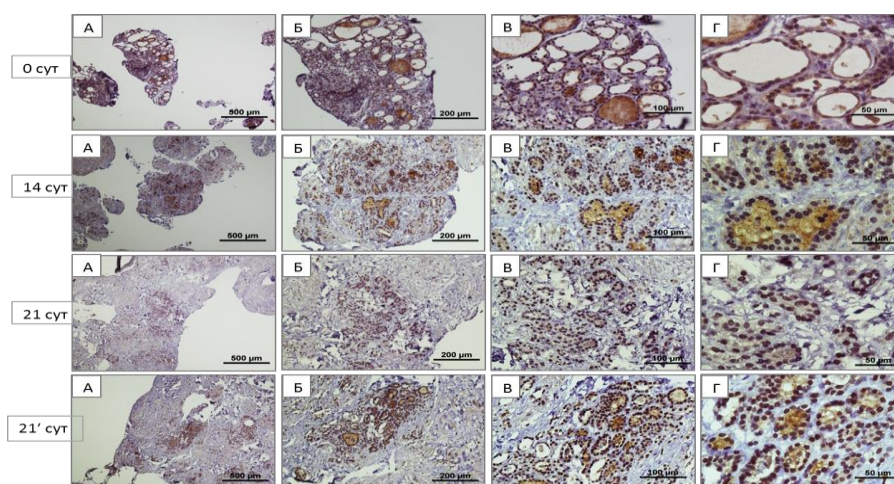


Рисунок 66 - Визуализация NIS-положительных клеток в формирующемся *in vitro* конструкте ЩЖ человека. Сроки культивирования: 0, 14, 21 сутки, 21' сутки (после добавления на 14 сутки ТТГ); А – x40, Б – x100, В – x200, Г – x400

Необходимо отметить, что визуальная экспрессия NIS в ответ на добавление на 14 сутки ТТГ также увеличивалась (Рис. 66, 21' сутки).

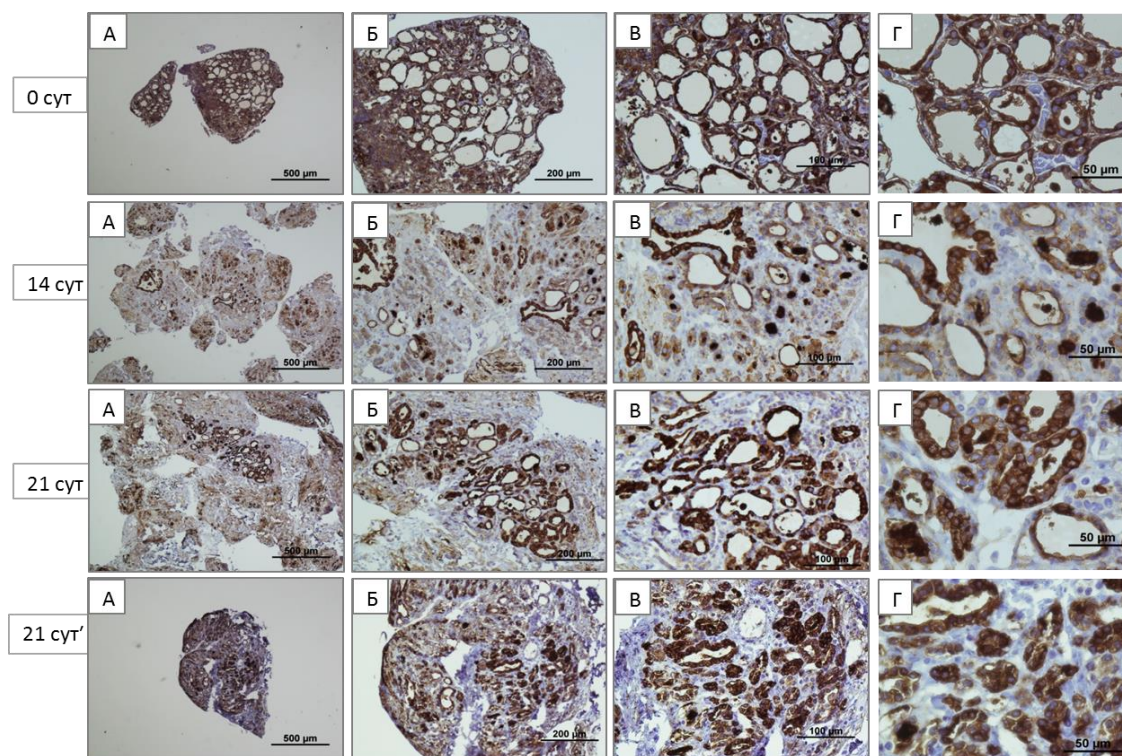


Рисунок 67 - Визуализация ТГ-положительных клеток в формирующемся *in vitro* конструкторе ЩЖ человека. Сроки культивирования: 0, 14, 21 сутки, 21' сутки (после добавления на 14 сутки к культуре ТТГ); А – х40, Б – х100, В – х200, Г – х400

Таким образом, разработана оригинальная система для долгосрочного 3D-культивирования фрагментов ЩЖ человека – МО на границе раздела жидкой среды (обогащенной 10% ЛТ) и воздушной среды. В этой системе происходит спонтанная структурная организация стромы ЩЖ с объединением функционально активных МО в единый конструктор. МО ЩЖ человека сохраняют жизнеспособность и функциональность при 3D-культивировании в среде с ЛТ и могут быть апробированы в качестве материала для 3D-биопринтинга ЩЖ человека.

3.4.4. 3D-биопринтинг конструкта ЩЖ человека с использованием микроорганизмов в качестве материала для биопечати

На предыдущих этапах исследования были подобраны условия и разработаны составляющие для апробации 3D-биопринтинга на модели ЩЖ человека. Так, отработаны технологии: 3D-биопечати разными гелями, изготовления тканевых сфероидов и 3D-биопечати сфероидами из клеток разных типов, выделения ЭЭ ЩЖ мыши и АЛЛ и показана принципиальная возможность путем 3D-биопечати сформировать функционально активный конструкт ЩЖ мыши на основе эмбриональных тканей. Параллельно разрабатывалась методология культивирования ТЦ, ТФ и МО ЩЖ человека для следующего этапа апробации разработанных подходов к 3D-биопринтингу ЩЖ человека.

В качестве биообъектов для 3D-биопринтинга тканеинженерной конструкции ЩЖ человека были выбраны МО ЩЖ–тканевые фрагменты, содержащие от 20 до 40 ТФ каждый, являющиеся аналогами тканевых структурных единиц ЩЖ - тиреонов. При 3D-биопринтинге последовательно печатали: тонкую коллагеновую подложку (коллагеновую решетку), далее в каждую ее ячейку биопринтер вносил по 1 МО и далее эти МО путем биопечати покрывались слоем коллагенового геля, оказываясь как бы «замурованными» в ячейках решетки. Этап пост-процессинга осуществляли в инкубаторе, в условиях высокой влажности при $t=37^{\circ}\text{C}$, где напечатанные конструкты «дозревали» в течение 3-х суток в питательных средах без внешних воздействий.

Общий вид решетки, напечатанной из коллагена, представлен на Рисунке 68. Видна правильная периодичность расположения ячеек для МО с расстояниями между ними 600 мкм.

Через 3 суток культивирования МО ЩЖ в конструкте сохраняли исходную структуру – визуализировалась большая часть ТФ, которые содержали в просвете гель с ТГ (Рис. 69).

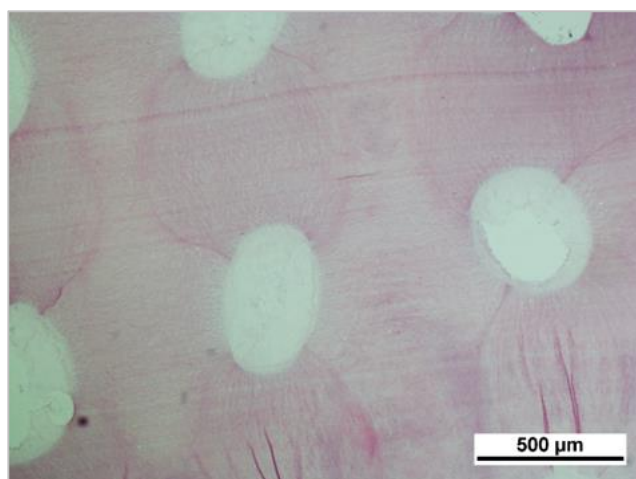


Рисунок 68 - Напечатанная решетка из коллагена с ячейками для МО ЩЖ, х40

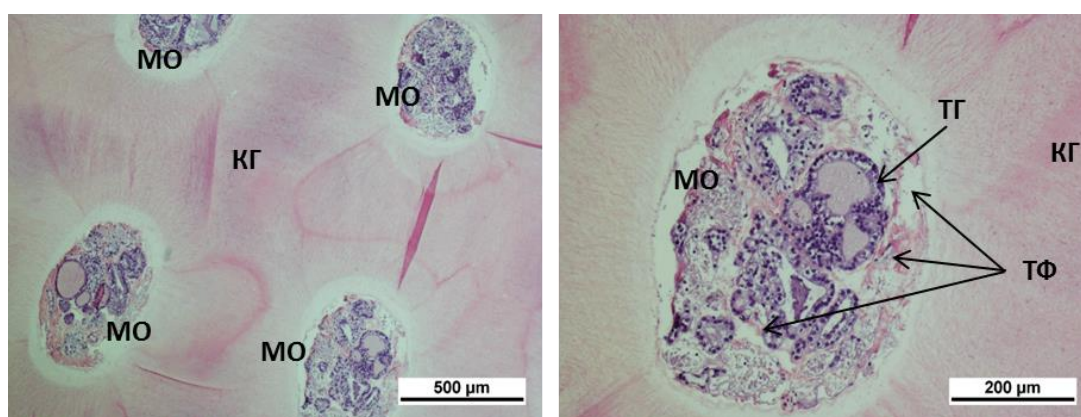


Рисунок 69 - МО ЩЖ человека в 3D-конструкте через 3 суток постпроцессинга. КГ– коллагеновый гель, МО – микроорганичные культуры ЩЖ, ТГ– тиреоглобулин, ТФ – тиреоидные фолликулы

Также были проведены дополнительные эксперименты по исследованию возможностей слияния МО ЩЖ в 3D–конструкте. Для данных исследований были напечатаны решетки с расстоянием в 200 мкм между ячейками в коллагеновом геле. После 3-х дней дозревания таких конструктов в отдельных случаях наблюдали подобие слияния МО (Рис. 70). Структура ТФ МО в эти сроки оставалась сохранной.

