

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ
НАМН УКРАЇНИ»**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВАСИЛЬЄВ РОМАН ГЕННАДІЙОВИЧ

УДК: 576.524 + 576.35 : 577.12

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Р.Г. Васильєв

Науковий керівник: Новікова Світлана Миколаївна,
доктор медичних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» – ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАНМ України», Київ, 2019.

У дисертаційній роботі представлені результати наукових досліджень морфофункціональних властивостей постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня (мСК-ПНГ) з вібрисів миші і волосяного фолікула людини, і розроблені деякі аспекти їх використання в регенеративній медицині. В роботі ідентифіковані нові маркери постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула – транскрипційний фактор Sox2 і мембранний рецептор CD349 (Frizzled-9). Вперше показано ієрархічну організацію культури мСК-ПНГ, що представлена КУО різних типів, та наявність субпопуляції ALDH^{bright} клітин. Досліджено вплив різних чинників (факторів росту (bFGF та EGF), щільності посіву, вмісту кисню в складі газової фази) на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ. Встановлено, що bFGF та EGF мають дозозалежний мітогенний ефект на постнатальні мСК-ПНГ. Виявлено, що низька щільність посіву та знижений вміст кисню (5 % і 10 %) є кращими для культивування постнатальних мСК-ПНГ. Показано, що постнатальні мСК-ПНГ мають здатність до самовідновлення і до направленої мультилінійної диференціації в нейрони, глію (Шванівські клітини), адипоцити, остеобласти і хондроцити. Досліджено життєздатність і проліферативну активність постнатальних мСК-ПНГ при культивуванні в складі фібринового і колагенового 3D гідрогелів. Розроблено метод створення тканинно-інженерного біомедичного продукту на основі постнатальних мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та остеопластичних

матеріалів. Терапевтичний потенціал постнатальних мСК-ПНГ був оцінений на моделях критичного дефекту кісток склепіння, пошкодження периферичного нерва і короткочасної киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампу. Встановлено, що постнатальні мСК-ПНГ стимулюють репаративну регенерацію кісток склепіння і периферичного нерва, а також сприяють виживанню нейронів зони CA1 гіпокампу. Також розроблено метод великомасштабної експансії постнатальних мСК-ПНГ людини із 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.

Список публікацій здобувача

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. (*Особистий внесок: розробка та проведення експерименту*).
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. (*Особистий внесок: розробка та проведення експерименту*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлюоресцентний та цитохімічний аналіз*).

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. (*Особистий внесок: культуральна робота, написання рукопису*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, написання рукопису*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, підготовка та характерізація клітинних препаратів для трансплантації*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлюоресцентний та цитохімічний аналіз, написання рукопису*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлюоресцентний та цитохімічний аналіз, написання рукопису*).

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. (*Особистий внесок: розробка способу культивування, написання патенту*).
10. Исследование *in vitro* биологических свойств мультипотентных стволовых клеток- производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих / [**Р. Г. Васильев**, А. Е. Родниченко, Д. А. Зубов та ін.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина / [**Р. Г. Васильев**, А. Е. Родниченко, Д. А. Зубов та ін.]. – Москва: Литтерра, 2014. – С. 39-57. (*Особистий внесок: культуральна робота, написання рукопису*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, отримання та характеризація клональних культур*).
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. (*Особистий внесок: культуральна робота, написання рукопису*).
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.

(Особистий внесок: культуральна робота, написання рукопису).

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.

(Особистий внесок: культуральна робота, розробка та проведення експерименту, написання рукопису).

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.

(Особистий внесок: культуральна робота, виготовлення клітинних препаратів для трансплантації).

16. Cell therapy of combat related spinal cord injury with use of adult neural crest-derived multipotent stem cells / V. F. Grytsyk, 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.

(Особистий внесок: культуральна робота, виготовлення клітинних препаратів для клінічного застосування).

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. (*Особистий внесок: культуральна робота, виготовлення 3D-конструкцій, моделювання дефекту кісток*).

SUMMARY

Vasyliiev R.G. Morphofunctional properties of adult neural crest-derived multipotent stem cells from hair follicle and biotechnological aspects of their using 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 morphofunctional properties of adult neural crest-derived multipotent stem cells (NC-MSCs) from mouse whiskers and human hair follicles together with some biotechnological aspects of their use in regenerative medicine. New markers of postnatal NCSC from the hair follicle - transcription factor Sox2 and membrane receptor CD349 (Frizzled-9) were identified in the work. For the first time, the hierarchical organization of the NC-MSC culture is shown, which is justified by the presence of different types of CFU and a subpopulation of ALDH^{bright} cells. The impact of various factors (bFGF, EGF, plating density, oxygen content in the gas phase) on the proliferation of adult NC-MSCs was tested. It was established that bFGF and EGF have a dose-dependent mitogenic effect, which is more pronounced in bFGF. It was found that low plating density and low concentration of oxygen (5% and 10%) are preferred for the cultivation of adult NC-MSCs. It was shown that adult NC-MSCs 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 NC-MSCs during cultivation in fibrin and collagen 3D hydrogels was investigated. A method for creating a tissue-engineered biomedical product based on adult NC-MSCs, fibrin hydrogel and osteoplastic materials was developed. The therapeutic potential of adult NC-MSCs 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 NC-MSCs stimulated reparative regeneration of

the skull bones and peripheral nerve, and also promoted the neurons survival of the hippocampus CA1 zone. A method for large-scale expansion of adult NC-MSCs with a preservation of their morphofunctional properties was also developed in order to create biomedical cellular and tissue engineered products for regenerative medicine.

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

List of publications published on the topic of the dissertation:

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. Родниченко, Д. А. Зубов та ін.] // *Стволовые клетки и регенеративная медицина* / [**Р. Г. Васильев**, А. Е. Родниченко, 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. Vasyliev**, 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. Vasyliev**, 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. Vasyliev**, 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. Vasyliev** // 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. Grytsyk, A. E. Rodnichenko, O. S. Gubar, O. A. Rybachuk, A. V. Zlatska, D. A. Zubov, **R. G. Vasyliev** // 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. Vasyliev**, O. S. Lysenko, V. F. Grytsyk, 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.

ЗМІСТ

С.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасний стан, досягнення та перспективи регенеративної медицини

1.2 Історія відкриття та вивчення нервового гребня. Нервовий гребінь в онтогенезі та філогенезі хребетних

1.3 Мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребня на різних етапах онтогенезу: ембріональні премігаторні, ембріональні мігаторні та постнатальні

1.4 Перспективи використання мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня у регенеративній медицині

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Культивування мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня

2.1.1 Отримання мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з волосяного фолікулу вібрисів миші та волосяного фолікулу людини

2.1.2 Тест на колонієутворюючі одиниці в умовах клональної щільності посіву

2.1.3 Субклонування колонієутворюючих одиниць. Отримання та культивування клональних культур клітин

2.1.4 Направлене диференціювання мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня

2.1.5 Культивування мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня у вигляді флотуючих 3D сфер

- 2.1.6 Культивування мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня у складі 3D гідрогелей та на поверхні остеопластичних матеріалів
- 2.1.7 Дослідження впливу різних чинників на проліферацію мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня для подальшої оптимізації умов культивування
- 2.1.8 Визначення кількості та життєздатності клітин. Оцінка проліферації та цитотоксичності
- 2.2 Молекулярно-біологічні, цитологічні та гістологічні методи дослідження
 - 2.2.1 Імуноцитохімічний аналіз
 - 2.2.2 Проточна цитометрія
 - 2.2.3 Цитохімічні методи забарвлення клітинних культур
 - 2.2.4 Виготовлення гістологічних препаратів
 - 2.2.5 Виділення мРНК
 - 2.2.6 Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією
 - 2.2.7 Кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі
 - 2.2.8 Визначення продукції клітинами у культурі факторів росту та цитокінів за допомогою імуноферментного аналізу та мультиплексного аналізу
- 2.3 Модельні системи *in vivo* та *in vitro* для оцінки терапевтичного потенціалу мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня
 - 2.3.1 Моделювання дефекту кісток склепіння критичного розміру та трансплантація 3D-конструкцій на основі мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня
 - 2.3.2 Моделювання ушкодження сідничного нерву (перетин) та трансплантація мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня

2.3.3 Моделювання короткочасної киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампу та трансплантація мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня

2.5 Мікроскопічні методи дослідження

2.6 Статистичні методи дослідження

РОЗДІЛ 3 МОРФОУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБНЯ ІЗ ВОЛОСЯНОГО ФОЛІКУЛА ВІБРИСІВ МИШІ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ЇХ ЕКСПАНСІЇ *IN VITRO*

3.1 Отримання та культивування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин -похідних нервового гребня з волосяного фолікула вібрисів миші з використанням модифікованого живильного середовища

3.2 Оптимізація умов культивування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші

3.2.1 Вплив щільності посіву на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші

3.2.2 Вплив факторів росту на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші

3.2.3 Вплив вмісту кисню у складі газової фази на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші

3.3 Дослідження морфофункціональних властивостей постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші при культивуванні у різних живильних середовищах

3.3.1 Імунофенотип постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші

3.3.2 Направлене диференціювання постнатальних мультипотентних

стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші

3.3.3 Дослідження клоногенного потенціалу постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші та їх здатності до самовідновлення

3.3.4 Направлене диференціювання клональних культур

3.4 Дослідження життєздатності та проліферації постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші при 3D культивуванні у складі колагенового та фібринового гідрогелю

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБНЯ У МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

4.1 Вплив трансплантації постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші на репаративну регенерацію дефекту кісток склепіння критичного розміру

4.1.1 Створення та оцінка біосумістності 3D конструкцій на основі постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня миші, фібринового гідрогелю та остеопластичних матеріалів

4.1.2 Гістоморфометричне дослідження репаративної регенерації дефекту критичного розміру кісток склепіння миші

4.2 Вплив трансплантації постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші на репаративну регенерацію сідничного нерву

4.3 Оцінка терапевтичного потенціалу постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші при трансплантації на органотипову культуру гіпокампу після короткочасної киснево-глюкозної депривації

РОЗДІЛ 5. ОТРИМАННЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОСТНАТАЛЬНИХ
МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ
НЕРВОВОГО ГРЕБНЯ З ВОЛОСЯНОГО ФОЛКУЛА ЛЮДИНИ

РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

ВИСНОВКИ

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

ДОДАТКИ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

EN

UA

ВСТУП

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., Моонеу Д.Д. 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 індуковані 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 [Bilko 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 (відповіддю 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 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 морфофункціональних 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 (всі 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 і структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 164 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 44 рисунками та 10 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасний стан регенеративної медицини

На теперішній час існує декілька прикладів успішного розвитку методів регенеративної медицини, заснованих на біологічних і біотехнологічних інноваціях. Так, в 1975 році J. Rheinwald та H. Green підібрали умови для серійного культивування епідермальних кератиноцитів людини [Rheinwald J.G. et al., 1975]. На основі даної методики була розроблена технологія отримання придатних для трансплантації стратифікованих шарів кератиноцитів [Green H. et al., 1979], які невдовзі були використані для лікування пацієнтів з обширними та глибокими опіками [Gallico G.G. et al., 1984].

Спосіб культивування епідермальних кератиноцитів став основою для розробки методик культивування інших типів епітеліальних клітин, зокрема – лімбальних стовбурових клітин епітелію рогівки. Трансплантація культивованих аутологічних лімбальних стовбурових клітин показала ефективність при лікуванні ряду ушкоджень та захворювань рогівки, патогенез яких обумовлений лімбальною недостатністю [Pellegrini G. et al., 1997]. У 2014 році “Holoclar” (аутологічний культивований епітелій рогівки, що містить лімбальні стовбурові клітини) став першим затвердженим ЕМЕА медичним препаратом для клінічного застосування, що містить розмноженні *in vitro* стовбурові клітини [Galli M.C., Serabian M., 2015].

В 1981 році Е. Bell заклав основи тканинної інженерії, описавши методи створення *in vitro* живого еквіваленту дерми (з фібробластів і колагенового гелю) та повношарового живого еквіваленту шкіри (з фібробластів, кератиноцитів та колагенового гелю) [Bell E., 1981]. В подальшому різноманітні аналоги живих еквівалентів шкіри та дерми почали з успіхом використовуватись для лікування опіків, хронічних ран, трофічних виразок шкіри та для проведення фармакологічних досліджень [Bello Y. et al., 2001].

В 1994 році М. Brittberg запропонував спосіб лікування глибоких дефектів суглобового хряща за допомогою аутологічних культивованих хондроцитів [Brittberg M., 1994]. На сьогодні ЕМЕА ухвалило два медичних продукта, заснованих на культивованих аутологічних хондроцитах: “ChondroSelect” (суспензія хондроцитів, 2009 г., перший медичний продукт, заснований на культивованих *in vitro* клітинах людини в ЄС) та “МАСІ” (matrix-induced autologous chondrocyte implantation, 2012 г., - подальший розвиток даної технології, який полягає в комбінації хондроцитів з колагеновою мембраною) [Galli M.C., Serabian M., 2015].

J. Thompson в 1998 році вперше отримав лінії плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) людини, що здатні диференціюватися в будь-які типи соматичних клітин [Thompson J., 1998]. В 2009 році корпорація “Geron” отримала дозвіл від FDA на проведення перших в світі клінічних випробувань клітинного препарату, отриманого з ЕСК (клітини-попередники олігодендроцитів для лікування ушкоджень спинного мозку) [Alper J., 2009]. Другими дозволеними клінічними випробуваннями з використанням похідних ЕСК стала трансплантація пігментного епітелію сітківки для лікування макулодистрофії [Schwartz S. et al., 2012].

Група японських вчених під керівництвом S. Yamanaka в 2006 році розробила метод отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) з диференційованих постнатальних соматичних клітин

[Takahashi K. et al., 2006]. За це відкриття в 2012 році S. Yamanaka був нагороджений Нобелівською премією в галузі фізіології та медицини. Вже 12 вересня 2014 року відбулася перша трансплантація клітинного препарату, отриманого з іПСК – шару пігментного епітелію сітківки для лікування «вологої» форми вікової макулярної дегенерації [Mandai M. et al., 2017].

Також відомі успішні випадки клінічного використання тканинно-інженерних конструкцій для відновлення кістки [Quarto R. et al., 2001], сечового міхура [Atala A. et al., 2006], трахеї [Macchiarini P. et al., 2008], та ін. [Langer R., Vacanti J., 2016].

1.2. Історія відкриття та вивчення нервового гребеня. Нервовий гребінь в онтогенезі та філогенезі хребетних

Нервовий гребінь (НГ) є унікальною для хребетних транзитною структурою в ході ембріонального розвитку. Вперше НГ був описаний швейцарським ембріологом Wilhelm His в 1868 році [His W., 1868]. Він ідентифікував тяж клітин, які знаходяться між нервовою трубкою, що розвивається, та майбутньою епідермальною ектодермою, як джерело краніальних і спинальних нервових гангліїв у курячого ембріона і дав цьому тяжу назву “*Zwischenstrang*” (нім.) – “шнур, що лежить поміж”. W. His був одним із перших ембріологів, який запропонував причинно-наслідкове пояснення процесу ембріонального розвитку, що базується на принципах фізичної механіки, фізіології розвитку, концепції існування у ембріона детермінованих орган-формуєчих гермінальних регіонів. Кожний із таких гермінальних регіонів вміщує клітини із визначеною долею розвитку. У 1874 р. він включив *Zwischenstrang* в перелік орган-формуєчих гермінальних регіонів [His W., 1874].

Термін “neural crest” (англ.) – “нервовий гребінь” вперше запропонував британський професор зоології Arthur Milnes Marshall у своїй роботі по розвитку нюхового органу в 1879 р. [Marshall A.M., 1879].

W. His и A. M. Marshall незалежно ідентифікували НГ як джерело походження краніальних та спінальних гангліїв та їх нейронів. Цей факт легко був прийнятий науковою спільнотою на підставі взаємозв'язку даних структур НГ з дорсальною нервовою трубкою. Однак, в 1890-х роках американська дослідниця-ембріолог Julia Platt, вивчаючи саламандру *Necturus maculosus* постулювала, що хрящ краніофасіального скелету та жаберних дуг, а також одонтобласти (клітини, які формують дентин) виникають із прилеглої до нервової трубки ектодерми [Platt J.V., 1893; Platt J.V., 1894]. Не дивлячись на гарну доказову базу та підтвердження цих даних іншими ембріологами, це відкриття не було визнано в той час, оскільки суперечило теорії зародкових листків, згідно якій хрящ виникає з мезодерми.

Лише через 50 років завдяки експериментам шведського ембріолога Sven Horstadius, виконаним на ембріонах амфібій, походження жаберних хрящів з НГ та скелетогенний потенціал НГ набули загального визнання [Horstadius S., 1941]. Тоді НГ був визнаний як джерело пігментних клітин (хроматофорів) та елементів нервової системи, таких як спінальні ганглії. Ці дані були узагальнені Sven Horstadius в його монографії [Horstadius S., 1950], видання якої стало важливою віхою в дослідженні НГ, а сама монографія в подальшому була двічі перевидана.

В 1960-х-1970-х роках акцент у вивченні НГ перемістився на ембріони птахів та дослідження механізмів міграції клітин НГ. Це відбулося завдяки появі нових експериментальних підходів до дослідження НГ. Американський нейробиолог James Weston вперше використав радіоактивну мітку (³H-тимідин) для вивчення міграції клітин НГ [Weston J., 1963]. Потім французька дослідниця Nicole Le Douarin розробила метод створення та дослідження химерних ембріонів курка-перепелиця [Le Douarin N.M., 1974]. За цим методом сегмент нервової трубки з прилеглим НГ на преміграторній стадії трансплантувався від ембріона перепелиці курячому ембріонові. Потім отриманий химерний ембріон деякий час розвивався та піддавався

гістологічному аналізу. Мігрувавши в тканини та органи курячого ембріону клітини НГ перепелиці могли бути ідентифіковані при забарвленні ДНК за R. Feulgen за рахунок наявності в них особливого ядерного маркера. Дані методи дозволили побудувати детальну мапу клітин НГ та зробити висновок про те, що вплив мікрооточення є важливою детермінантою міграції та диференціювання клітин НГ. Надалі формулюється концепція нейрокрістопатій – спадкових захворювань, пов'язаних з порушенням міграції, диференціювання та міжклітинних взаємодій клітин нервового гребня [Bolande R., 1974].

В 1980-х роках з'являються вітальні ліпофільні барвники для прижиттєвого мічення клітин НГ [Serbedzija G., 1989] та перші моноклональні антитіла для визначення клітин НГ, що дозволило вивчати ембріонів ссавців [Tucker G. et al., 1984; Bronner-Fraser M. et al., 1987; Serbedzija G., 1992].

Пізніше в 1990-х роках завдяки розвитку методів молекулярної біології та генетики вдалось встановити взаємозв'язок між певними мутаціями, розвитком субпопуляцій клітин НГ і морфогенетичними дефектами [Morrison-Graham K., 1992; Morriss-Kay G., 1996]. Також з'являються перші лінії трансгенних мишей, створених спеціально для вивчення міграції клітин НГ та їх ролі в морфогенезі [Lo C. et al., 1997].

В 2000 р. надруковані дві роботи однієї групи авторів, які описують створення і використання подвійних трансгенних мишей *Wnt1-Cre/ROSA26* для вивчення розвитку та ролі клітин НГ в морфогенезі зубів, нижньої щелепи та серця [Chai Y. et al., 2000; Jiang X. et al., 2000]. Першим компонентом даної системи є трансген, кодуючий Cre-рекомбіназу під контролем промотора та енансера гена *Wnt1*. Ген *Wnt1* експресується специфічно в клітинах нервової пластинки, дорсальної нервової трубки і ранніх міграторних клітинах НГ. Експресія гена *Wnt1* в клітинах НГ затухає в ході їх міграції по мірі віддалення від нервової трубки. Більше ген *Wnt1* у миші не експресується ні в будь-який інший період ембріонального розвитку

або постнатального життя, ні в будь-яких інших тканинах і органах [Echelard Y. et al., 1994]. Другим компонентом є репортерний ген R26R, який експресує β -галактозидазу із локуса ROSA26 тільки після Cre-опосередкованої рекомбінації [Soriano P. et al., 1999]. Локус ROSA26 експресується убіквітарно та однорідно у всіх клітинах та на всіх стадіях ембріонального та постнатального розвитку миші. За відсутності рекомбінації з локуса ROSA26 транскрибується некодуюча послідовність, тоді як після Cre-опосередкованої рекомбінації транскрипт кодує повністю функціональний білок β -галактозидази. Важливо, що нащадки клітин, в яких відбулася рекомбінація, продовжують продукувати β -галактозидазу навіть якщо *Wnt1-Cre* трансген стає неактивним. Дана трансгенна система стала першою, яка дозволяє вибірково, ефективно та стабільно маркувати клітини НГ на різних стадіях розвитку організму миші. В подальшому, завдяки цій системі та її модифікаціям, було доведено походження з НГ клітин Меркеля [Szeder V., 2003], субпопуляції адипоцитів [Billon N., 2007], клітин нюхової глії [Barraud P., 2010] та механорецепторів корпускул Мейсснера [Widera D., 2012].

На основі аналізу даних з галузі біології розвитку, еволюційної біології, кладистичного аналізу, молекулярної біології та генетики канадський вчений Brian Hall сформулював концепцію про те, що НГ є четвертим зародковим листком, поява якого відіграла ключову роль в еволюції хребетних [Hall B., 1997; Hall B., 2000; Hall B., 2009]. В теперішній час ця точка зору отримала широке розповсюдження, визнання і підтримку [Muñoz W., 2015].

Згідно сучасних уявлень, НГ є транзиторною структурою в ході ембріонального розвитку хребетних. НГ походить з ектодерми і формується із нейроектодерми на кордоні з соматичною ектодермою (рис. 1). Первинно НГ представлений популяцією клітин, які лежать у вигляді епітеліальних тяжів з обох сторін нервової трубки, що формується. По завершенні процесу нейруляції клітини НГ підлягають епітеліо-мезенхімальному переходу (ЕМП) та мігрують дистантно в різні тканини і органи ембріона, який

розвивається, де і надають початок різним диференційованим клітинним типам [Dupin E., 2006].

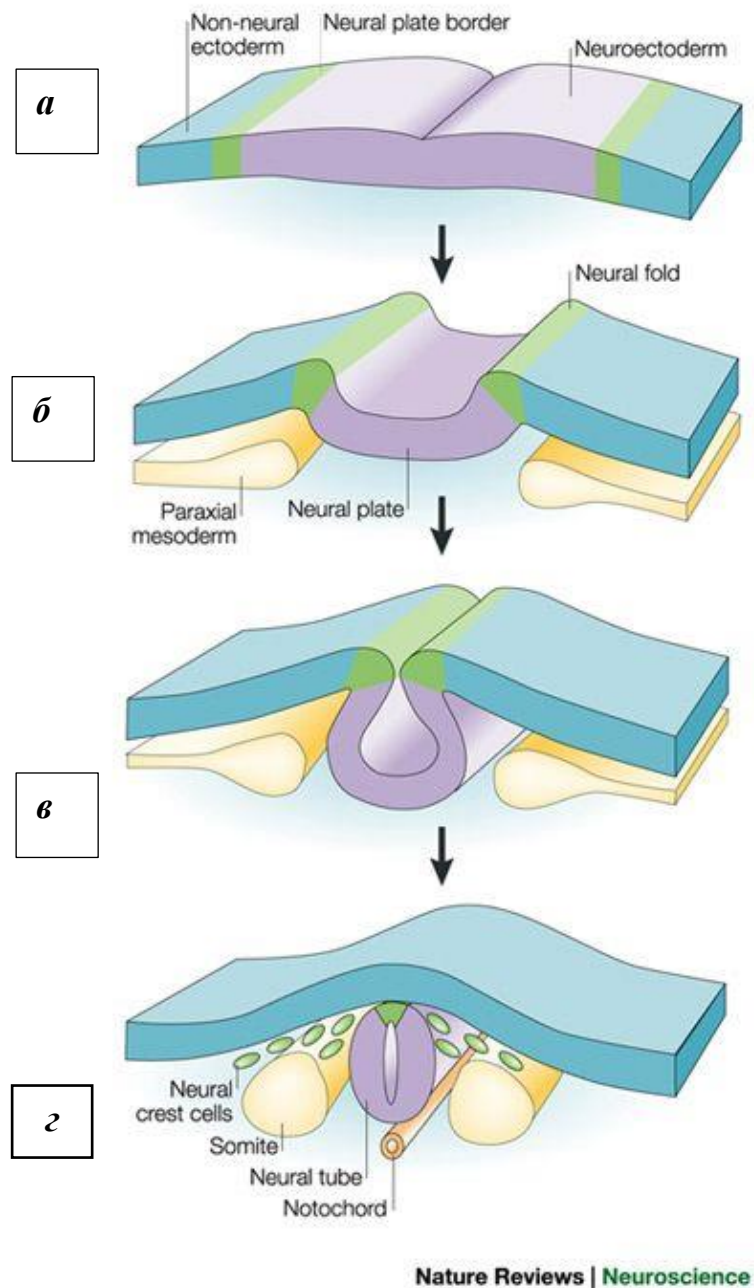


Рис. 1.1. Схема стадій формування НГ в процесі нейруляції. *a*) індукція формування НГ на кордоні презумптивної нервової пластинки та епідермальної ектодерми; *б*) початок нейруляції; *в*) завершення нейруляції, епітеліо-мезенхімальний перехід в клітинах НГ; *з*) її деламінація та початок міграції клітин НГ. Адаптовано до [Dupin E, Sommer L., 2012]

Процес нейруляції відбувається неодноразово по всій осі ембріону. Відповідно і формування НГ розтягнуто у часі (продовжується з моменту початкової стадії пізньої гастрული і до пізнього органогенезу) та просторі (відбувається в росто-каудальному напрямку). На розвиток НГ мають вплив зовнішні та внутрішні сигнали, а весь складний ланцюг подій від індукції НГ до його специфікації та наступного диференціювання, знаходиться під контролем генної регуляторної сітки [Meulemans D., 2004; Sauka-Spengler T., 2007]. На сьогодні ідентифіковані як регуляторні сигнали, так і більшість компонентів генної регуляторної сітки (рис. 2).

