

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

ВАСИЛЬЄВ РОМАН ГЕННАДІЙОВИЧ

УДК 576.524 + 576.35 : 577.12

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОСТНАТАЛЬНИХ
МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО
ГРЕБНЯ З ВОЛОСЯНОГО ФОЛІКУЛА ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ
ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У РЕГЕНЕРАТИВНІЙ МЕДИЦИНІ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ

Науковий керівник: доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Новікова Світлана Миколаївна,
заступник директора з наукової роботи,
завідувач лабораторії прикладних біотехнологій
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України», м. Київ.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Петренко Олександр Юрійович
завідувач відділом кріобіохімії
Інституту проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків;

доктор медичних наук, професор
Білько Надія Михайлівна
керівник Центру молекулярних та клітинних досліджень
Національного університету «Києво-Могилянська академія»
МОН України, м. Київ.

Захист відбудеться «28» травня 2019 р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України (03680 м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розісланий «27» квітня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник

І. В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Завдяки досягненням у галузі біотехнології, генетичної інженерії, молекулярної та клітинної біології у медицині з'явився й інтенсивно розвивається новий напрямок, який одержав назву регенеративна медицина [Langer R., Vacanti J., 2016]. Метою регенеративної медицини є заміна або відновлення відсутніх, дисфункціональних чи пошкоджених клітин, тканин і органів людини для відтворення їх нормальної функції. Основними підходами - клітинна терапія, тканинна інженерія та генна терапія [Мао А.С., Моoney D.J. 2015].

Розвиток більшості методів регенеративної медицини став можливим завдяки використанню різних типів диференційованих, прогеніторних і стовбурових клітин [Петренко А.Ю. и др., 2011]. Слід відзначити, що не всі типи постнатальних соматичних клітин людини можуть бути отримані у достатній кількості для потенційного медичного застосування [Цымбалюк В. И., Медведев В. В., 2010]. Це пов'язано з відсутністю здатності до проліферації у термінально диференційованих клітин чи/або інвазивністю процедури отримання біоптатів [Бутенко Г.М., Кирик В.М., 2011]. Ембріональні та індуквані плюрипотентні стовбурові клітини здатні до необмеженого розмноження та можуть бути направлено диференційовані у будь-який тип клітин. Однак, на сьогодні їх використання у медичних цілях має ряд етичних, технічних і пов'язаних з питаннями онкогенної безпеки обмежень [Angelos M., Kaufman D.S., 2015]. Отже, дослідження морфофункціональних властивостей постнатальних стовбурових та прогеніторних клітин є актуальною науковою задачею [Wilko N.M. et al., 2005; Чайковський Ю.Б. та інш., 2014].

Перспективним клітинним типом для застосування у регенеративній медицині є постнатальні мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребня (мСК-ПНГ). Це обумовлено особливостями їх ембріонального походження та роллю нервового гребня у філогенезі та онтогенезі хребетних [Hall B., 2009].

Останнім часом з цілого ряду тканин і органів ссавців на постнатальному етапі розвитку були виділені клітини-похідні нервового гребня, які, принаймні *in vitro*, демонструють здатність до самовідновлення та мультилінійного диференціювання у нейрони, Шваннівські клітини, меланоцити, адипоцити, остеобласти, хондроцити та інші типи клітин, тобто за функціональними ознаками є мультипотентними стовбуровими клітинами.

Постнатальні мСК-ПНГ з різних тканинних джерел мають подібні імунофенотипові маркери (Sox10, Nestin, CD271) та здатні диференціюватися у клітинні типи, що є похідними нервового гребня [Achilleos A., Trainor P.A., 2012].

Необхідно зазначити, що постнатальні мСК-ПНГ, виділені з різних тканинних джерел відрізняються за ефективністю направлено диференціювання та іншими морфофункціональними властивостями (відповідно на фактори росту, здатністю до самовідновлення) [Kruger G.M. et al., 2002; Kosykh A. et al., 2015; Vidal M. et al., 2015].

Крім того, тканинні джерела постнатальних мСК-ПНГ значно відрізняються за ступенем інвазивності забору біоптату, а також можливістю отримання гомогенної популяції мСК-ПНГ, що є важливим для подальшого клінічного застосування

[Nagoshi N. et al., 2008; Achilleos A., Trainor P. A., 2012; Wislet-Gendebien S. et al., 2012].

Одним із найбільш доступних джерел отримання постнатальних мСК-ПНГ у дорослих ссавців є волосяний фолікул (ВФ) [Sieber-Blum M. et al., 2004]. Перевагами використання ВФ є можливість отримання гомогенної популяції мСК-ПНГ без їх селекції методами імуномагнітної сепарації або флуоресцентно-активованого сортування клітин [Sieber-Blum M. et al., 2004; Clewes O. et al., 2011; Gericota V. et al., 2014]. Таким чином, вдосконалення методу культивування постнатальних мСК-ПНГ з ВФ та дослідження їх морфофункціональних властивостей і терапевтичного потенціалу є актуальними завданнями, вирішення яких сприятиме розробці нових підходів у регенеративній медицині.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано згідно з планами науково-дослідних робіт ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”: НДР «Дослідження нейропротекторних властивостей стовбурових клітин при різних експериментальних моделях патології нервової системи» № держреєстрації 0113U000100 (2013-2105 pp); НДР «Роль клітинних та ендокринних факторів у реалізації нейропротекторних властивостей стовбурових клітин при експериментальних ушкодженнях нервової системи» № держреєстрації 0116U000139 (2016-2018 pp).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було визначення морфофункціональних властивостей постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула у культурі *in vitro*, розробка біотехнологічних аспектів їх використання у регенеративній медицині та дослідження терапевтичного потенціалу цього типу клітин на експериментальних моделях *in vivo* та *ex vivo*.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула вібрисів дорослих мишей і вивчити їх морфофункціональні властивості *in vitro*.

2. Дослідити вплив різних чинників (фактори росту bFGF та EGF, щільність посіву та вміст кисню у складі газової фази) на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула та на підставі отриманих даних оптимізувати протокол їх експансії *in vitro*

3. Вивчити вплив колагенового і фібринового гідрогелів на життєздатність і проліферацію постнатальних мСК-ПНГ, створити 3D-конструкції на основі гідрогелів та у комбінації з остеопластичними матеріалами (ксеногенна частково демінералізована кісткова крихта, синтетичний матеріал з гідроксиапатиту кальцію та β -трикальційфосфату (70 : 30))

4. Дослідити терапевтичний потенціал постнатальних мСК-ПНГ на експериментальних моделях дефекту кісток склепіння черепа критичного розміру, ушкодження (перетину) сідничного нерва та короткочасної киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампу.

5. На основі розробленого з використанням клітин миші способу культивування постнатальних мСК-ПНГ отримати культуру клітин відповідного типу з волосяного фолікула людини, розробити протокол їх експансії та дослідити їх морфофункціональні властивості *in vitro*.

Об'єкт дослідження: постнатальні мСК-ПНГ з волосяного фолікула вібрисів дорослих мишей лінії FVB та з волосяного фолікула людини.

Предмет дослідження: морфофункціональні властивості постнатальних мСК-ПНГ миші та людини у культурі *in vitro*, вплив на проліферацію мСК-ПНГ ряду чинників і умов культивування, а також терапевтичний потенціал мСК-ПНГ у різних експериментальних моделях ушкодження тканин і анатомічних структур.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи досліджень: культуральні в системі *in vitro* (моношарова культура клітин, 3D культура на основі гідрогелів, органотипова культура зрізів гіпокампу, сферогенез, направлене диференціювання); проточна цитометрія; цитохімічний, імуноцитохімічний та гістоморфометричний аналіз; молекулярно-генетичні (виділення РНК, ПЛР зі зворотною транскрипцією, ПЛР у реальному часі, електрофорез нуклеїнових кислот); мікроскопія (світлопільна в прохідному світлі, фазово-контрастна, флуоресцентна, конфокальна лазерна скануюча); мікрохірургічні; статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведені дослідження поглиблюють існуючі уявлення щодо морфофункціональних властивостей постнатальних мСК-ПНГ. У дисертаційній роботі вперше показано ієрархічну організацію постнатальних мСК-ПНГ у культурі *in vitro*, існування колонієутворюючих одиниць (КУО) різних типів та існування у популяції мСК-ПНГ субпопуляції ALDH^{bright} клітин (з високою активністю ферменту альдегіддегідрогенази). Також вперше обґрунтовано переваги культивування постнатальних мСК-ПНГ за умов низького вмісту кисню. Проведені дослідження дозволили вдосконалити живильне середовище та протокол культивування постнатальних мСК-ПНГ миші та людини. Встановлено здатність постнатальних мСК-ПНГ до мультилінійного диференціювання на клональному рівні. Вперше показано стимулюючий вплив постнатальних мСК-ПНГ з ВФ на репаративну регенерацію дефекту кісток склепіння критичного розміру. Доведено значний терапевтичний ефект постнатальних мСК-ПНГ за умов трансплантації на органотипову культуру зрізів гіпокампу після їх короткотривалої киснево-глюкозної депривації. Розроблено метод експансії постнатальних мСК-ПНГ людини зі збереженням їх морфо функціональних властивостей.

Практичне значення отриманих результатів. Практичне значення результатів дослідження підтверджується Патентом України на корисну модель (№ 66086) «Спосіб культивування мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з бульбарного регіону волосяного фолікула дорослих ссавців».

Результати дослідження впроваджено у роботу лабораторії прикладних біотехнологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» та у роботу біотехнологічної лабораторії *ilaya.regeneration* медичної компанії *ilaya*[®] (Київ, Україна) для виготовлення біомедичних клітинних та тканинно-інженерних продуктів для лікування гриж міжхребцевих дисків, демієлінізуючих захворювань нервової системи, контузійних уражень спинного мозку, відновлення дефектів периферичних нервів та кісток склепіння.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено аналіз наукової літератури, виконано основний об'єм експериментальних досліджень,

проаналізовано отримані результати, проведено статистичну обробку даних. Спільно з науковим керівником було визначено мету та завдання, схему експериментів, а також узагальнено результати та обговорено висновки дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації були представлені й обговорені на міжнародних конференціях: «ISSCR Regional Forum EU: Stem Cells in Translation» (Флоренція, Італія, 2013 р.), «World Conference on Regenerative Medicine» (Лейпциг, Німеччина, 2013 р.), конференції для молодих науковців «CYS-2015» (Київ, 2015 р.), «World Conference on Regenerative Medicine» (Лейпциг, Німеччина, 2015 р.), «TERMIS EU Chapter: Towards Future Regenerative Therapies» (Уппсала, Швеція, 2016 р.), «ISCT 25th Annual Meeting» (Лондон, Велика Британія, 2017 р.), «Normal and Cancer Stem Cells: Discovery, Diagnosis and Therapy» (Київ, 2017 р.), «Досягнення та перспективи клінічної неврології» (Київ, 2018 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць: 8 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України (серед яких 6 у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), один розділ у монографії, один патент України на корисну модель та 7 тез у збірках міжнародних конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 174 сторінках комп'ютерного тексту. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», трьох розділів результатів власних досліджень, розділу «Узагальнення та обговорення результатів», висновків та списку використаних джерел, який налічує 158 посилань, з них 148 латиницею. Роботу проілюстровано 50 рисунками та 10 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** подані сучасні уявлення щодо застосування постнатальних стовбурових клітин у галузі регенеративної медицини, обґрунтована актуальність теми, наведений зв'язок з науковими програмами та темами, сформульовані мета та завдання дослідження, показані новизна та практична значимість одержаних результатів, особистий внесок здобувача та відомості про апробацію результатів.