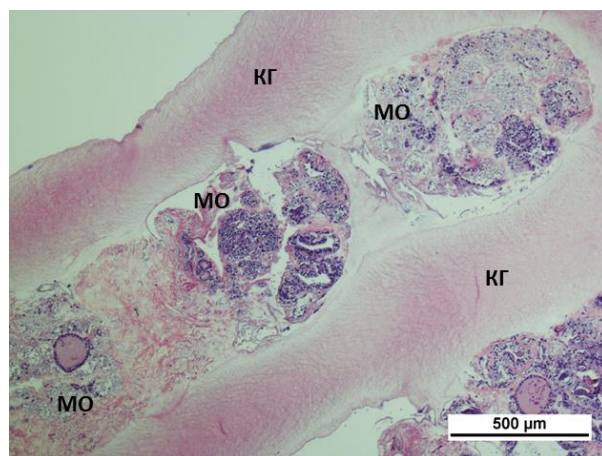


Рисунок 70 - МО ЩЖ человека в 3D-конструктах с часто расположенными ячейками; КГ – коллагеновый гель, МО – микроорганичные культуры ЩЖ

К сожалению, проводить более длительные эксперименты после 3D-биопечати конструктов не представлялось возможным, так как отсутствие их кровоснабжения *in vitro* приведет к естественной гибели клеток. Не представлялось возможным и трансплантировать эти конструкты (для проверки их функциональной полноценности) иммунодефицитным животным, так как этого необходимо было подавить функцию их собственной ЩЖ I^{131} , что, по данным литературы, они не перенесут. Именно поэтому функциональную полноценность конструктов ЩЖ человека, полученных путем 3D-биопечати, мы, как описано в предыдущем разделе работы, оценили косвенно, исследовав их способность захватывать I (по экспрессии NIS), синтезировать ТГ (по экспрессии ТГ), 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 конструктов 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 конструкта щитовидной железы.

Работа была проведена с применением оригинального биопринера 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.

Для выполнения данной работы для биопринтера Fabion было специально создано программное обеспечение. Данный биопринтер способен печатать конструкты с максимальными размерами по осям x-y-z – 4,5 x 3,5 x 15 см с точностью позиционирования 5,0 мкм, используя гидрогели с диапазоном вязкости 0,001 – 800кПа с разными типами полимеризации (термочувствительной, фоточувствительной, pH-чувствительной), с минимальным размером биологических объектов (сфероидов, МО) – 0,1 мм, с максимальной скоростью диспенсирования – 0,771 мм/с.

На первом этапе исследования была разработана технология печати гидрогелевой подложки. С использованием тестовой структуры была апробирована как печать полимером искусственного происхождения (Pluronic F-127), так и органическими полимерами природного происхождения - желатином и коллагеном. В результате исследования показано, что при печати материалом Pluronic F-127, линии, составляющие первый слой тестовой структуры, имели большую толщину в сравнении с линиями последующих слоев. Это связано с охлаждением материала по завершению печати, при этом, вероятно, снижается вязкость гидрогеля и деформируется геометрия напечатанного слоя. То есть первый слой при печати деформировался под давлением со стороны последующих слоев, что приводило к некоторому искажению структуры относительно заданной 3D-модели. При печати желатином толщина всех линий в напечатанном объекте оказалась больше, чем заданная в модели, что приводило к значимому уменьшению размера ячеек в решетке. Соответственно неоднородность структуры гидрогеля на основе желатина, а также высокая клейкость не позволили воспроизводить сложные геометрические формы с необходимой точностью. В то же время коллаген продемонстрировал приемлемые для биопечати свойства. При его использовании в местах соприкосновения геометрических элементов происходило слияние материала, что приводило к неразличимости отдельных слоев и созданию однородной конструкции. Это позволяло печатать сложные геометрические формы с необходимой точностью. Кроме того,

использованный коллаген является органическим полимером природного происхождения, химически очищенным от примесных белков и гликопротеидов, что минимизирует вероятность развития аллергических и воспалительных реакций на конструкты после их имплантации *in vivo*. Таким образом, данный полимер и подход позволяет печатать сложные геометрические формы с необходимой точностью. Далее специально для печати коллагеном была разработана система охлаждения форсунки и нагревания платформы для улучшения полимеризации. Данная система позволила использовать коллагеновый гидрогель с физиологическим рН (7.2-7.4) и предотвращала преждевременное затвердевание коллагена за счет охлаждения емкости форсунки (4°C). Полимеризация гидрогеля начиналась при изменении температуры после его попадания на поверхность ч. Петри, находившейся на специальной подогреваемой платформе (23°C), что приводило к образованию стабильной заданной коллагеновой структуры.

В качестве биологических объектов для биопечати были использованы тканевые сфероиды. Для получения тканевых сфероидов и стандартизации их диаметра были апробированы три методики – «висячей капли», с применением агарозных микромолдов и 96-ти луночных плашек с низкоадгезивной поверхностью. Апробацию технологии формирования сфероидов осуществили для нескольких видов клеток – первичных фибробластов человека, первичных хондроцитов барана, ММСК жировой ткани человека, миобластов линии L6, иммортализованных клеток эпителия почки линии НЕК293, а также ЭЭ щитовидной железы мышей линии CD-1. Исследованы форма, размеры, морфология сфероидов, жизнеспособность составляющих их клеток, а также их механические свойства в процессе краткосрочного (до 9 суток) культивирования. Исходно были сформированы сфероиды, содержащие от 1 тыс. до 27 тыс. клеток.

Показано, что сфероиды из различных типов клеток исходно содержащие 1 - 27 тыс. клеток на протяжении 9 суток культивирования сохраняли сферическую или приобретали эллипсоидную форму. Для одних типов

клеток показано некоторое увеличение размеров сфероидов, для других – уменьшение, что может быть связано как с их констрикцией, так и с разрыхлением. Однако снижение прочности (упругости) сфероидов в динамике культивирования в норме не зарегистрировано. В зависимости от типа клеток их исходный модуль Юнга составлял 0,2 – 3,0 кПа, и при их созревании либо несколько возрастал (максимально – до 5,4 кПа), либо не изменялся.

Метод «висячей капли» с использованием Hanging drop plate продемонстрировал возможность округления ЭЭ для последующего их использования в качестве материала для биопечати. Метод с использованием агарозных реплик показал возможность получения сфероидов в большом количестве при относительно небольших затратах. Метод получения тканевых сфероидов с использованием 96-луночных плашек с малоадгезивной поверхностью продемонстрировал возможность стандартизации размеров сфероидов, что является безусловным преимуществом для использования их в качестве печатного материала.

Исследование жизнеспособности клеток в сфероидах в динамике культивирования было необходимо для того, чтобы оценить каковы могут быть максимальные сроки передержки сфероидов *in vitro* до использования их в процессе биопечати. Было показано, что изменение доли жизнеспособных клеток в сфероидах зависит от типа клеток, их исходного размера и количества клеток в сфероидах. Но в целом на протяжении трех суток культивирования не менее 80% клеток в сфероидах оставались живыми.

Фундаментальным биологическим принципом, лежащим в обосновании использования тканевых сфероидов для создания трехмерных органных конструкторов путем 3D-биопечати, является феномен тканевого слияния. Поэтому мы исследовали распластывание сфероидов, миграцию из них клеток и их слияние друг с другом. При использовании, например, в качестве подложки для сфероидов электроспиннингового матрикса из полиуретана было показано открепление и миграция на волокна матрикса клеток

сфероидов соединительнотканного происхождения, в то время как клетки эпителиального происхождения оставались в структуре сфероидов более продолжительное время.

При анализе распластывания и слияния сфероидов для их удержания рядом друг с другом их помещали на разные поверхности: низкоадгезивную поверхность, полиуретановый матрикс или культуральный пластик. Распластывание и слияние фиксировали морфологически; дополнительно измеряли длину дуплета или триплета сфероидов и фиксировали угол их слияния. Распластывание и слияние сфероидов из разных типов клеток (включая ЭЭ ЩЖ мыши) наблюдали на всех подложках, что еще раз доказывает универсальность данного биологического явления. Эти процессы начинались уже в первые сутки и заканчивались (в зависимости от типа клеток в сфероидах) к 5-7 суткам. Необходимо отметить тот факт, что сфероиды при длительном (более 7 дней) культивировании (после формирования) сливались достоверно медленнее.

Таким образом на первых этапах работы был подобран гидрогель (высокоочищенный коллаген I типа) для 3D-биопечати, апробированы три способа формирования сфероидов, установлено максимально возможное время передержки тканевых сфероидов после формирования (до 3 суток) для использования их в технологии 3D-биопринтинга и время слияния сфероидов в единую конструкцию (5-7 суток). То есть были исследованы все компоненты для 3D-биопечати, подобраны и апробированы условия. Это позволило на следующем этапе работы применить разработанную технологию для создания функционально активного конструкта щитовидной железы мыши. При её биопринтинге были использованы два вида тканевых сфероидов – из ЭЭ ЩЖ, изолированных на сроке беременности мышей 14,5 дней (когда идет активный фолликулогенез с васкуляризацией эмбриональной ткани ЩЖ), и АЛЛ, выделенных на сроке беременности мышей 8,5 дней (когда в АЛЛ находится наибольшее количество эндотелиальных прогениторов) – для облегчения васкуляризации напечатанного конструкта ЩЖ. При созревании конструктов

после 3D-биопринтинга было показано слияние сфероидов ЭЭ ЩЖ и АЛЛ, пролиферация клеток в конструктах, локализация эндотелиальных прогениторов вокруг эпителиальных клеток и васкуляризация развивающихся ТФ именно за счет эндотелиальных прогениторов. Напечатанные конструкты были имплантированы под капсулы почек мышей с предварительно (за 8 недель до имплантации) нокаутированной щитовидной железой (достигнут стойко нулевой уровень T_4). Через 5 недель после имплантации уровень T_4 мышей поднялся в среднем до половины исходного, а температура тела (которая на фоне введения I^{131} снизилась в среднем на $2^{\circ}C$) – нормализовалась. Гистологическими исследованиями подтверждены приживание и васкуляризация напечатанного 3D-конструкта ЩЖ: наблюдалась ее фолликулярная структура с накоплением коллоида в полостях тиреоидных фолликулов и формированием капиллярной сети.