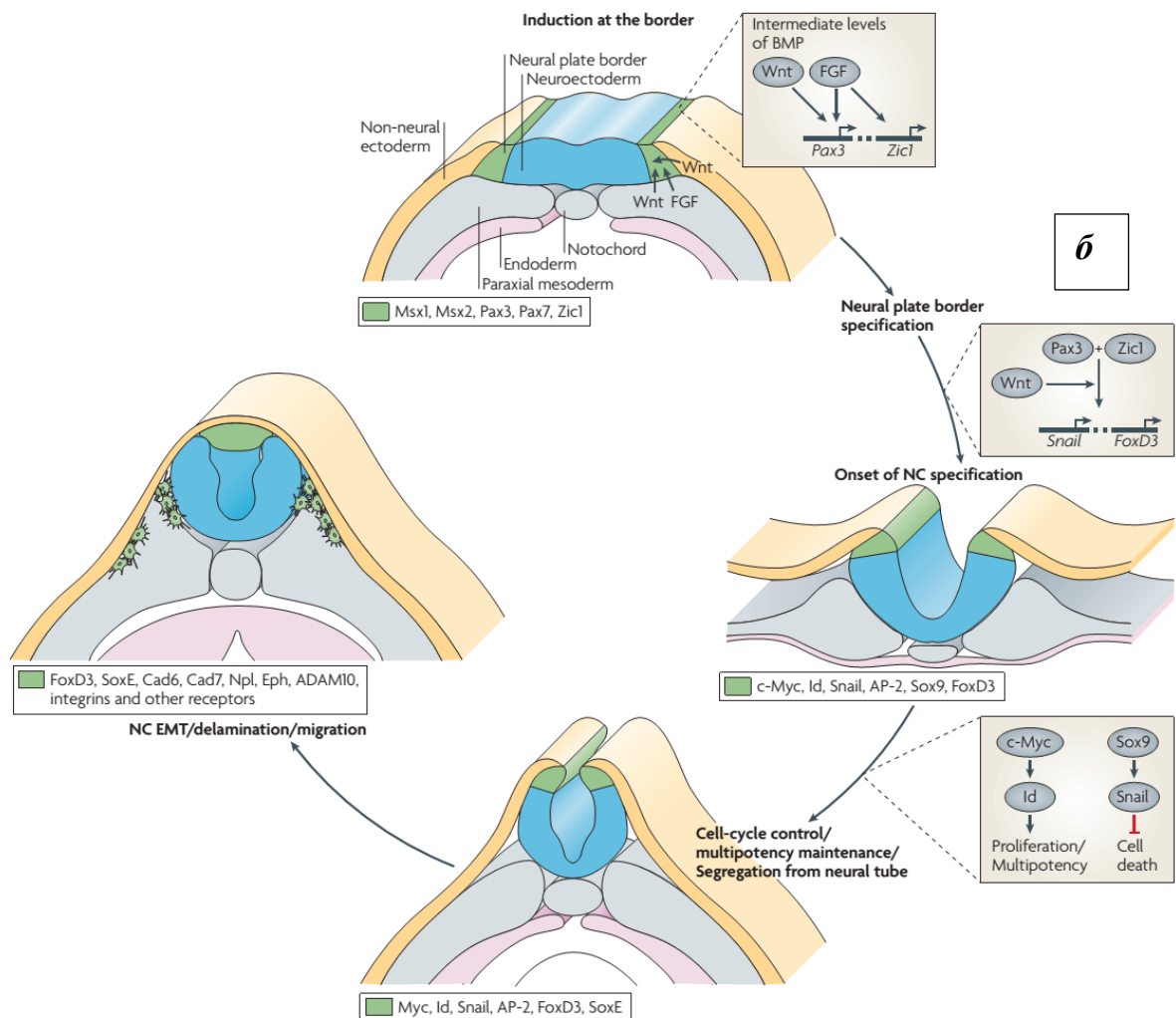


Рис. 1.2. Регуляторні сигнали та компоненти регуляторної сітки генів на різних етапах формування НГ. Адаптовано до [Sauka-Spengler T., Bronner-Fraser M., 2008]

Існує декілька основних шляхів міграції клітин НГ (рис. 3). Перший шлях міграції – вентромедіальний. Мігруючи по цьому шляху клітини НГ проходять повз передню частину шкірного склеротому та диференціюються в клітини сенсорних гангліїв дорсальних корешків спинного мозку, симпатичні нейрони, клітини мозкової речовини надниркової залози та Шваннівські клітини. Другий шлях міграції – дорсолатеральний, між епідермісом і дермоміотомом. Мігруючи по даному шляху клітини проходять повз щілини в базальній мембрані в епідерміс та диференціюються, переважно, в меланоцити.

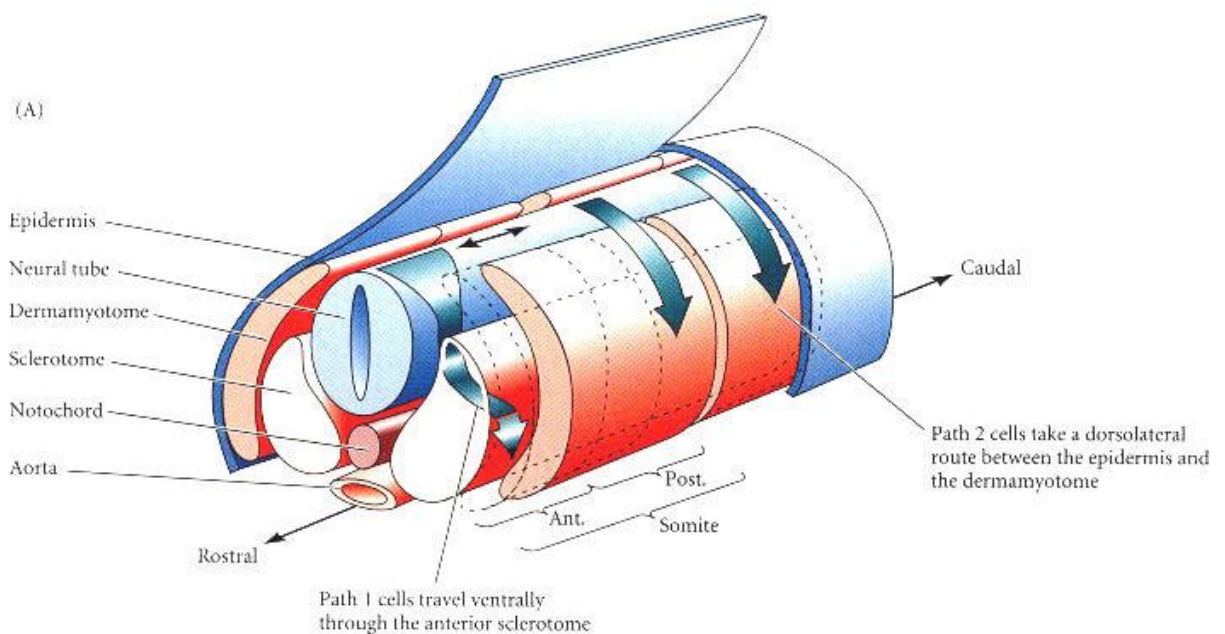


Рис. 1. 3. Шляхи міграції клітин НГ на рівні його тулубного відділу. Шлях 1 – вентромедіальний. Шлях 2 – дорсолатеральний. Адаптовано до [Dupin E., Creuzet S., and Le Douarin N. M., 2006]

Клітини НГ утворюються практично на всьому протязі замикаючої нервової трубки – від ділянки проміжного мозку (Diencerhalon) до крижових (сакральних) відділів нижче рівня 28-го сомїта. Виділені зі різних відділів нервової трубки клітини НГ приймають участь в утворенні різних структур; у

зв'язку з цим в НГ розрізняють декілька відділів або рівнів за довжиною зародка.

У дорослому організмі хребетних похідними НГ є наступні клітинні типи: нейрони та глія периферичної нервової системи, більша частина сенсорних нейронів, меланоцити, клітини Меркеля, одонтобласти, стромальні та ендотеліальні клітини рогівки, С-клітини тиреоїдної залози, мозкова речовина наднирників, частина строми тимуса [Dupin E., 2006; Hall B., 2009].

Найбільшою пластичністю володіють клітини краніального відділу НГ – окрім диференціювання в ряд перерахованих вище клітинних типів вони формують частину кісткової, хрящової та сполучної тканини обличчя, лоба, та вентральної частини шиї [Le Douarin N., 2003; Kaltschmidt B., 2012].

1.3. Ембріональні та постнатальні мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня

Значний потенціал клітин НГ до мультилінійної диференціації обумовлюється наявністю мультипотентних стовбурових клітин. D. Stemple та D. Anderson в 1992 р. вперше показали існування мультипотентних стовбурових клітин в НГ на ранній ембріональній стадії розвитку хребетних [Stemple D., Anderson D., 1992].

Дві групи вчених, використовуючи різні методичні підходи, отримали мультипотентні стовбурові клітини – похідні нервового гребеня (МСК-ПНГ) з волосяного фолікула – регіона «bulge» (потовщення зовнішньої кореневої піхви) [Sieber-Blum M., et al., 2004] та волосяного сосочка [Fernandes K., et al 2004]. Необхідно відзначити, що волосяний сосочок є похідним НГ тільки у волосяних фолікулів, розташованих в області голови. Але в тулубному відділі волосяний сосочок волосяних фолікулів виникає з мезодерми [Wong C., et al., 2006]. В той же час, клітини НГ виявлені в регіоні bulge волосяних фолікулів, як голови, так і тулуба [Wong C., et al. 2006].

1.4. Перспективи використання постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня в регенеративній медицині

Низка робіт свідчить про те, що фетальні та постнатальні МСК-ПНГ мають значний терапевтичний потенціал в моделях ушкодження *in vivo* периферичного нерву [Nie X., 2007; Ganz J., 2014], спинного мозку [Sieber-Blum M., 2006; Hu Y., 2010], кісток склепіння [Chung I.H., 2009], а також при відновленні назального [Fulco I., 2014] та суглобового хрящів [Pelttari K., 2014] в експерименті та в клініці.

Встановлено, що інструктивні сигнали від клітин – похідних нервового гребеня регулюють значну частину β -клітин в підшлунковій залозі під час ембріонального розвитку [Nekrep N., 2008], а котрансплантація островків Лангерганса зі сферами МСК-ПНГ збільшує проліферацію β -клітин і призводить до кращої васкуляризації та іннервації пересаджених островків що прижилися [Grapenspar L., 2015]. Завдяки цим властивостям МСК-ПНГ можуть бути перспективними для створення клітинного препарату при лікуванні діабету I-го и II-го типу.

Показана принципова можливість репрограмування МСК-ПНГ (без генетичних втручань, а тільки за допомогою маніпулювання умовами культивування *in vitro*) в клітини з характеристиками нейральних стовбурових клітин (НСК) ЦНС [Dromard C., 2007; Binder E., 2011; Weber M., 2015]. Спроможність недиференційованих МСК-ПНГ, або їх комітованих похідних, диференціюватися в характерні для ЦНС клітинні типи під впливом мікрооточення після трансплантації в різні відділи ЦНС, також підтверджена рядом експериментів *in vivo*. Так, МСК-ПНГ здібні диференціюватися в олігодендроцити після трансплантації в головний мозок мишей лінії *shiverer* (миши з аутосомно-рецесивною мутацією, що обумовлює відсутність основного білку мієліну та диференціювання в ЦНС) [Binder E., 2011]. Після трансплантації в пошкоджений спинний мозок МСК-

ПНГ диференціюються в олігодендроцити та гальмівні ГАМК-ергічні інтернейрони, але не в астроцити [Sieber-Blum M., 2006; Hu Y., 2010]. При трансплантації комітованих МСК-ПНГ людини, отриманих з пульпи зуба, в цереброспінальну рідину щурам лінії *Wistar* (із попередньо нанесеним холодним ушкодженням кори головного мозку), спостерігали їх міграцію, астроцитарне та нейрональне диференціювання, а також інтеграцію з клітинами реципієнта в області кори головного мозку [Király M., 2011]. Схожі дані отримані при трансплантації МСК-ПНГ людини з періодонтальної зв'язки в інтактний мозок дорослих мишей [Bueno C., 2013]. Значні поведінкові та функціональні покращення були отримані при трансплантації недиференційованих та комітованих в нейрональному напрямку МСК-ПНГ людини з нюхової слизової щурам з моделлю хвороби Паркінсона (унілатеральне стереотаксичне введення 6-гідроксидофаміна [Muller J., 2015]. При цьому відмічалось диференціювання як комітованих, так і недиференційованих МСК-ПНГ в дофамінергічні нейрони.

Розробка відтворюваних методик репрограмування МСК-ПНГ в НСК ЦНС та/або їх направлене диференціювання в характерні для ЦНС клітинні типи дозволить вирішити питання з інвазивністю забору нервової тканини для отримання НСК ЦНС для аутологічного застосування, та відкриє нові можливості для розробки методів лікування травматичних і дегенеративних захворювань ЦНС [Neirinckx V., 2013].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Культивування мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня

Експерименти з клітинами тварин були виконані на клітинних культурах, отриманих від самців мишей лінії FVB і FVB-Cg-Tg (GFPU) 5Nagy / J (трансгенних по 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". Дослідження проведені згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Миші піддавалися евтаназії методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. В ході виконання роботи було отримано 30 культур постнатальних МСК-ПНГ миші з регіону BR (bulge region) ВФВ (волосяного фолікула вібрисів).

Всі процедури з отримання біоптатів шкіри людини, ізоляції та культивування клітин були виконані з письмової інформованої згоди пацієнтів і відповідно до законів України. Культивування клітин проводилося в обладнаній за нормами GMP/GFP біотехнологічної лабораторії *ilaya.regeneration* (Ліцензія на господарську діяльність банку пуповинної крові, інших клітин і тканин людини МОЗ України № АЕ 186342 від 11.07.2013). Донорами біоптатів шкіри були 3 пацієнта з контузійними

ушкодженнями спинного мозку, 2 пацієнта з травматичними дефектами кісток черепа критичного розміру та 5 здорових донорів. Біологічний матеріал від донорів (периферична кров - ІФА, ПЛР) і клітинні культури (ПЛР) були обстежені на наступні інфекційні захворювання: *HIV*^{1/2}, *HBV*, *HCV*, *HSV*^{1/2}, *CMV*, *EBV*, *Treponema pallidum* і *Mycoplasma ssp.* Нормальний каріотип культивованих клітин людини після їх експансії був підтверджений диференціальною забарвленням хромосом з використанням GTG-методу. Всі культури клітин людини були отримані для подальшого медичного застосування, або банкування для довгострокового зберігання згідно із затвердженими локальним протоколам медичної компанії *ilaya*[®] і використовувалися в експериментах з письмової інформованої згоди донора.

Мишачі і людські клітинні культури також були тестовані на загальну контамінацію мікоплазмой за допомогою *Mycoplasma Test Kit I* (AppliChem, Німеччина).

2.1.1 Отримання мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня з волосяного фолікулу вібрисів миші та волосяного фолікулу людини. Культуру МСК-ПНГ миші отримували з експлантів регіону bulge (ВВ) волосяного фолікула (ВФ) вібрисів за методом M. Sieber-Blum [Sieber-Blum et al., 2004] в нашій модифікації [Васильєв та ін., 2011]. Під контролем стереомікроскопа Stemi 2000 (Carl Zeiss, Німеччина) волосяні фолікули вібрисів вирізалися з біоптатів шкіри і очищалися від прилеглої дерми і жирової тканини. Потім проводили мікродисекцію регіону bulge нижче шкіри на рівні кільцевого синуса і вище волосяного сосочка на рівні кавернозного синуса. Після цього розсікали сполучнотканинну капсулу і витягували регіон bulge мікропінцетом. 3-5 експлантів регіону bulge (ВВ) поміщали в покриту колагеном І-го типу чашку Петрі 35, інкубували протягом 1 год для їх прикріплення і заливали ростовою середовищем. Першу зміну середовища проводили через 48 годин і в подальшому кожні третю добу. Пересів первинної культури здійснювали на 10 день культивування в

покриті колагеном культуральні флакони T25 (SPL, Korea) і культивували до субконфлуентного стану.

Культуру МСК-ПНГ людини отримували по адаптованому методу для експлантів волосяних фолікулів людини, виділених з біоптатів шкіри діаметром 5 мм [Vasyliiev et al., 2017]. Біоптати шкіри отримували під місцевою анестезією 2% розчином лідокаїну гідрохлориду за допомогою панч-ножа з волосистої частини голови. Зразки поміщалися в середовище для транспортування складу: DMEM: F12 (Sigma, USA) з 15 мМ HEPES і 1% розчину антибіотиків/антимикотика. Біоптат розрізали на декілька частин скальпелем і інкубували протягом ночі при +40°C в розчині dispase II 0,4 U / ml (Sigma, USA). На наступний день під контролем стереомікроскопа за допомогою пінцетів видаляли епідерміс і ізолювали волосяні фолікули (ВФ). ВФ експлантували в покриті тонким шаром гідрогелю з колагену I / III типу 2 чашки Петрі 35 мм діам. і інкубували 40 хв для їх прикріплення, після чого заливали ростовим середовищем.

Для ферментативного виділення МСК-ПНГ з біоптатів шкіри людини після видалення епідермісу і волосяних фолікулів фрагменти дерми інкубували протягом 3 год у суміші ферментів, що містить 0,1% пронази і 0,1% колагенази ІА. Після закінчення ферментативної обробки отриману суспензію клітин ретельно піпетувати, фільтрували через сито з діам 40 мкм і двічі відмивали від залишкових ферментів шляхом додавання десятикратного обсягу ФСБ, що не містить Ca^{2+} та Mg^{2+} з наступним центрифугуванням при 4°C, 800 g протягом 10 хв. Потім клітини висівали на пластик в культуральний флакон T25 і проводили преплейтінг протягом 72 годин. Преплейтінг здійснювали в ростовому середовищі наступного складу: α MEM (Sigma, USA), 10% FBS (Sigma, USA), 1 нг / мл bFGF (Gibco, UK), 2 mM stable glutamine (Biowest, France) і 1% розчину антибіотиків / антимикотика (Biowest, France). Після 72 год збирали ростове середовище з неадгезованою фракцією клітин і центрифугували 5 хв, 400 g. Отриману фракцію клітин ресуспенували в 5 мл збідненої тромбоцитами плазми крові, до якої потім

додавали 0,5 мл суміші сироватки крові і 10% розчину кальцію (3: 1) і заливали в культуральний флакон T25. Після полімеризації фібринового гідрогелю зі збідненої тромбоцитами плазми у флакон додавали 5 мл ростового середовища. На 14-ту добу культивування клітини виділяли з гідрогелю ферментативною обробкою 0,05% розчином пронази (5 мл) протягом 5 хв при 37°C і постійному помішуванні. Клітини пасирували або на покриті колагеном культуральні флакони T25, або у флакон T25 з фібриновим гідрогелем зі збідненою тромбоцитами плазми.

Щільність посіву клітин при рутинному культивуванні мишачих і людських постнатальних МСК-ПНГ становила 1000 клітин / см². Культивування здійснювали в мультигазовому інкубаторі СВ 210 ("BINDER", Німеччина) при 37°C, 97% насичує вологості, в штучній атмосфері, що складається з 90% N₂, 5% O₂ і 5% CO₂. В експериментах по дослідженню впливу концентрації O₂ на швидкість росту МСК-ПНГ використовували наступні його концентрації в складі газової фази: 5%, 10% і 21%.

Для культивування мишачих МСК-ПНГ використовували такі живильні середовища: 1) оригінальне середовище M. Sieber-Blum, яке вперше було використано для отримання постнатальних МСК-ПНГ з ВФВ [Sieber-Blum et al., 2004]: базальне середовище α MEM (Sigma, USA), 10% ETC (Sigma, США) 5% екстракту курячих ембріонів (ЕКЕ) (Seralab, UK), 2 мм стабільного глутаміну (Biowest, Франція), 1% розчину антибіотиків/антимикотика (Biowest, Франція); 2) живильне середовище, що не містить ЕКЕ: базальне середовище DMEM: F12 (Sigma, США) з 10% ETC; (Sigma, США), 1% вітамінів MEM (Sigma, США), 2% поживної добавки B27 (Gibco, Велика Британія), 2 мм стабільного глутаміну (Biowest, Франція); 3) середовище з ростовими факторами і низькою концентрацією сироватки: базальне середовище α MEM (Sigma, США), 5% FBS (Sigma, США), 5 нг/мл bFGF (Gibco, UK), 10 нг/мл EGF (Gibco, UK) , 1% живильної добавки ITS

(Gibco, Велика Британія), 2 мМ стабільного глутаміну (Biowest, Франція) і 1% розчину антибіотиків / антимикотика (Biowest, Франція).

Для культивування та експансії постанатальних МСК-ПНГ людини використовували живильне середовище з ростовими факторами і низькою концентрацією сироватки – №3.

При використанні методу експлантів пересів первинної культури здійснювали на 14-20 день культивування в покриті колагеном флакони T25 (SPL, Korea). Починаючи з P2 клітини засівалися в покриті колагеном 5-шарові Multi-Flasks площею 875 см² (Corning, США) з посівною щільністю 1000 клітин / см².

Культури МСК-ПНГ людини і миші пасирували з використанням 0,01% розчину трипсину в 0,53 мМ розчині Na₂EDTA (Sigma, USA). Перед додаванням трипсину клітини двічі промивалися ФСБ без Ca²⁺ + і Mg²⁺ (Sigma, США).

Кількість подвоєнь клітинної популяції (PDN) і час подвоєння клітинної популяції (PDT) розраховували за такими стандартними формулами:

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

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

де X_k - кількість отриманих клітин; X₀ - кількість засіяних клітин; T - час культивування клітин.

2.1.2 Тест на колонієутворюючі одиниці в умовах клональної щільності посіву. Для оцінки здатності до зростання в умовах клональної щільності МСК-ПНГ засеївали в кількості 100-300 клітин в покриті колагеном I-го типу чашки Петрі 100 мм діам (SPL, Korea) в живильному середовищі №3. Концентрація ЕТС була підвищена до 20%. Клітини культивували протягом 14 днів. Потім клітини або фіксували і забарвлювали для аналізу колонієутворюючих одиниць (КУО), або субклонували для аналізу їх

здатності до самовідновлення. Ефективність колонієутворення (ЕК) розраховували за стандартною формулою:

$$EK, \% = (\text{кількість сформованих колоній} / \text{кількість посіяних клітин}) \times 100$$

2.1.3 Субклонування колонієутворюючих одиниць. Отримання та культивування клональних культур. Для оцінки здатності МСК-ПНГ до самовідновлення здійснювали пересів отриманих в тесті на КУО клональних колоній (субклонування) в нову чашку Петрі 100 мм за допомогою циліндрів для клонування (Sigma, США). Клітини культивували 14 діб, фіксували та забарвлювали для аналізу КУО. На підставі числа клітин в колонії і морфології клітин КУО були ранжовані на 3 типи: колонії I-го типу склалися з невеликої кількості (до 50-ти) клітин великого розміру та з вираженими морфологічними ознаками диференціювання; колонії II-го типу - з 100-300 клітинами різної морфології; колонії III-го типу – з понад 500 клітинами малого розміру та без морфологічних ознак диференціювання.

В експериментах по дослідженню здатності КУО до направленого адіпогенного та остеогенного диференціаціювання після формування колоній на протязі 14 діб живильне середовище замінювали на середовище для диференціювання та культивували на протязі 21 доби. Заміну середовища для диференціювання проводили два рази на тиждень.

Для отримання клональних культур відбирали колонії, що містять більше 100 клітин (в середньому ~ 500-1000 клітин, тобто КУО III-го типу) і пересівали за допомогою клонувальних циліндрів (Sigma, США) в культуральний флакон T25. Потім клітини пересівались після досягнення культурою субконфлуентного стану і розсівалися для подальших експериментів.

2.1.4 Культивування мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня у вигляді флотуючих сфер (сферогенез). МСК-ПНГ двічі

відмивали від залишків сироватки шляхом центрифугування (200g, 5 хв) і засівали в концентрації 10^4 клітин / мл в чашку Петрі 35 мм для суспензійних клітинних культур в 2 мл безсироваткового живильного середовища наступного складу: базальне середовище DMEM: F12, 2% живильної добавки B27 (Gibco, UK), 1% живильної добавки N2 (Gibco, UK), 2 мМ стабільного глутаміну, 20 нг / мл bFGF, 40 нг / мл EGF. Фактори росту додавали кожні 48 год. Зміну половини середовища проводили два рази на тиждень. Клітини культивували протягом 14-21 діб.

2.1.5 Направлене диференціювання мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня.

2.1.5.1 Направлене диференціювання в адипогенному напрямку.

МСК-ПНГ засівалися в покриті колагеном чашки Петрі 35 мм в концентрації 40×10^3 клітин / cm^2 в ростовому середовищі і на наступний день переводилися в диференціююче середовище наступного складу: DMEM з високим вмістом глюкози (4,5 г / л) (Sigma, США) з 5% донорської конячою сироватки (РАА, Австрія), 10% ЕТС, 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину, 500 мкМ ізобутілметілксантіну і 5 мкг / мл інсуліну (всі - "Sigma-Aldrich", США). Зміну середовища виробляли 2 рази в тиждень. Тривалість диференціювання - 14 діб.

2.1.5.2 Направлене диференціювання в остеогенному напрямку.

МСК-ПНГ засівалися в концентрації 20×10^3 клітин / cm^2 в ростовому середовищі і на наступний день переводилися в диференціююче середовище наступного складу: DMEM з низьким вмістом глюкози (1 г / л) з 10% ЕТС, 100 нМ дексаметазону, 10 мМ β - гліцерофосфату і 50 мкг / мл аскорбат-2-фосфату (всі - "Sigma-Aldrich", США). Зміну середовища проводили 2 рази на тиждень. Тривалість диференціювання - 21-30 діб.

2.1.5.3 Направлене диференціювання в хондрогенному напрямку.

Хондрогенне диференціювання культур здійснювали за методом мікромасс-культури. Тобто, 3×10^5 клітин центрифугували задля отримання осаду в 15-мл пробірках (Nunc, США) протягом 14 хв. за 2000 об./хв. у хондрогенному диференціовальному середовищі, що містило DMEM-HG з високим вмістом глюкози – 4,5 г/л (Sigma-Aldrich, США) з додаванням 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти (Sigma-Aldrich, США), 40 мкг/мл L-проліну (Sigma-Aldrich, США), 100 мкг/мл пірувату натрію (Sigma-Aldrich, США), 10 нг/мл rhTGF- β 3 (Sigma-Aldrich, США), 10^{-7} М дексаметазону (Sigma-Aldrich, США), 1% ITS+, що містить 6,25 мкг/мл інсуліну, 6,25 мкг/мл трансферину, 6,25 нг/мл селенової кислоти, 1,25 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, 5,35 мг/мл лінолевої кислоти (BD Biosciences, США) та інкубували протягом 21-ї доби в мультигазовому інкубаторі при 37°C і 5% атмосфері CO₂ і 5% O₂. Зміна середовища проводилася кожен 3-4-ту добу.

В результаті на 21-шу добу індукції отримували щільний хондроїд на дні пробірки, котрий надалі нарізали на кріотомі.

2.1.5.4 Направлене диференціювання в нейрональному напрямку.