У **розділі 1 «Огляд літератури»** представлено аналітичний огляд теоретичних та експериментальних даних літератури, що стосуються морфофункціональних властивостей постнатальних мСК-ПНГ та перспектив їх застосування у регенеративній медицині.

У **розділі 2 «Матеріали і методи дослідження»** надана загальна характеристика об'єктів, методів і матеріалів дослідження.

Експерименти було виконано на клітинних культурах, отриманих від самців мишей лінії FVB і FVB-Cg-Tg (GFPU) 5Nagy/J (трансгенних за GFP) 4-6 місячного віку з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки, що підтверджено висновком комісії з біоетики ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМНУ".

Всі процедури з отримання біопатів шкіри людини, ізоляції та культивування клітин було виконано з письмової інформованої згоди донорів і відповідно до законів України. Культивування клітин проводилося в обладнаній за нормами

GMP/GTP біотехнологічній лабораторії *ilaya.regeneration* (ТОВ «А.А. Партнерс», ліцензія на господарську діяльність банку пуповинної крові, інших клітин і тканин людини МОЗ України № АЕ 186342 від 11.07.2013).

Культури мСК-ПНГ миші ($n = 30$) отримували за методом M. Sieber-Blum [Sieber-Blum M. et al., 2004] у нашій модифікації [Васильєв Р. Г. та ін., Патент №66086, 2011]. Культури мСК-ПНГ людини ($n = 10$) отримували за методом адаптованим для експлантів ВФ людини [Vasyliiev R. et al. 2017].

Культивування постнатальних мСК-ПНГ здійснювали у мультигазовому інкубаторі СВ 210 (Binder, Німеччина) при 37°C , у штучній атмосфері, що складалася з 90 % N_2 , 5 % O_2 і 5 % CO_2 .

Для культивування мСК-ПНГ миші використовували такі живильні середовища: №1 – оригінальне середовище M. Sieber-Blum, яке вперше було використано для отримання постнатальних мСК-ПНГ [Sieber-Blum et al., 2004], що містить 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС) та 5 % екстракту курячих ембріонів; №2 – живильне середовище з 10 % ЕТС, що не містило ЕКЕ; №3 – середовище з ростовими факторами та низькою (5 %) концентрацією ЕТС.

Для оцінки впливу щільності посіву на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ клітини засівали з щільністю посіву 10, 50, 100, 1000 та 5000 клітин / cm^2 у флакони Т25 і культивували у живильному середовищі №2 при 5 % O_2 протягом 7 діб.

Для оцінки впливу факторів росту (EGF та bFGF) на проліферацію мСК-ПНГ клітини засівали у лунки 6-ти лункових планшетів з щільністю посіву 1000 кл / cm^2 і культивували протягом 7 діб у живильному середовищі №2 без факторів росту, та з додаванням EGF (5, 10, 20 та 50 нг / мл), або bFGF (1, 2, 5 та 10 нг /мл).

Для оцінки впливу вмісту кисню у складі газової фази на проліферацію мСК-ПНГ клітини засівали з щільністю 1000 клітин/ cm^2 у живильному середовищі №2 та №3 і культивували протягом 5 діб при 21 %, 10 % або 5 % O_2 .

Для експансії постнатальних мСК-ПНГ людини використовували живильне середовище №3.

Для оцінки здатності до зростання в умовах клональної щільності мСК-ПНГ засівали в кількості 100 – 300 клітин в покриті 0,01 % розчином колагену I-го типу чашки Петрі 100 мм (SPL, Корея). Клітини культивували протягом 14 діб. Потім клітини або фіксували холодним етанолом та забарвлювали азур-еозином за Романовським для аналізу колонієутворюючих одиниць (КУО), або пересівали для аналізу їх здатності до самовідновлення. Ефективність колонієутворення (ЕКУ) розраховували за стандартною формулою [Freshney R. I., 2010]:

$$EK, \% = \left(\frac{\text{кількість сформованих колоній}}{\text{кількість експлантованих клітин}} \right) \times 100$$

Кількість подвоєнь клітинної популяції (PDN) і час подвоєння клітинної популяції (PDT) розраховували за стандартними формулами [Freshney R. I., 2010]:

$$PDT = T / 3.31 \lg (X_k / X_0)$$

$$PDN = 3.31 \lg (X_k / X_0)$$

де X_k – кількість отриманих клітин; X_0 – кількість засіяних клітин; T - час культивування клітин.

Направлене диференціювання мСК-ПНГ здійснювали у відповідних живильних середовищах: адипогенному, остеогенному, хондрогенному,

нейрональному та гліальному.

Для оцінки здатності мСК-ПНГ до сферогенезу їх культивували у суспензійних чашках Петрі 35 мм (SPL, Корея) у безсироватковому середовищі наступного складу: DMEM:F12, 2 % живильної добавки B27, 1 % живильної добавки N2 (Gibco, Велика Британія), 2 мМ стабільного глутаміну, 20 нг / мл bFGF, 40 нг / мл EGF.

3D культивування клітин здійснювали у колагеновому та фібриновому гідрогелях.

Життєздатність клітин визначали забарвленням 0,4% розчином трипанового синього з підрахунком загальної кількості клітин і кількості мертвих клітин у камері Горяєва, або за допомогою комбінованого забарвлення флюоресцеїн діацетатом (FDA) і пропідіум йодидом (PI) (всі – “Sigma”, США).

Імуноцитохімічний аналіз постнатальних мСК-ПНГ людини та миші проводили у непрямому варіанті з використанням відповідних первинних та вторинних антитіл.

Імунофенотипування мСК-ПНГ проводили методом проточної цитометрії з використанням проточного цитофлуориметра-сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США).

Субпопуляцію ALDH^{brigh} клітин визначали за допомогою ALDEFUORTM kit (STEMCELL Technologies, Канада) відповідно до інструкцій виробника.

В роботі були використані цитохімічні методи забарвлення клітинних культур: азур-еозином за Романовським для визначення різних типів КУО, Alizarin Red S для визначення кальцифікованого позаклітинного матриксу за умов остеогенного диференціювання та Oil Red O для забарвлення нейтральних ліпідів у разі адипогенного диференціювання.

Метод ПЛР із зворотною транскрипцією був використаний для підтвердження експресії постнатальними мСК-ПНГ миші генів, характерних для клітин нервового гребня.

Моделювання дефекту кісток склепіння черепа критичного розміру здійснювали на обох тім'яних кістках (*os parietale*) у мишей лінії FVB під авертиновим наркозом. Усі тварини були розподілені на наступні групи: 1) дефект кістки без заповнення; 2) заповнення ксеногенною частково демінералізованою кістковою крихтою (ДМК); 3) заповнення синтетичним остеопластичним матеріалом на основі гідроксиапатиту кальцію та β-трикальційфосфату (НА:βТСП 70:30); 4) трансплантація 3D-конструкції на основі постнатальних мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та ДМК; 5) трансплантація 3D-конструкції на основі постнатальних мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та НА : βТСП (70 : 30). Кількість тварин складала n = 8 для кожної групи.

Моделювання ушкодження сідничного нерву (перетин) проводили на мишах лінії FVB під авертиновим наркозом. Тварини були розподілені на наступні групи: 1) хибнооперовані; 2) з перетином правого сідничного нерву; 3) з перетином правого сідничного нерву та трансплантацією 5×10^5 постнатальних мСК-ПНГ. Кількість тварин складала n = 5 для кожної групи.

Гістоморфометричний аналіз проводили на зрізах сідничного нерву після імпрегнації сріблом і забарвлених гематоксилін-еозином зрізах тім'яної кістки.

Моделювання короточасної киснево-глюкозної депривації (КГД) органотипової культури гіпокампу здійснювали на зрізах від 8-9-денних мишей лінії FVB. Для

ідентифікації нейронів, гліальних клітин і трансплантованих клітин застосовували подвійне імуногістохімічне забарвлення з відповідними антитілами.

Прижиттєву мікроскопію, дослідження цитологічних і гістологічних препаратів проводили на інвертованому флуоресцентному мікроскопі Axio Observer A1, обладнаному цифровою камерою AxioCam ERc 5s і програмним забезпеченням ZEN 2012. Конфокальну мікроскопію здійснювали на мікроскопі Zeiss LSM 510 META (всі – Carl Zeiss, Germany) та FluoView FV1000 (Olympus Inc., Японія).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартних методів із застосуванням пакету прикладних програм «MS Excel XP» та «Statistica SPSS 10.0 for Windows». Результати представляли у вигляді середнього арифметичного значення та стандартного відхилення ($M \pm SD$). Достовірність різниці між показниками оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу).

У розділах 3-5 представлені результати власних досліджень та їх обговорення.

Морфофункціональні властивості постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з волосяного фолікула вібрисів миші та оптимізація умов їх експансії *in vitro*. Метою цього розділу роботи було отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ миші з використанням живильного середовища на основі ETC, але без вмісту ЕКЕ, та підтвердити відповідність отриманих мСК-ПНГ описаним для них критеріям і дослідити їх морфофункціональні властивості.

Було зроблено припущення, що культивування експлантів ВФВ за умов низького вмісту кисню у складі газової фази (5 %) та використання вітамінів, антиоксидантів та гормонів, що входять до складу комерційно доступної живильної добавки В27 дозволить отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ без використання ЕКЕ.

У разі застосування зазначених вище умов на 4-ту – 6-ту добу культивування із всіх експлантів ВФВ починалася міграція й активна проліферація клітин, які мали характерну для мСК-ПНГ морфологію (рис. 1а). Імуноцитохімічний аналіз клітин первинної культури показав, що вони є позитивними за описаними раніше маркерами постнатальних мСК-ПНГ [Sieber-Blum M., 2004]: Nestin (білок проміжних філаментів) (рис. 1б.); поверхневий низькоафінний рецептор до нейротрофінів р75, який є одним з перших маркерів у ході ембріогенезу, що відрізняє клітини нервового гребня від клітин нервової трубки (рис.1в); та транскрипційний фактор Sox10, який вважається майстер-геном, що відповідає за індукцію нервового гребня в ембріогенезі (рис. 1г).