Таким образом, напечатанные конструкты щитовидной железы *in vivo* компенсировали гипотиреоз, подтвердив свою функциональность. Полученные результаты явились основанием для разработки подходов к созданию конструктов щитовидной железы человека.

Основной проблемой в этом аспекте является биологическая составляющая. В качестве адекватного биологического материала для использования в технологии 3D-биопринтинга теоретически можно использовать сфероиды из ТЦ, ТФ или небольшие отдельные МО щитовидной железы. Состояние исследований в этой области описано в обзоре литературы. Очевидно, что технологии полноценного культивирования ТЦ человека, ТФ и МО – отсутствуют. Однако, исходя из анализа результатов исследований, одной из наиболее перспективных следует признать технологию 3D-культивирования в гелях на границе раздела гель-воздух. В настоящей работе апробирована технология культивирования ТЦ, ТФ и МО ЩЖ человека в геле на основе ЛТ, полученном по оригинальной технологии.

Одиночные ТЦ, ТФ и МО ЩЖ выделяли из фрагментов нормальной ЩЖ, полученных после тиреоидэктомии у больных раком ЩЖ.

В разработанной системе 3D-культивирования в геле на основе ЛТ человека наблюдалась быстрая селекция SP (не более 5% от всех клеток) ТЦ, способных к пролиферации и обогащенных фракцией стволовых клеток. Эта субпопуляция спонтанно формировала ТФ с правильной полярностью ТЦ и их функциональной активностью (способностью пролиферировать, захватывать I из внешней среды и синтезировать ТГ) даже через 4,5 месяца культивирования. 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. А сфероиды, изготовленные из ТЦ, оказались нестабильными - распадались через 1-2 суток после формирования, а большая часть ТЦ в них погибала.

При 3D-культивировании до 4,5 месяцев ТФ (выделенных из ткани ЩЖ человека), на границе раздела жидкость-воздух в них сохранялась жизнеспособность ТЦ, их составляющих, и функциональность, в частности, способность захватывать I из окружающей среды. С этих позиций выделенные ТФ, как структурная и функциональная единица щитовидной железы, вероятно, могут быть использованы в качестве материала для 3D-биопринтинга ЩЖ человека. Кроме того, вероятно, что данный подход можно будет использовать для «сохранения» ТФ (выделенных из участков здоровой ткани ЩЖ) после тиреоидэктомии по поводу рака ЩЖ на период лечения больного I¹³¹.

Также была исследована возможность использования МО, то есть микрофрагментов тиреоидной ткани, содержащих от 20 до 40 ТФ каждый в качестве возможного материала для 3D-биопринтинга ЩЖ человека. Было показано, что большая часть ТЦ в ТФ в составе МО оставались живыми, способными захватывать I и синтезировать ТГ, как минимум в течение 21 суток при 3D-культивировании в геле на основе ЛТ, и, соответственно, могут быть использованы в качестве материала для 3D-биопринтинга.

При 3D-биопринтинге прототипа ЩЖ человека последовательно печатали: тонкую коллагеновую подложку, (коллагеновую решетку), далее в каждую ее ячейку биопринтер вносил по 1 МО и далее эти МО путем биопечати покрывались слоем коллагенового геля, оказываясь как бы «замурованными» в ячейках решетки. Показано, что через 3 суток культивирования МО в конструкторе сохраняли исходную структуру – визуализировалась большая часть ТФ. В дополнительных экспериментах по исследованию МО ЩЖ в 3D-конструкторе в решетках с близко расположенными ячейками (200 мкм между ячейками) в коллагеновом геле после 3-х дней созревания в отдельных случаях наблюдали подобие слияния МО. Структура ТФ МО в эти сроки оставалась сохранной.

Таким образом, в настоящем исследовании разработаны биологические аспекты технологии 3D-биопринтинга с использованием биопринтера Fabion, созданного в компании «3D Биопринтинг Солюшенс». Эта технология апробирована путем создания функционально активного конструктора ЩЖ мышцы на основе ЭЭ и АЛЛ, а также прототипов конструкторов ЩЖ человека на основе МО ЩЖ.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика 3D-биопечати тканеинженерного конструкта 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 рН (7,2-7,4).
2. С использованием 5 типов клеточных культур исследованы свойства и поведение тканевых сфероидов, полученных тремя методами, и показана жизнеспособность не менее 80% клеток в течение 3-х 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-конструктов.
3. Разработана специальная «турникетная» система для биопринтера Fabion, позволяющая производить 3D-биопечать одиночными сфероидными.
4. Показана морфологическая и функциональная полноценность конструктов щитовидной железы мышей, полученных путем 3D- биопечати из сфероидов эмбриональных эксплантов щитовидной железы, аллантоисов мышцы 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 *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.
8. Показаны: развитие *in vitro* структуры микроорганных 3D-культур щитовидной железы человека за счет формирования внеклеточного матрикса (коллагена), пролиферация тиреоцитов и принципиальная возможность получения функциональных конструкторов щитовидной железы путем 3D-биопечати.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанную методику 3D-биопечати коллагеном с разными температурными режимами емкости форсунки и платформы рекомендуется использовать при 3D-биопринтинге разных типов конструктов.
2. При использовании для экструзионной 3D-биопечати тканевых сфероидов рекомендуемое время созревания конструкта 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	антитела
АЛЛ	аллантаис
ВКМ	внеклеточный матрикс
ИПСК	индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
КЦКН	компьютерно-цифровая система контроля
ЛТ	лизат тромбоцитов
ММСК	мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
МО	микроорганизмы культуры
МТТ	микротетразолиевый тест
ПАм	полиакриламид
ПЕМА	полигидроксиэтилметакрилат
ПНИПААм	полиизопропилакриламид
ПРС	полная ростовая среда
ПТФЭ	политетрафторэтилен
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ПЭГДА	полиэтиленгликоль-диакрилат
ПЭГДМА	полиэтиленгликоль-диметакрилат
СОК	стволовые опухолевые клетки
T ₃	трийодтиронин
T ₄	тироксин
ТГ	тиреоглобулин
ТИК	тканеинженерная конструкция
ТП	тиреоидная пероксидаза
ТТГ	тиреотропный гормон гипофиза
ТТФ-1	тиреоидный фактор транскрипции-1
ТФ	тиреоидные фолликулы
ТЦ	тиреоциты
УФ	ультрафиолет
ЩЖ	щитовидная железа

ЭСК	эмбриональные стволовые клетки
ЭТС	эмбриональная телячья сыворотка
ЭФР	эпидермальный фактор роста
ЭЭ	эмбриональные экспланты
ADMSC	adipose derived mesenchymal stem cells, мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани
BMSC	bone marrow stromal cells, стромальные клетки костного мозга
DAPI	4',6 -diamidino-2-phenylindole, 4',6 -диамидино-2- Фенилиндол
DMEM	Dulbecco 's modified Eagle medium, среда Игла в модификации Дюльбекко
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко
EMEM	minimum essential media, минимальная поддерживающая среда
FGF	fibroblasts growth factor, фактор роста фибробластов
GFP	green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок
HEK293	human embryonic kidney, клеточная линия, полученная из клеток надпочечника abortированного эмбриона человека
HEPES	4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота (буфер)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells, эндотелиальные клетки пупочной вены человека
I	йод
I ¹³¹	радиоактивный йод
IGF	insulin-like growth factor, инсулиноподобный фактор роста
LIFT	laser-induced forward transfer, лазер-индуцированный перенос вещества
MJM	multi jet modeling, метод многоструйного моделирования
NIS	sodium-iodide symporter, натрий-йод симпортер

PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule, молекула клеточной адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток
PDGF	platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста
PI	propidium iodide, пропидия йодид
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium, культуральная среда института мемориального парка Розуэлла
SP	side population, минорная популяция клеток
TDMSC	tonsil derived mesenchymal stem cells, мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из миндалина
TGF	transforming growth factor, трансформирующий фактор Роста
VEGF	vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов
VEGF	vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ТЕРМИНОВ

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КТ	компьютерная томография
МРТ	магнитно-резонансная томография
РНК	рибонуклеиновая кислота
САПР	система автоматизированного проектирования
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
AMF	additive manufacturing file format, формат файла для аддитивных технологий
CAD	computer aided design, средства автоматизированного проектирования
CAM	computer aided manufacturing, система автоматизированного производства
CJP	color jet printing, в аддитивных технологиях - метод послойного склеивания порошка
DLP	digital light processing, разновидность стереолитографии
FDA	Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США
FDM	fused deposition modeling, метод послойного наплавления
SLA	stereolithography, стереолитография
SLM	selective laser melting, прямое лазерное спекание
SLS	selective laser sintering, селективное лазерное спекание
STL	stereolithography, формат файла, широко используемый для хранения трехмерных моделей объектов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Билявская, С.Б. Характеристика первичной культуры клеток из неонатальной щитовидной железы свиней: фолликулогенез, гормональная и ростовая активность/ С. Б. Билявская, Г. А. Божок, Е. И. Легач [и др.]// Цитология. – 2013. – Т. 7, № 55. – С. 482–491.
2. Буйнов, М.А. Роботические технологии в медицине и биопринтинге: состояние проблемы и современные тенденции/ М. А. Буйнов, А. А. Воротников, Д. Д. Климов [и др.]// Вестник МГТУ «Станкин». – 2017. – Т. 1, № 40. – С. 127–131.
3. Кудан, Е.В. Распластывание тканевых сфероидов, сформированных из первичных фибробластов человека, на поверхности микроволокнистого электроспиннингового полиуретанового матрикса (сканирующее электронно-микроскопическое исследование)/ Е. В. Кудан, Ф. Д. А. Перейра, В. А. Парфенов [и др.]// Морфология. – 2015. – Т. 6, № 148. – С. 70–74.
4. Миронов, В.А. Устройство и способы печати биологических тканей и органов/ В. А. Миронов, Ю. Д. Хесуани, А. Н. Митряшкин [и др.].
5. Прохоров, А.В. Ксенотрансплантация культуры β -клеток в лечении инсулинзависимого сахарного диабета/ А. В. Прохоров, С. И. Третьяк, В. А. Горанов// Бел. мед. журнал. – 2002. – Т. 1. – С. 34–37.
6. Сергеева, Н.С. 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 конструкто/ Н. С. Сергеева, Ю. Д. Хесуани, В. А. Кирсанова [и др.]// Голова и шея. – 2017. – С. 105–106.
7. Сергеева, Н.С. Стволовые и (или) прогениторные клетки щитовидной железы и возможности их использования в тканевой инженерии/ Н. С. Сергеева, Ю. Д. Хесуани, И. К. Свиридова [и др.]// Гены и клетки. – 2018.