МСК-ПНГ засівалися в концентрації 50×10^3 клітин на покриті полі-L-лізином (Sigma, USA) і ламініном (Gibco, UK) покривні скельця в 4-х ямкові планшети (SPL, Korea) в ростовому середовищі і на наступну добу переводилися в диференціуюче середовище наступного складу: базальне середовище Neurobasal (Gibco, UK), 2% живильної добавки B27 (Gibco, UK), 1% живильної добавки N2 (Gibco, UK), 5 мкМ синтетичного ретиноїду es32 (AMSBIO, UK) або 5 мкМ all-trans ретиноєвої кислоти (Sigma, USA), 1 мкМ форсколіну (Sigma, USA), 20 нг/мл NGF (PeproTech, USA), 20 нг/мл BDNF (PeproTech, USA) та 20 нг/мл GDNF (PeproTech, USA). Тривалість диференціювання становила 14 діб.

2.1.5.5 Направлене диференціювання в гліальному напрямку (Шваннівські клітини). МСК-ПНГ засівали в концентрації 50×10^3 клітин на покриті полі-L-лізином (Sigma, США) і ламініном (Gibco, Велика Британія) покривні скельця в 4-х ямкові планшети (SPL, Корея) в живильному середовищі і на наступну добу переводили на середовище для диференціювання наступного складу: базальне середовище - суміш 1: 1 Neurobasal (Gibco, UK) і DMEM: F12 (Gibco, UK), 2% B27 supplement (Gibco, UK), 1% N2 supplement (Gibco, UK), 1 мкМ синтетичного ретиноїди es32 (AMSBIO, UK) або 1 мкМ all-trans ретиноєвої кислоти (Sigma, USA), 10 мкМ форсколін (Sigma, USA), 20 нг / мл Neuregulin-1 (Gibco, UK), 10 нг / мл PDGF-BB (PeproTech, USA) і 20 нг / мл IGF (Gibco, UK). Тривалість диференціювання - 14 діб.

2.1.6 Культивування мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня у складі 3D (тривимірних) гідрогелей та на поверхні остеопластичних матеріалів.

2.1.6.1 Приготування колагенового та фібринового гідрогелів. Колагеновий гідрогель готували за методом E. Bell []. Для цього стерильний розчин 0,34 М NaOH змішували з $\times 10$ середовищем MEM (Sigma, США) в співвідношенні 1: 2 і на кожні 100 мл отриманої суміші додавали 100 мг L-глутаміну (Sigma, США) і 9 мл 7,5% розчину бікарбонату натрію (Sigma, США). На льоду змішували отриману суміш з розчином колагену I-го типу (3 мг / мл, Sigma, США) в співвідношенні 1: 4 і вносили необхідну кількість клітин в живильному середовищі (обсяг клітинної суспензії становив 10% від обсягу гелю), ретельно перемішували і поміщали на 30 хв в інкубатор для полімеризації гелю.

Фібриновий гідрогель готували шляхом змішування на льоду 0,5 мл розчину фібриногену (4 мг/мл, Sigma, США) з 0,5 мл живильного середовища з клітинами, яке містило 1 ОД тромбіну (Технологія-Стандарт, Росія),

ретельно перемішували і поміщали на 30 хв в інкубатор для полімеризації гелю.

Після повної полімеризації гідрогель заливали 1 мл ростового середовища. Гідрогелі готували в чашках Петрі 35 мм - по 1 мл гідгелю з $0,5 \times 10^6$ клітин. Для кожної культури ($n = 5$) було приготовлено по 2 гідрогелю кожного типу (всього по 10 зразків гідрогелю кожного типу). Половину зразків гідрогелів кожного типу використовували для виділення і підрахунку клітин через 7 діб культивування, другу половину - через 14 діб культивування.

2.1.6.2 Виділення клітин з гідрогелів

Для виділення клітин з колагенового гелю його обробляли 0,1% розчином колагенази I (Sigma, США) протягом 15 хв при 37°C і постійному помішуванні. Отриману суспензію клітин центрифугували (200g, 5 хв) і обробляли 5 хв 0,25% розчином трипсину (Sigma, США) для дисоціації клітинних агломератів.

Для виділення клітин з фибринового гелю зразки обробляли 0,1% розчином пронази протягом 10 хв при 37°C і постійному помішуванні. Отриману суспензію клітин центрифугували (200g, 5 хв) і обробляли 5 хв 0,01% розчином трипсину (Sigma, США) для дисоціації клітинних агломератів.

2.1.6.3 Засів клітин на гранули остеопластических матеріалів.

Створення комбінованих 3D біфазних конструкцій з фибринового гідрогелю та остеопластичних матеріалів

Гранули демінералізованої кісткової крихти великої рогатої худоби (iLaya.osteogen™, медична компанія iLaya®, Україна) і синтетичного остеопластичного матеріалу з β -трикальцій фосфату / гідроксиапатиту (β TCSF

/ НА 70:30; «Сінтекістка» ТОВ «ІМПЛАНТ», Україна) відміряли хірургічної ложкою Фолькмана з діаметром робочої частини 3 мм і засипали в ямки 96-ти ямкового планшету для суспензійного культивування. МСК-ПНГ засівали у 200 мкл живильного середовища у кількості 100 000 клітин на ямку. Зміну живильного середовища проводили через 24 год.

2.1.7 Дослідження впливу різних факторів на проліферацію мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня для оптимізації умов культивування

2.1.7.1 Вплив щільності посіву на проліферацію постнатальних МСК-ПНГ миші

Клітини 3-го пасажу (ПЗ) засівалися з щільністю посіву 10, 50, 100, 1000 і 5000 клітин / cm^2 у вкриті колагеном флакони T25 і культивувалися в ростовому середовищі №2 при 5% O_2 протягом 7 діб, після чого робили підрахунок клітин. Зміну середовища проводили через кожні 48 год. Розраховували число подвоєнь клітинної популяції і час подвоєння клітинної популяції за стандартними формулами.

2.1.7.2 Вплив факторів росту (EGF і bFGF) на проліферацію постнатальних МСК-ПНГ миші

Клітини ПЗ засівалися в покриті колагеном лунки 6-ямкові планшети (в тріпліках) з щільність посіву 1000 клітин / cm^2 і культивувалися протягом 7 діб в ростовому середовищі №2 без факторів росту, або з додаванням EGF (5, 10, 20 і 50 нг / мл), або bFGF (1, 2, 5 і 10 нг / мл). Зміну ростового середовища проводили кожні 48 год. Клітини підраховували на 3-тю, 5-ту і 7-му добу культивування та будували криву росту.

2.1.7.3 Вплив концентрації O₂ в складі газової фази та різних живильних середовищ на проліферацію постнатальних МСК-ПНГ миші

Постнатальні мишачі МСК-ПНГ третього пасажу (ПЗ) засівали в концентрації 1000 клітин/см² в живильному середовищі №2 (з 10% ЕТС та 5% ЕКЕ) та №3 (з 5% ЕТС, 5 нг/мл bFGF та 10 нг/мл EGF) і культивували протягом 5-тих діб при 21%, 10% або 5% O₂ з в мультігазовому інкубаторі СВ 210 ("BINDER", Німеччина), після чого робили підрахунок клітин.

2.1.8 Визначення кількості і життєздатності клітин. Оцінка проліферації та цитотоксичності

Рутинну оцінку кількості та життєздатності клітин при пересіві в ході культивування, перед заморожуванням, після розморожування, до засіву в гідрогелі та після виділення з гідрогелів проводили фарбуванням 0,4% розчином трипанового синього з підрахунком загальної кількості клітин і кількості мертвих клітин в камері Горяєва. Для цього змішували 20 мкл досліджуваної суспензії клітин з 20 мкл 0,4% трипанового синього і інкубували 5 хв до підрахунку. Трипановий синій проникає в клітини з порушеною цілісністю цитоплазматичної мембрани і забарвлює їх в синій колір.

Для оцінки життєздатності клітин, культивованих на поверхні гранул остеопластических матеріалів, в складі 3D гідрогелів та в складі 3D комбінованих біфазних конструкцій на основі гранул і фібринового гідрогелю проводили комбіноване фарбування флуоресцеїн діацетатом (FDA, Sigma, США) і пропідіум йодидом (PI, Sigma, США). Для цього видаляли культуральне середовище, відмивали зразки три рази розчином Хенкса (Biowest, France) і заливали розчином Хенкса, що містив 1 мкг / мл FDA і 2 мкг / мл PI. Час інкубації становив для гранул 5 хв, 3D гідрогелів і біфазних конструкцій - 10 хв. Після інкубації розчин барвників видаляли, відмивали 3

рази розчином Хенкса та досліджували за допомогою флуоресцентного інвертованого мікроскопу. FDA забарвлює живі клітини яскраво зеленим кольором. PI проникає в мертві клітини і фарбує ядро в помаранчевий колір. Для кожного зразку робили 5 фотографій випадкових полів зору, підраховували в кожному полі загальну кількість клітин в одній площині, кількість живих і мертвих клітин. Життєздатність визначали як кількість живих клітин / загальна кількість клітин $\times 100\%$.

2.2 Молекулярно-біологічні, цитологічні та гістологічні методи дослідження

2.2.1 Імуноцитохімічний аналіз

Для оцінки чистоти культур від можливої контамінації кератиноцитами та гомогенності клітинної популяції постнатальних МСК-ПНГ миші, одержаної методом експлантів, клітини первинної культури фарбували FITC-кон'югованими анти-панцітокератіновими мишачими моноклональними антитілами (1:50, Sigma, США) і первинними кролячими поліклональними антитілами до Nestin (1: 200, Sigma, США), з подальшою детекцією козячими анти-кролячими антитілами, кон'югованими з Alexa 647 (1:1000, Abcam).

Для імуноцитохімічного аналізу розмножених постнатальних МСК-ПНГ людини і миші використовували такі первинні антитіла: кролячі поліклональні до S100 β (1: 250, Invitrogen, США), p75 (CD271, LNGFR) (1: 500, BioLegend, США) і Sox2 (1:100, BioLegend, США); мишачі моноклональні до Sox10 людини (1:100, R&D, США), до Sox10 миші (1:100, Santa Cruz, США), Nestin (1: 200, Santa Cruz, США), β -III-tubulin (1: 200, Sigma, США).

Використовували наступні вторинні антитіла: антитіла віслюка проти миші, кон'юговані з Alexa-488, Alexa-555 або Alexa-647; антитіла віслюка

проти кролика, кон'юговані з Alexa-488, Alexa-568 або Alexa-647 (Thermo Fisher, США).

Клітини фіксували 20 хв холодним 4% параформальдегіду, пермеабілізували при внутрішньоклітинному забарвленні 15 хв 0.1% розчином Triton X-100 в ФБС, блокували 30 хв в розчині ФБС з 0.1% Tween-20, 1% BSA, 5% FBS. Препарати інкубували з первинними антитілами протягом ночі при 40°C і з вторинними протягом 1 год при кімнатній температурі.

2.2.2 Проточна цитометрія

Імунофенотип постнатальних мишачих і людських постнатальних МСК-ПНГ визначали за допомогою проточного цитофлуориметра-сортера "BD FACSAria" ("Becton Dickinson", США). Аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1 (Becton Dickinson, USA). Для побудови гістограм використовували програмне забезпечення Cyflogic v.1.2.1 (CyFlo Ltd., USA).

Для вивчення імунофенотипу мишачих постнатальних МСК-ПНГ використовували наступні флуорохром-кон'юговані моноклональні анти-мишачі антитіла: до CD44 (PE), CD45 (PE-Cy-7), CD73 (PE), CD90 (біотиніловані первинні антитіла, потім стрептавідин-PE), CD117 (PE-Cy-7), Sca-1 (PE) і Nestin (PE) (всі - "BD Pharminger", США) відповідно до інструкцій виробника.

Імунофенотип постнатальних МСК-ПНГ людини визначали на фінальному пасажі з використанням флуорохром-кон'югованих моноклональних мишачих антитіл до наступних антигенів людини: CD34, CD45 CD56, CD73, CD90, CD105, CD140a, CD140b, CD146, CD166, CD271 і Nestin (всі - "BD Pharminger", USA) відповідно до інструкцій виробника. Для детекції Sox10 використовували первинні некон'юговані мишачі моноклональні антитіла (Novus, USA) і вторинні Alexa-647 анти-мишачі

моноклональні антитіла віслюка. Для детекції CD349 (Frizzled-9) використовували первинні некон'юговані кролячі антитіла (Bioss, USA) і вторинні Alexa-647 анти-кролячі моноклональні антитіла віслюка. Для внутрішньоклітинного забарвлення клітини фіксували розчином Cytofix, пермеабілізували і фарбували в буфері PhosFlow (всі - Becton Dickinson, USA) згідно з інструкціями виробника.

ALDH^{brigh} клітини визначали за допомогою ALDEFLUORTM kit (STEMCELL Technologies, Канада) відповідно до інструкцій виробника: до 200 000 клітин в 1 мл буферу ALDEFLUORTM додавали 5 мкл барвника BODIPYTM-aminoacetaldehyde (BAAA) (тестова пробірка), перемішували і негайно переносили 0,5 мл суміші в контрольну пробірку, що містить 5 мкл diethylaminobenzaldehyde (DEAB) (специфічний інгібітор ALDH). Клітини в тестовій і контрольній пробірці інкубували 30 хв при 37°C і аналізували на зеленому (FITC) каналі. Першими аналізували клітини з контрольної пробірки. Популяцію клітин визначали на підставі значень forward scatter (FSC) vs side scatter (SSC). Потім створювали діаграму SSC vs FITC і встановлювали вольтаж таким чином, щоб в регіоні P1 (інтенсивність флюоресценції вище 10^2) по FITC-каналі було біля 0% оброблених DEAB клітин, а значення флюоресценції у більшості оброблених DEAB клітин дорівнювало 0. Після цього аналізували клітини з тестової пробірки. ALDH^{brigh} вважалися клітини зі значенням флюоресценції вище 10^2 по FITC-каналі.

2.2.3 Цитохімічні методи забарвлення клітинних культур

Для забарвлення КУО клітини фіксували 20 хв холодним етанолом і забарвлювали азур-еозином за Романовським (Макрохім, Україна) протягом 20 хв. Для підтвердження остеогенного і адіпогенного диференціювання, клітини фіксували 20 хв у 10% нейтральному забуференому формаліні, промивали фосфатним буферним розчином (ФБР) і фарбували 20 хв 2%

розчином Alizarin Red S (рН 4,1; для детекції кальцифікованого позаклітинного матриксу) або 0,5% розчином Oil Red O (для забарвлення нейтральних ліпідів) (всі – Sigma-Aldrich, USA). Одержані кріозрізи хондроїду (20 мкм завтовшки) фарбували на наявність кислих ГАГ 0,1% розчином Safranin O (Sigma-Aldrich, США) або 1% розчином толуїдинового блакитного (Sigma-Aldrich, США) з 1% тетраборнокислого натрію на наявність метахроматичного забарвлення (Макрохім, Україна).

2.2.4 Виготовлення гістологічних препаратів

Для світлопольної мікроскопії біологічний матеріал фіксували протягом доби в 10% розчині нейтрального формаліну, промивали зразки, зневоднювали у серії спиртів, заключали їх у парафін та отримували зрізи товщиною 10 мкм на мікротомі. Потім зрізи депарафінізували у ксилолі та імпрегнованої азотнокислим сріблом (для зразків периферичного нерву) за допомогою швидкого методу імпрегнації елементів периферичної нервової системи [Коломійцев і ін., 1981], або забарвлювали гематоксілін-еозіном за стандартним протоколом (для зразків тім'яної кістки).

2.2.4 Виділення мРНК та синтез кДНК

Для виділення тотальної РНК 10^6 клітин ресуспедували в 0,5 мл розчині Nucleozol (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, США) для їх лізису. Після чого додавали 200 мкл очищеної від РНКаз води та інтенсивно перемішували протягом 15 с. Центрифугували в режимі 15 хв, 12000g, при $+4^{\circ}\text{C}$. Відбирали водну фракцію, що містила РНК та додавали такий же об'єм ізопропанолу для преципітації РНК. З ізопропанолом зразки інкубували при кімнатній температурі 10 хв, після чого знову центрифугували 15 хв, 12000g, при $+4^{\circ}\text{C}$. Отриманий осад РНК двічі відмивали в 70% етанолі шляхом центрифугування. Таким чином одержували очищену РНК в осаді. Після

цього відбирали весь етанол, а осад підсушували на льоду. РНК розчиняли у 20 мкл стерильної очищеної від РНКаз бідистильованої води (biH_2O), вимірювали її концентрацію методом спектрофотометрії, робили аліквоти та зберігали за -70°C .

Для синтезу кДНК використовували RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, USA). Для отримання загального об'єму кДНК 60 мкл змішували 1 мкг тотальної РНК, 2 мкл праймерів $\text{oligo}(\text{dT})_{18}$ та вільну від нуклеаз бідистильовану воду до загального об'єму 41 мкл. Всі три компоненти перемішували і ставили у апарат для ПЛР GeneAmpPCRSystem 2400 (PerkinElmer, USA) для віджигу праймерів та денатурації вторинної структури РНК. Використовували наступну програму: 65°C – 5 хв, охолодження до $+4^\circ\text{C}$. До отриманого продукту додавали реакційний буфер – 8 мкл 5-кратного розчину, інгібітор РНКаз - 2 мкл, суміш нуклеотидів dNTP – 5 мкл та зворотну транскриптазу M-MLVReverse Transcriptase – 2 мкл. Суміш поміщали в ампліфікатор з заданною програмою: 42°C – 60 хв; 75°C - 5 хв; охолодження до $+4^\circ\text{C}$. Отриману ДНК, що є комплементарною до РНК зберігали на -20°C .

2.2.6 Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією

Для аналізу експресії мишачими постнатальними МСК-ПНГ маркерів НГ на рівні мРНК було використано 5 різних культур. Клітини були зняті з культуральної посуду з використанням 0,01% розчину трипсину в 0,53 мМ розчині Na_2EDTA і двічі відмиті ФСБ. Тотальна РНК з 10^6 клітин була ізольована за допомогою заснованого на колонках набору NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Німеччина) відповідно до рекомендацій виробника з обов'язковим використанням ДНКаз. кДНК була синтезована з 5 мкг тотальної РНК, з використанням $\text{oligo}(\text{dT})$ праймерів і Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, США) відповідно до рекомендацій

виробника. Наступні пари праймерів були використані для детекції цільових транскриптів в зразках:

- для Sox2 (Mus musculus nestin mRNA, GenBank number NM_016701.3):

F: 5'-TCACAACAATCGCGGGCGG-3 ',

R: 5'-GTTTCATGTGCGCGTAGCTGT-3 ';

- для Sox10 (Mus musculus SRY (sex determining region Y) -box 10 (Sox10) mRNA, GenBank number NM_011437.1:

F537 5'- GACTGGACGCTGGTGCCCATGCCC-3 ',

R829 5'- CCGTTCTTCCGCCCGCCGAGGTTG-3 ';

- для β-актину (Mus musculus actin, beta (Actb) mRNA, GenBank number NM_007393.3):

F552 5'-CCACTGGCATCGTGATGGAC-3 ',

R949 5'-GCGGATGTCCACGTCACACT-3 '.

ПЛР здійснювалася за допомогою AmpliTaq™ DNA Polymerase kit (Thermo Fisher, USA). Для оцінки якості виділеної мРНК контрольна ПЛР була виконана з праймерами до GAPDH ("housekeeping" ген гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа) з набору. В якості контролю на наявність геномної ДНК були використані зразки без додавання зворотної транскриптази.

2.2.7 Кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

До реакційної суміші ПЛР в режимі реального часу додавали 2 мкл кДНК (синтезованої в об'ємі 60 мкл з 1 мкг тотальної РНК), 4 мкл суміші 5x HOT FIREPol®EvaGreen®HRM Mix (ROX) (Solis BioDyne, Естонія), по 1 мкл суміші праймерів (прямий і зворотній, 50 pM) до гену, експресія якого досліджувалася, деіонізовану воду до загального об'єму 20 мкл. Реакції кПЛР ставили в 96-лункових планшетах (AppliedBiosystems, USA) на приладі Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Були використані наступні умови ампліфікації – 10 хв, 95 °C; (15 с, 95 °C; 40 с, 60°C) ×40 циклів.

Для нормалізації було використано ген ендogenous контролю *TBP* (TATA-box binding protein). Реакції проводили в триплікатах для кожного гена. Середнє для триплікатів граничне значення циклу (threshold, C_T) нормалізували відповідно до C_T ендogenous контролю (*TBP*). ΔC_T - це різниця в C_T між досліджуваним геном та геном ендogenous контролю. Результати обробляли в програмі Microsoft Excel та представляли у графічному вигляді. Наведені дані виражені у відносних одиницях.

Ампліфікація всіх досліджуваних генів, окрім *SOX2*, *SOX10* та *NGFR* проводилась за умов 15 хв, 95 °C; (15 с, 95 °C; 40 с 60°C) ×40 циклів. Для детекції *SOX2*, *SOX10* та *NGFR* температура і час віджигу праймерів складав 62°C та 60 с відповідно. Етап дисоціації (95°C, 15 с., 64°C, 40 с., 95°C, 15 с.), результати якого відображали специфічність ампліфікованого продукту, був доданий до кожної проведеної реакції. Інформацію щодо праймерів, використаних в дослідженні наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Праймери, використані в дослідженні

| № | Ген | Прямий праймер 5'→3' (позиції у сіквенсі) | Зворотній праймер 5'→3' (позиції у сіквенсі) | Розмір продукт у (пари основ) |
|---|--------------------------------------|---|--|--|
| 1 | <i>TERT</i> | ctccatcctgaaagccaaga | agtcagcttgagcaggaatg | 118 |
| 2 | <i>POU5F1</i> (<i>OCT-3/4A</i>) | tgtactcctcggtcctttc | tccaggttttctttccctagc | 150 |
| 3 | <i>SOX2</i> | cagctcgcagacctacatga | tggagtgggaggaagaggtga | 152 |
| 4 | <i>KLF4</i> | tcccgccgctccattacca | ggggtgaagaaggtggggtga | 120 |

| | | | | |
|----|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----|
| 5 | <i>MYC</i> | agaacggagggagggatcgc | ctcgtccctctgcctctcg | 96 |
| 6 | <i>NANOG</i> | tcccctcctcccatecctca | ggctccaaccatactccacct | 109 |
| 7 | <i>LIN28A</i> | agcctcatgtccgctgaagg | gcagggtagggctgtggatt | 98 |
| 8 | <i>SOX9</i> | gaaagagaggaccaaccagaat | ttgggtacgagttgcctttag | 125 |
| 9 | <i>SOX10</i> | tttgactactctgaccatcagccc | agtgtcgtatatactggctgctcc | 191 |
| 10 | <i>SNAIL1</i> | ccacgaggtgtgactaactatg | accaaacaggaggtgaaata | 126 |
| 11 | <i>SNAIL2</i> | cctgtgctgaccaaccaata | atgctcttgacgctctctct | 91 |
| 12 | <i>NGFR</i> | acctccagaacaagacctatagc | ttgttctgcttgacgctgttcc | 195 |
| 13 | <i>PHOX2B</i> | ggcctaaagtaatcgcgctaag | cgaagccagggaagtttgtt | 114 |
| 14 | <i>PRPH</i> | gcatcccttctctggcttatg | gggatcattggcttcttatcgg | 126 |
| 15 | <i>DCT</i> | cacagttctgacgctgacaata | caagcaagcaaagcggaaac | 139 |
| 16 | <i>TBP</i> | ccactcacagactctcacaac | ctgcggtacaatcccagaact | 127 |
| 17 | <i>NES</i> | agaggaagagaacctgggaaag | ttggtccttctccaccgtatc | 124 |
| 18 | <i>TUBB3</i> | gatgtacgaagacgacgagga | ggtttagacactgctggcttc | 113 |
| 19 | <i>BDNF</i> | gtcaagttgggagcctgaaatag | aggtgtgaaatgggctgaatg | 91 |
| 20 | <i>NGF</i> | taccaagggagcagctttcta | cattgctctctgagtgtggttc | 125 |
| 21 | <i>GDNF</i> | acttgggtctgggctatgaaac | ctttgtcactcaccagccttct | 135 |
| 22 | <i>VEGFA</i> | ccategacagaacagtccttaac | tggeaatccaattccaagag | 150 |
| 23 | <i>FGF2</i> | caccagtggatagtgtgagaga | gccaatcttggttcaggtactta | 149 |
| 24 | <i>LIF</i> | gaagggtcggatctgagagaat | ctggaccctgacaccctaaa | 106 |
| 25 | <i>NTF3</i> | ggcgcaactactttcttctctct | agctcggtcattcaaagtctcc | 101 |
| 26 | <i>GFAP</i> | aaactgaggcacgagcaaag | tcaccagtctgctcagtcaa | 122 |
| 27 | <i>S100B</i> | aatcaaagagcaggaggttggtg | tcgtggcaggcagtagtaa | 120 |
| 28 | <i>NTF4</i> | tcctatgtgcgggcattga | tctcagcatccagctctgttatt | 150 |
| 29 | <i>EGR2</i> (<i>KROX20</i>) | aggtcgttggatctcccatatc | gggtactgagggtcaatggagaa | 103 |
| 30 | <i>MBP</i> | aacctcctgagaagataacc | ccgtgtgtctcgggtgagtaa | 109 |

| | | | | |
|----|--------------|----------------------|----------------------|-----|
| 31 | <i>JUN</i> | agctggagcgcctgataat | tcctgctcatctgtcacgtt | 100 |
| 32 | <i>OLIG2</i> | gcatccagtggtcccgattt | cggtactcctgcgtgtaatg | 104 |

2.2.8 Визначення продукції клітинами у культурі факторів росту та цитокінів за допомогою імуноферментного аналізу та мультиплексного аналізу

Продукцію мишачими постнатальними МСК-ПНГ факторів росту bFGF (FGF-2) та VEGF, та нейротрофінів NGF, BDNF, NT-3 та NT-4/5 визначали імуноферментним методом (ІФА) з використанням рідеру Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader (MTX Lab Systems, США) наступних наборів згідно с інструкціями виробника: FGF2 Mouse ELISA Kit (Thermo Fisher, США), Mouse VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США), та Mouse Multi-Neurotrophin Rapid™ Screening ELISA kits (Biosensis, США).

Продукцію факторів росту та цитокінів постнатальними МСК-ПНГ людини визначали за допомогою мультіплексного аналізу з використанням рідеру Bio-Plex 200 Systems та наборів Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 21-plex Assay та Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay.