Додатково було проведено імуноцитохімічне дослідження первинної культури на наявність клітин, позитивних за Sox2 (транскрипційний фактор) та CD349 (Frizzled-9, рецептор до факторів росту із родини Wnt). Більшість клітин у культурі була позитивна за Sox2 (рис. 2а), та майже всі клітини були позитивні за CD349 (Frizzled-9) (рис. 2б). Клітини первинної культури також були досліджені для визначення можливої контамінації кератиноцитами за допомогою антитіл до панцитокератину. Усі первинні культури (n = 5) були негативними при забарвленні антитілами до панцитокератину.

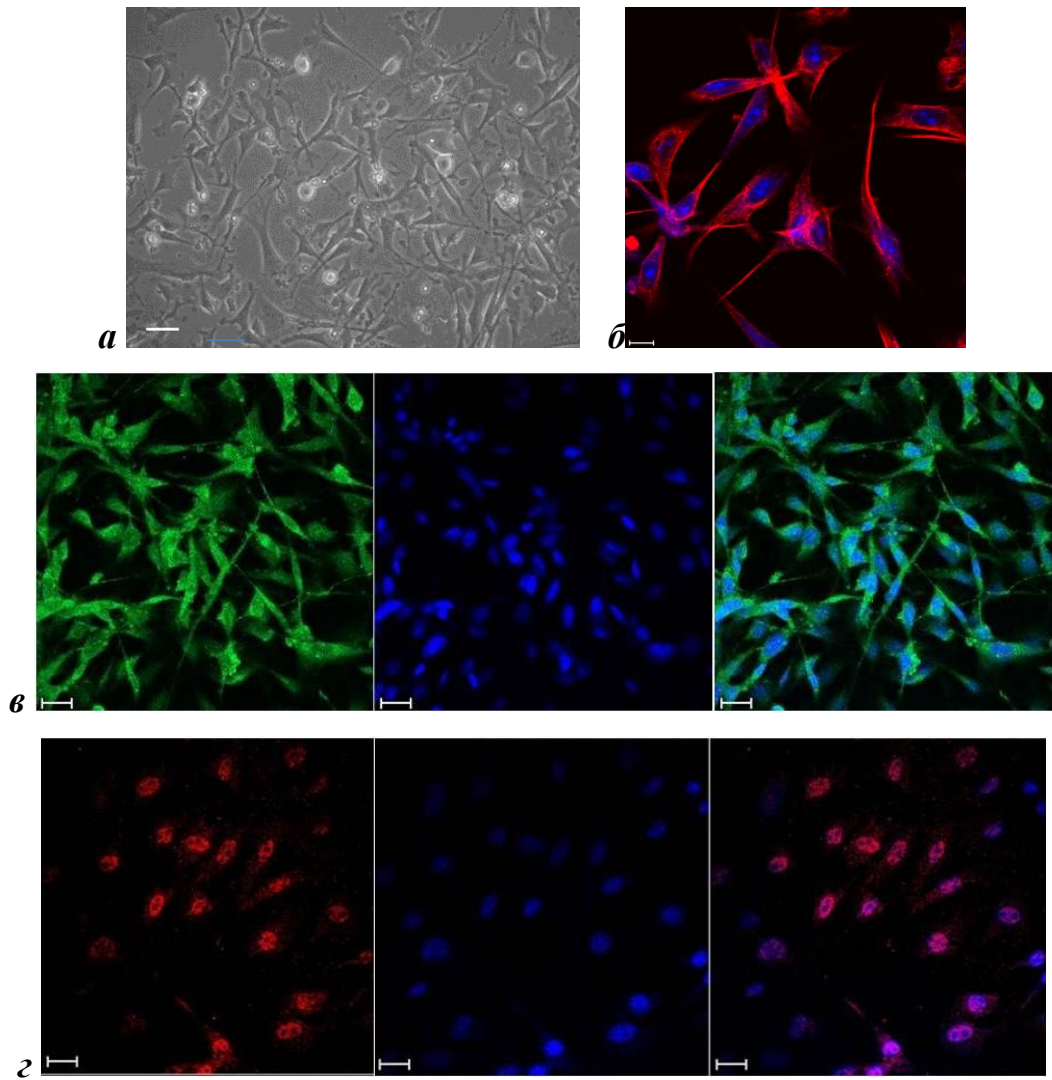


Рис. 1. Постнатальні мСК-ПНГ з ВФВ миші. *а)* Морфологія клітин в первинній культурі (П0). Фазово-контрастна мікроскопія, масштабний відрізок – 100 мкм. *б)* Імуноцитохімічне дослідження білку проміжних філаментів Nestin (червоний колір), масштабний відрізок – 20 мкм. *в)* Імуноцитохімічне дослідження низькоафінного рецептору до нейротрофінів р75 (зелений колір). *г)* Імуноцитохімічне дослідження транскрипційного фактору Sox10 (червоний колір). На *б* – *г* ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). На *в* та *г* масштабний відрізок – 50 мкм

Таким чином, отримані нами з використанням модифікованого живильного середовища клітини у первинній культурі повністю відповідали описаним раніше критеріям для постнатальних мСК-ПНГ із ВФВ миші за морфологією та фенотипом [Sieber-Blum M. et al., 2004]. Також були встановлені нові маркери, характерні для постнатальних мСК-ПНГ – Sox2 та CD349 (Frizzled-9) (рис. 2).

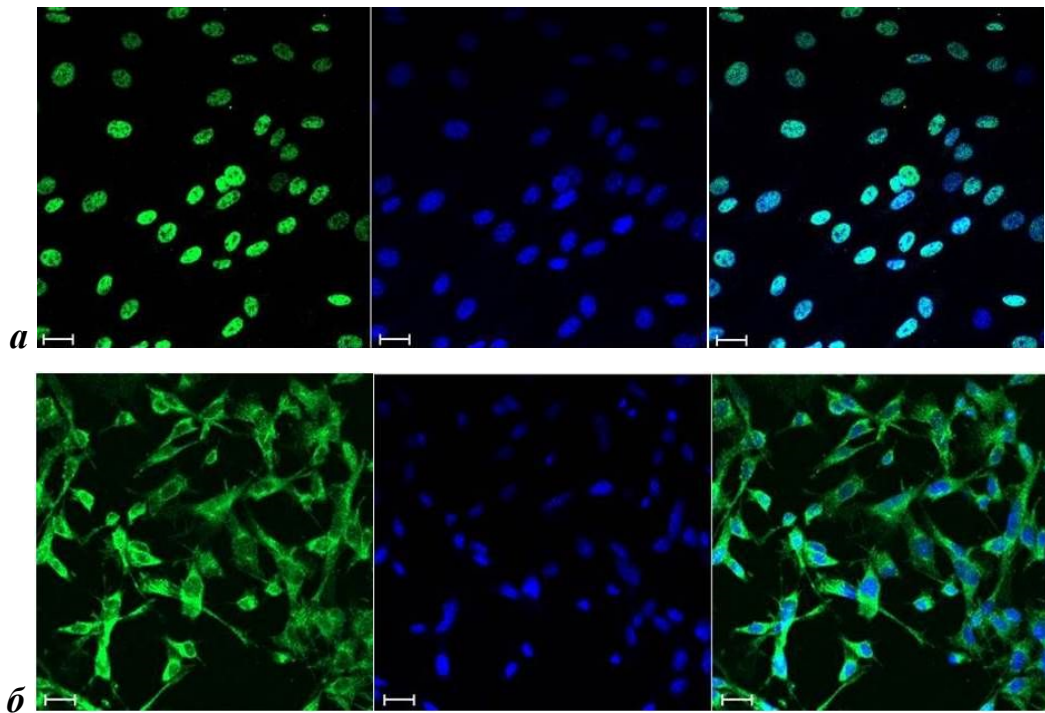


Рис. 2. *а)* Імуноцитохімічне дослідження транскрипційного фактору Sox2 (зелений колір). *б)* Імуноцитохімічне дослідження CD349 (Frizzled-9). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм

На першому пасажі культури досягали субконфлуентного стану на 7-му добу культивування. Середня кількість клітин у культурі мСК-ПНГ ($n = 5$) становила $(1,034 \pm 0,211) \times 10^6$. Таким чином, з використанням модифікованого живильного середовища вже на першому пасажі була отримана значна кількість клітин, що була достатня для подальшого культивування, постановки тесту на КУО, та кількісного аналізу імунофенотипу методом проточної цитометрії. Результати імунофенотипування культур мСК-ПНГ П1 наведені у таблиці 1.

Згідно даних проточної цитометрії культури постнатальних мСК-ПНГ з ВФВ миші на П1 містили більш ніж 90 % клітин, позитивних за маркерами стовбурових клітин (Sca-1 та Nestin), та позитивних за класичними маркерами мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (CD44, CD73 та CD90). У культурі були відсутні CD45⁺ клітини (значення для кількості позитивних клітин < 1 % вважається похибкою методу), що свідчить про відсутність контамінації гемопоетичними клітинами. Також у культура мСК-ПНГ на П1 містила незначну, але достовірно визначену кількість CD117⁺ клітин.

Було встановлено, що вже на П1 культури постнатальних мСК-ПНГ є гетерогенними за проліферативним потенціалом в умовах клональної щільності, тобто формують колонії різних типів. В залежності від кількості та морфології клітин, усі КУО були розділені на три типи: КУО I-го типу містили до 50 клітин з вираженими морфологічними ознаками диференціювання ($5,2 \pm 2,4$ % від загального числа колоній); колонії II-го типу склались з 100-300 клітин різної морфології

($13,0 \pm 4,6$ %); колонії III-го типу містили понад 500 клітин без морфологічних ознак диференціювання ($31,0 \pm 4,5$ %).

Таблиця 1

Імунофенотип клітин у культурі постнатальних мСК-ПНГ з ВФВ миші на П1 методом проточної цитометрії

| Антиген | CD44 | CD73 | CD90 | CD117 (c-kit) | Sca-1 | Nestin | CD45 |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|---------------|
| КПК, % $M \pm s$ | $98,9 \pm 0,8$ | $92,7 \pm 4,8$ | $99,5 \pm 2,5$ | $8,4 \pm 1,9$ | $95,5 \pm 2,8$ | $95,3 \pm 2,3$ | $0,2 \pm 0,1$ |

Примітка. КПК – кількість позитивних клітин.