- Т. 13, № 2. – С. 22–24.
8. Сергеева, Н.С. Культивирование тиреоцитов тиреоидных фолликулов и микроорганных культур щитовидной железы как первый этап создания тканеинженерных конструкций/ Н. С. Сергеева, Ю. Д. Хесуани, И. К. Свиридова [и др.]// Молекулярная медицина. – 2018. – Т. 16, № 5. – С. 9–14.
 9. Сергеева, Н.С. Способ получения ростовой добавки на основе лизата тромбоцитов из тромбоцитарной массы доноров к среде для наращивания клеточной массы стволовых, прогениторных, дифференцированных и опухолевых клеток/ Н. С. Сергеева, Я. Д. Шанский, И. К. Свиридова [и др.].
 10. Третьяк, С.И. Способ получения культуры ксеногенных тироцитов для лечения гипотиреоза у человека/ С. И. Третьяк, В. А. Горанов, В. Я. Хрыщанович.
 11. Третьяк, С.И. Современные методы лечения гипотиреоза/ С. И. Третьяк, В. Я. Хрыщанович// Монография. – 2011. – С. 150.
 12. Хесуани, Ю.Д. Введение в 3D-биопринтинг: история формирования направления, принципы и этапы биопечати/ Ю. Д. Хесуани, Н. С. Сергеева, В. А. Миронов [и др.]// Гены и клетки. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 40–47.
 13. Хэм, А. Гистология/ А. Хэм, Д. Кормак. – Т. 5.
 14. Albergo, J.I. Proximal tibia reconstruction after bone tumor resection: are survivorship and outcomes of endoprosthetic replacement and osteoarticular allograft similar?/ J. I. Albergo, C. L. Gaston, L. A. Aponte-Tinao [et al.]// Clin. Orthop. Relat. Res. – 2017. – Vol. 475, № 3. – P. 676–682. – ISSN 0009-921X.
 15. Allen, C.J. Coagulation Changes following Combined Ablative and Reconstructive Breast Surgery/ C. J. Allen, C. A. Karcutskie, L. Zebib [et al.]// Plast. Reconstr. Surg. – 2016. – Vol. 137, № 6. – P. 923–930. – ISSN 0032-1052.

16. Ambesi-Impiombato, F.S. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids./ F. S. Ambesi-Impiombato, L. A. Parks, H. G. Coon// Proc. Natl. Acad. Sci. – 1980. – Vol. 77, № 6. – P. 3455–3459. – ISSN 0027-8424.
17. Andolfi, C. Usefulness of Three-Dimensional Modeling in Surgical Planning, Resident Training, and Patient Education./ C. Andolfi, A. Plana, P. Kania [et al.]// J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A. – 2017. – Vol. 27, № 5. – P. 512–515. – ISSN 1557-9034.
18. Antonica, F. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells/ F. Antonica, D. F. Kasprzyk, R. Opitz [et al.]// Nature. – 2012. – Vol. 491, № 7422. – P. 66–71. – ISSN 0028-0836.
19. Arauchi, A. Tissue-engineered thyroid cell sheet rescued hypothyroidism in rat models after receiving total thyroidectomy comparing with nontransplantation models./ A. Arauchi, T. Shimizu, M. Yamato [et al.]// Tissue Eng. Part A. – 2009. – Vol. 15, № 12. – P. 3943–3949. – ISSN 1937-335X.
20. Barron, J.A. Application of laser printing to mammalian cells/ J. A. Barron, B. R. Ringeisen, H. Kim [et al.]// Thin Solid Films. – Elsevier, 2004. – Vol. 453–454. – P. 383–387. – ISSN 0040-6090.
21. Bazou, D. Biochemical properties of encapsulated high-density 3-D HepG2 aggregates formed in an ultrasound trap for application in hepatotoxicity studies/ D. Bazou// Cell Biol. Toxicol. – 2010. – Vol. 26, № 2. – P. 127–141. – ISSN 0742-2091.
22. Bertoni, A.P.S. Progesterone Upregulates Gene Expression in Normal Human Thyroid Follicular Cells./ A. P. S. Bertoni, I. S. Brum, A. C. Hillebrand, T. W. Furlanetto// Int. J. Endocrinol. – Hindawi, 2015. – Vol. 2015.
23. Biliavskaia, S.B. Characteristics of primary cell culture from neonatal thyroid gland of pigs: folliculogenesis, hormone and growth./ S. B. Biliavskaia, G. A. Bozhok, E. I. Legach [et al.]// Tsitologiya. – 2013. – Vol. 55, № 7. – P. 482–491. – ISSN 0041-3771.

24. Billiet, T. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability/ T. Billiet, E. Gevaert, T. De Schryver [et al.]// *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, № 1. – P. 49–62. – ISSN 01429612.
25. Boland, T. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels/ T. Boland, V. Mironov, A. Gutowska [et al.]// *Anat. Rec.* – 2003. – Vol. 272A, № 2. – P. 497–502. – ISSN 0003-276X.
26. Boyd-Moss, M. Bioprinting and Biofabrication with Peptide and Protein Biomaterials/ M. Boyd-Moss, K. Fox, M. Brandt [et al.]// *Advances in experimental medicine and biology*. – 2017. – Vol. 1030. – P. 95–129. – ISSN 0065-2598.
27. Bratt-Leal, A.M. Magnetic manipulation and spatial patterning of multicellular stem cell aggregates/ A. M. Bratt-Leal, K. L. Kepple, R. L. Carpenedo [et al.]// *Integr. Biol.* – 2011. – Vol. 3, № 12. – P. 1224–1232. – ISSN 1757-9708.
28. Burger, P.E. Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue/ P. E. Burger, X. Xiong, S. Coetzee [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102, № 20. – P. 7180–7185. – ISSN 0027-8424.
29. Campbell, P.G. Tissue engineering with the aid of inkjet printers/ P. G. Campbell, L. E. Weiss// *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2007. – Vol. 7, № 8. – P. 1123–1127. – ISSN 1471-2598.
30. Chan, H.F. Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment/ H. F. Chan, Y. Zhang, Y.-P. Ho [et al.]// *Sci. Rep.* – Nature Publishing Group, 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 3462. – ISSN 2045-2322.
31. Chang, C.C. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies/ C. C. Chang, E. D. Boland, S. K. Williams, J. B. Hoying// *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* – 2011. – Vol. 98B, № 1. – P. 160–170. – ISSN 15524973.

32. Chen, X. Development of a computer-aided design software for dental splint in orthognathic surgery/ X. Chen, X. Li, L. Xu [et al.]// *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 38867. – ISSN 2045-2322.
33. Chia, H.N. Recent advances in 3D printing of biomaterials./ H. N. Chia, B. M. Wu// *J. Biol. Eng. – BioMed Central*, 2015. – Vol. 9. – P. 4. – ISSN 1754-1611.
34. Chua, K.-N. Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold/ K.-N. Chua, W.-S. Lim, P. Zhang [et al.]// *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26, № 15. – P. 2537–2547. – ISSN 01429612.
35. Civitareale, D. Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene./ D. Civitareale, M. P. Castelli, P. Falasca, A. Saiardi// *Mol. Endocrinol.* – 1993. – Vol. 7, № 12. – P. 1589–1595. – ISSN 0888-8809.
36. Civitareale, D. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter./ D. Civitareale, R. Lonigro, A. J. Sinclair, R. Di Lauro// *EMBO J.* – 1989. – Vol. 8, № 9. – P. 2537–2542. – ISSN 0261-4189.
37. Clifton, K.H. Thyroid gland formation from inocula of monodispersed cells: early results on quantitation, function, neoplasia and radiation effects./ K. H. Clifton, R. K. DeMott, R. T. Mulcahy, M. N. Gould// *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – Vol. 4, № 11–12. – P. 987–990. – ISSN 0360-3016.
38. Coclet, J. Cell population kinetics in dog and human adult thyroid./ J. Coclet, F. Foureau, P. Ketelbant [et al.]// *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 1989. – Vol. 31, № 6. – P. 655–665. – ISSN 0300-0664.
39. Comolli, N. In vitro analysis of PNIPAAm–PEG, a novel, injectable scaffold for spinal cord repair/ N. Comolli, B. Neuhuber, I. Fischer, A. Lowman// *Acta Biomater.* – 2009. – Vol. 5, № 4. – P. 1046–1055. – ISSN 17427061.
40. Costa, J.B. Fast Setting Silk Fibroin Bioink for Bioprinting of Patient-Specific Memory-Shape Implants/ J. B. Costa, J. Silva-Correia, J. M. Oliveira, R. L. Reis// *Adv. Healthc. Mater.* – 2017. – Vol. 6, № 22. – P. 1701021. – ISSN