2.3. Модельні системи *in vivo* та *in vitro* для оцінки терапевтичного потенціалу мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня

2.3.1 *Моделювання дефекту кісток склепіння критичного розміру та трансплантація біфазних 3D конструкцій на основі мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня, фібринового гідрогелю та остеопластичних матеріалів.* Дослідження проведено на мишах лінії FVB, 4-6 місячного віку, розводки віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Всі втручання виконувалися під авертіновим наркозом (0,4 мл 2,5% розчину внутрішньочеревно). Дефект

кісткової тканини моделювали за допомогою стоматологічного буру зі свердлом діаметром 3 мм на обох тим'яних кістках (*os parietale*). Усі тварини були розподілені на наступні групи: 1) дефект кістки без заповнення; 2) дефект кістки заповнений ксеногенної частково демінералізованою кістковою крихтою (ДМК); 3) дефект кістки заповнений синтетичним остеопластичним матеріалом (НА:ТСП 30:70); 4) дефект кістки з трансплантацією біфазного конструкту на основі постнатальних МСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та ДМК; 5)) дефект кістки з трансплантацією біфазного конструкту на основі постнатальних МСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та НА:ТСП 30:70. Кількість тварин складала n=8 для кожної групи.

Тварини виводилися з експерименту шляхом евтаназії методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом через місяць та два місяці від початку експерименту.

2.3.2 Моделювання ушкодження сідничного нерву (перетин) та трансплантація мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня

Дослідження проведено на мишах лінії FVB, 4-6 місячного віку, розводки віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Мишей лінії FVB розділили на наступні групи. Тварини першої групи (n = 5) були контрольними, у яких правий сідничний нерв тільки мобілізували, але хірургічно не перетинали (хибно-оперовані). Тваринам другої групи (n = 5) був проведений перетин правого сідничного нерва в ділянці середньої його третини з видаленням відрізка довжиною 3 мм. З урахуванням ретракції решт нерва протяжність дефекту становила 5-7 мм.

Мишам третьої групи (n = 5) в день операції в область травми сідничного нерва підсаджували МСК-ПНГ в фібриновими гелі як носії ($0,5 \times 10^6$ клітин в 20 мкл гелю). Для цього проводили анатомічне зіставлення

проксимального і дистального ділянок нерва, змішували 10 мкл 2% розчину фібриногену і 10 мкл середовища DMEM: F12, що містить клітини і 0,5 ОД тромбіну. Полімеризація розчину і утворення фібринового гелю відбувалися безпосередньо після внесення в область дефекту.

Всі втручання виконувалися під авертіновим наркозом (0,4 мл 2,5% розчину внутрішньочеревно).

2.3.3 Моделювання короточасної киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампу; трансплантація мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня та оцінка їх терапевтичного впливу

2.3.3.1 Виготовлення зрізів гіпокампу та його органотипова культура

Шматочки гіпокампу готували з мозку 8-9-денних мишей дикого типу лінії FVB. Тварини були обезголовлені, і мозок виділявся із склепіння. Ізоляцію та культивування зрізів гіпокампу виконували за методом L.Stoppini: гіпокамп виділяли з мозку в охолоджене живильне середовище наступного складу: 50% середовища MEM, 5 мМ Tris, 2 мМ NaHCO₃, 12,5 мМ HEPES, 15 мМ глюкози, 25 % сольового розчину Хенкса (HBSS), 100 одиниць / мл пеніциліну та 100 мг / мл стрептоміцину, рН 7,3). Зрізи нарізали автоматичним чоппером (McIlwain, Великобританія), перпендикулярно поздовжній осі гіпокампу, товщиною 350-375 мкм. Потім культивували протягом 5-7 днів. Вирощування органотипових зрізів здійснювалось на напівпроникних мембранах, розташованих на поверхні розділу газової (суміш повітря з 5% CO₂) та рідкої (50% MEM, 25% донорської конячої сироватки, 2,5 мМ TRIS, 2 мМ NaHCO₃, 12,5 мМ HEPES, 15 ммоль глюкози, 25% HBSS, 100 одиниць / мл пеніциліну та 100 мг / мл стрептоміцину, рН 7,2) фаз при 37°C. Культуральне середовище було змінено на другий день інкубації, а потім два або три рази на тиждень. Протягом 5-7 днів культивування зрізи гіпокампу були повністю очищені від клітин,

пошкоджені під час виділення, і досягнуто стабільного стану. За цей час зрізи згладжувалися, їх товщина зменшується від 350 до 375 мкм до 200-250 мкм.

Для виявлення пошкоджених клітин використовували забарвлення органотипових зрізів з використанням іодиду пропідіуму (PI) – стабільного флуоресцентного барвника, який проникає в клітини з пошкодженою мембраною, зв'язується з молекулою ДНК і набуває помаранчової флуоресценції. PI у концентрації 5 мкМ додавали до живильного середовища до киснево-глюкозної депривації. Культури аналізували на флуоресцентному мікроскопі. Для експерименту були відібрані зрізи, в яких не було виявлено мертвих клітин, забарвлених PI.

2.3.3.1 Киснево-глюкозна депривація органотипової культури гіпокампу та трансплантація МСК-ПНГ

Киснево-глюкозна депривація (КГД) є розповсюдженою моделлю ішемічного ушкодження *in vitro*. Для виконання КГД органотипові зрізи зберігали протягом 10 хв у спеціальній камері (з температурою +35°C), де кисень замінювали азотом, а глюкоза у живильному середовищі замінювалася на сахарозу. Після цього зрізи повертали до нормальних умов культивування протягом двох годин (нормоксична реоксигенація). Після КГД культивовані шматочки, скиби повертали в культуральну середовище з йодидом пропідіума (5 мкМ). Загибель клітин гіпокампу, зокрема нейронів зони CA1, спостерігали за допомогою флуоресцентного мікроскопу через 2, 4, 6, 12, 24, 48 та 72 год після моделювання КГД. PI-позитивні клітини в зоні CA1 після КГД та трансплантації були зараховані в прямокутну зону з фіксованим розміром (0,4 мм²).

Через дві години після КГД/реоксигенації $2,5 \times 10^5$ МСК-ПНГ наносили на органотипову культуру гіпокампу.

2.3.3.1 Імуногістохімічний аналіз органотипової культури гіпокампу

Для ідентифікації нейронів, гліальних клітин та трансплантованих клітин застосовувався подвійний імуногістохімічне забарвлення з антитілами до астроцитарного маркера GFAP (курячі поліклональні, 1: 1500, DAKO, Данія); нейронний маркери NeuN (мишачі моноклональні, 1: 1000, Chemicon, Великобританія) та β -III-тубулін (кролячі поліклональні, 1: 500, Sigma, США); маркер клітин мікроглії Iba-1 (кролячі поліклональні, 1: 750, Molecular Probes Inc., США); олігодендроцитарний маркер olig-2 (кролячі поліклональні, 1: 1500, Chemicon, Великобританія); маркер стовбурових/прогеніторних нейральних клітин та МСК-ПНГ нестін (мишачі моноклональні, 1: 500, Millipore, США) та анти-GFP (кролячі поліклональні, 1: 1000, Molecular Probes Inc, США).

Органотипові культури гіпокампу фіксували 4% розчином формальдегіду, промивали 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР), обробляли розчином 0,3% Triton X-100, 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) для кращого проникнення антитіл та блокування неспецифічного забарвлення. Протягом 24 год культури гіпокампу інкубували в суміші первинних антитіл. Після промивання в 0,1 М ФБР, зрізи обробляли протягом 1 год вторинними антитілами: анти-мишачими Alexa Fluor-555-кон'югованими (1: 1000, Invitrogen, США), анти-кролячими Alexa Fluor-488-кон'югованими та анти-курячими Alexa Fluor--647-кон'югованими антитілами (1: 1000, Invitrogen, США). Після промивання в 0.1М ФБР зрізи фіксували кришкою на спеціальному середовищі для флуоресцентних препаратів (DAKO, Данія). Зрізи гіпокампу вивчали, використовуючи конфокальну мікроскопію FluoView FV1000 (Olympus Inc., Японія) з цифровою камерою та комп'ютером.

Кількість нейронів у зоні CA1 органотипової культури гіпокампу в нормальному стані та моделювання ішемічної травми розраховували в прямокутній зоні з фіксованим розміром (0,4 мм²). Порівняльний розрахунок

контрольних та ішемізованих скибок проводився на 3, 7 та 14 добу після КГД.

2.5 Мікроскопічні методи дослідження

Прижиттєву мікроскопію, дослідження цитологічних і гістологічних препаратів проводили на інвертованому флюоресцентної мікроскопі Axio Observer A1, оснащеному 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).

2.6. Статистичні методи дослідження

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 середньої арифметичної та стандартного відхилення ($M \pm s$). Достовірність різниці між показниками оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу).

РОЗДІЛ 3

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБНЯ З ВОЛОСЯНОГО ФОЛІКУЛА ВІБРИСІВ МИШІ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ЇХ ЕКСПАНСІЇ *IN VITRO*

Розділ присвячено дослідженню впливу різних факторів на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня (мСК-ПНГ) із волосяного фолікула вібрисів миші, оптимізації умов їх культивування *in vitro* та вивченню морфофункціональних властивостей мСК-ПНГ. При цьому проводилось як порівняльне вивчення морфофункціональних властивостей мСК-ПНГ при їх отриманні та експансії за початковим протоколом, описаним у роботі [Sieber-Blum M., 2004], та новими умовами культивування, так і дослідження раніше невідомих аспектів їхньої біології.

3.1 Отримання та культивування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня з волосяного фолікула вібрисів миші з використанням модифікованого живильного середовища

В початковому оригінальному протоколі M. Sieber-Blum із співавторами [Sieber-Blum M., 2004], які вперше описали існування постнатальних мСК-ПНГ у регіоні bulge (потовщення зовнішньої кореневої піхви) волосяного фолікула вібрисів миші та отримали культуру цих клітин, у якості мітогенних добавок використовували суміш 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС) та 5 % екстракту курячих ембріонів (ЕКЕ). Як ЕТС, так і ЕКЕ мають невизначений, складний і варіабельний склад, що негативно впливає на якість одержуваних культур клітин і відтворюваність результатів

експериментів. Крім того існують ризики зараження клітин різними інфекційними агентами (вірусами, пріонами) при використанні даних субстанцій. Треба відзначити, що в даний час ЕТС продовжують широко використовуватися як ростова добавка до живильних середовищ для різних типів клітин при їх рутинному культивуванні. Однак, існує тенденція до розробки живильних середовищ з низьким вмістом ЕТС (для більшої відтворюваності результатів), живильних середовищ без вмісту ЕТС (serum-free media), та живильних середовищ, які взагалі не містять у своєму складі компонентів тваринного (animal-free media), або іншого чужорідного походження (xeno-free media). Треба відзначити, що за загальними рекомендаціями провідних регулюючих організацій у сфері охорони здоров'я людини FDA (США) та EMEA (ЄС), використання ЕТС при виробництві продуктів для передової терапії на основі клітин людини дозволено лише для ЕТС фармакологічної якості (pharma grade) та на I-II фазах клінічних досліджень. Комерційний продукт для передової терапії на основі клітин людини повинен виготовлятися з використанням живильних середовищ, що не містять субстанцій чужорідного походження (xeno-free media)

Стосовно ЕКЕ ситуація ще складніша, тому що окрім регуляторних обмежень щодо його використання у процесі виготовлення продуктів для передової терапії на основі клітин людини існує проблема його лабораторного виготовлення та доступності як комерційного продукту, пов'язані з виникненням вірусу пташиного грипу. На теперішній час ЕКЕ виробляється в малих обсягах, обмеженою кількістю компаній і переважно у вигляді безбілкового ультрафільтрату. Лабораторне отримання ЕКЕ являє собою складний і трудомісткий процес. Внаслідок цього розробка живильних середовищ для постнатальних мСК-ПНГ миші та інших лабораторних тварин, що не містять ЕКЕ та мають малий вміст ЕТС (low serum media) з подальшою розробкою на їх основі живильних середовищ без вмісту ЕТС (serum-free media), та середовищ без вмісту чужорідних компонентів (xeno-

free media) для клінічного застосування культивованих мСК-ПНГ людини є актуальним завданням.

Метою даного розділу роботи було отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ миші з використанням живильного середовища на основі ЕТС та без вмісту ЕКЕ, підтвердити відповідність отриманих мСК-ПНГ описаним для них критеріям і дослідити деякі раніше не вивчені морфофункціональні властивості, такі як: імунофенотип методом проточної цитометрії; вміст в популяції постнатальних мСК-ПНГ ALDH^{bright} клітин; клоногенний потенціал мСК-ПНГ у динаміці культивування та здатність до самовідновлення.

Було зроблено припущення, що культивування експлантів регіону bulge (region bulge, RB) волосяного фолікулу вібрисів (ВФВ) за умов низького вмісту кисню у складі газовою фази (5 %) та використання вітамінів, антиоксидантів та гормонів, що містяться у комерційно доступній поживній добавці В27 дозволить отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ.

При застосуванні зазначених вище умов на 4-6-ту добу культивування із усіх експлантів RB ВФВ починалася еміграція та активна проліферація фібробластоподібних клітин (рис. 3.1).

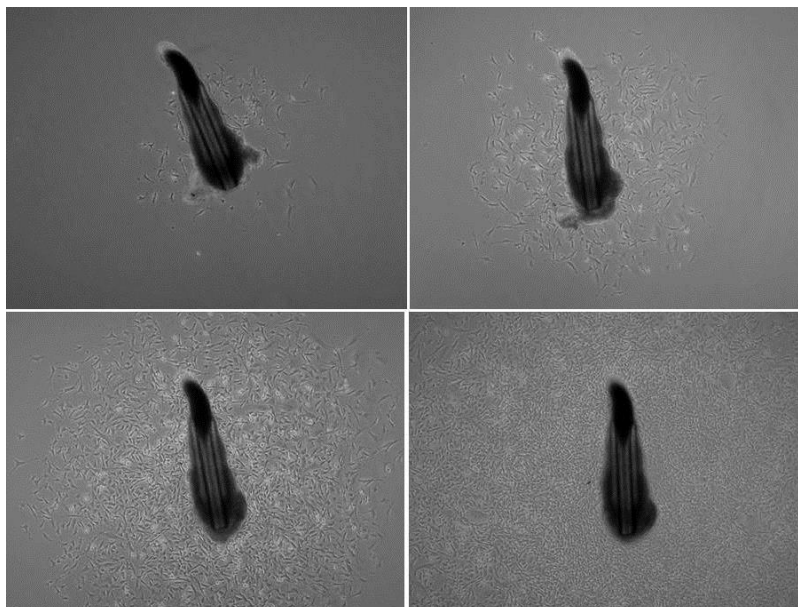


Рис. 3.1. Динаміка еміграції та проліферації клітин з експлантів RB ВФВ. А) 4-та доба; Б) 5-та доба; В) 6-та доба; Г) 7-ма доба культивування. Фазово-контрастна мікроскопія, збільшення x25.

Усі клітини у первинній культурі мали мігранторний фенотип та характерну для клітин – похідних НГ «зіркоподібну» морфологію (stellate morphology) (рис 3.2 а). Імуноцитохімічний аналіз клітин первинної культури показав, що популяція забарвлюється на описані раніше характерні маркери постнатальних мСК-ПНГ з RB ВФВ [Sieber-Blum M., 2004]: Nestin (білок проміжних філаментів, що є маркером нейральних стовбурових/прогеніторних клітин в ЦНС та клітин НГ на премігранторній та мігранторній стадіях їх розвитку в ембріогенезі; також є маркером стовбурового/прогеніторного стану інших типів клітин) (рис. 3.2 б); поверхневий низькоафінний рецептор до нейротрофінів р75 (CD271, LNGFR), який являється одним з перших маркерів в ході ембріогенезу, що відрізняє клітини НГ від клітин нервової трубки (Рис. 3.3); так транскрипційний фактор Sox10, який вважається майстер-геном, що відповідає за індукцію нервового гребня в ембріогенезі (Рис. 3.4).

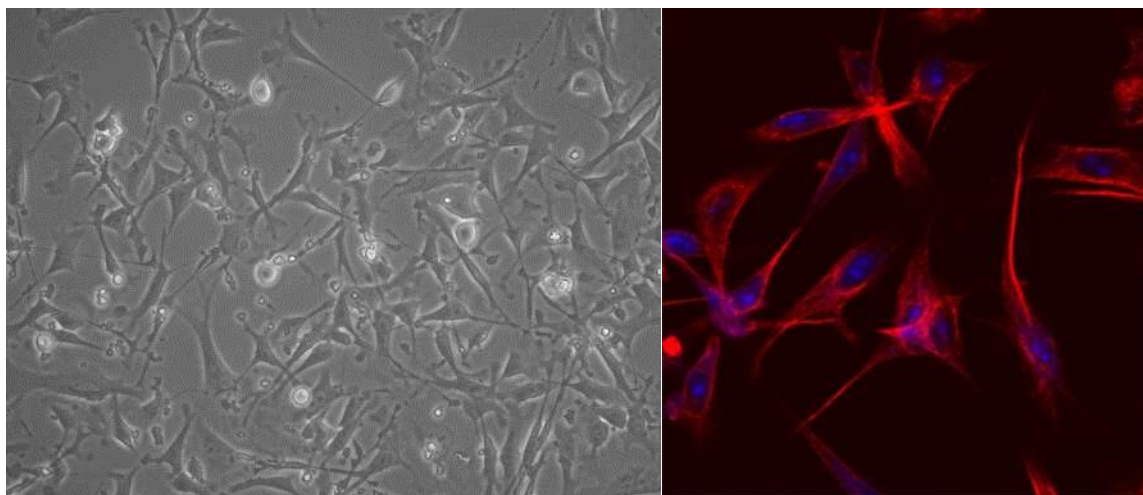


Рис. 3.2. Постнатальні МСК-ПНГ з волосяного фолікула вібрисів. А) Морфологія клітин в первинній культурі. Фазова-контрастна мікроскопія, збільшення x100. Б) Імуноцитохімічний аналіз експресії білка проміжних

філаментів нестїну (червоний колїр). Ядра клїтин забарвленї Ноеchst 33342 (синїй колїр). Збїльшеннїя x200

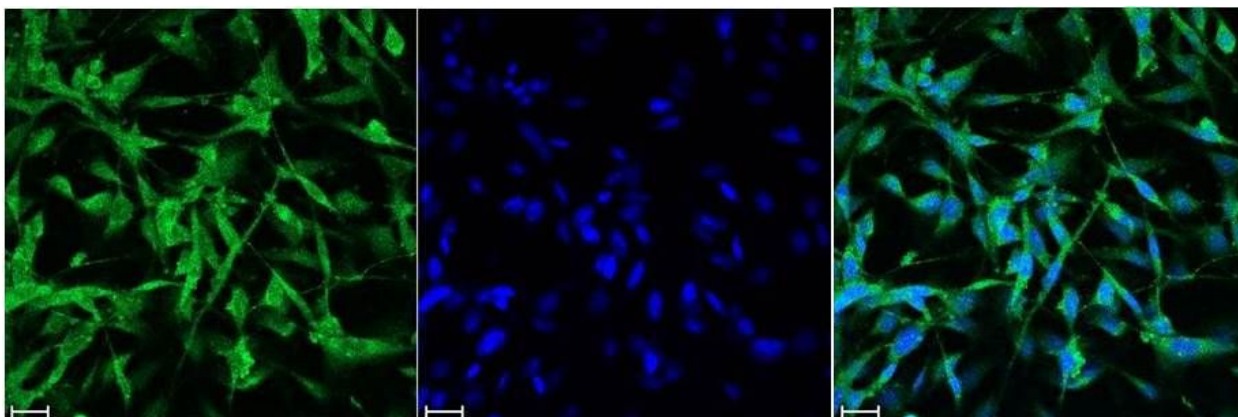


Рис. 3.3. Імуноцитохїмічний аналіз експресїї низькоафїнного рецептору до нейротрофїнів p75 (CD271, LNGFR) (зелений колїр). Ядра клїтин забарвленї Ноеchst 33342 (синїй колїр). Масштабний вїдрїзок – 50 мкм

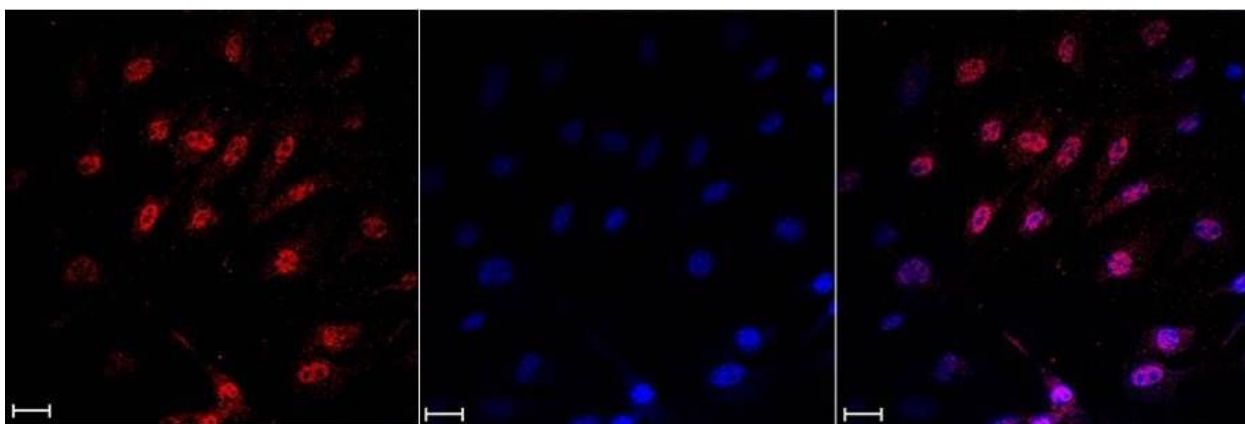


Рис. 3.4. Імуноцитохїмічний аналіз експресїї транскрипційного фактору Sox10 (червоний колїр). Ядра клїтин забарвленї Ноеchst 33342 (синїй колїр). Масштабний вїдрїзок – 50 мкм.

Додатково був проведений їмуноцитохїмічний аналіз первинної культури на наявнїсть клїтин, позитивних за Sox2 (транскрипційний фактор, один їз чотирьох транскрипційних факторїв, гїперекспресїя яких призводить

до індукованої плюрипотентності) та CD349 (frizzled-9, рецептор до факторів росту із сімейства Wnt). Більшість клітин у культурі була позитивна за Sox2, та майже всі клітини були позитивні за CD349 (frizzled-9) (Рис. 3.1.5, 3.1.6).

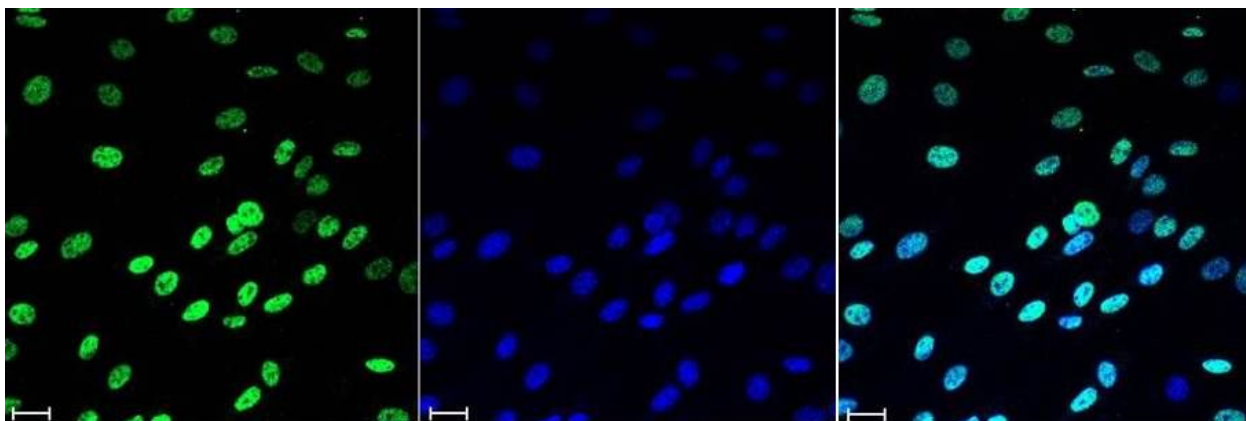


Рис. 3.5. Імуноцитохімічний аналіз експресії транскрипційного фактору Sox2 (зелений колір). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм.

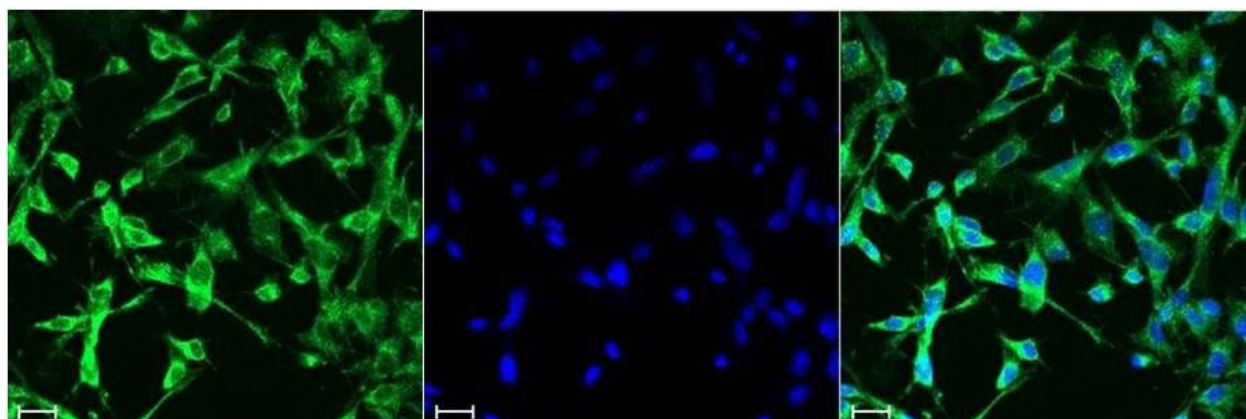


Рис. 3.6. Імуноцитохімічний аналіз експресії рецептору до факторів сімейства Wnt CD349 (frizzled-9) (зелений колір). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм

Клітини первинної культури також були забарвлені антитілами до панцитокератину для детекції можливої контамінації культури кератиноцитами. Усі перевірені первинні культури (n = 5) були негативними при забарвленні антитілами до панцитокератину (рис. 3.7).