При дослідженні культур постнатальних мСК-ПНГ на П1 була визначена субпопуляція $ALDH^{\text{bright}}$ клітин (рис. 3), що складала $13,44 \pm 2,19$ % від загальної кількості клітин.

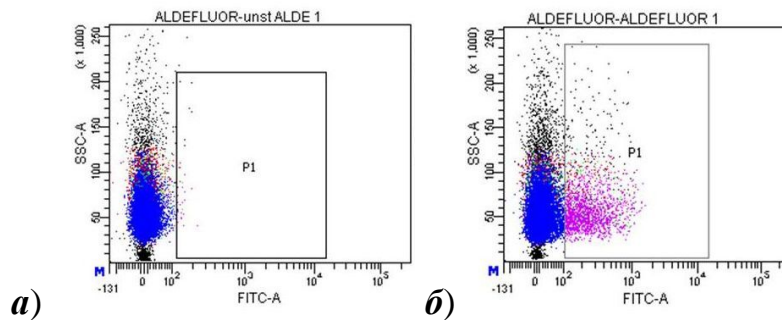


Рис. 3. Визначення субпопуляції $ALDH^{\text{bright}}$ клітин у культурі постнатальних мСК-ПНГ з ВФВ миші методом проточної цитометрії. *а)* контроль – клітини, оброблені DEAB – інгібітором ALDH; *б)* досліджувана популяція клітин. Регіон P1 визначає клітини з високою активністю ALDH.

Після аналізу культур постнатальних мСК-ПНГ на П1 було проведено їх подальше культивування протягом двох пасажів. Пасажування здійснювали зі щільністю посіву 1000 клітин/ cm^2 . На П3 була визначена кількість $Nestin^+$ та $ALDH^{\text{bright}}$ клітин. Також було проведено визначення кількості та типів КУО. Відповідні дані наведено у таблиці 2.

Відповідно до отриманих даних при експансії постнатальних мСК-ПНГ миші у запропонованому живильному середовищі на П3 значно знижується кількість $Nestin^+$ та $ALDH^{\text{bright}}$ клітин, а також КУО III-го типу ($p < 0,01$ у порівнянні з П1). Таким чином, використання модифікованого живильного середовища дозволяє отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ, але не здатне підтримувати їх у стовбуровому стані. При експансії постнатальних мСК-ПНГ до П3 відбувається втрата фенотипових і функціональних ознак стовбурових клітин ($Nestin$, висока

активність ALDH, КУО III-го типу), що може свідчити про їх спонтанну диференціацію. Тобто, живильне середовище без використання ЕКЕ потребує подальшої оптимізації.

Таблиця 2

Визначення кількості ALDH^{bright}, nestin⁺ клітин та кількості і типів КУО у культурі постнатальних мСК-ПНГ з ВФВ миші на ПЗ

| Культура № | Nestin ⁺ клітини, % | ALDH ^{bright} клітини, % | ЕК, % | КУО I-го типу, % | КУО II-го типу, % | КУО III-го типу, % |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------|-------------------|--------------------|
| 1 | 69,8 | 3,5 | 36 | 12 | 20 | 4 |
| 2 | 67,6 | 3,1 | 32 | 10 | 19 | 3 |
| 3 | 74,6 | 4,7 | 38 | 12 | 21 | 5 |
| 4 | 59,8 | 1,9 | 29 | 9 | 18 | 2 |
| 5 | 62,3 | 2,1 | 32 | 9 | 21 | 22 |
| <i>M ± s</i> | 66,8 ± 5,9 | 3,1 ± 1,1 | 33,4 ± 3,6 | 10,4 ± 1,5 | 19,7 ± 1,5 | 3,1 ± 1,3 |

У нашому дослідженні низька щільність посіву позитивно впливала на швидкість проліферації мСК-ПНГ, збільшуючи кількість подвоєнь популяції клітин (рис. 4) і зменшуючи середній час подвоєння популяції клітин (рис. 5).

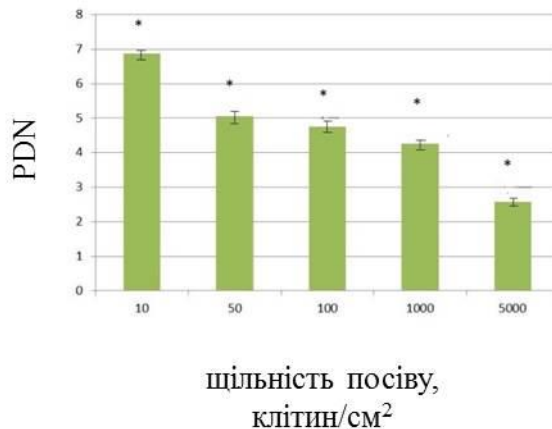
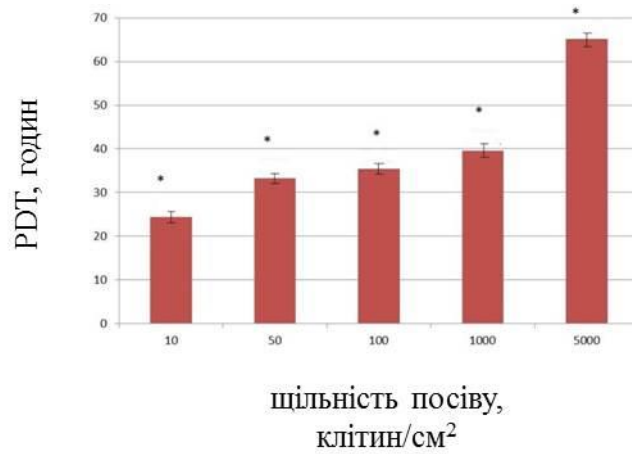


Рис. 4. Вплив щільності посіву на кількість подвоєнь клітинної популяції постнатальних мСК-ПНГ миші на протязі одного пасажу тривалістю сім діб

* Відмінності значущі ($p < 0,05$) при порівнянні між усіма групами



б

Рис. 5. Вплив щільності посіву на кількість подвоєнь клітинної популяції постнатальних мСК-ПНГ миші на протязі одного пасажу тривалістю сім діб

* Відмінності значущі ($p < 0,05$) при порівнянні між усіма групами

При дослідженні впливу bFGF та EGF на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ миші було виявлено, що ці фактори росту мають дозозалежну мітогенну дію (рис. 6).

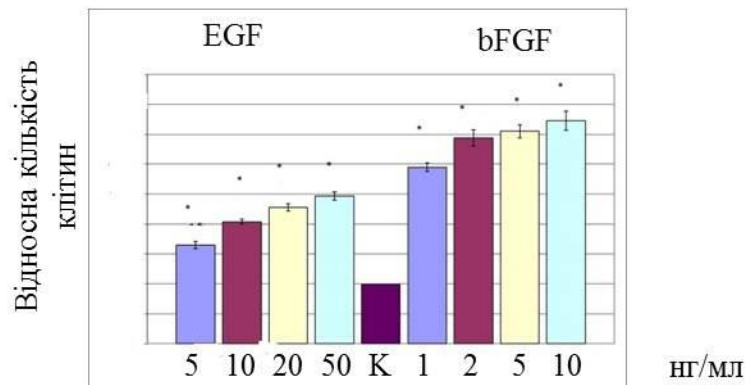


Рис. 6. Вплив EGF та bFGF на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ миші.

* Відмінності значущі ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольним середовищем (К)

Таким чином, bFGF та EGF виявилися ефективними мітогенами для постнатальних мСК-ПНГ та були застосовані при розробці живильного середовища, що не містить ЕКЕ, та має низький вміст ЕТС.

Результати культивування постнатальних мСК-ПНГ миші в двох живильних середовищах при різному вмісті кисню представлені на рис. 7. Низький вміст кисню мав стимулюючий вплив на проліферацію мСК-ПНГ при використанні обох живильних середовищ. Живильне середовище № 3 мало переваги над живильним середовищем №1 по кількості отриманих клітин за 5 діб культивування при всіх досліджених значеннях вмісту кисню.

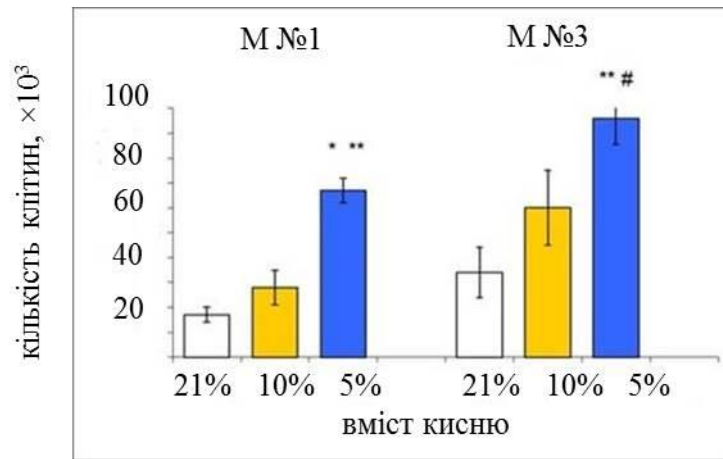


Рис. 7. Вплив вмісту кисню на швидкість росту постнатальних мСК-ПНГмиші при культивуванні у живильному середовищі № 1 (М № 1) та живильному середовищі № 3 (М № 3)

* Відмінності значущі ($p < 0,01$) при порівнянні 5 % кисню з 10 % та 21 % кисню у групах з використанням живильного середовища №1.

** Відмінності значущі ($p < 0,01$) при порівнянні живильного середовища №1 та живильного середовища №3 за умов вмісту кисню 5 %.

Відмінності значущі ($p < 0,01$) при порівнянні 5 % кисню з 10 % та 21 % кисню у групах з використанням живильного середовища №3.

Важливими функціональними ознаками стовбурових клітин є здатність до самовідновлення та направленого диференціювання. Клональні культури постнатальних МСК-ПНГ миші мали здатність до направленого мультилінійного диференціювання у адипоцити, остеобласти, гліальні клітини та нейрони (рис. 8).