- 21922640.
41. Cui, H. 3D Bioprinting for Organ Regeneration/ H. Cui, M. Nowicki, J. P. Fisher, L. G. Zhang// *Adv. Healthc. Mater.* – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 1601118. – ISSN 21922640.
 42. Dababneh, A.B. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review/ A. B. Dababneh, I. T. Ozbolat// *J. Manuf. Sci. Eng.* – American Society of Mechanical Engineers, 2014. – Vol. 136, № 6. – P. 061016.
 43. Damante, G. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells./ G. Damante, G. Tell, R. Di Lauro// *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 66. – P. 307–356. – ISSN 0079-6603.
 44. Davies, T.F. The Emerging Cell Biology of Thyroid Stem Cells/ T. F. Davies, R. Latif, N. C. Minsky, R. Ma// *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – Vol. 96, № 9. – P. 2692–2702. – ISSN 0021-972X.
 45. Delmarcelle, A.-S. An Ex vivo Culture System to Study Thyroid Development/ A.-S. Delmarcelle, M. Villacorte, A.-C. Hick, C. E. Pierreux// *J. Vis. Exp.* – 2014. – № 88. – ISSN 1940-087X.
 46. Derby, B. Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds/ B. Derby// *Science (80-.)*. – 2012. – Vol. 338, № 6109. – P. 921–926. – ISSN 0036-8075.
 47. Derwahl, M. Pathogenesis of toxic thyroid adenomas and nodules: relevance of activating mutations in the TSH-receptor and Gs-alpha gene, the possible role of iodine deficiency and secondary and TSH-independent molecular mechanisms/ M. Derwahl, D. Manole, A. Sobke, M. Broecker// *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2009. – Vol. 106, № S 04. – P. S6–S9. – ISSN 0947-7349.
 48. Ding, X. Surface acoustic wave microfluidics/ X. Ding, P. Li, S.-C. S. Lin [et al.]// *Lab Chip.* – 2013. – Vol. 13, № 18. – P. 3626–3649.
 49. Domann, F.E. Restoration of Thyroid Function after Total Thyroidectomy and Quantitative Thyroid Cell Transplantation/ F. E. Domann, J. M. Mitchen, K.

- H. Clifton// *Endocrinology*. – 1990. – Vol. 127, № 6. – P. 2673–2678. – ISSN 0013-7227.
50. Duan, B. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels/ B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang, J. T. Butcher// *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. – 2013. – Vol. 101A, № 5. – P. 1255–1264. – ISSN 15493296.
 51. Dumont, J.E. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors/ J. E. Dumont, F. Lamy, P. Roger, C. Maenhaut// *Physiol. Rev.* – 1992. – Vol. 72, № 3. – P. 667–697. – ISSN 0031-9333.
 52. Durmus, N.G. Magnetic levitation of single cells./ N. G. Durmus, H. C. Tekin, S. Guven [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – National Academy of Sciences, 2015. – Vol. 112, № 28. – P. E3661–E3668. – ISSN 1091-6490.
 53. Elsdale, T. Collagen substrata for studies on cell behavior/ T. Elsdale, J. Bard// *J. Cell Biol.* – 1972. – Vol. 54, № 3. – P. 626–637. – ISSN 0021-9525.
 54. Endo, T. Thyroid Transcription Factor-1 Activates the Promoter Activity of Rat Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter Gene/ T. Endo, M. Kaneshige, M. Nakazato [et al.]// *Mol. Endocrinol.* – 1997. – Vol. 11, № 11. – P. 1747–1755. – ISSN 0888-8809.
 55. Farahani, R.D. Three-dimensional printing of multifunctional nanocomposites: Manufacturing techniques and applications./ R. D. Farahani, M. Dubé, D. Therriault// *Adv. Mater.* – 2016. – Vol. 28, № 28. – P. 5794–5821. – ISSN 1521-4095.
 56. Faulkner-Jones, A. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D/ A. Faulkner-Jones, C. Fyfe, D.-J. Cornelissen [et al.]// *Biofabrication*. – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 044102. – ISSN 1758-5090.
 57. Fayet, G. Isolation of a Normal Human Thyroid Cell Line: Hormonal Requirement for Thyroglobulin Regulation/ G. Fayet, S. Hovsépian// *Thyroid*. – 2002. – Vol. 12, № 7. – P. 539–546. – ISSN 1050-7256.

58. Fierabracci, A. Identifying thyroid stem/progenitor cells: advances and limitations/ A. Fierabracci// *J. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 213, № 1. – P. 1–13. – ISSN 0022-0795.
59. Fierabracci, A. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid/ A. Fierabracci, M. A. Puglisi, L. Giuliani [et al.]// *J. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 198, № 3. – P. 471–487. – ISSN 0022-0795.
60. Francis-Lang, H. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression./ H. Francis-Lang, M. Price, M. Polycarpou-Schwarz, R. Di Lauro// *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – Vol. 12, № 2. – P. 576–588. – ISSN 0270-7306.
61. Friend, J. Microscale acoustofluidics: Microfluidics driven via acoustics and ultrasonics/ J. Friend, L. Y. Yeo// *Rev. Mod. Phys.* – 2011. – Vol. 83, № 2. – P. 647–704. – ISSN 0034-6861.
62. Gibelli, B. Thyroid stem cells--danger or resource?/ B. Gibelli, A. El-Fattah, G. Giugliano [et al.]// *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* – Pacini Editore, 2009. – Vol. 29, № 6. – P. 290–295. – ISSN 1827-675X.
63. Guo, F. Controlling cell-cell interactions using surface acoustic waves./ F. Guo, P. Li, J. B. French [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – National Academy of Sciences, 2015. – Vol. 112, № 1. – P. 43–48. – ISSN 1091-6490.
64. Guo, F. Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves./ F. Guo, Z. Mao, Y. Chen [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – National Academy of Sciences, 2016. – Vol. 113, № 6. – P. 1522–1527. – ISSN 1091-6490.
65. Gutzweiler, L. Large scale production and controlled deposition of single HUVEC spheroids for bioprinting applications/ L. Gutzweiler, S. Kartmann, K. Troendle [et al.]// *Biofabrication.* – 2017. – Vol. 9, № 2. – P. 025027. – ISSN 1758-5090.
66. Hakam, M.S. Evaluation of fibrin-gelatin hydrogel as biopaper for application in skin bioprinting: An in-vitro study/ M. S. Hakam, R. Imani, N. Abolfathi [et al.]// *Biomed. Mater. Eng.* – 2017. – Vol. 27, № 6. – P. 669–682. – ISSN

18783619.

67. Hayase, S. Expression of Stanniocalcin 1 in Thyroid Side Population Cells and Thyroid Cancer Cells/ S. Hayase, Y. Sasaki, T. Matsubara [et al.]// *Thyroid*. – 2015. – Vol. 25, № 4. – P. 425–436. – ISSN 1050-7256.
68. Heller, M. Materials and scaffolds in medical 3D printing and bioprinting in the context of bone regeneration./ M. Heller, H.-K. Bauer, E. Goetze [et al.]// *Int. J. Comput. Dent.* – Vol. 19, № 4. – P. 301–321. – ISSN 1463-4201.
69. Hesvani, Y.D. Design and Implementation of Novel Multifunctional 3D Bioprinter/ Y. D. Hesvani, F. D. A. S. Pereira, V. Parfenov [et al.]// *3D Print. Addit. Manuf.* – 2016. – Vol. 3, № 1. – P. 64–68. – ISSN 2329-7662.
70. Ho, V.H.B. Generation and manipulation of magnetic multicellular spheroids/ V. H. B. Ho, K. H. Müller, A. Barcza [et al.]// *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31, № 11. – P. 3095–3102. – ISSN 01429612.
71. Hölzl, K. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting/ K. Hölzl, S. Lin, L. Tytgat [et al.]// *Biofabrication*. – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 032002. – ISSN 1758-5090.
72. Horváth, L. Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting/ L. Horváth, Y. Umehara, C. Jud [et al.]// *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 7974. – ISSN 2045-2322.
73. Hoshi, N. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics./ N. Hoshi, T. Kusakabe, B. J. Taylor, S. Kimura// *Endocrinology*. – NIH Public Access, 2007. – Vol. 148, № 9. – P. 4251–4258. – ISSN 0013-7227.
74. Huang, G.S. Solid freeform-fabricated scaffolds designed to carry multicellular mesenchymal stem cell spheroids for cartilage regeneration./ G. S. Huang, C. S. Tseng, B. Linju Yen [et al.]// *Eur. Cell. Mater.* – 2013. – Vol. 26. – P. 179–194. – ISSN 1473-2262.
75. Ingeson-Carlsson, C. Switching from MAPK-dependent to MAPK-independent repression of the sodium-iodide symporter in 2D and 3D cultured normal thyroid cells/ C. Ingeson-Carlsson, M. Nilsson// *Mol. Cell. Endocrinol.*

- 2013. – Vol. 381, № 1–2. – P. 241–254. – ISSN 03037207.
76. Ingeson-Carlsson, C. Dual contribution of MAPK and PI3K in epidermal growth factor-induced destabilization of thyroid follicular integrity and invasion of cells into extracellular matrix/ C. Ingeson-Carlsson, M. Nilsson// *Exp. Cell Res.* – 2014. – Vol. 326, № 2. – P. 210–218. – ISSN 00144827.
77. Ishido, Y. Follicular thyroglobulin enhances gene expression necessary for thyroid hormone secretion/ Y. Ishido, Y. Luo, A. Yoshihara [et al.]// *Endocr. J.* – 2015. – Vol. 62, № 11. – P. 1007–1015. – ISSN 0918-8959.
78. Ishido, Y. Thyroglobulin Suppresses Thyroid-Specific Gene Expression in Cultures of Normal But Not Neoplastic Human Thyroid Follicular Cells/ Y. Ishido, K. Yamazaki, M. Kammori [et al.]// *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2014. – Vol. 99, № 4. – P. E694–E702. – ISSN 0021-972X.
79. Ito, A. Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force/ A. Ito, K. Ino, M. Hayashida [et al.]// *Tissue Eng.* – 2005. – Vol. 11, № 9–10. – P. 1553–1561. – ISSN 1076-3279.
80. Itoh, M. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae/ M. Itoh, K. Nakayama, R. Noguchi [et al.]// *PLoS One* / ed. Zhu D. – 2015. – Vol. 10, № 9. – P. e0136681. – ISSN 1932-6203.
81. Iwata, H. Agarose Cell Encapsulation Technology and Therapeutics/ H. Iwata, Y. Ikada// *Birkhauser Boston.* – 1999.
82. Jakab, K. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems./ K. Jakab, A. Neagu, V. Mironov [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – National Academy of Sciences, 2004. – Vol. 101, № 9. – P. 2864–2869. – ISSN 0027-8424.
83. Jakab, K. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells./ K. Jakab, C. Norotte, F. Marga [et al.]// *Biofabrication.* – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 022001. – ISSN 1758-5090.
84. Jeker, L.T. Mouse Thyroid Primary Culture/ L. T. Jeker, M. Hejazi, C. L.