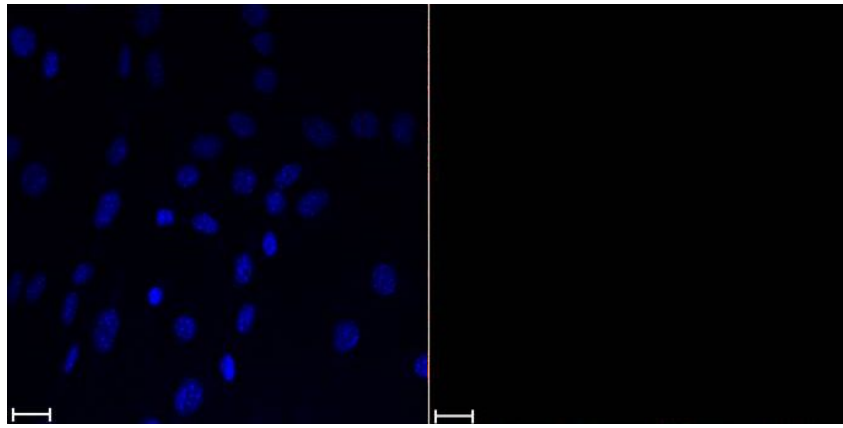


Рис. 3.7. Перевірка первинної культури постнатальних мСК-ПНГ з RV ВФВ миші на контамінацію кератиноцитами шляхом забарвлення анти-панцитокератиновими антитілами (зелений колір - відсутній). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм

Таким чином, отримані нами з використанням модифікованого живильного середовища клітини в первинній культурі повністю відповідали описаним раніше критеріям для постнатальних мСК-ПНГ із регіону bulge волосяного фолікулу вібрисів миші за морфологією та фенотипом [Sieber-Blum M., 2004]. Окрім того більшість клітин у культурі була позитивна за транскрипційним фактором Sox2, що раніше був ідентифікований в клітинах – похідних нервового гребня, що знаходилися у дермі шкіри, та відповідали за регуляцію репаративної регенерації шкіри [A.P. Johnston et al., 2013]. Ембріональне походження цих Sox2-позитивних клітин з нервового гребня було доказано за допомогою використання спеціальних ліній трансгенних мишей. Окрім того вважається, що Sox2 відповідає за здатність клітин – похідних нервового гребня до диференціювання в нейрони [F. Cimadamore et al., 2011].

мСК-ПНГ в первинній культурі також були позитивними за CD349 (Frizzled-9), рецептору до факторів росту сімейства Wnt. Це може вказувати на важливу роль Wnt-сигналіngu не тільки в у процесі індукції формування нервового гребня в ембріогенезі, та в експансії мСК-ПНГ на міграторній

стадії їх розвитку [], але і в підтриманні стовбурового стану постнатальних мСК-ПНГ, що потребує подальшого вивчення.

Для запобігання контамінації культури мСК-ПНГ кератиноцитами та індукції спонтанного диференціювання за умов великої щільності клітин, та для збереження клітин в недиференційованому стані на 10-14-ту добу культивування експланти RB ВФВ видаляли, а клітини пасирували у культуральний флакон T25. На першому пасажі культури досягали субконфлуентного стану на 7-му добу культивування. Середня кількість клітин у культурі мСК-ПНГ (n = 5) становила $1,034 \pm 0,211 \times 10^6$; середня щільність клітин $41,36 \pm 8,4 \times 10^3$ клітин/см². Таким чином, з використанням модифікованого живильного середовища вже на першому пасажі була отримана значна кількість клітин, що була достатня для подальшого культивування, проведення тесту на колонієутворюючі одиниці (КУО), та проведення кількісного аналізу імунофенотипу мСК-ПНГ методом проточної цитометрії.

Результати імунофенотипування культур мСК-ПНГ на П1 наведено у таблиці 3.1 та на рис. 3.8.

Таблиця 3..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, % | 98,9 ± 0, | 92,7 ± 4, | 99,5 ± 2, | 8,4 ± 1, | 95,5 ± 2, | 95,3 ± 2, | 0,2 ± 0, |
| <i>M ± s</i> | 8 | 8 | 5 | 9 | 8 | 3 | 1 |

Примітка. КПК – кількість позитивних клітин.

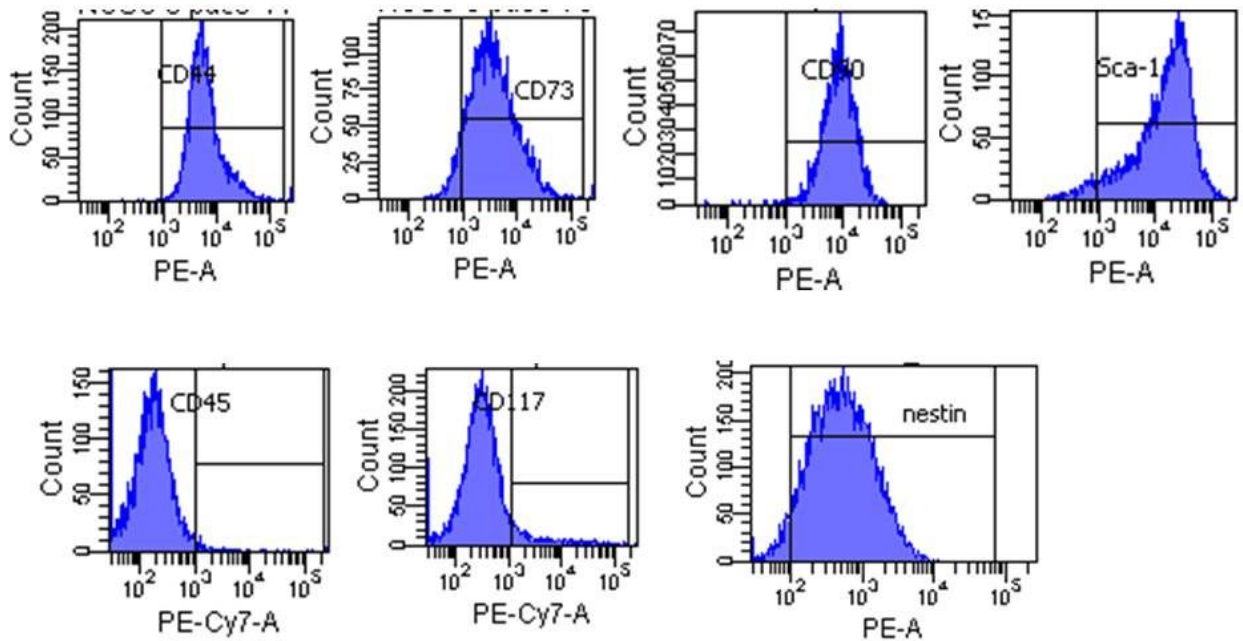


Рис. 3.8. Імунофенотип культури постнатальних мСК-ПНГ з RV ВФВ миші на П1 методом проточної цитометрії. Репрезентативні гістограми експресії клітинами антигенів CD44, CD73, CD90, Sca-1, CD45, CD117 та нестину.

Згідно даних проточної цитометрії культури постнатальних мСК-ПНГ з RV ВФВ миші на П1 містили більш ніж на 90 % клітин, позитивних за маркерами стовбурових клітин (Sca-1 та нестін), та позитивних за класичними за маркерами мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (CD44, CD73 та CD90). У культурі були відсутні CD45⁺ клітини (значення для кількості позитивних клітин на рівні < 1% вважається похибкою методу), що свідчить про відсутність контамінації клітинами гемапоетичного походження. Також у культурі мСК-ПНГ на П1 містилася незначна, але достовірно визначена кількість CD117⁺ (<10 %). CD117 (c-kit) є поверхневим рецептором до SCF (stem cell factor, фактор стовбурових клітин), та тривалий час вважався маркером меланобластів – попередників меланоцитів, які в ембріональному розвитку походять з нервового гребня [M. Ito et al., 1999; M. Sieber-Blum, Z. Zhang, 2002].

Меланобласти на відміну від мСК-ПНГ є типом прогениторних клітин, що мають здатність до диференціювання лише в один тип клітин – меланоцити (пігментні клітини шкіри). Однак, нещодавно CD117 спочатку був успішно використаний як маркер для селекції мСК-ПНГ з гетерогенної популяції клітин, що були отримані при спробі диференціювати ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) миші у напрямку НГ. При цьому відібрані CD117⁺ клітини експресували інші маркери НГ, мали здатність до самовідновлення та направлено диференціювання у периферичні нейрони, Шваннівські клітини та меланоцити [Т. Motohashi et al., 2007]. Пізніше була описана несподівана мультипотентність CD117⁺ клітини, отриманих зі шкіри дорослих мишей [Т. Motohashi et al., 2009; Т. Motohashi et al., 2016]. Ці постнатальні CD117⁺ клітини, як і їх аналоги, отримані із ЕСК, мали здатність до диференціювання у периферичні нейрони, шваннівські клітини та меланоцити.

При дослідженні культур постнатальних мСК-ПНГ на П1 також була визначена популяція ALDH^{bright} клітин (Рис. 3.1.9, Табл. 3.1.2), тобто клітин, що мали високу активність альдегіддегідрогенази, яка властива різним типам стовбурових клітин. Кількість таких клітин складала 13,44±2,19% від загальної кількості клітин.

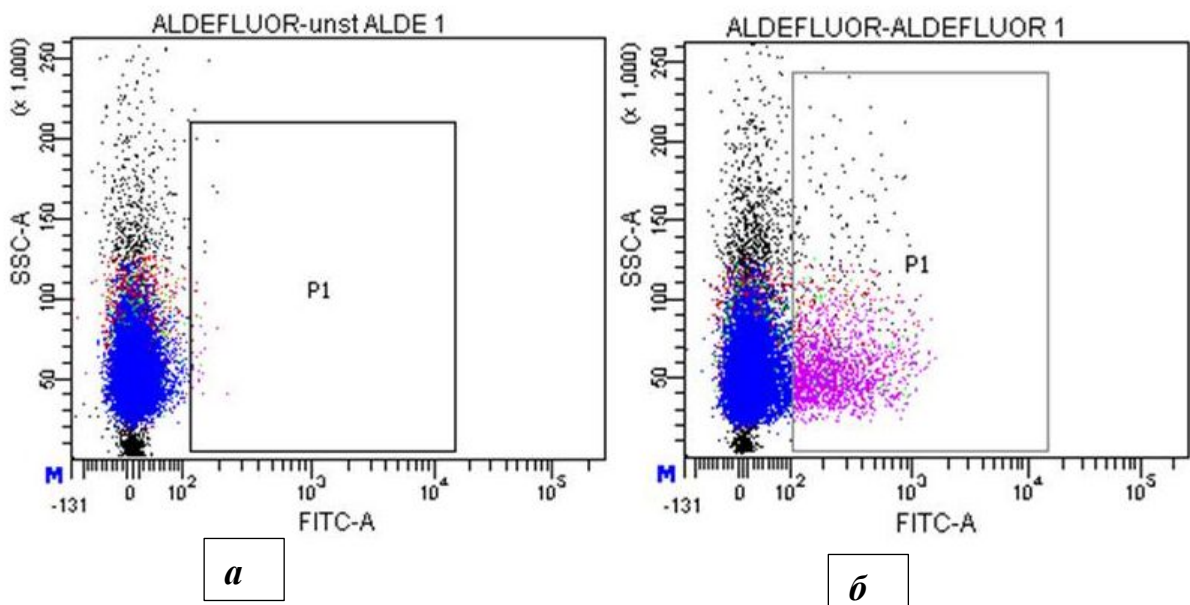


Рис. 3.9. Визначення ALDH^{bright} клітин у культурі постнатальних мСК-ПНГ з RB ВФВ миші на П1 методом проточної цитометрії; а) контроль – гістограма популяції клітин, оброблених DEAB – інгібітором ALDH; Б) досліджувана популяція клітин. Регіон P1 визначає клітини з високою активністю ALDH.

Культури постнатальних мСК-ПНГ на П1 також були досліджені на експресію транскрипційних факторів Sox10 та Sox2 на рівні мРНК. Дані полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією наведено на рис. 3.10.

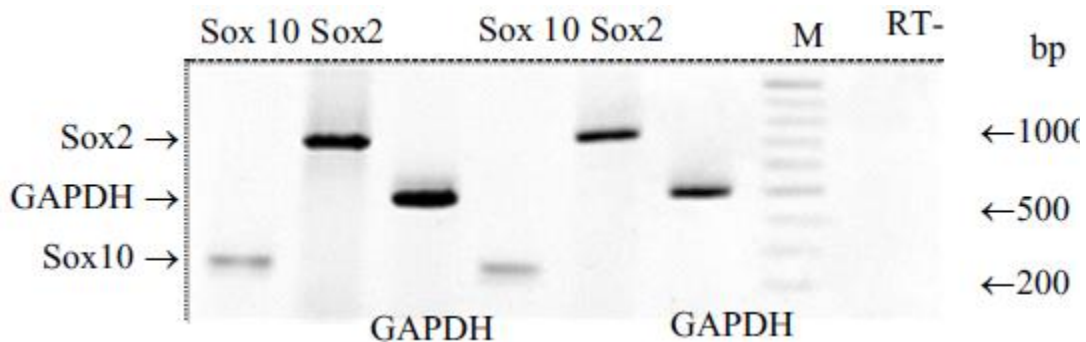


Рис. 3.10. Експресія транскрипційних факторів Sox2 та Sox10 на рівні мРНК у клітинами культури постнатальних мСК-ПНГ миші з RB ВФВ на П1.

При постановці тесту на КУО була показана здатність постнатальних мСК-ПНГ до росту в умовах клональної щільності з утворенням клональних колоній. Ефективність колонієутворення в використаних умовах культивування склала $49,2 \pm 4,8\%$.

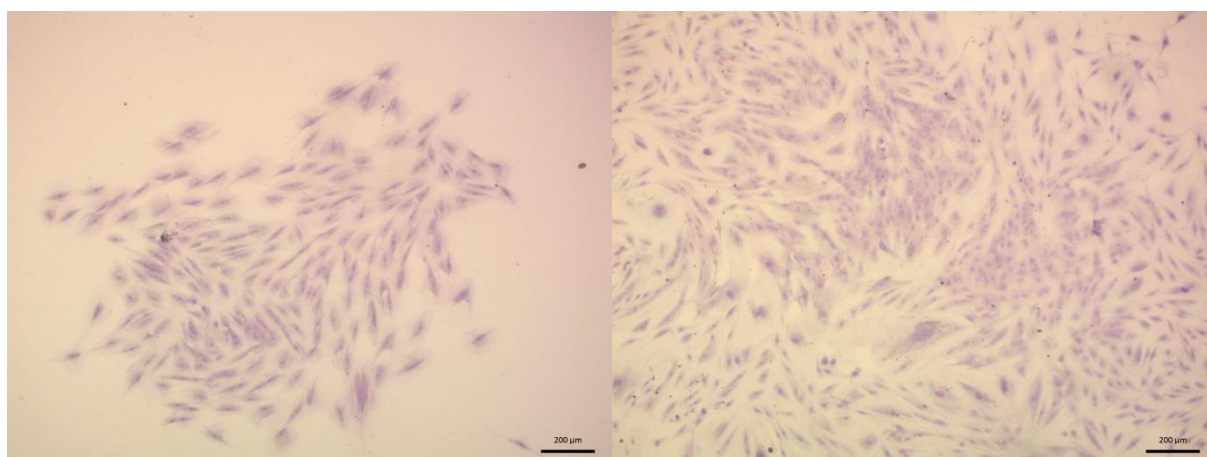
Таблиця 3.2

Визначення кількості ALDH^{bright} клітин та кількості і типів КУО у культурі постнатальних мСК-ПНГ на П1

| Клітинна культура, | ALDH ^{bright} клітини, % | Ефективність колоніє | КУО I-го типу, % | КУО II-го типу, % | КУО III-го типу, |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | | | | | |

| № | | утворення (ЕКУ), % | | | % |
|------------|------------|-----------------------|---------|----------|----------|
| 1 | 14,9 | 56 | 4 | 19 | 33 |
| 2 | 10,8 | 43 | 8 | 10 | 25 |
| 3 | 13,7 | 47 | 2 | 14 | 31 |
| 4 | 16,1 | 51 | 7 | 7 | 37 |
| 5 | 11,7 | 49 | 5 | 15 | 29 |
| <i>M±s</i> | 13,44±2,19 | 49,2±4,8 | 5,2±2,4 | 13,0±4,6 | 31,0±4,5 |

При цьому було показано, що вже в культурі ПІ постнатальні мСК-ПНГ з RV ВФВ є гетерогенними по проліферативному потенціалу в умовах клональної щільності, або іншими словами – формують колонії різних типів (Рис. 3.1.11). Так, в залежності від кількості і морфології клітин, усі клональні колонії (КУО) могли бути розділені три типи: колонії I-го типу склалися з до 50 великих клітин з вираженими морфологічними ознаками диференціації ($5,2 \pm 2,4\%$ від загального числа колоній); колонії II-го типу - з 100-300 клітин різної морфології ($13,0 \pm 4,6\%$ від загального числа колоній); колонії III-го типу - понад 500 невеликих клітин без морфологічних ознак диференціації ($31,0 \pm 4,5\%$ від загального числа колоній) (табл. 3.11).



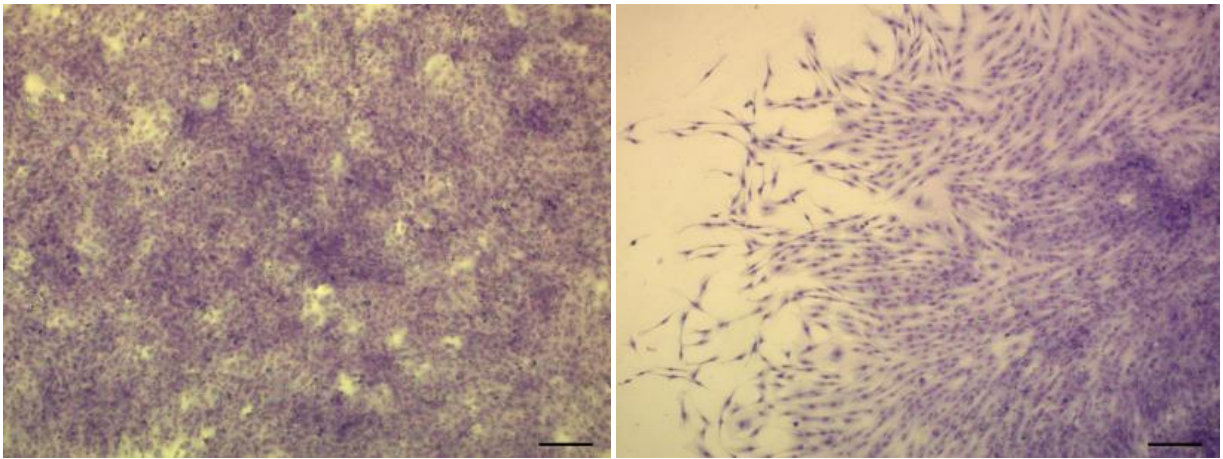


Рис. 3.11. Клональна гетерогенність постнатальних мСК-ПНГ у культурі П1. А) КУО I-го типу; Б) КУО II-го типу; В) центр КОУ III-го типу; Г) периферія КОУ III-го типу. Забарвлення азур-еозином за Романовським. Масштабний відрізок 200 мкм

Після аналізу культур постнатальних мСК-ПНГ на П1 було проведено їх подальше культивування на протязі двох пасажів до П3. Пасажування здійснювали з засівною щільністю 1000 клітин/см². По досягненні культурами мСК-ПНГ П3 було визначено кількість нестін⁺ та ALDH^{bright} клітин. Також було проведено визначення кількості та типів КУО. Репрезентативна гістограма по визначенню ALDH^{bright} клітин представлена на рис. 3.12. Дані по кількості нестін⁺ та ALDH^{bright} клітин, кількості КУО, та співвідношенню різних типів КУО наведено у таблиці 3.3.

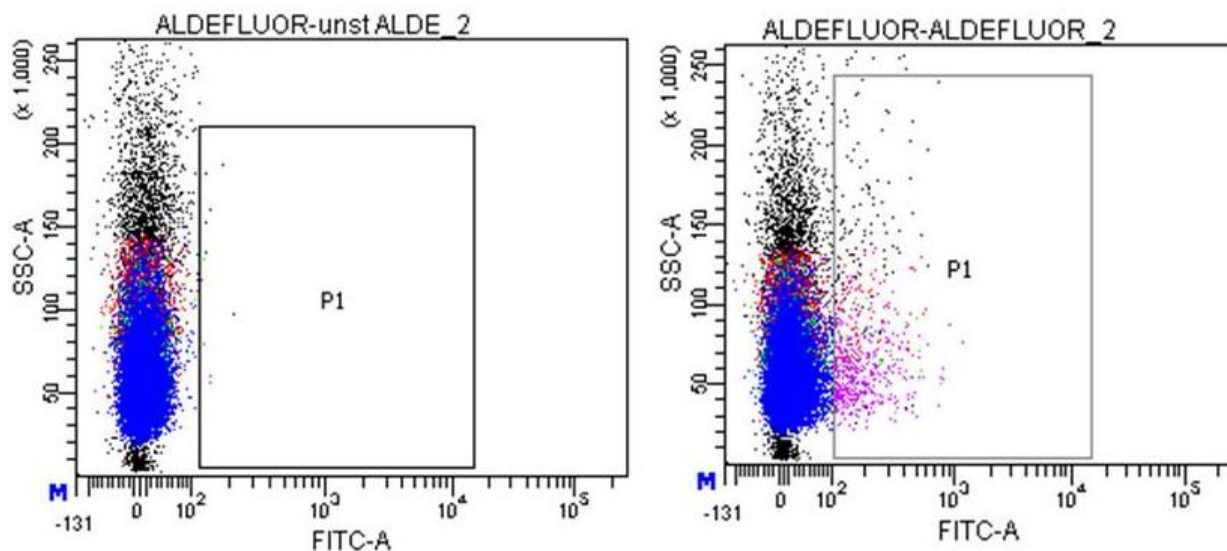


Рис. 3.12. Визначення $ALDH^{bright}$ клітин у культурі постнатальних мСК-ПНГ з RV ВФВ миші на П1 методом проточної цитометрії. А) контроль – гістограма популяції клітин, оброблених DEAB – інгібітором ALDH; Б) досліджувана популяція клітин. Регіон P1 визначає клітини з високою активністю ALDH.

ТЕКСТ

Таблиця 3.3

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

| Клітинна культура, № | нестін ⁺ клітини, % | $ALDH^{bright}$ клітини, % | Ефективність колоніє утворення (ЕКУ), % | КУО Іго типу, % | КУО Пго типу, % | КУО Шго 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 |
| $M \pm s$ | 66,82±5,91 | 3,06±1,13 | 33,4±3,6 | 10,4±1,5 | 19,7±1,5 | 3,1±1,3 |

Таким чином, з наведених даних можливо зробити висновок, що використання модифікованого живильного середовища дозволяє отримати культуру постнатальних мСК-ПНГ з RB ВФВ миші, але не здатне підтримувати мСК-ПНГ у стовбуровому стані. При експансії постнатальних мСК-ПНГ до ПЗ з пасируванням з посівної щільністю 1000 клітин/см² відбувається втрата експресії фенотипових та функціональних маркерів стовбурових клітин (нестін, висока активність ALDH), що може свідчити про спонтанне диференціювання мСК-ПНГ. Таким чином, живильне середовище без використання ЕКЕ потребує подальшої оптимізації, яка мож полягати у використанні рекомбінантних факторів росту.

Вивчення мСК-ПНГ і розробка методів їх культивування зі збереженням в стовбурових стані являє собою актуальну і складну задачу. Тривалий час вважалося, що стовбурові клітини нервового гребеня (neural crest stem cells), подібно самому нервового гребеня (НГ), мають транзиторну природу і існують тільки у вузькому проміжку часу під час ембріонального розвитку. В останні 15 років дане подання змінилося в зв'язку з виділенням з багатьох тканин постнатального (дорослого) організму ссавців клітин з властивостями мСК-ПНГ. Однак, їх вивчення має ряд труднощів. По-перше, мСК-ПНГ зустрічаються в тканинах дорослого організму у вигляді мінорної популяції і відсутні на даний момент фенотипічні маркери, що дозволяють відрізнити їх від клітин мезенхімального походження. По-друге, ряд термінально диференційованих клітинних типів - похідних НГ, таких як меланоцити і Шваннієвські клітини, мають здатність до дедиференціювання і подальшого мультилінійного диференціювання в інші клітинні типи [12, 13]. При цьому, як уже згадувалося, фенотипічні маркери для мСК-ПНГ, що дозволяють відрізнити їх від диференційованих клітин - похідних НГ, відсутні. По-третє, відсутні експериментальні підходи, що дозволяють досліджувати *in vivo* популяції стовбурових клітин з повільно оновлювальних тканин за їхньою визначальною властивістю - здатністю до самовідновлення,

подібно до розробленого для гемопоетичних стовбурових клітин метода серійної трансплантації.

Розробка спеціальних ліній трансгенних мишей дозволила вирішити проблему виділення клітин - похідних НГ з дорослого організму [14]. Було показано, що регіон bulge волосяного фолікула вібрисів є зручним джерелом для отримання постнатальних мСК-ПНГ і велика частина клітин в первинній культурі, згідно з результатами клонального аналізу, є стовбуровими клітинами [2]. Як показує клональний аналіз в нашому дослідженні, культура клітин - похідних НГ має ієрархічну організацію і складається зі стовбурових клітин (значний проліферативний потенціал, здатні до самовідновлення), прогеніторних клітин (помірний проліферативний потенціал, обмежена здатність до самовідновлення) і диференційованих (обмежена здатність до проліферації) клітин. Це підтверджується роботами інших авторів [2, 15] і також для мСК-ПНГ отриманих з різних тканинних джерел і на більш ранніх стадіях розвитку організму [16]. Слід зазначити, що нестін, що вважався маркером нейральних стовбурових клітин, стовбурових клітин нервового гребня та постнатальних мСК-ПНГ, скоріше є маркером високої проліферативної активності, що є характерним як для стовбурових, так і для прогеніторних клітин, так як кількість нестін-позитивних клітин можна порівняти з загальною кількістю колонієутворюючих клітин (КУО), але вона значно перевершує кількість КУО III-го типу. Кількість же $ALDH^{bright}$ клітин сопоставима з кількістю КУО III-го типу. На нашу думку, ми вперше показали існування в культурі клітин - похідних нервового гребеня популяції $ALDH^{bright}$ клітин. Надалі необхідно проведення експериментів із сортування і порівняння проліферативного і клоногенного потенціалу $ALDH^{bright}$ and $ALDH^{diminished}$ субпопуляцій клітин у культурі постнатальних мСК-ПНГ. Подібно до інших клітинних типів активність $ALDH$ може виявитися маркером власне стовбурових клітин в гетерогенній популяції клітин - похідних НГ.

3.2 Оптимізація умов культивування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші.

Даний підрозділ присвячено дослідженню впливу різних чинників (щільність посіву, фактори росту та вміст кисню у складі газової фази) на швидкість росту культур постнатальних мСК-ПНГ з RV ВФВ миші. Останнім часом велика увага приділяється стратегіям оптимізації нарощування клітин з використанням замінників ЕТС, рекомбінантних факторів росту і шляхом культивування клітин в умовах зі зниженим вмістом кисню, ближчим до фізіологічних [Estrada et al., 2012]. Дані підходи можуть мати велике значення при культивуванні клітин з метою їх терапевтичного застосування, так як при цьому скорочуються терміни культивування, підвищується кількісний вихід клітин і їх якість. Оптимізація умов культивування МСК-ПНГ є важливим завданням, так як дані клітини містяться в тканинах дорослого організму в мінорних кількостях.