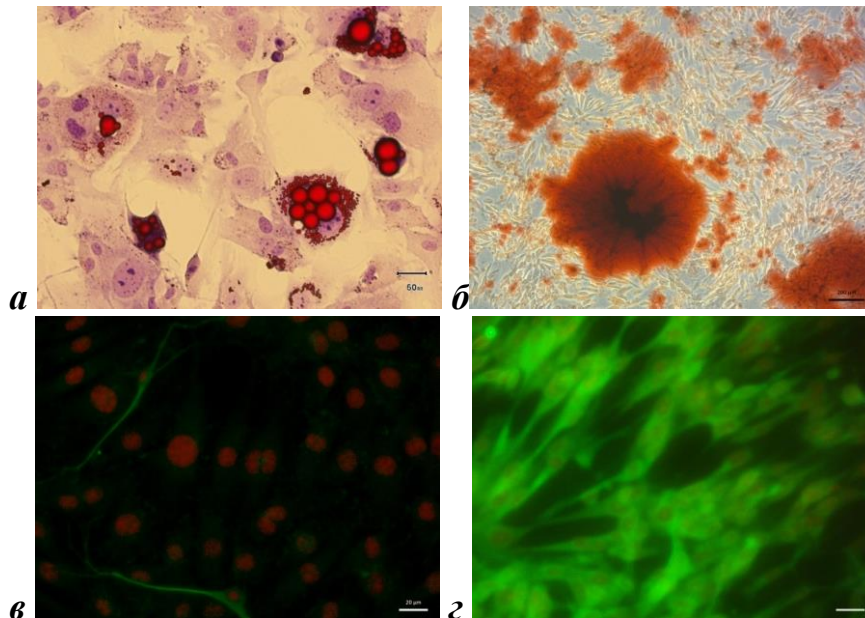


Рис. 8. Направлене диференціювання клональних культур мСК-ПНГ: *а*) адипоцити, забарвлення Oil Red (червоний колір); *б*) остеобласти, забарвлення мінералізованого матриксу Alizarin Red (червоний колір); *в*) нейрони, забарвлення на β -III-tubulin (зелений колір); *г*) Шванівські клітини, забарвлення на S100 β (зелений колір); *а*, *в* та *г* – масштабний відрізок 50 мкм, *б* – масштабний відрізок 200 мкм

Також у роботі показана принципова можливість культивування мСК-ПНГ у тривимірних конструкціях на основі колагенового та фібринового гідрогелів. Життєздатність мСК-ПНГ на всіх етапах підготовки та культивування клітин у складі гідрогелів була вищою за 90 %. Морфологія та життєздатність мСК-ПНГ у складі колагенового та фібринового гідрогелів були подібні при тривалому культивуванні, але показники росту клітин значно відрізнялися (табл. 3).

Таблиця 3

Кількість та життєздатність мСК-ПНГ на різних етапах приготування 3D гідрогелів та культивування в них (M ± s)

| | Перед засівом | КГ 7 діб | ФГ, 7 діб | КГ 14 діб | ФГ 14 діб |
|------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Кількість клітин, $\times 10^3$ | 508,0 ± 13,0 | 654,0 ± 62,0* | 1090,0 ± 136,0* | 728,0 ± 31,0* | 1412,0 ± 101,0* |
| ЖЗ, FDA/PI, % | - | 94,8 ± 1,9 | 95,2 ± 1,9 | 94,4 ± 2,1 | 94,8 ± 1,3 |
| ЖЗ, тр. с., % | 95,6 ± 2,3 | 90,2 ± 1,9 | 90,8 ± 2,6 | 90,6 ± 2,9 | 91,2 ± 1,5 |

Примітка: ЖЗ – життєздатність, КГ – колагеновий гідрогель, ФГ – фібриновий гідрогель. Тр.с. – трипановий синій

*Відмінності значущі ($p < 0,05$) при порівнянні колагенового та фібринового гідрогелів

Дослідження терапевтичного потенціалу постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервовго гребня у модельних системах *in vivo* та *ex vivo*

Вплив трансплантації постнатальних мСК-ПНГ миші на репаративну регенерацію сідничного нерву. У роботі показано стимулюючий вплив трансплантації постнатальних мСК-ПНГ на репаративну регенерацію сідничного нерву. За результатами морфометричного аналізу гістологічних препаратів дистального відрізка сідничного нерва встановлено, що загальна кількість нервових волокон у мишей з трансплантацією мСК-ПНГ більша, ніж у тварин контрольної групи (відповідно $10522,8 \pm 1044,0$ та $8409,5 \pm 739,5$, різниця статистично достовірна, $p < 0,05$).

Оцінка терапевтичного потенціалу постнатальних мСК-ПНГ при трансплантації на органотипову культуру гіпокампу після короткочасної киснево-глюкозної депривації. Трансплантовані постнатальні мСК-ПНГ виживали на

органотипових зрізах гіпокампу протягом усього терміну спостереження (14-ть діб), але вони не диференціювались у клітини, характерні для ЦНС. Разом с тим, трансплантація мСК-ПНГ призводила до виживання ушкоджених внаслідок КГД нейронів зони СА1, що може бути зумовлено паракринним ефектом, тобто продукцією нейротрофінів та факторів росту з антиапоптичною дією (рис. 9).

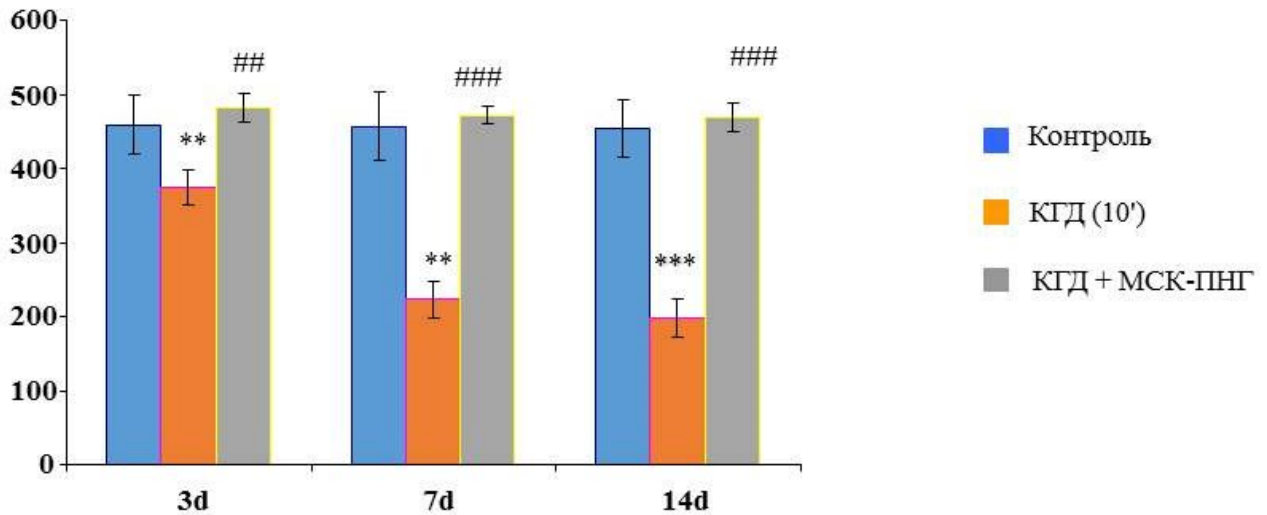


Рис. 9. Кількість NeuN⁺нейронів у зоні СА1 інтактною органотиповою культурою гіпокампу (контроль), після КГД та після КГД і трансплантації мСК-ПНГ

** Відмінності значущі ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем

*** Відмінності значущі ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем

Відмінності значущі ($p < 0,01$) у порівнянні з КГД

Відмінності значущі ($p < 0,001$) у порівнянні з КГД

Отримання, культивування та вивчення морфофункціональних властивостей постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з волосяного фолікула людини. В ході роботи вдалося успішно отримати та розмножити до терапевтичної кількості ($60 \times 10^6 - 100 \times 10^6$ клітин) постнатальні мСК-ПНГ з експлантів ВФ від усіх донорів ($n = 10$). У середньому $15,8 \pm 4,5$ ВФ були отримані з одного зразка шкіри діаметром 5 мм. Слід зазначити, що частина ВФ (1 – 5 на культуру, $16,4 \pm 7,1$ % від експлантованих ВФ) відкріплювалася від субстрату, незважаючи на використання тонкого шару колагенового гідрогелю. Еміграція та проліферація мСК-ПНГ спостерігалася з більш ніж половини експлантованих ВФ. При цьому більшість ВФ виявили змішаний ріст мСК-ПНГ та кератиноцитів ($34,9 \pm 11,6$ % ВФ проти $25,3 \pm 8,8$ % ВФ, що дали гомогенні культури мСК-ПНГ). В застосованих умовах культивування еміграція та проліферація мСК-ПНГ з експлантів почалася на 5 - 10-ту добу, час у первинній культурі у середньому становив $16,2 \pm 2,5$ доби та в середньому з одного ВФ було одержано 10^4 мСК-ПНГ.

Для подальшого розмноження гомогенних культур мСК-ПНГ відокремлювали від домішки кератиноцитів методом диференціальної трипсинізації під час пасажування. Використання 0,01 % розчину трипсину дозволило ефективно знімати мСК-ПНГ, тоді як щільні колонії кератиноцитів залишалися прикріпленими

до субстрату. Відсутність контамінації культури мСК-ПНГ кератиноцитами на П1 була підтверджена імуноцитохімічним аналізом з використанням антитіл до пан-цитокератину, який дав негативний результат.

Для підтвердження походження отриманих клітин із нервового гребня було проведено аналіз їх фенотипу за допомогою імуноцитохімічного аналізу. Було показано, що отримані клітини у первинній культурі (П0) є позитивними за NESTIN, P75 (CD271), SOX10 та SOX2 (рис. 10).

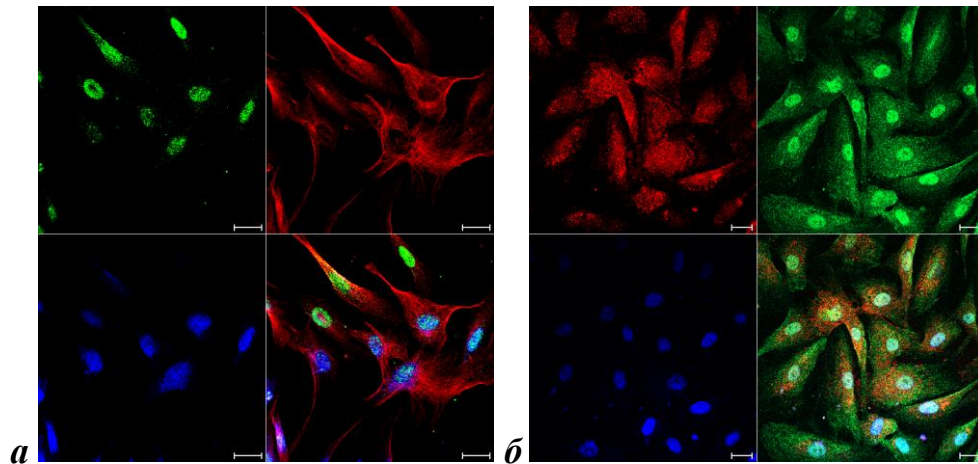


Рис. 10. *а*) Імуноцитохімічний аналіз транскрипційного фактору SOX2 (зелений колір) та білка проміжних філаментів NESTIN (червоний колір). *б*) Імуноцитохімічний аналіз транскрипційного фактору SOX10 (зелений колір) та поверхневого рецептору P75 (червоний колір). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм

Починаючи з П1 у запропонованих умовах культивування відбувалась швидка проліферація мСК-ПНГ. Таким чином, при використанні щільності посіву 500 - 1300 клітин на 1 см², культури досягали 70 - 100 % конфлуентності протягом 5 - 7 діб і пасажували раз на тиждень. При цьому за пасаж відбувалось у середньому $6,04 \pm 0,35$ PDN, з середнім значенням PDT $27,90 \pm 1,58$ години. Ці параметри на П1 - П3 показали незначні відмінності як у культурі клітин від одного донора на різних пасажах, так і між донорами.