- Burek [et al.]// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 257, № 2. – P. 511–515. – ISSN 0006291X.
85. Ji, S. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs./ S. Ji, M. Guvendiren// *Front. Bioeng. Biotechnol.* – Frontiers Media SA, 2017. – Vol. 5. – P. 23. – ISSN 2296-4185.
86. Johansen, R. An experimental study of thyroid regeneration following subtotal thyroidectomy./ R. Johansen, R. E. Gardner, M. Galante [et al.]// *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1951. – Vol. 93, № 3. – P. 303–109. – ISSN 0039-6087.
87. Jungst, T. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels./ T. Jungst, W. Smolan, K. Schacht [et al.]// *Chem. Rev.* – 2016. – Vol. 116, № 3. – P. 1496–1539. – ISSN 1520-6890.
88. Kelm, J.M. Design of Custom-Shaped Vascularized Tissues Using Microtissue Spheroids as Minimal Building Units/ J. M. Kelm, V. Djonov, L. M. Ittner [et al.]// *Tissue Eng.* – 2006. – Vol. 12, № 8. – P. 2151–2160. – ISSN 1076-3279.
89. Keriquel, V. *In vivo* bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice/ V. Keriquel, F. Guillemot, I. Arnault [et al.]// *Biofabrication.* – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 014101. – ISSN 1758-5082.
90. Kikkawa, F. Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene./ F. Kikkawa, F. J. Gonzalez, S. Kimura// *Mol. Cell. Biol.* – 1990. – Vol. 10, № 12. – P. 6216–6224. – ISSN 0270-7306.
91. Kimura, S. Thyroid regeneration: how stem cells play a role?/ S. Kimura// *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – Frontiers Media SA, 2014. – Vol. 5. – P. 55. – ISSN 1664-2392.
92. Kimura, T. Regulation of Thyroid Cell Proliferation by TSH and Other Factors: A Critical Evaluation of *in Vitro* Models/ T. Kimura, A. Van Keymeulen, J. Golstein [et al.]// *Endocr. Rev.* – 2001. – Vol. 22, № 5. – P. 631–656. – ISSN 0163-769X.

93. Koch, L. Skin tissue generation by laser cell printing/ L. Koch, A. Deiwick, S. Schlie [et al.]// *Biotechnol. Bioeng.* – 2012. – Vol. 109, № 7. – P. 1855–1863. – ISSN 00063592.
94. Kogai, T. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression./ T. Kogai, F. Curcio, S. Hyman [et al.]// *J. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 167, № 1. – P. 125–135. – ISSN 0022-0795.
95. Koumarianou, P. Pax8 controls thyroid follicular polarity through cadherin-16/ P. Koumarianou, G. Gómez-López, P. Santisteban// *J. Cell Sci.* – 2017. – Vol. 130, № 1. – P. 219–231. – ISSN 0021-9533.
96. Lafferty, K.J. Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice./ K. J. Lafferty, A. Bootes, G. Dart, D. W. Talmage// *Transplantation.* – 1976. – Vol. 22, № 2. – P. 138–149. – ISSN 0041-1337.
97. Lan, L. Stem Cells Derived from Goiters in Adults Form Spheres in Response to Intense Growth Stimulation and Require Thyrotropin for Differentiation into Thyrocytes/ L. Lan, D. Cui, K. Nowka, M. Derwahl// *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 9. – P. 3681–3688. – ISSN 0021-972X.
98. Lan, L. Isolation, proliferation and differentiation of thyroid stem cell from human thyroid nodule tissue./ L. Lan, D. Cui, B. Shi [et al.]// *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 92, № 12. – P. 806–810. – ISSN 0376-2491.
99. Laschke, M.W. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications/ M. W. Laschke, M. D. Menger// *Biotechnol. Adv.* – 2017. – Vol. 35, № 6. – P. 782–791. – ISSN 07349750.
100. Leberfinger, A.N. Concise Review: Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication/ A. N. Leberfinger, D. J. Ravnic, A. Dhawan, I. T. Ozbolat// *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. – Vol. 6, № 10. – P. 1940–1948. – ISSN 21576564.
101. Lee, H.-S. Clonal expansion of adult rat hepatic stem cell lines by suppression of asymmetric cell kinetics (SACK)/ H.-S. Lee, G. G. Crane, J. R. Merok [et

- al.]// *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 83, № 7. – P. 760–771. – ISSN 0006-3592.
102. Lee, Y.-B. Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture/ Y.-B. Lee, S. Polio, W. Lee [et al.]// *Exp. Neurol.* – 2010. – Vol. 223, № 2. – P. 645–652. – ISSN 00144886.
103. Leijten, J. Advancing Tissue Engineering: A Tale of Nano-, Micro-, and Macroscale Integration/ J. Leijten, J. Rouwkema, Y. S. Zhang [et al.]// *Small.* – 2016. – Vol. 12, № 16. – P. 2130–2145. – ISSN 16136810.
104. Li, P. Acoustic separation of circulating tumor cells./ P. Li, Z. Mao, Z. Peng [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – National Academy of Sciences*, 2015. – Vol. 112, № 16. – P. 4970–4975. – ISSN 1091-6490.
105. Lin, R.-Z. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research/ R.-Z. Lin, H.-Y. Chang// *Biotechnol. J.* – 2008. – Vol. 3, № 9–10. – P. 1172–1184. – ISSN 18606768.
106. Lin, R.-Z. Magnetic Reconstruction of Three-Dimensional Tissues from Multicellular Spheroids/ R.-Z. Lin, W.-C. Chu, C.-C. Chiang [et al.]// *Tissue Eng. Part C Methods.* – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 197–205. – ISSN 1937-3384.
107. Lode, A. Additive manufacturing of collagen scaffolds by three-dimensional plotting of highly viscous dispersions/ A. Lode, M. Meyer, S. Brüggemeier [et al.]// *Biofabrication.* – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 015015. – ISSN 1758-5090.
108. Luciani, N. Successful chondrogenesis within scaffolds, using magnetic stem cell confinement and bioreactor maturation/ N. Luciani, V. Du, F. Gazeau [et al.]// *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 37. – P. 101–110. – ISSN 17427061.
109. Lynch, R.J. Geographic inequity in transplant access/ R. J. Lynch, R. E. Patzer// *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2019. – Vol. 24, № 3. – P. 337–342. – ISSN 1087-2418.
110. Ma, R. Thyroid Follicle Formation and Thyroglobulin Expression in Multipotent Endodermal Stem Cells/ R. Ma, R. Latif, T. F. Davies// *Thyroid.* – 2013. – Vol. 23, № 4. – P. 385–391. – ISSN 1050-7256.

111. Ma, R. Human Embryonic Stem Cells Form Functional Thyroid Follicles/ R. Ma, R. Latif, T. F. Davies// *Thyroid*. – 2015. – Vol. 25, № 4. – P. 455–461. – ISSN 1050-7256.
112. Mandolino, C. Hypothermic preservation of rat liver microorgans (LMOs) in bes-gluconate solution. Protective effects of polyethyleneglycol (PEG) on total water content and functional viability./ C. Mandolino, M. D. Pizarro, A. B. Quintana [et al.]// *Ann. Hepatol.* – Vol. 10, № 2. – P. 196–206. – ISSN 1665-2681.
113. Mandrycky, C. 3D bioprinting for engineering complex tissues/ C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, D.-H. Kim// *Biotechnol. Adv.* – 2016. – Vol. 34, № 4. – P. 422–434. – ISSN 07349750.
114. Mansouri, A. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function/ A. Mansouri, K. Chowdhury, P. Gruss// *Nat. Genet.* – 1998. – Vol. 19, № 1. – P. 87–90. – ISSN 1061-4036.
115. Marchioli, G. Fabrication of three-dimensional bioplotted hydrogel scaffolds for islets of Langerhans transplantation/ G. Marchioli, L. van Gurp, P. P. van Krieken [et al.]// *Biofabrication*. – 2015. – Vol. 7, № 2. – P. 025009. – ISSN 1758-5090.
116. Marro, A. Three-Dimensional Printing and Medical Imaging: A Review of the Methods and Applications./ A. Marro, T. Bandukwala, W. Mak// *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* – 2016. – Vol. 45, № 1. – P. 2–9. – ISSN 1535-6302.
117. Mazuel, F. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels/ F. Mazuel, A. Espinosa, N. Luciani [et al.]// *ACS Nano*. – 2016. – Vol. 10, № 8. – P. 7627–7638. – ISSN 1936-0851.
118. Melchels, F.P.W. Additive manufacturing of tissues and organs/ F. P. W. Melchels, M. A. N. Domingos, T. J. Klein [et al.]// *Prog. Polym. Sci.* – Pergamon, 2012. – Vol. 37, № 8. – P. 1079–1104. – ISSN 0079-6700.
119. Mézel, C. Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling/ C. Mézel, A. Souquet, L. Hallo, F.