3.2.1 Вплив щільності посіву на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші.

Щільність посіву клітин є одним з визначальних чинників успішного культивування будь-якого клітинного типу, а також значно впливає на збільшення кількості стовбурових / прогеніторних клітин в культурі і на збереження їх в недиференційованому стані. Крім того, одним з функціональних ознак ієрархічної організації клітинної популяції є велика швидкість росту культури при меншій щільності посіву. Подібний ефект був описаний для культур мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (ММСК) кісткового мозку від різних видів тварин [Javazon et al., 2001; Sekiya et al., 2002; Neuhuber et al., 2008]. Залежність швидкості росту від щільності посіву вперше була показана для ММСК кісткового мозку (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)

виділених від тварин різних видів [17]. Цей феномен, мабуть, є функціональним наслідком ієрархічної організації даних клітинних популяцій в культурі. У нашому дослідженні низька щільність посіву позитивно впливала на швидкість проліферації мСК-ПНГ, збільшуючи кількість подвоєнь популяції і зменшуючи середній час подвоєння клітинної популяції (Рис. 3.13).

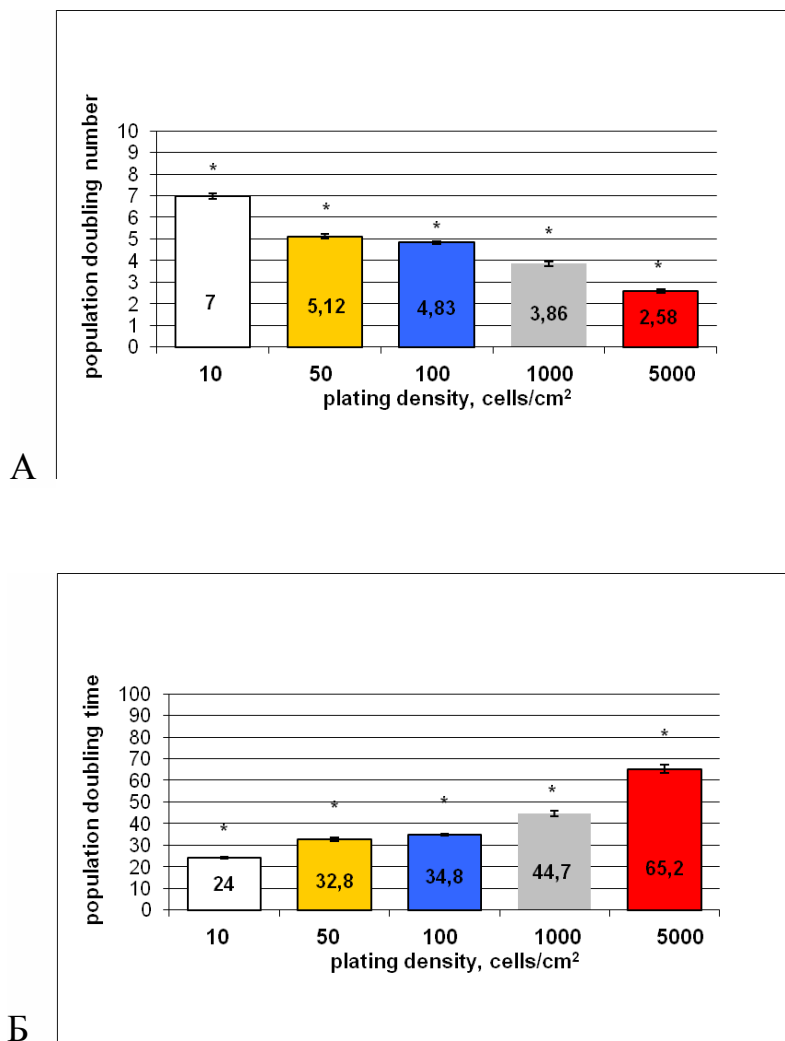


Рис. 3.13. Вплив щільності посіву на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ миші. А) кількість подвоєнь популяції клітин (PDN); Б) час подвоєння клітинної популяції (PDT). * $p < 0,05$ при порівнянні між усіма групами

мСК-ПНГ виявили сильну залежність швидкості росту від щільності посіву. Найкращі показники росту спостерігалися при найнижчій щільності

посіву (10 клітин на см^2): число подвоювання клітин в популяції майже втричі перевищувало, тоді як час подвоєння популяції був у три рази менше, ніж у групі з високою щільністю посіву клітин (5000 клітин на см^2). Виявлено, що в використаних умовах культивування оптимальна щільність посіву клітин для постнатальних мСК-ПНГ становить 10-100 клітин на см^2 .

3.2.2 Вплив факторів росту на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші. Фактори росту являють собою сигнальні молекули білкової природи, що в аутокринній, чи паракринній спосіб контролюють поведінку та чисельність різних популяцій клітин в організмі. Розробка технології рекомбінантних ДНК дозволила отримувати різні фактори росту та цитокіни, що можуть бути використані у якості лікарських засобів, або як митогенні добавки для культури клітин.

Після аналізу літератури у пошуках факторів росту, здатних підтримувати постнатальні мСК-ПНГ у стовбуровому стані, та стимулювати їх проліферацію були обрані два кандидати: епідермальний фактор росту (EGF), та основний фактор росту фібробластів (bFGF, або FGF-2)

При дослідженні ефектів цих двох факторів росту було виявлено, що bFGF та EGF мають дозозалежну митогенну дію (рис. 3.14). Відповідні криві росту при використанні різних концентрацій EGF та bFGF представлені на Рис. 3.15 та Рис. 3.16.

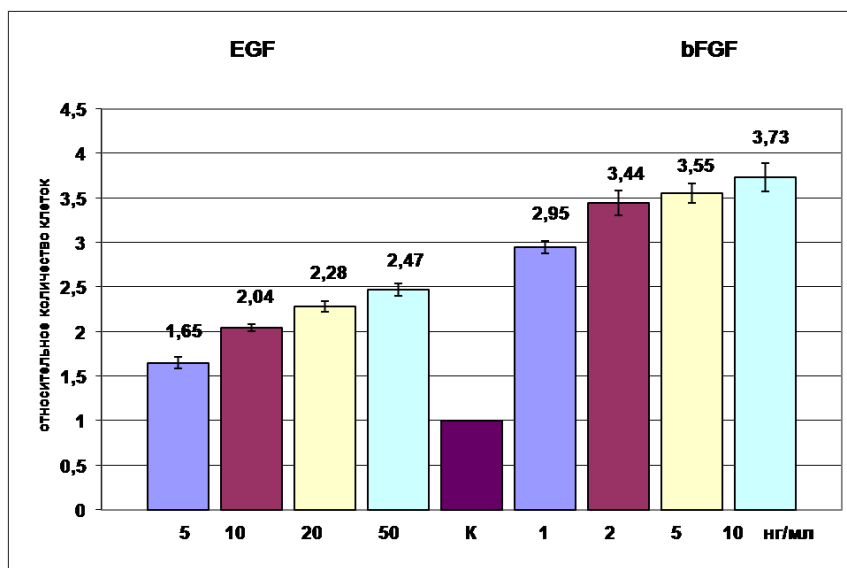


Рис. 3.14. Дозозалежний стимулюючий вплив EGF та bFGF на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ миші у порівнянні з контрольним живильним середовищем.

Примітно, що ефект bFGF був більш виражений і проявлявся в нижчих концентраціях: 1 нг/мл bFGF було достатньо, щоб збільшити кількість клітин втричі порівняно з контролем. Вищі концентрації bFGF (від 2 до 10 нг/мл) давали подібні криві росту та приблизно в 4 рази збільшували кількість клітин. EGF мав менш вражаючий ефект і при концентрації 10 нг/мл лише подвоював кількість клітин порівняно з контролем.

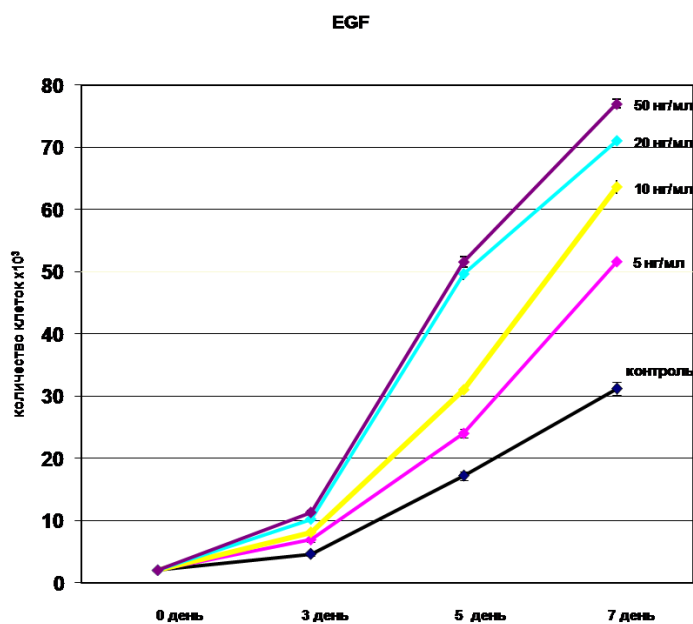


Рис. 3.15. Вплив різних концентрацій EGF проліферацію постнатальних мСК-ПНГ миші, представлений у вигляді кривих росту.

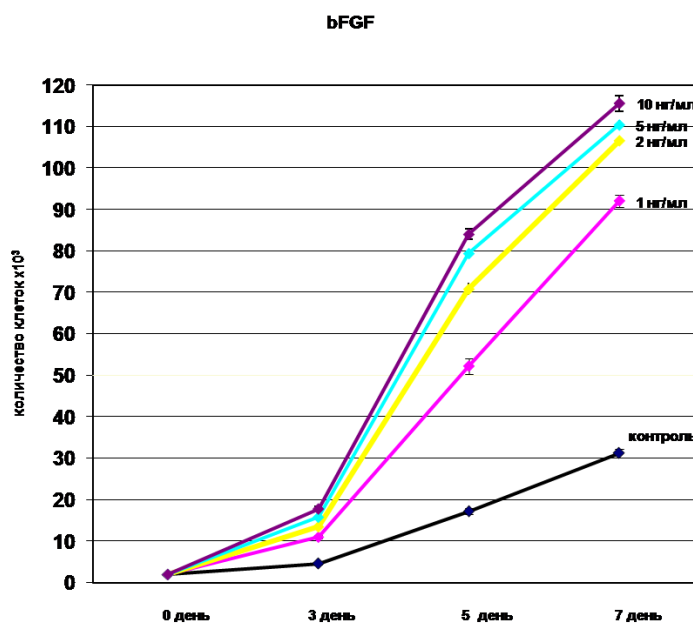


Рис. 3.16. Вплив різних концентрацій bFGF проліферацію постнатальних мСК-ПНГ миші, представлений у вигляді кривих росту.

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

3.2.3 Вплив вмісту кисню у складі газової фази на проліферацію постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші.

Відомо, що одним із найважливіших чинників, що негативно впливають на функціонування, проліферацію та старіння клітин як у культурі *in vitro*, так і у організмі *in vivo* є вільні радикали кисню. На теперішній час загальноприйнятим є використання для культивування клітин CO₂-інкубаторів, що підтримують необхідну для росту клітин температуру, вологість та вміст CO₂, необхідний для функціонування буферних систем живильного середовища. Однак, у стандартних CO₂-інкубаторів не має функції контролю вмісту кисню. Таким чином вміст кисню у складі газової фази при культивуванні клітин у стандартних CO₂-інкубаторах дорівнює атмосферному значенню, що становить близько 18-21% кисню у повітрі. Також відомо, що стовбурові клітини у організмі локалізуються не випадково, а в спеціальних місцях – так званих нішах. Ніші стовбурових клітин організовані таким чином, щоб регулювати їх функціонування та захищати від дії шкідливих факторів. Високий вміст кисню відноситься до таких факторів за рахунок загальної токсичної дії, генерації надмірної кількості вільних радикалів кисню при взаємодії з іншими сполуками, та за рахунок генотоксичної дії (ушкодження ДНК). За даними різних досліджень вміст кисню в нішах стовбурових клітин коливається від 2 % до 8 %. Тому було проведено дослідження впливу різного вмісту кисню на швидкість росту постнатальних мСК-ПНГ з використанням живильного середовища №1 (оригінальне середовище для культивування постнатальних мСК-ПНГ, що містить 10 % ЕТС та 5 % ЕКЕ) та живильного середовища №3 (з низьким вмістом ЕТС – 5 %, та з bFGF і EGF)м

Результати по культивуванню постнатальних мСК-ПНГ миші в двох різних типах живильних середовищ при різному вмісті кисню представлені на Рис. 3.17. Як можна бачити, низька концентрація кисню мала

стимулюючий вплив на швидкість проліферації мСК-ПНГ у обох живильних середовищах. У живильному середовищі №1 була отримана наступна кількість клітин за 5 діб культивування: 21% O₂ - 170 ± 44x10³, 10% O₂ - 364 ± 37x10³; 5% O₂ - 660 ± 85x10³ клітин. Живильне середовище №3 мало переваги над живильним середовищем №1 по кількості отриманих клітин за 5 діб культивування при всіх досліджених значеннях концентрації кисню на мСК-ПНГ, яке зберігалось: 21% O₂ - 352 ± 81x10³; 10% O₂ - 820 ± 63x10³; 5% O₂ - 996 ± 45x10³.

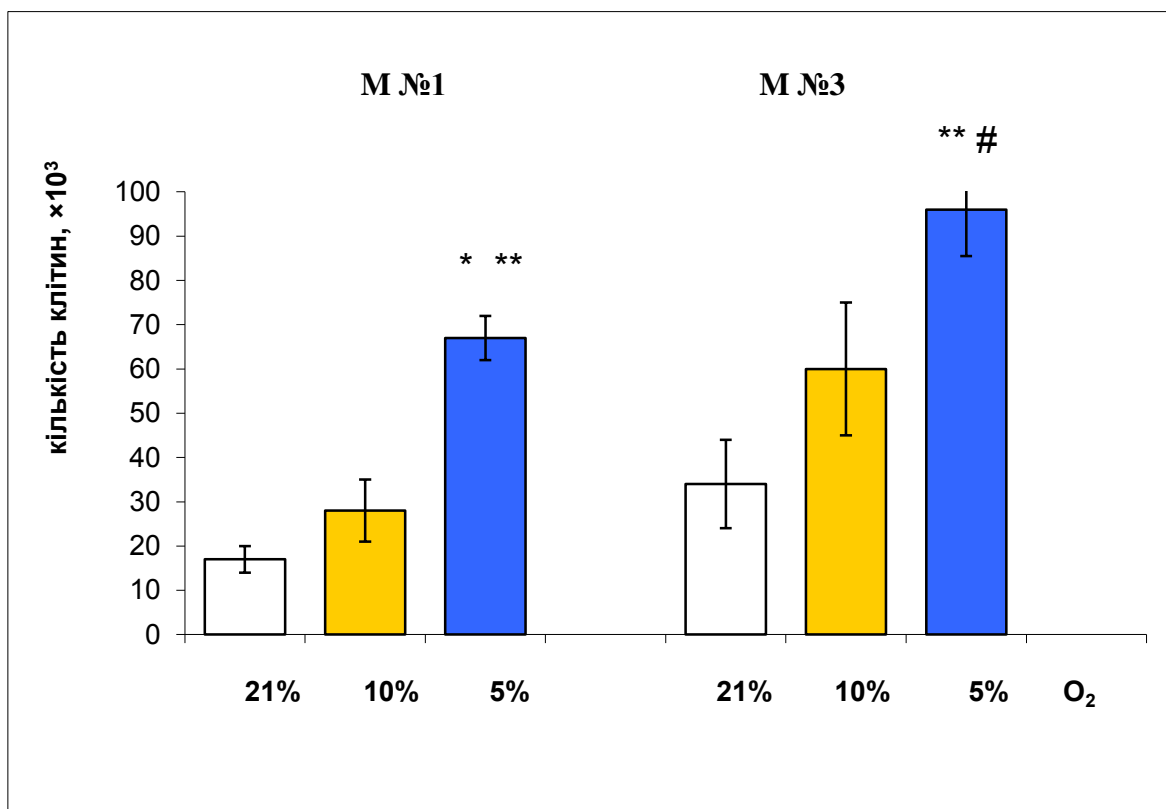


Рис. 3.17 Вплив різного вмісту кисню на швидкість росту постнатальних мСК-ПНГ миші при культивуванні у живильному середовищі №1 та живильному середовищі №2.

3.3 Дослідження морфофункціональних властивостей постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші

3.3.1 Імунофенотип постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші та продукція ними факторів росту і цитокінів при культивуванні у різних живильних середовищах.

Склад живильного середовища може мати суттєвий вплив не тільки на швидкість росту культур клітин та кількість КУО, але і на інші морфофункціональні властивості клітин, що можуть визначити їх терапевтичний та регенеративний потенціал, зокрема, на: імунофенотип, здатність до диференціювання, продукцію факторів росту та цитокінів, та інші. Тому було проведено порівняльне дослідження швидкості росту, імунофенотипу, клоногенного потенціалу (кількості КУО) та продукції деяких факторів росту (bFGF і VEGF) та нейротрофінів (NGF, BDNF, NT-3 та NT-4/5).

При порівнянні швидкості росту культур мСК-ПНГ, отриманих та культивованих у живильних середовищах №1 та №3 була виявлена значна перевага живильного середовища №3 за цим показником при культивуванні на протязі п'ятох пасажів (Рис. 3.18).

Показові гістограми імунофенотипу мСК-ПНГ на п'ятому пасажі наведено на Рис. 3.19 та Рис. 3.10. Наведено показові гістограми визначення кількості ALDH^{bright} клітин на Рис. 3.21 та Рис. 3.22. Кількісні дані наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Імунофенотип клітин культури постнатальних мСК-ПНГ з RB ВФВ миші на П5 методом проточної цитометрії

| Маркер | CD44 | CD73 | CD90 | CD117 (c-kit) | Sca- 1 | nestin | ALDH ^{bright} | CD45 |
|------------------|------------|------------|------------|------------------|------------|------------|------------------------|-----------|
| Середовище №1 | 99,67 ± | 83,74 ± | 93,51 ± | 38,43 ± | 95,52 ± | 88,51 ± | 10,23 ± | 0,21 ± |

| | | | | | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Кількість позитивних клітин, % <i>M±s</i> | 2,54 | 6,54 | 4,36 | 10,29 | 2,81 | 7,54 | 3,47 | 0,09 |
| Середовище №3 | | | | | | | | |
| Кількість позитивних клітин, % <i>M±s</i> | 98,92 ± 0,78 | 92,74 ± 4,78 | 99,51 ± 2,52 | 8,43 ± 1,86 | 95,52 ± 2,81 | 95,31 ± 2,34 | 25,05 ± 5,72 | 0,18 ± 0,11 |

3.3.2 Направлене диференціювання постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші. При культивуванні мСК-ПНГ в відповідних індуктивних середовищах для направлено диференціювання з клітинами відбувалися морфологічні та функціональні зміни, характерні для даного напрямку диференціювання. Так, при культивуванні в адіпоіндуктивному середовищі клітини набували округло-полігональну форму, в цитоплазмі з'являлися дрібні ліпідні вакуолі, які збільшувалися в розмірах з часом диференціювання і фарбувалися специфічним для нейтральних ліпідів барвником Oil Red O (Рис. 3.23).

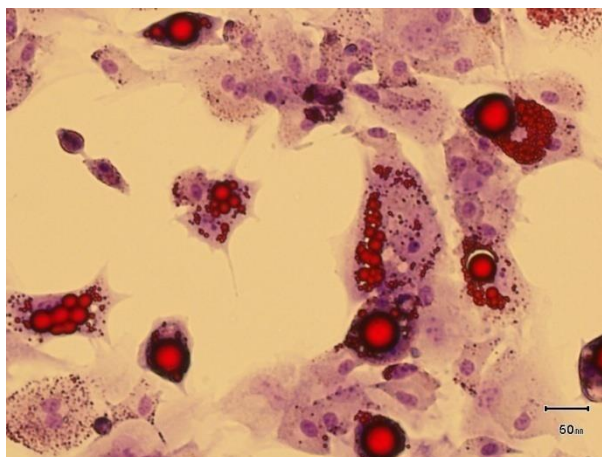


Рис. 3.23. Направлене диференціювання постнатальних мСК-ПНГ миші у адипоцити. Забарвлення Oil Red O на ліпідні вакуолі (червоний колір). Контрастування азур-еозином за Романовським. Масштабний відрізок 50 мкм.

При культивуванні в остеоіндуктивному середовищі клітини ставали полігональними, через 14 діб позитивно забарвлювалися на лужну фосфатазу та остеокальцин і починали продукувати кальцифікований позаклітинний матрикс, який інтенсивно забарвлювалася Alizarin Red S на 21-шу добу диференціювання (Рис. 3.24).

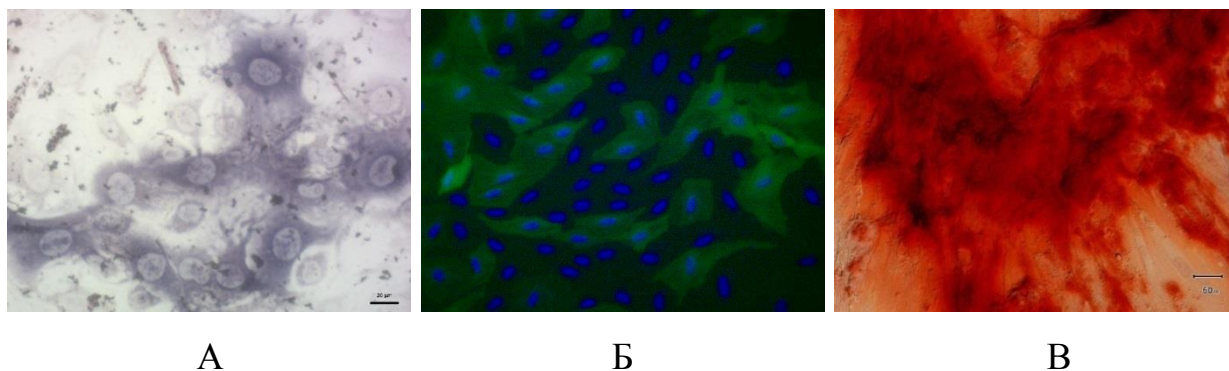


Рис. 3.24. Направлене диференціювання постнатальних мСК-ПНГ миші у остеобласти. А) активність лужної фосфатази (ALP) при виявленні за допомогою BCIP/NBT (фіолетовий колір); Б) позитивне забарвлення антитілами до остеокальцину (зелений колір). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір); В) виявлення кальцифікованого позаклітинного матриксу забарвленням Alizarin Red S (червоний колір). Масштабний відрізок 50 мкм.

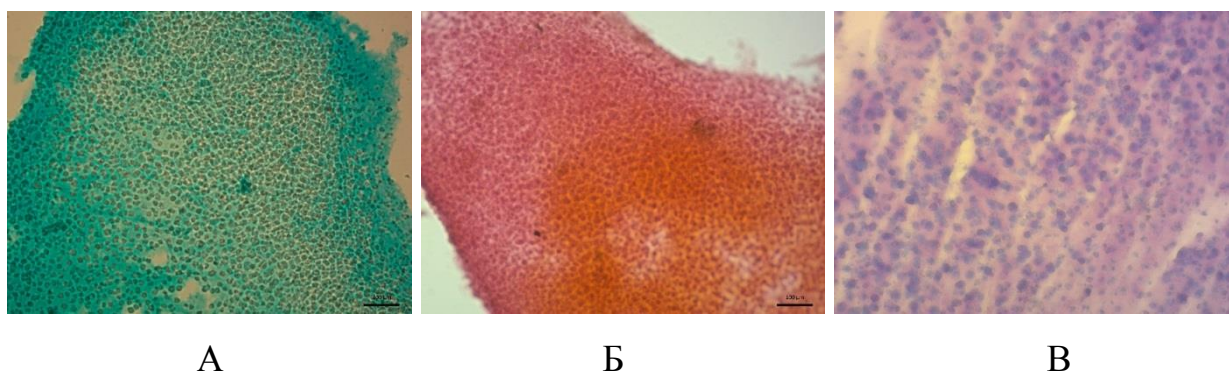
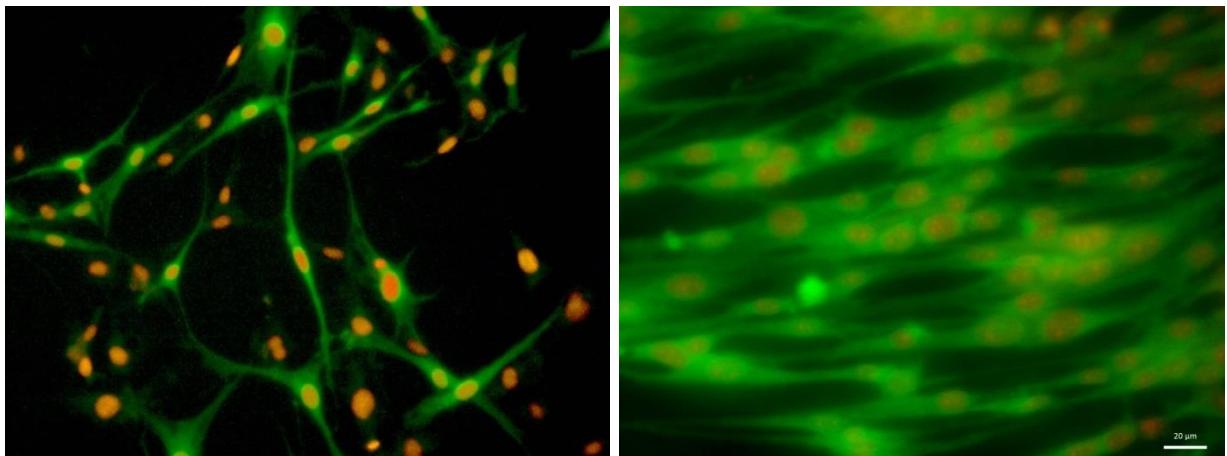


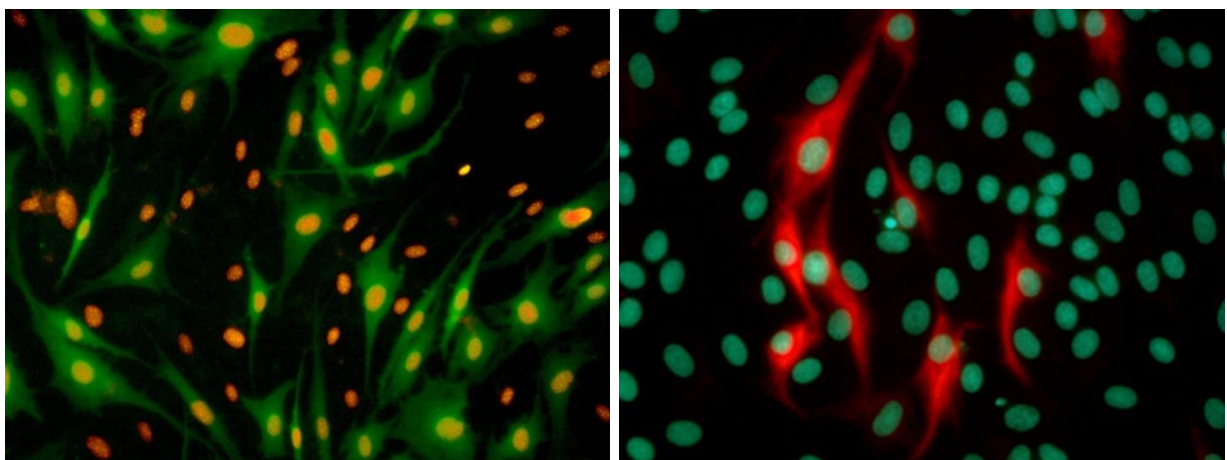
Рис. 3.25. Направлене диференціювання постнатальних мСК-ПНГ миші у хондроцити. А) забарвлення Alcian Blue; Б) забарвлення Safranin O; В) забарвлення Toluidine Blue. А та Б – масштабний відрізок 100 мкм. В – масштабний відрізок 50 мкм.