Важливими параметрами, що визначають безпеку та ефективність біомедичного продукту на основі клітин людини, є стабільність каріотипу клітин після їх розмноження *in vitro* та кількість КУО. Культури всіх донорів були досліджені за допомогою цитогенетичного аналізу на П1 та після експансії до терапевтичної кількості клітин (П3 – П4). Результати цитогенетичного аналізу показали нормальний каріотип. Тест на КУО показав, що після великомасштабного розмноження постнатальних мСК-ПНГ значне число клітин у культурі зберігало клонотенційний потенціал, а частота КУО становила $25,9 \pm 7,7$ %.

Важливою властивістю стовбурових клітин є здатність до самовідновлення. Для оцінки здатності до самовідновлення було субклоновано 5 КУО від кожного донора. У всіх випадках було виявлено утворення вторинних колоній. Таким чином, постнатальні мСК-ПНГ людини зберігають свій клонотенційний потенціал та здатність

до самовідновлення після масштабного розмноження за розробленим методом культивування.

Фенотип культур мСК-ПНГ з ВФ людини після великомасштабної експансії було досліджено за допомогою проточної цитометрії з використанням антитіл до класичних маркерів клітин нервового гребня (SOX10, P75), загальних маркерів стовбурових клітин (NESTIN, SOX2 та CD34), маркерів мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (CD73, CD90 та CD105), рецепторів для деяких факторів росту (CD140a/PDGFR α , CD140b/PDGFR β та CD349/FRIZZLED-9), молекул адгезії (CD56/NCAM, CD146/MCAM та CD166/ALCAM) та маркерів гемопоетичних (CD45) та антигенпрезентуючих клітин (HLA-DR) (рис.11).

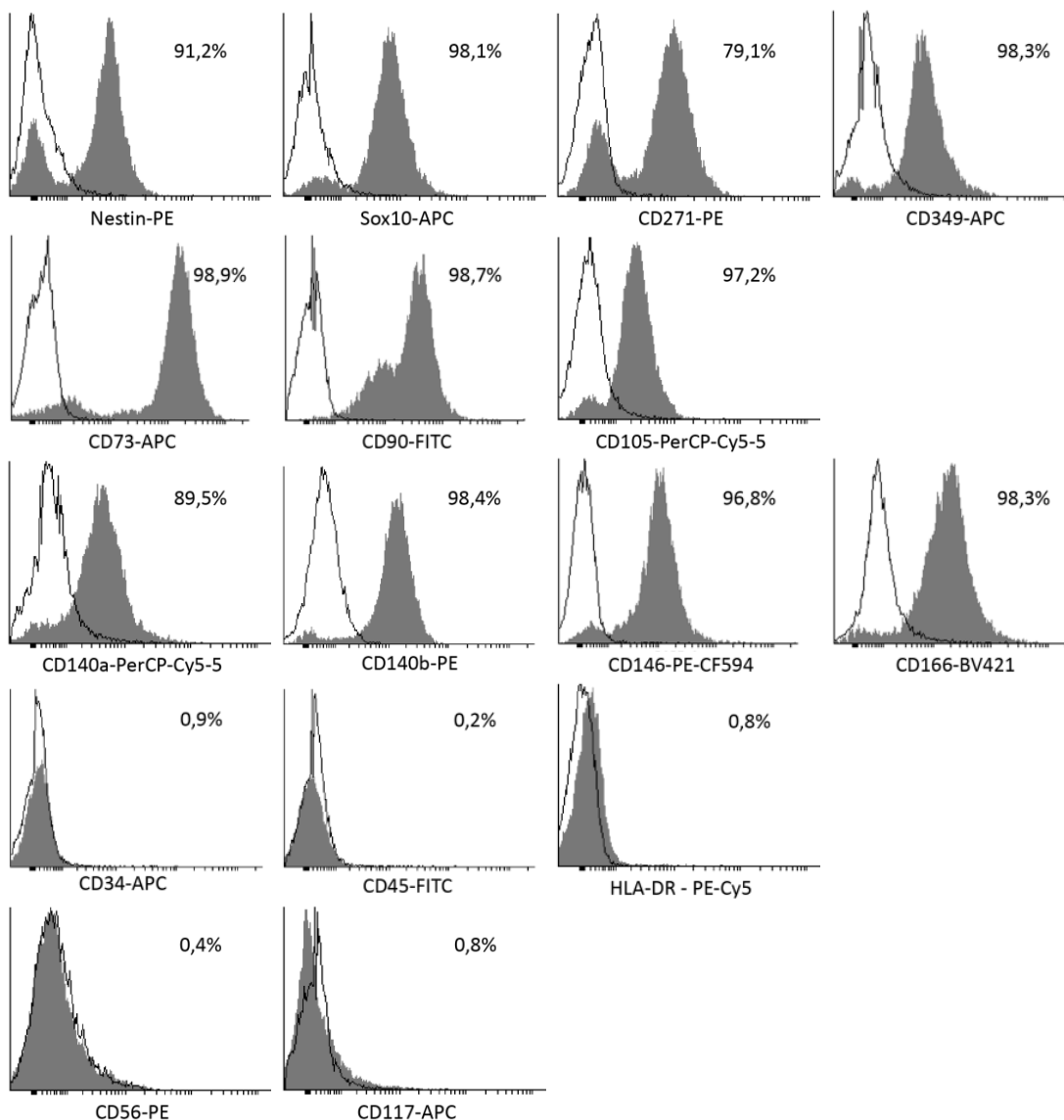


Рис. 11. Імунофенотип постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула людини після експансії *in vitro*

Всі культури мСК-ПНГ після експансії містили понад 90% SOX10⁺ та NESTIN⁺ клітин, але кількість клітин, позитивних за P75 (CD271), значно варіювала від 45,9 до 93,8 % (73,32 ± 18,39 %). Крім того, культури мСК-ПНГ були

позитивними за основними класичними маркерами мезенхімальних стовбурових / стромальних клітин – CD73, CD90 та CD105 (> 90 % клітин). Також в середньому 90 % клітин були позитивними за CD140b, CD166 та CD349. Більш гетерогенними культури були за CD140a ($67,68 \pm 14,26$ % позитивних клітин) та CD146 ($87,92 \pm 8,42$ % позитивних клітин). мСК-ПНГ були негативними за маркерами гемопоетичних клітин CD34 та CD45. Іноді відзначалася невелика кількість CD56⁺ (до 7,8 %) та HLA-DR⁺ (до 4,2 %) клітин.

Таким чином у запропонованих умовах культивування вдалося провести великомасштабну експансію постнатальних мСК-ПНГ з ВФ людини із збереженням їх фенотипових маркерів. Також постнатальні мСК-ПНГ з ВФ людини після великомасштабної експансії зберігали здатність до направленої мультилінійної диференціації (рис. 12).

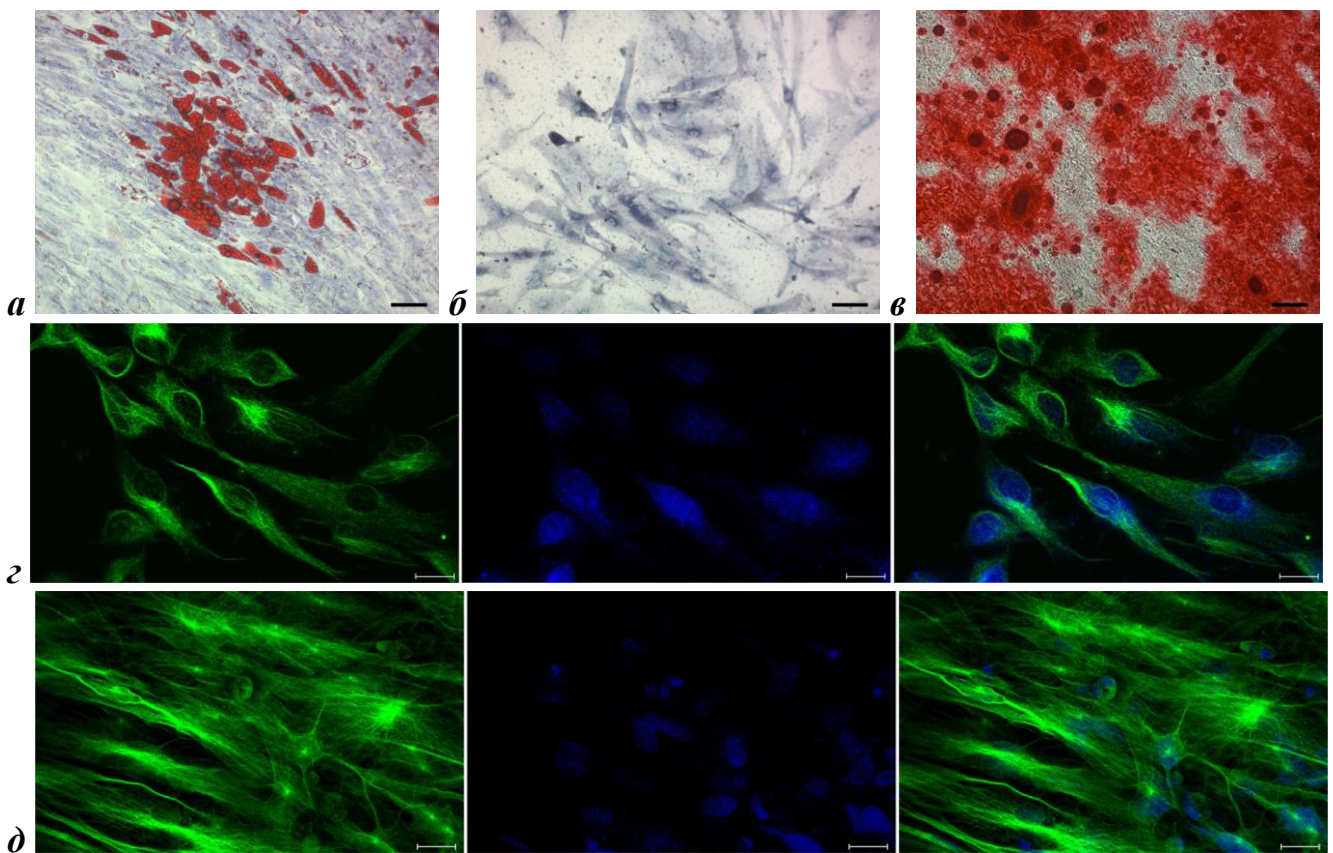


Рис. 12. Мультилінійне диференціювання постнатальних мСК-ПНГ з ВФ людини: *а*) адипоцити, забарвлення ліпідів Oil Red O (червоний колір); *б*) остеобласти, забарвлення на ALP (фіолетовий колір); *в*) – остеобласти мінералізованого позаклітинного матриксу Alizarin Red S (червоний колір); *з*) – Шванівські клітини, забарвлення на S100β (зелений колір); *д*) нейрони, забарвлення на β-III-tubulin (зелений колір); *а*, *б* та *в* – масштабний відрізок 100 мкм, *б* та *д* – масштабний відрізок 50 мкм

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримані нові дані стосовно морфофункціональних властивостей постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула та розроблено біотехнологічні аспекти щодо їх використання у регенеративній медицині (методи експансії постнатальних мСК-ПНГ *in vitro* та створення 3D-конструкцій на їх основі для подальшої трансплантації).