- Guillemot// *Biofabrication*. – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 014103. – ISSN 1758-5082.
120. Mirica, K.A. Using Magnetic Levitation for Three Dimensional Self-Assembly/ K. A. Mirica, F. Ilievski, A. K. Ellerbee [et al.]// *Adv. Mater.* – 2011. – Vol. 23, № 36. – P. 4134–4140. – ISSN 09359648.
121. Mironov, V. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering./ V. Mironov, T. Boland, T. Trusk [et al.]// *Trends Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, № 4. – P. 157–161. – ISSN 0167-7799.
122. Mironov, V. Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line/ V. Mironov, V. Kasyanov, R. R. Markwald// *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22, № 5. – P. 667–673. – ISSN 09581669.
123. Mizuno, K. Thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP): cDNA cloning, functional characterization, and structural identity with thyroid transcription factor TTF-1./ K. Mizuno, F. J. Gonzalez, S. Kimura// *Mol. Cell. Biol.* – American Society for Microbiology (ASM), 1991. – Vol. 11, № 10. – P. 4927–4933. – ISSN 0270-7306.
124. Moldovan, N.I. Principles of the Kenzan Method for Robotic Cell Spheroid-Based Three-Dimensional Bioprinting/ N. I. Moldovan, N. Hibino, K. Nakayama// *Tissue Eng. Part B. Rev.* – 2017. – Vol. 23, № 3. – P. 237–244. – ISSN 1937-3376.
125. Morgan, S.J. Thyrotropin Stimulates Differentiation Not Proliferation of Normal Human Thyrocytes in Culture/ S. J. Morgan, S. Neumann, B. Marcus-Samuels, M. C. Gershengorn// *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2016. – Vol. 7. – P. 168.
126. Mulcahy, R.T. Hormonal Effects on the Quantitative Transplantation of Monodispersed Rat Thyroid Cells/ R. T. Mulcahy, D. P. Rose, J. M. Mitchen, K. H. Clifton// *Endocrinology*. – 1980. – Vol. 106, № 6. – P. 1769–1775. – ISSN 0013-7227.
127. Murphy, A. An investigation of the optimum culture conditions for a differentiated culture of sheep thyroid cells./ A. Murphy, C. Mothersill, M. K.

- O'Connor [et al.]// *Acta Endocrinol. (Copenh)*. – 1983. – Vol. 104, № 4. – P. 431–436. – ISSN 0001-5598.
128. Murphy, S. V. 3D bioprinting of tissues and organs/ S. V Murphy, A. Atala// *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32, № 8. – P. 773–785. – ISSN 1087-0156.
129. Napolitano, A.P. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels/ A. P. Napolitano, D. M. Dean, A. J. Man [et al.]// *Biotechniques*. – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 494–500. – ISSN 0736-6205.
130. Ness, G.O. Primary organ-culture of nonneoplastic and neoplastic thyroid-tissue as multicellular spheroids/ G. O. Ness, R. Bjerkvig, L. A. Akslen [et al.]// *Int. J. Oncol.* – 1995. – Vol. 6, № 5. – P. 1071–1078. – ISSN 1019-6439.
131. Nilsson, M. Primary culture of human thyrocytes in Transwell bicameral chamber: thyrotropin promotes polarization and epithelial barrier function./ M. Nilsson, J. Husmark, B. Nilsson [et al.]// *Eur. J. Endocrinol.* – 1996. – Vol. 135, № 4. – P. 469–480. – ISSN 0804-4643.
132. Nyberg, S.L. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver/ S. L. Nyberg, J. Hardin, B. Amiot [et al.]// *Liver Transplant.* – 2005. – Vol. 11, № 8. – P. 901–910. – ISSN 1527-6465.
133. O'Brien, C.M. Three-dimensional printing of nanomaterial scaffolds for complex tissue regeneration/ C. M. O'Brien, B. Holmes, S. Faucett, L. G. Zhang// *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2015. – Vol. 21. – P. 103–114. – ISSN 1937-3368.
134. Oh, H. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction/ H. Oh, S. B. Bradfute, T. D. Gallardo [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 100, № 21. – P. 12313–12318. – ISSN 0027-8424.
135. Okamoto, M. Stem Cell Antigen 1-Positive Mesenchymal Cells Are the Origin of Follicular Cells during Thyroid Regeneration/ M. Okamoto, S. Hayase, M. Miyakoshi [et al.]// *PLoS One* / ed. Laudet V. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P.

e80801. – ISSN 1932-6203.

136. Osman, R. Build Angle: Does It Influence the Accuracy of 3D-Printed Dental Restorations Using Digital Light-Processing Technology?/ R. Osman, N. Alharbi, D. Wismeijer// *Int. J. Prosthodont.* – 2017. – Vol. 30, № 2. – P. 182–188. – ISSN 08932174.
137. Ossendorp, F.A. Thyrotropin Dependent and Independent Thyroid Cell Lines Selected from FRTL-5 Derived Tumors Grown in Nude Mice/ F. A. Ossendorp, P. F. Bruning, M. D. Schuurin [et al.]// *Endocrinology.* – 1990. – Vol. 127, № 1. – P. 419–430. – ISSN 0013-7227.
138. Owens, C.M. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft./ C. M. Owens, F. Marga, G. Forgacs, C. M. Heesch// *Biofabrication.* – 2013. – Vol. 5, № 4. – P. 045007. – ISSN 1758-5090.
139. Ozbolat, I.T. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation/ I. T. Ozbolat// *Trends Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33, № 7. – P. 395–400. – ISSN 01677799.
140. Ozbolat, I.T. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting/ I. T. Ozbolat, M. Hospodiuk// *Biomaterials.* – 2016. – Vol. 76. – P. 321–343. – ISSN 01429612.
141. Ozbolat, I.T. Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends/ I. T. Ozbolat, Y. Yin Yu// *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 2013. – Vol. 60, № 3. – P. 691–699. – ISSN 0018-9294.
142. Park, J. Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: Characterization and evaluation/ J. Park, S. J. Lee, S. Chung [et al.]// *Mater. Sci. Eng. C.* – 2017. – Vol. 71. – P. 678–684. – ISSN 09284931.
143. Pasca di Magliano, M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation/ M. Pasca di Magliano, R. Di Lauro, M. Zannini// *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 97, № 24. – P. 13144–13149. – ISSN 0027-8424.
144. Paternot, S. Differential Utilization of Cyclin D1 and Cyclin D3 in the Distinct Mitogenic Stimulations by Growth Factors and TSH of Human Thyrocytes in

- Primary Culture/ S. Paternot, J. E. Dumont, P. P. Roger// *Mol. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 20, № 12. – P. 3279–3292. – ISSN 0888-8809.
145. Peltola, S.M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes/ S. M. Peltola, F. P. W. Melchels, D. W. Grijpma, M. Kellomäki// *Ann. Med.* – 2008. – Vol. 40, № 4. – P. 268–280. – ISSN 0785-3890.
146. Pérez-Pomares, J.M. Tissue fusion and cell sorting in embryonic development and disease: biomedical implications/ J. M. Pérez-Pomares, R. A. Foty// *BioEssays.* – 2006. – Vol. 28, № 8. – P. 809–821. – ISSN 02659247.
147. Pizarro, M.D. Performance of cold-preserved rat liver Microorgans as the biological component of a simplified prototype model of bioartificial liver/ M. D. Pizarro, M. G. Mediavilla, A. B. Quintana [et al.]// *World J. Hepatol.* – 2016. – Vol. 8, № 33. – P. 1442. – ISSN 1948-5182.
148. Pulvertaft, R.J. Studies on tissue cultures of human pathological thyroids./ R. J. Pulvertaft, J. R. Davies, L. Weiss, J. H. Wilkinson// *J. Pathol. Bacteriol.* – 1959. – Vol. 77, № 1. – P. 19–32. – ISSN 0368-3494.
149. Rapoport, B. Studies on the cyclic AMP response to thyroid stimulating immunoglobulin (TSI) and thyrotropin (TSH) in human thyroid cell monolayers./ B. Rapoport, S. Filetti, N. Takai [et al.]// *Metabolism.* – 1982. – Vol. 31, № 11. – P. 1159–1167. – ISSN 0026-0495.
150. Rengier, F. 3D printing based on imaging data: review of medical applications/ F. Rengier, A. Mehndiratta, H. von Tengg-Kobligk [et al.]// *Int. J. Comput. Assist. Radiol. Surg.* – 2010. – Vol. 5, № 4. – P. 335–341. – ISSN 1861-6410.
151. Revilla-León, M. Position Accuracy of Implant Analogs on 3D Printed Polymer versus Conventional Dental Stone Casts Measured Using a Coordinate Measuring Machine./ M. Revilla-León, Ó. Gonzalez-Martín, J. Pérez López [et al.]// *J. Prosthodont.* – 2018. – Vol. 27, № 6. – P. 560–567. – ISSN 1532-849X.
152. Rocca, M. Multimaterial Extrusion Bioprinting/ M. Rocca// *SLAS Technol.* – 2017. – Vol. 1. – P. 1–10.
153. Roseti, L. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new

- perspectives/ L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta [et al.]// Mater. Sci. Eng. C. – 2017. – Vol. 78. – P. 1246–1262. – ISSN 09284931.
154. Sapozhnikov, O.A. Radiation force of an arbitrary acoustic beam on an elastic sphere in a fluid/ O. A. Sapozhnikov, M. R. Bailey// J. Acoust. Soc. Am. – Acoustical Society of America, 2013. – Vol. 133, № 2. – P. 661–676. – ISSN 0001-4966.
155. Sastre-Perona, A. Wnt-Independent Role of β -Catenin in Thyroid Cell Proliferation and Differentiation/ A. Sastre-Perona, P. Santisteban// Mol. Endocrinol. – 2014. – Vol. 28, № 5. – P. 681–695. – ISSN 0888-8809.
156. Saunders, R.E. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing/ R. E. Saunders, J. E. Gough, B. Derby// Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, № 2. – P. 193–203. – ISSN 01429612.
157. Schon, B.S. Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs/ B. S. Schon, K. Schrobback, M. van der Ven [et al.]// Cell Tissue Res. – 2012. – Vol. 347, № 3. – P. 629–642. – ISSN 0302-766X.
158. Schütte, J. Artificial microorgans: a microfluidic tool for *in vitro* assessment of toxicity/ J. Schütte, M. Stelzle// Bioanalysis. – 2011. – Vol. 3, № 21. – P. 2373–2375. – ISSN 1757-6180.
159. Shafiee, A. Printing Technologies for Medical Applications/ A. Shafiee, A. Atala// Trends Mol. Med. – Elsevier Current Trends, 2016. – Vol. 22, № 3. – P. 254–265. – ISSN 1471-4914.
160. Shi, H. Presence of free triiodothyronine and free thyroxine in thyroid follicles may be correlated with the quick secretion of thyroid hormones under certain physiological conditions./ H. Shi, W. Lin, B. O. Liang [et al.]// Biomed. reports. – Spandidos Publications, 2016. – Vol. 4, № 4. – P. 467–470. – ISSN 2049-9434.
161. Shim, J.-H. Bioprinting of a mechanically enhanced three-dimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system/ J.-H. Shim, J.-S. Lee, J. Y. Kim, D.-W. Cho// J.