Спрямоване диференціювання в нейральні типи клітин також приводила до характерних морфологічних змін і експресії специфічних для нейронів і гліальних (Шваннівських) клітин білків. Так, при спрямованому диференціюванні в нейрони фібробластоподібні клітини трансформувалися в клітини з округлою рефрактерною сомою та довгими відростками і позитивно забарвлювалися на β -III-тубулін при іммуноцітохімічеськіє реакції із специфічними антитілами (Рис. 3.26, А).



А

Б



В

Г

Рис. 3.26. Направлене диференціювання постнатальних МСК-ПНГ миші у нейрони та гліальні (Шваннівські клітини). А) позитивне забарвлення антитілами до β -III-тубулін (зелений колір). Б) В) Г) А, Б та В – ядра клітин забарвлені йодидом пропідіума (помаранчевий колір) Г – ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок 50 мкм

Культивовані в індуктивному для гліального диференціювання середовищі клітини набували характерну для гліальних клітин морфологію і експресували специфічні для гліальних клітин білки S-100 β , GFAP та MBP (Рис. 3.26, Б, В та Г).

3.3.3 Дослідження клоногенного потенціалу постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші та їх здатності до самовідновлення.

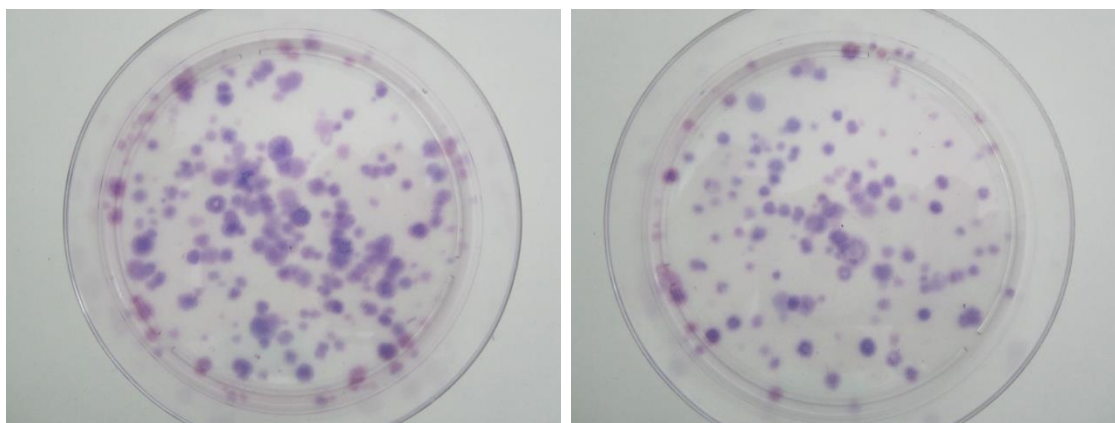


Рис. 3.27. Тест на КУО в культурі постнатальних мСК-ПНГ миші. А) КУО різного розміру у культурі постнатальних мСК-ПНГ; Б) субклонування КУО III-го типу призводить до утворення нових КУО. Забарвлення азур-еозином за Романовським.

Таблиця 3.5

Здатність різних типів КУО до формування вторинних та третинних колоній

| Тип КУО | Вторинні КУО | | | Третинні КУО | | |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| | КОЕф I-го типу | КОЕф II-го типу | КОЕф III-го типу | КОЕф I-го типу | КОЕф II-го типу | КОЕф III-го типу |
| КОЕф I-го типу | - | - | - | - | - | - |
| КОЕф II-го типу | + | + | - | + | - | - |
| КОЕф III-го типу | + | + | + | + | + | + |

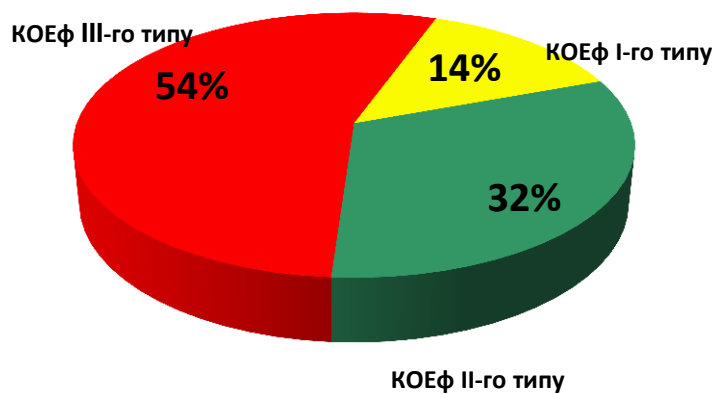


Рис. 3.28. Співвідношення різних типів КУО в культурі постнатальних мСК-ПНГ.

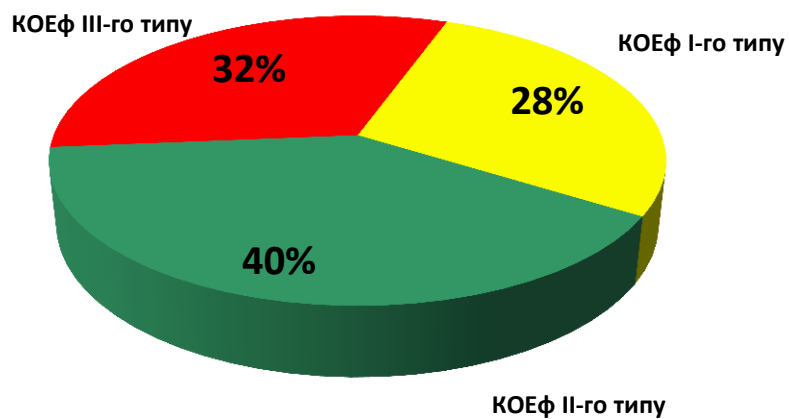
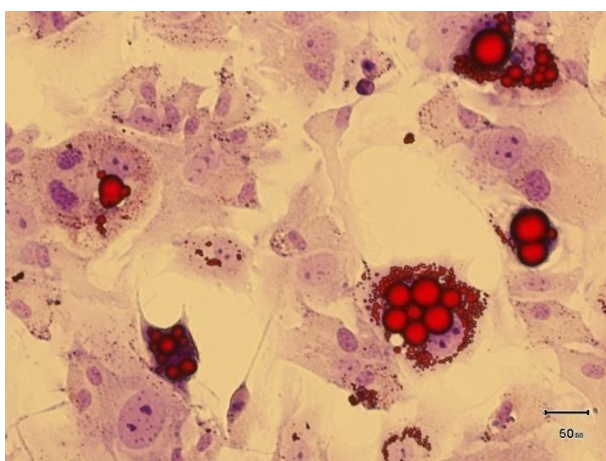
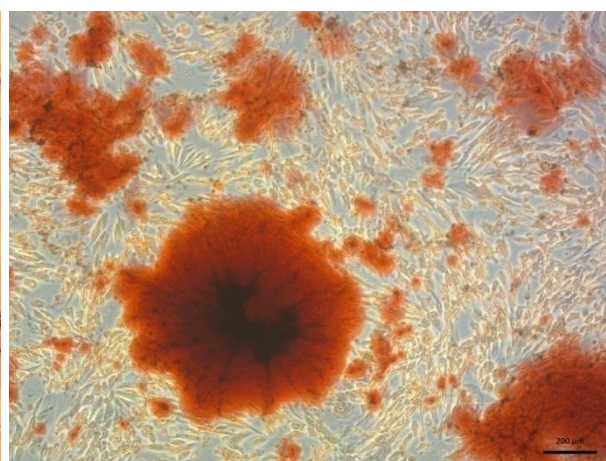


Рис. 3.29. Співвідношення різних типів ККО при субклонуванні ККО III-го типу.

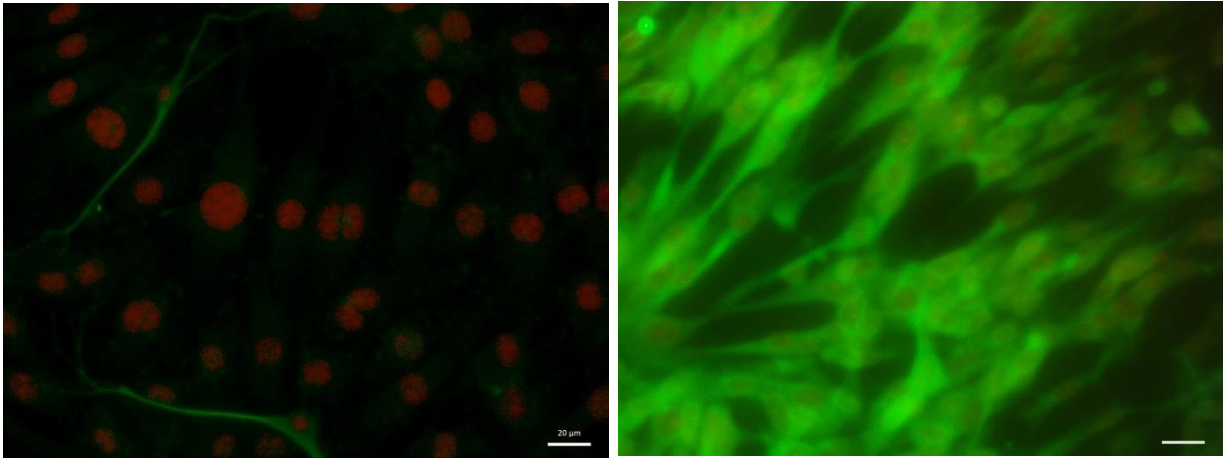
3.3.4 Направлене диференціювання клональних культур та колонієутворюючих одиниць.



А



Б



В

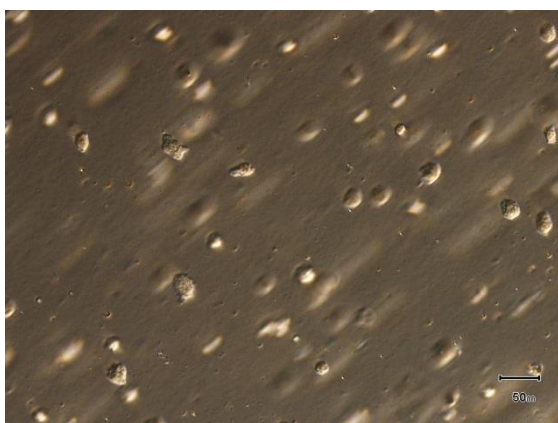
Г

Рис. 3.30. Направлене диференціювання клональних культур постнатальних мСК-ПНГ миші. А) адипоцити, забарвлення ліпідних вакуолей за допомогою Oil Red O (червоний колір); Б) остеобласти, забарвлення мінералізованого позаклітинного матриксу за допомогою Alizarin Red S (червоний колір); В) нейрони, експресія β -III-тубуліну (зелений колір); Г) гліальні (Шваннівські) клітини, експресія S100 β (зелений колір). А, В и Г – масштабний відрізок 50 мкм. Б – масштабний відрізок 200 мкм.

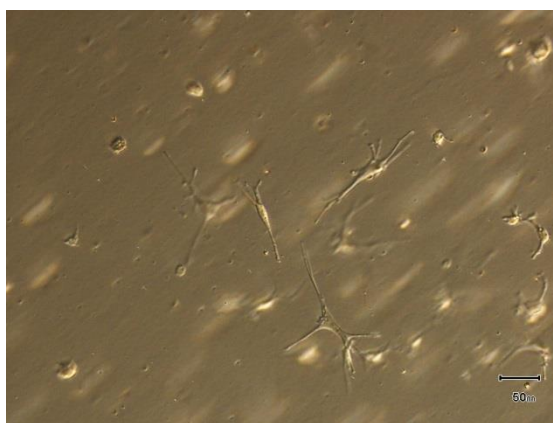
3.4 Дослідження життєздатності та проліферації постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші при 3D культивуванні у складі колагенового та фібринового гідрогелю.

У роботі показана принципова можливість культивування мСК-ПНГ в тривимірних конструкціях на основі колагенового і фібринового гідрогелів. Обидва типи гелів зручні в роботі, вимагають небагато часу на приготування і полімеризацію, дозволяють отримувати рівномірний розподіл клітин в їх складі. Безпосередньо після приготування гідрогелю мСК-ПНГ в їх складі мали округлу форму (Рис. 31, А та Б). Через 24 год культивування форма мСК-ПНГ змінювалася на фібробластоїдну і клітини формували кілька довгих відростків (Рис. 3.31, В, Г). На сьому добу культивування в гідрогелях

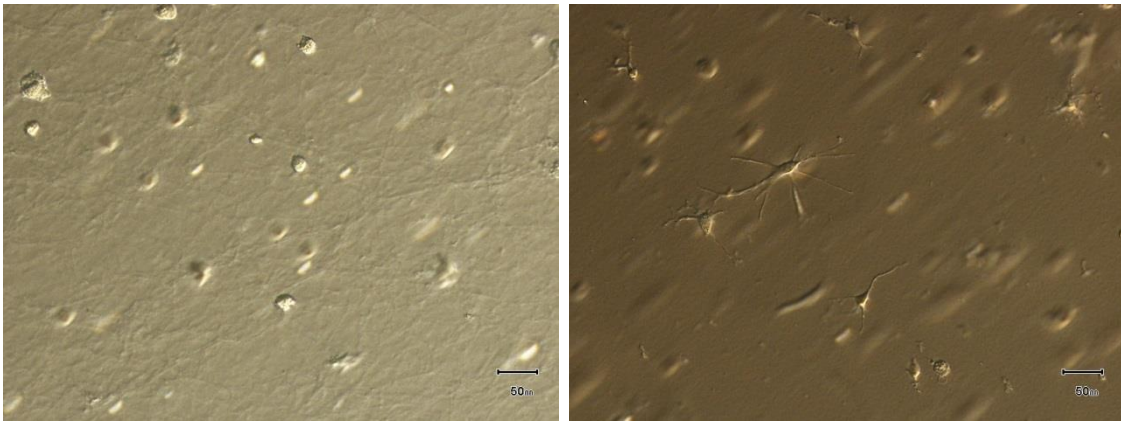
обох типів клітини формували пов'язану контактами мережу. При культивуванні протягом 14 діб мСК-ПНГ зберігали фібробластоїдну морфологію і організацію у вигляді клітинної мережі, також демонструючи високу життєздатність (Рис. 3.32, Табл. 3.6.). Життєздатність мСК-ПНГ на всіх етапах приготування гідрогелю та культивування клітин в складі гідрогелей була вище 90%, що показано двома різними методами визначення життєздатності. Більш низькі значення життєздатності мСК-ПНГ, отримані при оцінці забарвленням трипановим синім, порівняно з забарвленням FDA / PI, можуть пояснюватися додаткової травматичною процедурою - вивільненням клітин з 3D конструкцій за допомогою ферментативної обробки. Цим же можна пояснити статистично значиму відміну при оцінці даним методом життєздатності клітин до засіву в гелі і після ізоляції з гелів. При цьому показники життєздатності клітин, виміряні різними методами, не мали достовірних відмінностей між колагеновим і фібриновим гідрогелями. Якщо морфологія, мережева клітинна організація і життєздатність мСК-ПНГ в складі колагенового і фібринового гідрогелей були подібні при тривалому культивуванні, то показники клітинного росту значно відрізнялися (Табл. 3.6). Так, кількість мСК-ПНГ при культивуванні протягом 14 діб в складі колагенового гідрогелю збільшувалася в 1,45 рази, тоді як кількість мСК-ПНГ при культивуванні в фібриновим гідрогелю збільшувалася в 2,8 рази. Таким чином, швидкість зростання мСК-ПНГ була у два рази вища в фібриновому гідрогелю, ніж в колагеновому.



А



Б



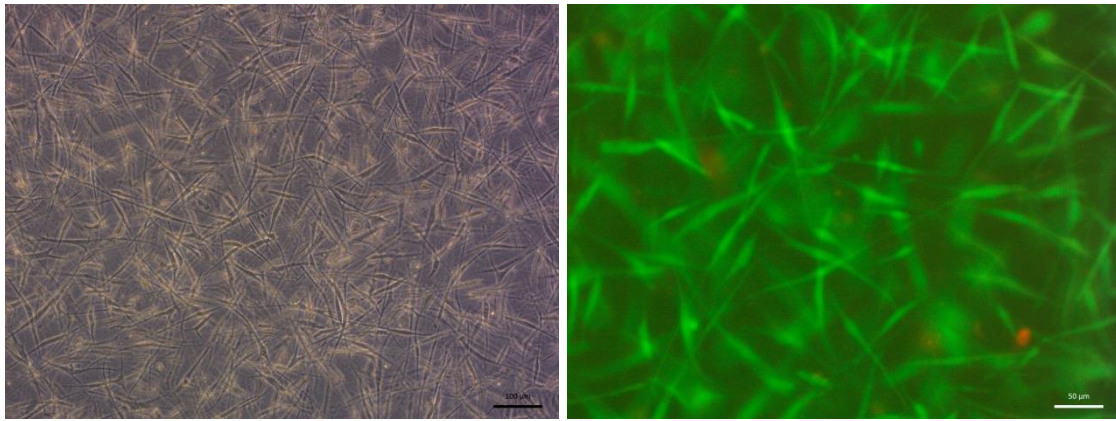
В

Г

Рис.3.31. Зміна морфології мСК-ПНГ на початкових етапах культивування у 3D колагеновому та фібриновому гідрогелях.

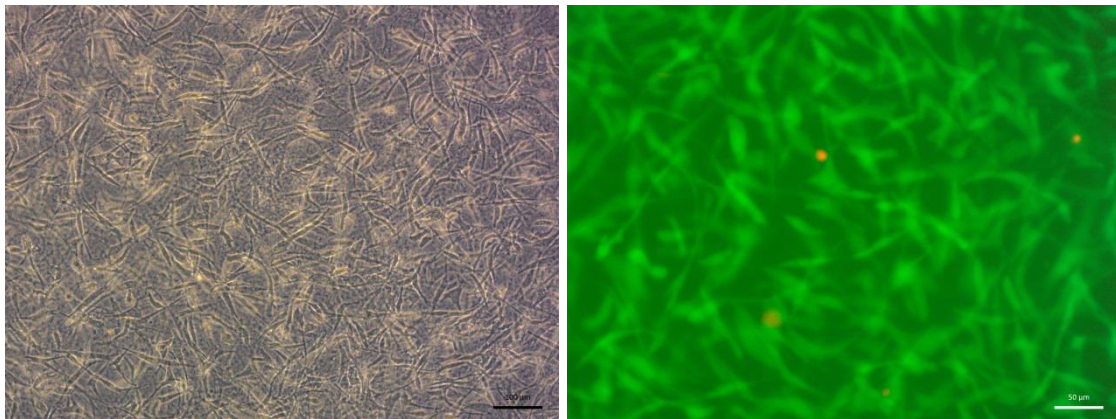
А – колагеновий гідрогель, 1 год після приготування; Б – колагеновий гідрогель, 24 год культивування; В – фібриновий гідрогель, 1 год після приготування; Г – фібриновий гідрогель, 24 год культивування.

Рельєфний контраст; масштабний відрізок – 50 мкм.



А

Б



В

Г

Рис. 3.32. Тривале культивування (14 діб) мСК-ПНГ в гідрогелях: морфологія та життєздатність.

А – морфологія мСК-ПНГ у колагеновому гідрогелі; Б – життєздатність мСК-ПНГ у колагеновому гідрогелі; В – морфологія мСК-ПНГ у фібриновому гідрогелі; Г – життєздатність мСК-ПНГ у фібриновому гідрогелі.

А и В – фазово-контрастна мікроскопія, масштабний відрізок 50 мкм.

Б и Г – флюоресцентна мікроскопія, забарвлення FDA/PI, масштабний відрізок – 100 мкм.

Кількість та життєздатність мСК-ПНГ на різних етапах приготування 3D гідрогелей та культивування в них ($M \pm s$)

| | Перед засівом | Колагеновий гель, 7 діб | Фібриновий гель, 7 діб | Колагеновий гель, 14 діб | Фібриновий гель, 14 діб |
|------------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Кількість клітин, $\times 10^3$ | 508 \pm 13 | 654 \pm 62 | 1090 \pm 136 | 728 \pm 31 | 1412 \pm 101 |
| Життєздатність FDA/PI, % | - | 94,8 \pm 1,9 | 95,2 \pm 1,9 | 94,4 \pm 2,1 | 94,8 \pm 1,3 |
| Життєздатність трипановий синій, % | 95,6 \pm 2,3 | 90,2 \pm 1,9 | 90,8 \pm 2,6 | 90,6 \pm 2,9 | 91,2 \pm 1,5 |

Таким чином, нами показана принципова можливість тривалого культивування мСК-ПНГ в гідрогелях двох різних типів, заснованих на використанні природних компонентів позаклітинного матриксу - колагену і фібрину. При цьому швидкість проліферації мСК-ПНГ значно вище при культивуванні в фібриновому, ніж в колагеновому гідрогелі. Це може бути пов'язано з тим, що фібрин є основним компонентом провізорного матриксу при раневому загоєнні і повинен підтримувати активну міграцію і проліферацію клітин. Тоді як колаген I-го типу є основним компонентом позаклітинного матриксу сполучної тканини, а оновлення клітинних елементів сполучної тканини відбувається рідко. Різні типи гідрогелів можуть бути використані для відновлення тканин різних типів. Колагеновий гідрогель може бути більш затребуваним при відновленні ушкоджень повільно оновлювальних тканин, наприклад - кісткової тканини.

Використання фібринового гідрогелю може бути більш доцільним в тих випадках, коли потрібне швидке ремоделювання тканини в процесі репарації - при відновленні ушкоджень периферичних нервів або для загоєння ран шкіри. Раніше нами було показано, що ADSC в складі фібринового гідрогелю більш ефективно сприяють загоєнню експериментальних повношарових опіків, ніж в складі колагенового гідрогелю, що було пов'язано з більшою стимуляцією неоангіогенезу [1].

Отримані нами результати можуть бути використані при розробці тканинно-інженерних конструкцій на основі мультипотентних стовбурових клітин - похідних нервового гребеня для відновлення дефектів тканин різних типів.

РОЗДІЛ 4.

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН – ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБНЯ У МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

4.1 Вплив трансплантації постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші на репаративну регенерацію дефекту кісток склепіння критичного розміру

4.1.1 Створення та оцінка біосумістності біфазних конструкцій на основі постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші, фібринового гідрогелю та остеопластичних матеріалів

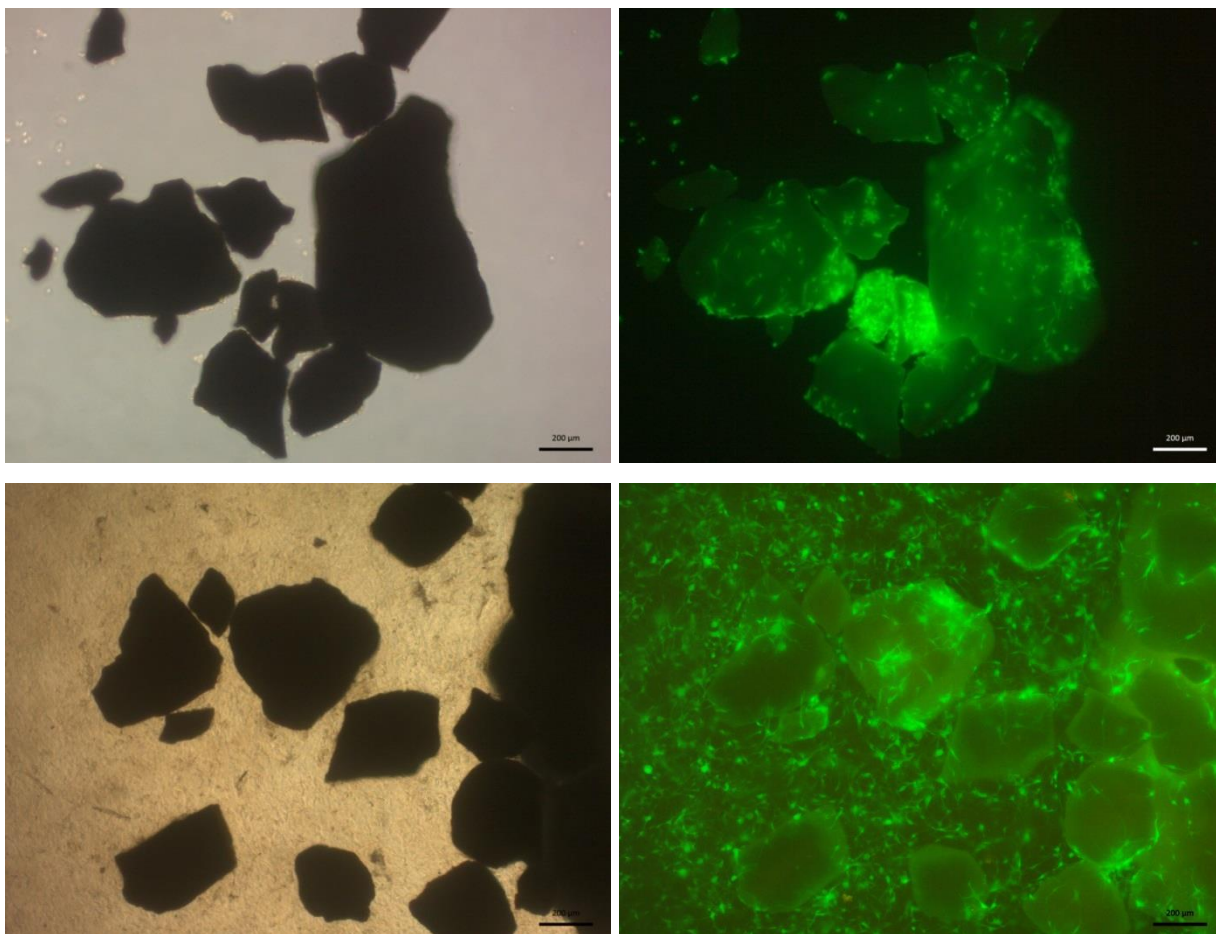


Рис. 4.1. Створення комбінованих біфазних конструктів, засів постнатальних мСК-ПНГ та оцінка їх життєздатності. А та Б – прямий засів клітин на гранули остеопластичного матеріалу. А) фазово-контрастна мікроскопія гранул остеопластичного матеріалу; Б) забарвлення FDA/PI для оцінки життєздатності клітин. FDA – живі клітини, зелений колір. PI – мертві клітини, помаранчевий колір (забарвлення відсутне).