1. Отримано культуру постнатальних мСК-ПНГ з ВФ вібрисів дорослих мишей та доведено відповідність їх морфофункціональних властивостей *in vitro* існуючим літературним даним щодо стовбурових клітин нервового гребня. Виявлено ієрархічну організацію клітин у культурі постнатальних мСК-ПНГ *in vitro*, що базується на існуванні 3 типів колоній (КУО), які відрізняються за здатністю до самовідновлення, морфологією та кількістю клітин в їх складі: КУО I-го типу – до 50 клітин; КУО II-го типу – 100-300 клітин; КУО III-го типу – більше 500 клітин. Визначено, що окрім відомих для стовбурових клітин нервового гребня маркерів (Sox10, p75, Nestin) постнатальні мСК-ПНГ є позитивними за Sox2 та CD349 (Frizzled-9). Встановлено, що у культурі постнатальних мСК-ПНГ існує субпопуляція ALDH^{bright} клітин.

2 Показано, що низька щільність посіву клітин (10 – 1000 клітин / см²) та низький вміст кисню у складі газової фази (5 % та 10 %), поряд с факторами росту bFGF та EGF мають стимулюючий вплив на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ з ВФ вібрисів дорослих мишей. На основі цих даних оптимізовано протокол їх експансії *in vitro*.

3. Встановлено, що на тлі високої життєздатності мСК-ПНГ при культивуванні у колагеновому і фібриновому гідрогелях (94,4 ± 2,1 % та 94,8 ± 1,3 % відповідно), швидкість проліферації мСК-ПНГ вдвічі більша у фібриновому гідрогелі (кількість клітин після 14 діб культивування: (1412,0 ± 101,0) × 10³ та (728,0 ± 31,0) × 10³ відповідно).

5. Показано значний терапевтичний ефект постнатальних мСК-ПНГ у моделях дефекту кісток склепіння критичного розміру, ушкодження периферичного нерву та короткотривалої киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампу мишей лінії FVB.

6. На основі отриманих з використанням постнатальних мСК-ПНГ з ВФ вібрисів миші експериментальних даних розроблено оригінальний метод експансії постнатальних мСК-ПНГ людини із збереженням їх морфофункціональних властивостей

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Multipotent stem cells of bulbar region of hair follicle with properties of neural crest derivatives / R. G. Vasyliiev // Problems of Cryobiology. – 2012 – Vol. 22. – P. 165-168.
2. Clonal multipotency of neural crest-derived stem/progenitor cells from bulge region of adult mammal hair follicle / R. G. Vasyliiev // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, №. 3. – P. 279-282.

3. In vitro properties of neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of whisker follicle / R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko, D. A. Zubov, I. F. Labunets, S. N. Novikova, G. M. Butenko // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Vol. 7, № 4. – P. 71-79.
4. Biological properties of neural crest-derived multipotent stem cells from the bulge region of whisker follicle expanded under new culture condition / R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko, D. A. Zubov, S. Y. Rumar, O. S. Gubar, I. F. Labunets, S. N. Novikova // *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, №6. – P. 469-476.
5. 3D cultivation of neural crest-derived multipotent stem cells in collagen and fibrin hydrogels: effects on cell viability and proliferation / R. G. Vasyliiev, D. A. Zubov, A. E. Rodnichenko, I. F. Labunets, S. N. Novikova // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 50-54.
6. Effects of neural crest-derived multipotent stem cells on regeneration of an injured peripheral nerve in mice / R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko S. N. Shamalo, A. S. Demidchouk, I. F. Labunets, Yu. B. Chaikovskii, G. M. Butenko // *Neurophysiology*. – 2015. – Vol. 47, № 1. – P. 82-86.
7. Large-scale expansion and characterization of human adult neural crest-derived multipotent stem cells from hair follicle for regenerative medicine applications / R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko, O. S. Gubar, A. V. Zlatska, I. M. Gordiienko, S. N. Novikova, D. O. Zubov // *Experimental Oncology*. – 2017. – Vol. 39, №3. – P. 171-180.
8. Comparative analysis of biological properties of large-scale expanded adult neural crest-derived stem cells isolated from human hair follicle and skin dermis / R. G. Vasyliiev, O. S. Gubar, I. M. Gordiienko, L.S. Litvinova, A. E. Rodnichenko, V. V. Shupletsova, A. V. Zlatska, K. A. Yurova, N. M. Todosenko, V. E. Khadzhynova, M. V. Shulha, S. N. Novikova, D. O. Zubov // *Stem Cell International*. – 2019. – Article ID 9640790, 20 pages.
9. Патент на корисну модель UA 66086 Україна, МПК (2011.01) C12N 5/00 Спосіб культивування мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня з бульбарного регіону волосяного фолікула дорослих ссавців / Васильєв Р.Г., Родніченко А.Є., Лабунець І.Ф., Бутенко Г.М.; заявник та патентотримач ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». - № u201106227; заявл. 18.05.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
10. Исследование in vitro биологических свойств мультипотентных стволовых клеток - производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих / [Р. Г. Васильев, А. Е. Роднichenko, Д. А. Зубов та ін.] // *Стволовые клетки и регенеративная медицина* / [Р. Г. Васильев, А. Е. Роднichenko, Д. А. Зубов та ін.]. – Москва: Литтерра, 2014. – С. 39-57.
11. Biological properties of the neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of adult hair follicle at clonal level // R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko, D. A. Zubov, T. S. Shestakova, L. S. Litvinova, O. A. Rybachuk, I. F. Labunets, S. N. Novikova, G. M. Butenko // *ISSCR regional meeting “Stem Cells in Translation”*, Florence, September 15-18, 2013. Abstract 215, P.52-53.
12. Clonal multipotency, self-renewal and spherogenesis of the neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of adult hair follicle / R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko, D. A. Zubov, I. F. Labunets, S. N. Novikova, G. M. Butenko // *World*

Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, 21-23 October 2013: abstracts. - Supplement of Regenerative Medicine, 2013. – P. 174-175.

13. Explore of neural crest-derived multipotent stem cells therapeutic potential for the application in the regenerative medicine / R. G. Vasyliiev, O. S. Lysenko, P. P. Klimenko, A. S. Demydchuk, A. E. Rodnichenko, S. M. Shamalo, O. S. Gubar, D. A. Zubov, A. V. Zlatska, I. F. Labunets, S. M. Novikova, Y. B. Chaikovsky, G. M. Butenko // CYS : Conference for Young Scientists, Kyiv, 21-25 September 2015 : abstract book, Lutsk : Vezha-Print, 2015. – P. 129.

14. Neural crest-derived multipotent stem cells from bulge region of adult hair follicle. Biotechnological aspects of use in regenerative medicine / R. G. Vasyliiev, A. E. Rodnichenko, S. M. Shamalo, A. S. Demydchuk, O. S. Lysenko, S.Y. Rymar, O. S. Gubar, P. P. Klimenko, D. A. Zubov, I. F. Labunets, S. M. Novikova, Y. B. Chaikovsky, G. M. Butenko // World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, 21-23 October 2015 : Meeting Abstracts. - Regenerative Medicine. – 2015. – Vol. 10, №07s. – P. 109.

15. Therapeutic potential of neural crest-derived multipotent stem cells in an in vitro model of ischemic injury of hippocampus / O. A. Rybachuk, A. E. Rodnichenko, D. G. Nesterenko, D. A. Zubov, N. O. Savytska, L. S. Litvinova, V. V. Shupletsova, I. F. Labunets, S. N. Novikova, G. M. Butenko, R. G. Vasyliiev // European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2016, Uppsala, Sweden, 28 June – 01 July 2016. – European Cells and Materials. – 2016. – Vol. 31, Suppl. 1. – P. 311.

16. Cell therapy of combat related spinal cord injury with use of adult neural crest-derived multipotent stem cells / V. F. Grytskyk, A. E. Rodnichenko, O. S. Gubar, O. A. Rybachuk, A. V. Zlatska, D. A. Zubov, R. G. Vasyliiev // Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy 2017, London, UK, 03-06 May 2017: Cytotherapy. – 2017. – Vol. 19, Suppl. – P. S126.

17. Adult neural crest-derived multipotent stem cells for critical sized calvarial bone defects restoration // R. G. Vasyliiev, O. S. Lysenko, V. F. Grytskyk, V. O. Shevchun, A. E. Rodnichenko, P. P. Klimenko, O. S. Gubar, A. V. Zlatska, D. A. Zubov // Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy 2017, London, UK, 03-06 May 2017: Cytotherapy. – 2017. – Vol. 19, Suppl. – P. S140.

АНОТАЦІЯ

Васильєв Р.Г. Морфофункціональні властивості постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з волосяного фолікула та біотехнологічні аспекти їх використання у регенеративній медицині. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20. – біотехнологія – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2019.