- Micromechanics Microengineering. – IOP Publishing, 2012. – Vol. 22, № 8. – P. 085014. – ISSN 0960-1317.
162. Shimura, H. Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1./ H. Shimura, F. Okajima, S. Ikuyama [et al.]// Mol. Endocrinol. – 1994. – Vol. 8, № 8. – P. 1049–1069. – ISSN 0888-8809.
 163. Skardal, A. Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds/ A. Skardal, D. Mack, E. Kapetanovic [et al.]// Stem Cells Transl. Med. – 2012. – Vol. 1, № 11. – P. 792–802. – ISSN 21576564.
 164. Snell, G.D. The Homograft Reaction/ G. D. Snell// Annu. Rev. Microbiol. – 1957. – Vol. 11, № 1. – P. 439–458. – ISSN 0066-4227.
 165. Spinel, C. Thyroid Culture from Monolayer to Closed Follicles/ C. Spinel, M. Herrero// Thyroid Hormone. – InTech, 2012.
 166. Subramaniam, A.B. Noncontact orientation of objects in three-dimensional space using magnetic levitation./ A. B. Subramaniam, D. Yang, H.-D. Yu [et al.]// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – National Academy of Sciences, 2014. – Vol. 111, № 36. – P. 12980–12985. – ISSN 1091-6490.
 167. Suzuki, K. Dedifferentiation of Human Primary Thyrocytes into Multilineage Progenitor Cells without Gene Introduction/ K. Suzuki, N. Mitsutake, V. Saenko [et al.]// PLoS One / ed. Wutz A. – 2011. – Vol. 6, № 4. – ISSN 1932-6203.
 168. Takasu, N. Primary culture of thyroid cells Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures/ N. Takasu. – 1996.
 169. Tasevski, V. The Fischer Rat Thyroid Cell Line FRTL-5 Exhibits a Nondiploid Karyotype/ V. Tasevski, D. Benn, G. Peters [et al.]// Thyroid. – 1998. – Vol. 8, № 7. – P. 623–626. – ISSN 1050-7256.
 170. Tasoglu, S. Manipulating biological agents and cells in micro-scale volumes for applications in medicine/ S. Tasoglu, U. A. Gurkan, S. Wang, U. Demirci// Chem. Soc. Rev. – 2013. – Vol. 42, № 13. – P. 5788. – ISSN 0306-0012.
 171. Tasoglu, S. Magnetic Levitational Assembly for Living Material Fabrication/

- S. Tasoglu, C. H. Yu, V. Liaudanskaya [et al.]// *Adv. Healthc. Mater.* – 2015. – Vol. 4, № 10. – P. 1469–1476. – ISSN 21922640.
172. Taylor, M.J. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing./ M. J. Taylor, N. J. London, S. M. Thirdborough [et al.]// *Cryobiology.* – 1990. – Vol. 27, № 3. – P. 269–278. – ISSN 0011-2240.
173. Thomas, T. Expression of Endoderm Stem Cell Markers: Evidence for the Presence of Adult Stem Cells in Human Thyroid Glands/ T. Thomas, K. Nowka, L. Lan, M. Derwahl// *Thyroid.* – 2006. – Vol. 16, № 6. – P. 537–544. – ISSN 1050-7256.
174. Toda, S. Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture/ S. Toda, S. Aoki, K. Suzuki [et al.]// *Cell Tissue Res.* – 2003. – Vol. 312, № 3. – P. 281–289. – ISSN 0302-766X.
175. Toda, S. Culture models for studying thyroid biology and disorders./ S. Toda, S. Aoki, K. Uchihashi [et al.]// *ISRN Endocrinol.* – Hindawi Limited, 2011. – Vol. 2011. – P. 275782. – ISSN 2090-4649.
176. Toda, S. Thyrocyte integration, and thyroid folliculogenesis and tissue regeneration: perspective for thyroid tissue engineering./ S. Toda, N. Koike, H. Sugihara// *Pathol. Int.* – 2001. – Vol. 51, № 6. – P. 403–417. – ISSN 1320-5463.
177. Toda, S. Thyroid Tissue-Organotypic Culture Using a New Approach for Overcoming the Disadvantages of Conventional Organ Culture/ S. Toda, A. Ootani, S. Aoki, H. Sugihara// *Cell Biol.* – Academic Press, 2006. – P. 411–414.
178. Toda, S. Primary culture of the thyroid: three-dimensional culture using extracellular matrix/ S. Toda, H. Sugihara// *Cell Tissue Cult. Lab. Proced.* – 1996. – Vol. 2, № 17. – P. 1–12.
179. Toda, S. A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term/ S. Toda, K. Watanabe, F.

- Yokoi [et al.]// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 294, № 4. – P. 906–911. – ISSN 0006291X.
180. Toni, R. Ex situ bioengineering of bioartificial endocrine glands: A new frontier in regenerative medicine of soft tissue organs/ R. Toni, A. Tampieri, N. Zini [et al.]// *Ann. Anat. - Anat. Anzeiger.* – 2011. – Vol. 193, № 5. – P. 381–394. – ISSN 09409602.
181. Vassart, G. The Thyrotropin Receptor and the Regulation of Thyrocyte Function and Growth/ G. Vassart, J. E. Dumont// *Endocr. Rev.* – 1992. – Vol. 13, № 3. – P. 596–611. – ISSN 0163-769X.
182. Villacorte, M. Thyroid follicle development requires Smad1/5- and endothelial cell-dependent basement membrane assembly/ M. Villacorte, A.-S. Delmarcelle, M. Lernoux [et al.]// *Development.* – 2016. – Vol. 143, № 11. – P. 1958–1970. – ISSN 0950-1991.
183. Visser, J. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs/ J. Visser, B. Peters, T. J. Burger [et al.]// *Biofabrication.* – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 035007. – ISSN 1758-5082.
184. Walsh, J.P. Setpoints and susceptibility: do small differences in thyroid function really matter?/ J. P. Walsh// *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2011. – Vol. 75, № 2. – P. 158–159. – ISSN 03000664.
185. Wang, S. Smart hydrogels for 3D bioprinting/ S. Wang, J. M. Lee, W. Y. Yeong// *Int. J. Bioprinting.* – 2015. – ISSN 24247723.
186. Wang, Y. Recent development and biomedical applications of self-healing hydrogels/ Y. Wang, C. K. Adokoh, R. Narain// *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 77–91. – ISSN 1742-5247.
187. Wang, Y. Primary Cell Culture Systems for Human Thyroid Studies./ Y. Wang, W. Li, J. E. Phay [et al.]// *Thyroid.* – Mary Ann Liebert, Inc., 2016. – Vol. 26, № 8. – P. 1131–1140. – ISSN 1557-9077.
188. Welm, B.E. Sca-1pos Cells in the Mouse Mammary Gland Represent an Enriched Progenitor Cell Population/ B. E. Welm, S. B. Tepera, T. Venezia [et al.]// *Dev. Biol.* – 2002. – Vol. 245, № 1. – P. 42–56. – ISSN 00121606.

189. Westermark, B. Thyrotropin is not a growth factor for human thyroid cells in culture./ B. Westermark, F. A. Karlsson, O. Wålinder// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – National Academy of Sciences, 1979. – Vol. 76, № 4. – P. 2022–2026. – ISSN 0027-8424.
190. Westermark, K. Thyrocyte Migration and Histiotypic Follicle Regeneration Are Promoted by Epidermal Growth Factor in Primary Culture of Thyroid Follicles in Collagen Gel/ K. Westermark, M. Nilsson, T. Ebendal, B. Westermark// Endocrinology. – 1991. – Vol. 129, № 4. – P. 2180–2186. – ISSN 0013-7227.
191. Whatley, B.R. Magnetic-directed patterning of cell spheroids/ B. R. Whatley, X. Li, N. Zhang, X. Wen// J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2014. – Vol. 102, № 5. – P. 1537–1547. – ISSN 15493296.
192. Wilson, W.C. Cell and organ printing 1: Protein and cell printers/ W. C. Wilson, T. Boland// Anat. Rec. – 2003. – Vol. 272A, № 2. – P. 491–496. – ISSN 0003-276X.
193. Włodarczyk-Biegun, M.K. 3D bioprinting of structural proteins/ M. K. Włodarczyk-Biegun, A. del Campo// Biomaterials. – 2017. – Vol. 134. – P. 180–201. – ISSN 01429612.
194. Xin, L. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis/ L. Xin, D. A. Lawson, O. N. Witte// Proc. Natl. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 102, № 19. – P. 6942–6947. – ISSN 0027-8424.
195. Yamada, K.M. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D/ K. M. Yamada, E. Cukierman// Cell. – 2007. – Vol. 130, № 4. – P. 601–610. – ISSN 00928674.
196. Zhou, Y. The Application of Ultrasound in 3D Bio-Printing/ Y. Zhou// Molecules. – 2016. – Vol. 21, № 5. – P. 590. – ISSN 1420-3049.
197. Zhu, W. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering/ W. Zhu, X. Ma, M. Gou [et al.]// Curr. Opin. Biotechnol. – 2016. – Vol. 40. – P. 103–112. – ISSN 09581669.

198. Food and Drug Administration, Technical Considerations for Additive
Manufactured Devices [Electronic resource]. – 2016.