У дисертаційній роботі представлені результати наукових досліджень морфофункціональних властивостей постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня (мСК-ПНГ) з вібрисів миші та волосяного фолікула людини, розроблені деякі аспекти їх використання у регенеративній

медицині. У роботі ідентифіковані нові маркери постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула – транскрипційний фактор Sox2 та мембранний рецептор CD349 (Frizzled-9). Вперше показана ієрархічна організація культури мСК-ПНГ, що представлена КУО різних типів, та наявність субпопуляції ALDH^{bright} клітин. Досліджено вплив різних чинників (bFGF, EGF, щільність посіву, вміст кисню у складі газової фази) на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ. Встановлено, що bFGF та EGF мають дозозалежний мітогенний ефект, який більш виражений у bFGF. Виявлено, що низька щільність посіву та знижена концентрація кисню (5 % та 10 %) є кращими для культивування постнатальних мСК-ПНГ. Показано, що постнатальні мСК-ПНГ мають здатність до самовідновлення та до спрямованої мультилінійної диференціації у нейрони, глію (Шванівські клітини), адипоцити, остеобласти та хондроцити. Досліджено життєздатність і проліферативну активність постнатальних мСК-ПНГ при культивуванні у складі фібринового та колагенового 3D гідрогелів. Розроблено метод створення тканинно-інженерного біомедичного продукту на основі постнатальних мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю й остеопластичних матеріалів. Терапевтичний потенціал постнатальних мСК-ПНГ був оцінений на моделях критичного дефекту кісток склепіння, пошкодження периферичного нерва та короточасної киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампу. Встановлено, що постнатальні мСК-ПНГ стимулюють репаративну регенерацію кісток склепіння та периферичного нерва, а також сприяють виживанню нейронів зони CA1 гіпокампу. Також розроблено метод великомасштабної експансії постнатальних мСК-ПНГ людини зі збереженням їх морфофункціональних властивостей з метою створення біомедичних клітинних і тканинно-інженерних продуктів для регенеративної медицини.

Ключові слова: нервовий гребінь, мультипотентні стовбурові клітини, імунофенотип, гідрогелі, остеопластичні матеріали, дефект кісток черепа, великомасштабна експансія клітин *in vitro*, біомедичний продукт на основі клітин людини.

АННОТАЦІЯ

Васильев Р. Г. Морфофункциональные свойства постнатальных мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня из волосяного фолликула и биотехнологические аспекты их использования в регенеративной медицине. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20. – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

В диссертационной работе представлены результаты научных исследований морфофункциональных свойств постнатальных мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня (мСК-ПНГ) из вибрисс мыши и волосяного фолликула человека и разработаны некоторые биотехнологические аспекты их использования в регенеративной медицине. В работе идентифицированы новые маркеры постнатальных мСК-ПНГ из волосяного фолликула – транскрипционный фактор Sox2 и мембранный рецептор CD349 (Frizzled-9). Впервые показана иерархическая организация культуры мСК-ПНГ, представленная КУО разных типов, и наличие субпопуляции ALDH^{bright} клеток. Исследовано влияние различных

факторов (bFGF, EGF, плотность посева, содержание кислорода в составе газовой фазы) на пролиферацию постнатальных мСК-ПНГ. Установлено, что bFGF и EGF обладают дозозависимым митогенным эффектом, который более выражен у bFGF. Выявлено, что низкая плотность посева и пониженная концентрация кислорода (5 % и 10 %) являются предпочтительными для культивирования постнатальных мСК-ПНГ. Показано, что постнатальные мСК-ПНГ обладают способностью к самообновлению и к направленной мультилинейной дифференциации в нейроны, глию (Шваннские клетки), адипоциты, остеобласты и хондроциты. Исследована жизнеспособность и пролиферативная активность постнатальных мСК-ПНГ при культивировании в составе фибринового и коллагенового 3D гидрогелей. Разработан метод создания ткане-инженерного биомедицинского продукта на основе постнатальных мСК-ПНГ, фибринового гидрогеля и остеопластических материалов. Терапевтический потенциал постнатальных мСК-ПНГ был оценен на моделях критического дефекта костей черепа, повреждения периферического нерва и кратковременной кислородно-глюкозной депривации органотипической культуры гиппокампа. Установлено, что постнатальные мСК-ПНГ стимулируют репаративную регенерацию костей черепа и периферического нерва, а также способствуют выживанию нейронов зоны CA1 гиппокампа. Также разработан метод крупномасштабной экспансии постнатальных мСК-ПНГ человека с сохранением их морфофункциональных свойств с целью создания биомедицинских клеточных и ткане-инженерных продуктов для регенеративной медицины.

Ключевые слова: нервный гребень, мультипотентные стволовые клетки, иммунофенотип, гидрогели, остеопластические материалы, дефект костей черепа, крупномасштабная экспансия клеток *in vitro*, биомедицинский продукт на основе клеток человека.

SUMMARY

Vasyliiev R. G. Morphological and functional properties of adult neural crest-derived multipotent stem cells from hair follicle and biotechnological aspects of their use in regenerative medicine. – Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences in speciality 03.00.20. – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis presents the results of scientific research on morphological and functional properties of adult neural crest-derived multipotent stem cells (NCSCs) from mouse whiskers and human hair follicles as well as some biotechnological aspects of their use in regenerative medicine. New markers of postnatal NCSCs from the hair follicle - transcription factor Sox2 and membrane receptor CD349 (Frizzled-9) were identified in the study. The human cultured NC-MSCs common phenotype was detected by flow cytometry and immunocytochemical analysis for key neural crest markers (Sox10, p75), common stem cell markers (Nestin, Sox2 and CD34), markers of mesenchymal stem/stromal cells, mSCs (CD73, CD90 and CD105), receptors for some growth factors (CD140a/PDGFR α , CD140b/PDGFR β and CD349/Frizzled-9), adhesion molecules (CD56/NCAM, CD146/MCAM and CD166/ALCAM) and markers of hematopoietic (CD45) and antigen-presenting cells (HLA-DR). All cultures of NC-MSCs after expansion

contained more than 90% Sox10⁺ and Nestin⁺ cells, but the number of cells expressing p75 (CD271) significantly varied from 45.9 to 93.8 % of positive cells (73.32 ± 18.39 %). The NCSCs homogeneously expressed the key markers of mesenchymal and stem/stromal cells - CD73, CD90 and CD105. All these markers were represented on average in over 90% of cells. Also, on average more than 90% of the cells were positive for CD140b, CD166 and CD349. More heterogeneous cultures expressed the CD140a (67.68 ± 14.26) and CD146 (87.92 ± 8.42). Adult NCSCs was negative for hematopoietic markers CD34 and CD45 (the number of positive cells did not exceed 1 %). Sometimes there was a small number of CD56⁺ cells (up to 7.8 %) and HLA-DR⁺ (up to 4.2 %). Starting from the passage 1 (P1) under optimized by author cell culturing conditions, a steady rapid increase in the number of human NCSCs has begun. Thus, when using cell plate density of 500-1300 cells per 1 cm², the cell cultures reached 70-100 % of the confluence over 5-7 days and were subcultured every each week. Moreover, by a passage, an average PDN value was 6.04 ± 0.35 , and an average PDT value consists of 27.90 ± 1.58 hours. These parameters at the early passages showed no significant differences in the cell culture from one donor during different passages as well as between donors. For the first time, the hierarchical organization of the NCSCs culture is shown, which is justified by the presence of different types of CFUs and a subpopulation of ALDH^{bright} cells. Also, the data provided show that the uses of a modified by author the cell growth medium allows obtaining a culture of postnatal NCSCs from mouse vibrissa follicle, but is not capable of NCSCs maintaining in stem cell state. Mouse postnatal NCSCs expansion up to P3 results in loss of phenotypic and functional signs of stem cells (Nestin, high activity of ALDH, CFU type III), which may indicate a spontaneous differentiation of mouse postnatal cultured NCSCs. Thus, a growth medium with no use of the chicken extract needs further optimization, which may be to select the optimal cell density, use of low oxygen content in the gas phase and use of recombinant growth factors. Moreover, initial low cell seeding density positively influenced the rate of mouse NCSCs proliferation, increasing the doubling number of the population and reducing the average cell population doubling time. The impact of various factors (bFGF, EGF, plating density, oxygen content in the gas phase) on the proliferation of adult NCSCs was tested. It was established that bFGF and EGF have a dose-dependent mitogenic effect, which is more pronounced for bFGF. It was found that low plating density and low concentration of oxygen (5 % and 10 %) are preferred for the culturing of adult NCSCs. It was shown that adult NCSCs have the ability to self-renewal and directed multilineage differentiation into neurons, glia (Schwann cells), adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. The viability and proliferative activity of adult NCSCs during cultivation in fibrin and collagen 3D hydrogels was investigated. A method for creating tissue-engineered biomedical products based on adult cultured NCSCs, fibrin hydrogel and osteoplastic materials was developed. The therapeutic potential of adult NCSCs was evaluated in models of the calvarial bones critical defect, peripheral nerve injury and short-term oxygen-glucose deprivation of the hippocampus organotypic culture. It was shown that adult NCSCs stimulated reparative regeneration processes of the skull bones and peripheral nerve, and also promoted the neurons survival of the hippocampus CA1 zone. The study shows the stimulating effect of mice postnatal cultured NCSCs transplantation on reparative regeneration of the sciatic nerve. Thus, during the morphometric method used for the peripheral segment of the damaged nerve

measurement, it was found that the total number of nerve fibers in mice subjected to NCSCs transplantation was higher than that of control animals (10522.8 ± 1044.0 and 8409.5 ± 739.5 , $p < 0.05$). The transplanted postnatal mice NCSCs survived on organotypic slices of the hippocampus during the entire observation period (14 days), but they did not differentiate into cells that are characteristic of the CNS. However, transplantation of NCSCs resulted in the survival of the oxygen/glucose deprivation-damaged neurons in the hippocampal CA1 region, which may be due to the paracrine (trophic) effect reflected by cell production of neurotrophins and growth factors with anti-apoptotic action. A method for large-scale expansion of adult NCSCs with a preservation of their morphology and functional properties was also developed in order to create biomedical cell- and tissue-engineered products for regenerative medicine.

Key words: neural crest, multipotent stem cells, immunophenotype, hydrogels, osteoplastic materials, calvarial bones defect, large-scale cell expansion *in vitro*, human cells-based biomedical product.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

| | |
|---------|--|
| 3D | three dimensional |
| ALDH | aldehyde dehydrogenase |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| CD | cluster of differentiation |
| EGF | Epidermal growth factor |
| PDN | population doubling number |
| PDT | population doubling time |
| ВФ | волосяний фолікул |
| ВФВ | волосяний фолікул вібрисів |
| ЖЗ | життєздатність |
| КГ | колагеновий гідрогель |
| КГД | киснево-глюкозна депривація |
| КУО | колонієутворюючі одиниці |
| мСК-ПНГ | мультипотентні стовбурові клітини – похідні нервового гребня |
| НГ | нервовий гребінь |
| П | пасаж |
| Тр.с. | трипановий синій |
| ЕК | Ефективність колонієутворення |
| ЕКЕ | екстракт курячих ембріонів |
| ЕТС | ембріональна теляча сироватка |
| ФГ | фібриновий гідрогель |