4.1.2 Гістологічне дослідження репаративної регенерації дефекту критичного розміру кісток склепіння миші

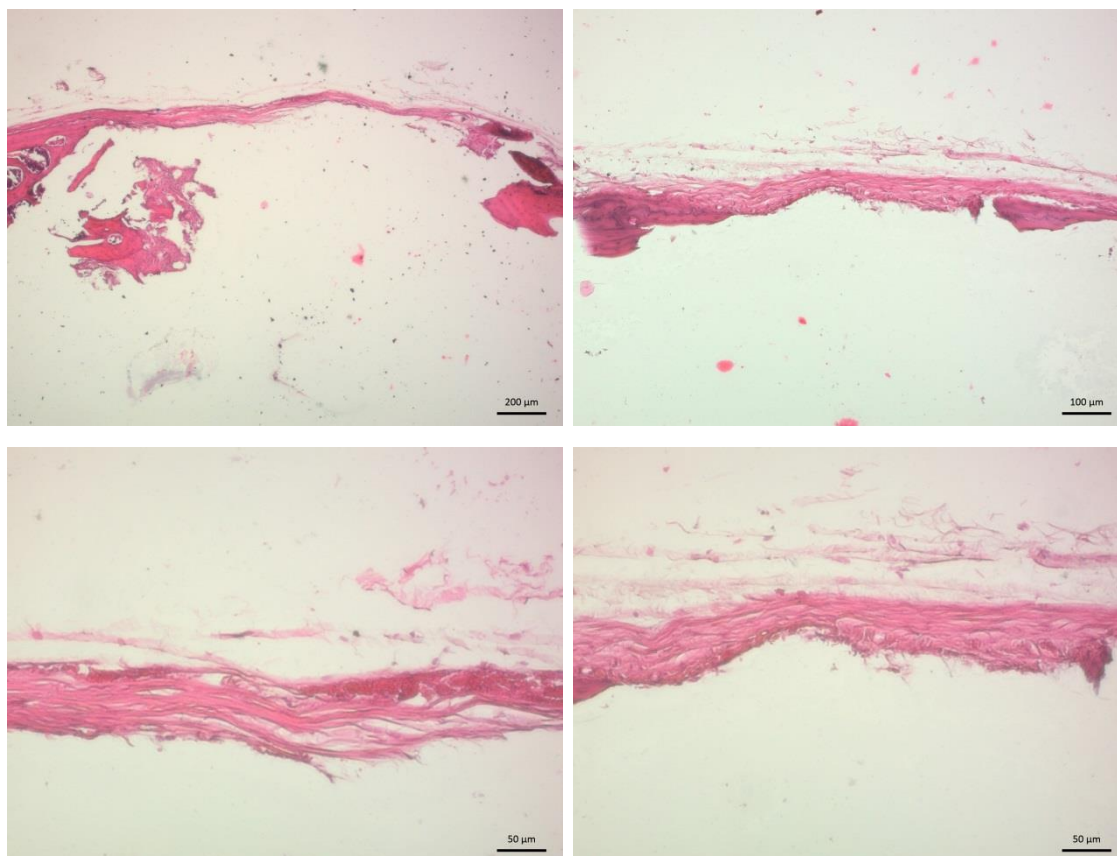


Рис. 4.2. Гістологічне дослідження контрольного дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) через місяць після моделювання пошкодження. Забарвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

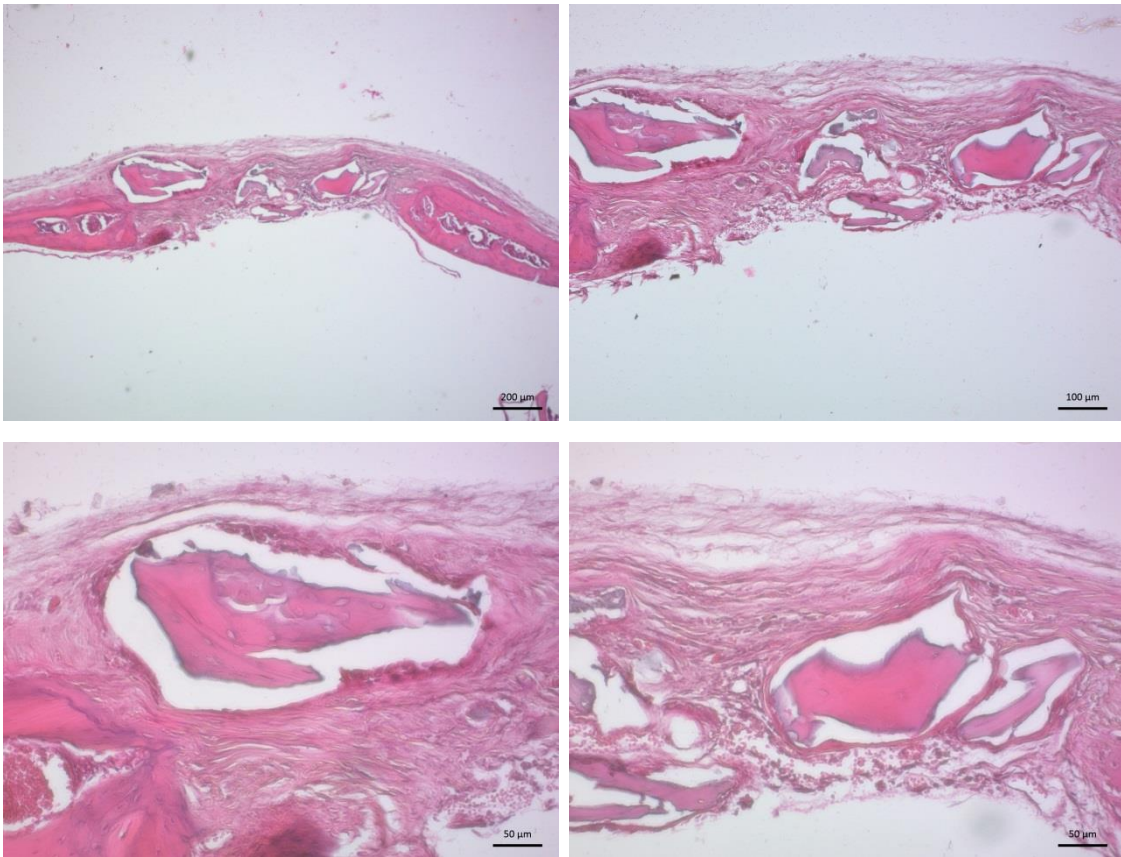


Рис. 4.3. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) заповненого крихтою ДМК через місяць після моделювання пошкодження. Зabarвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

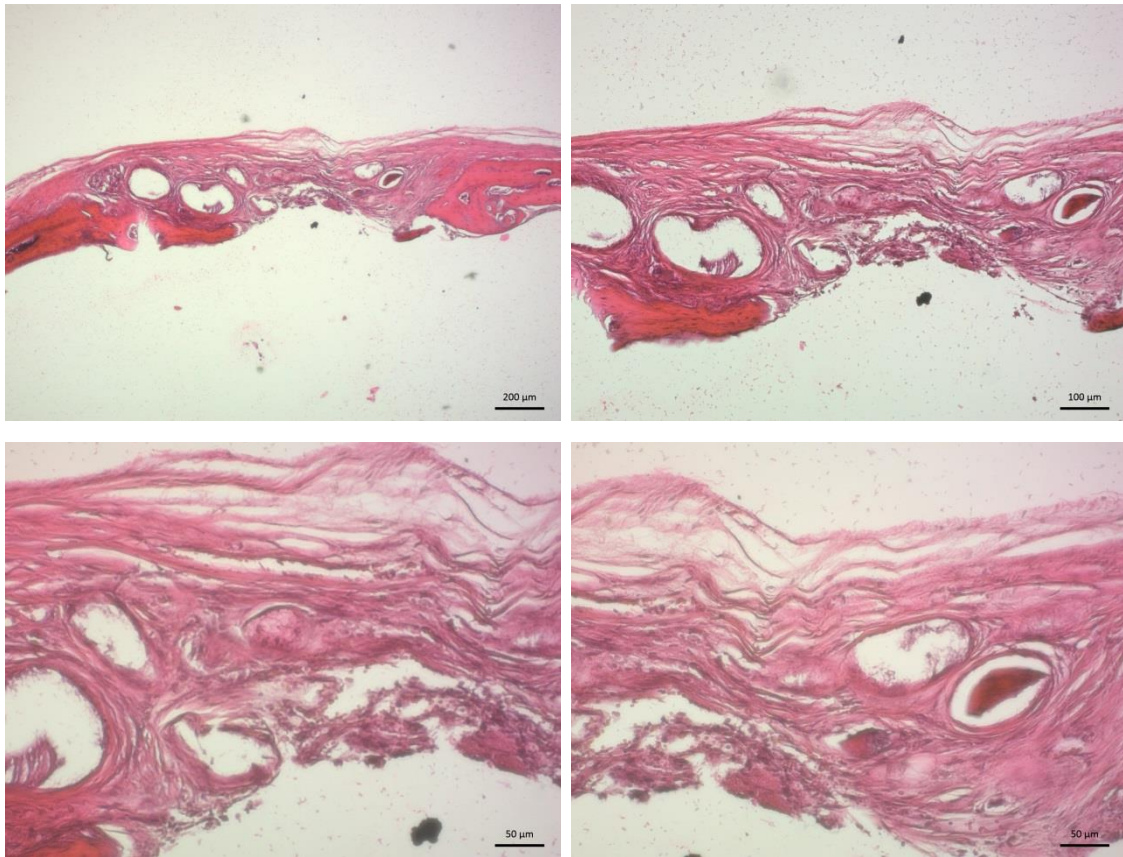


Рис. 4.4. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) заповненого гранулами НА/ТСП через місяць після моделювання пошкодження. Забарвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

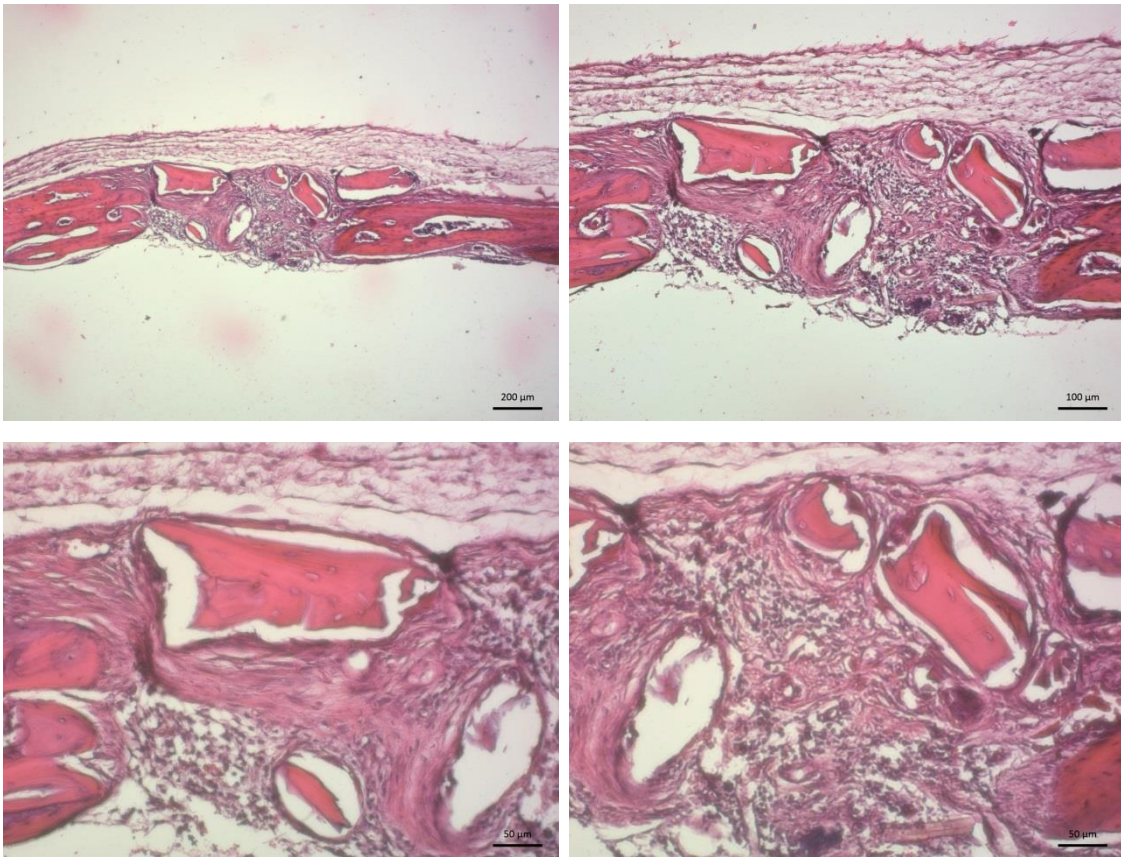


Рис. 4.5. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) з трансплантацією біфазного конструкту на основі мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та крихти ДМК через місяць після моделювання пошкодження. Зabarвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

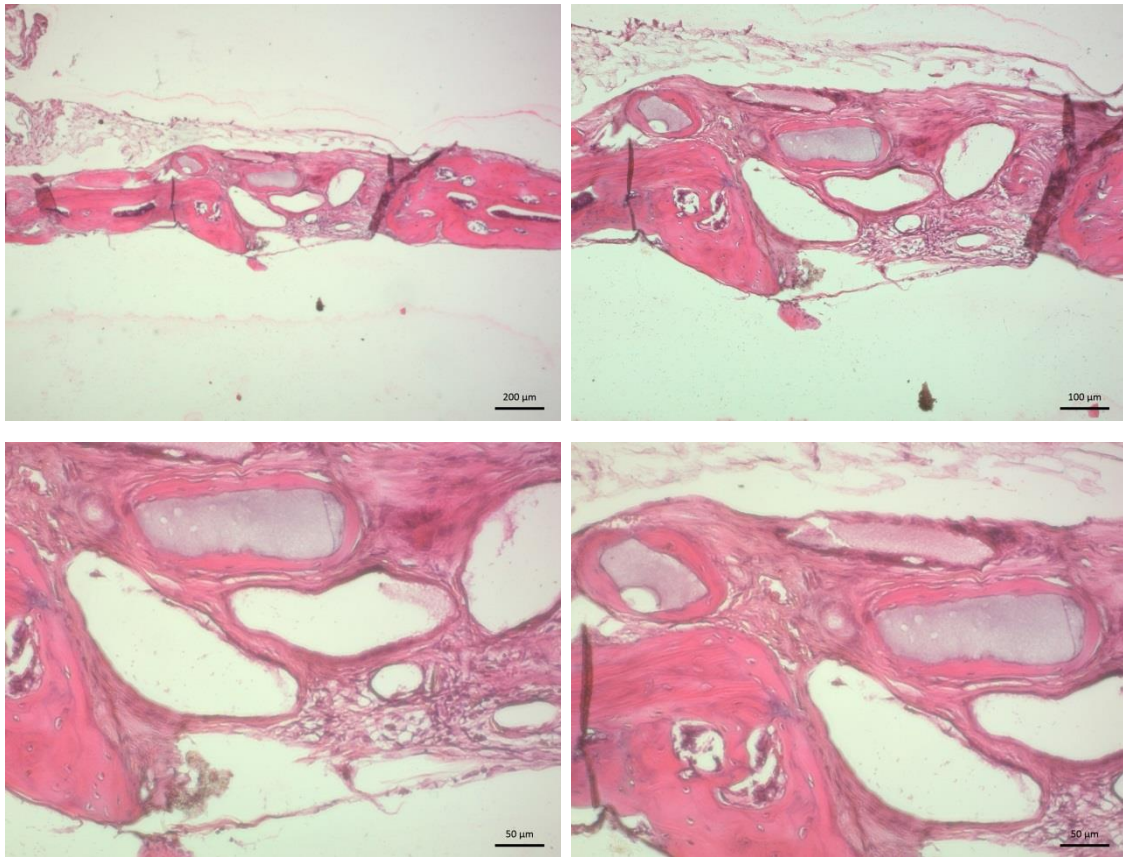


Рис. 4.6. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) з трансплантацією біфазного конструкту на основі мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та гранул НА/ТСП через місяць після моделювання пошкодження. Зabarвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

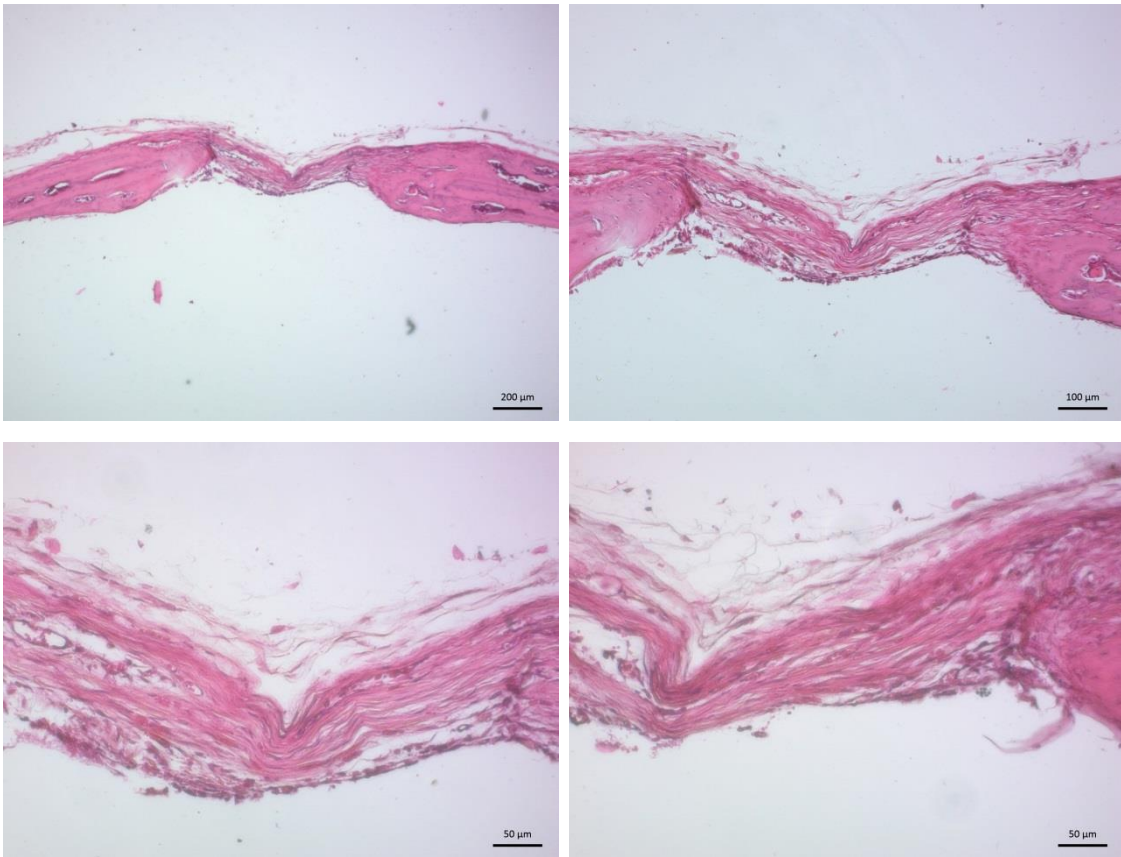


Рис. 4.7. Гістологічне дослідження контрольного дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) через два місяці після моделювання пошкодження. Зabarвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

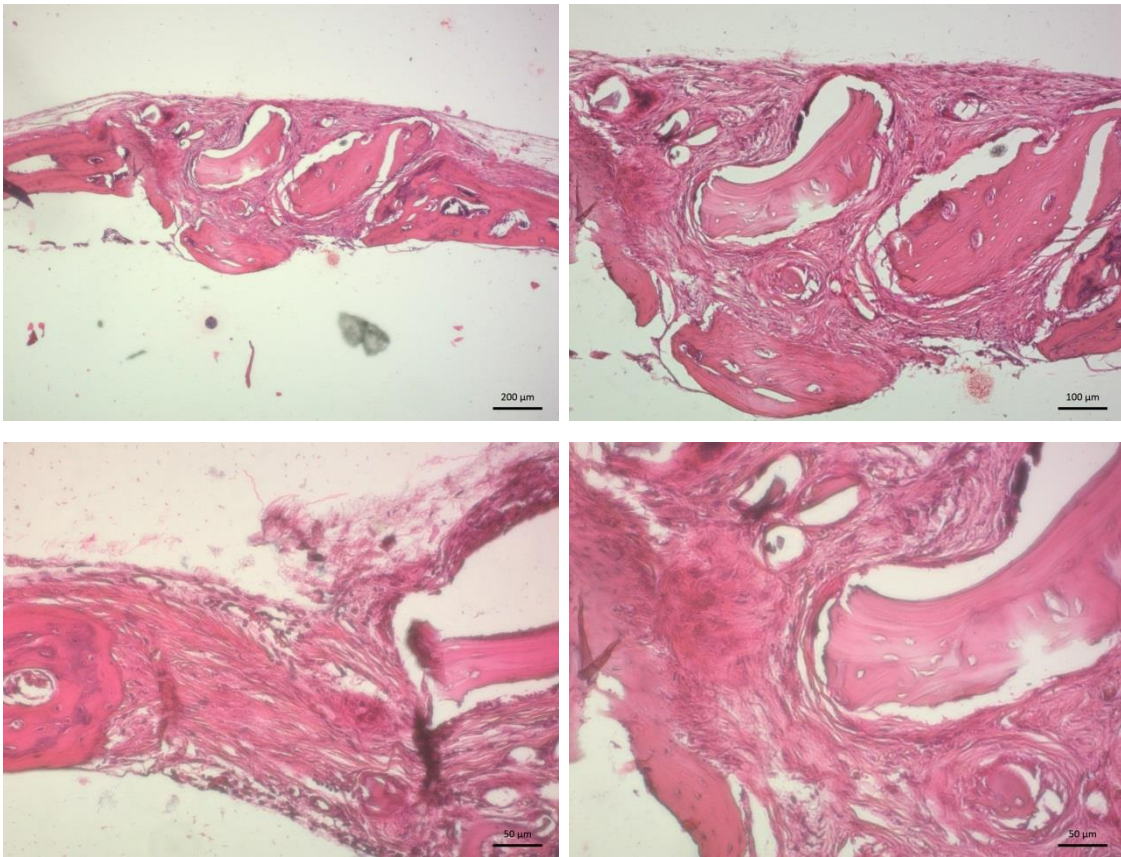


Рис. 4.8. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) заповненого крихтою ДМК через два місяці після моделювання пошкодження. Забарвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

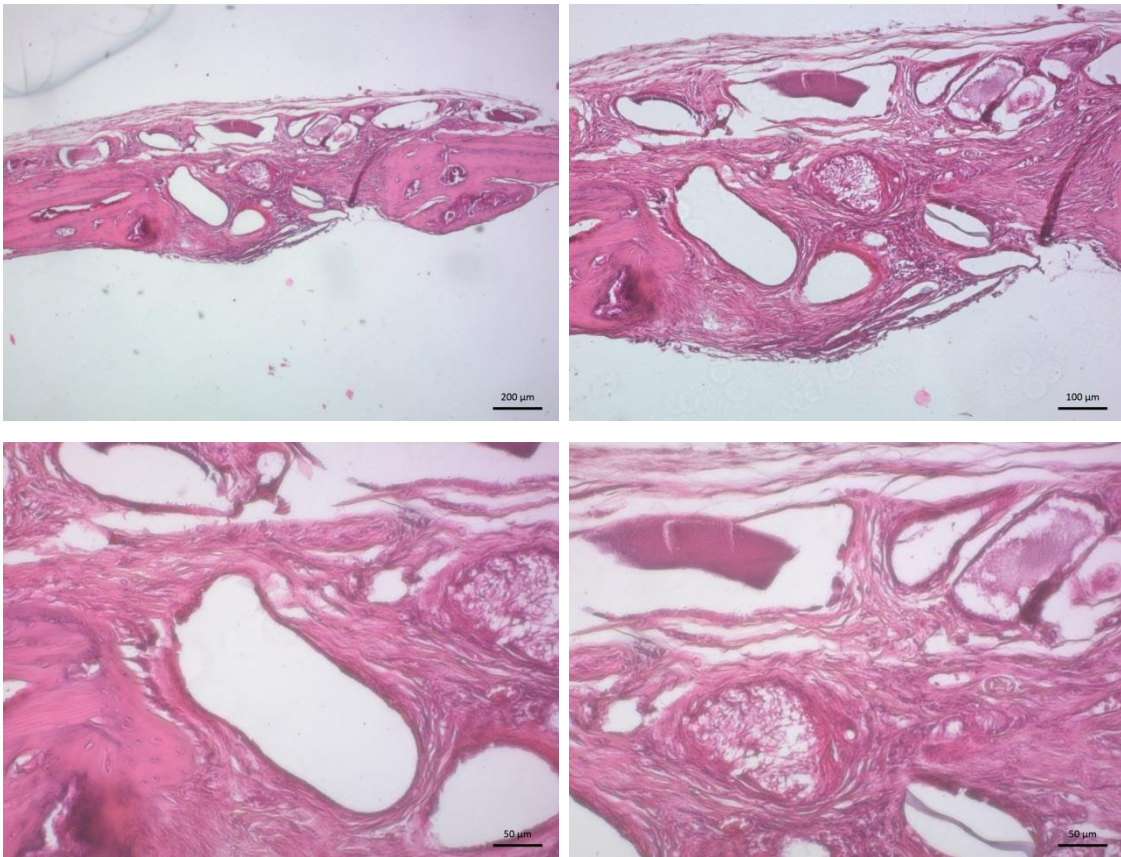


Рис. 4.9. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) заповненого гранулами НА/ТСП через місяць після моделювання пошкодження. Зabarвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

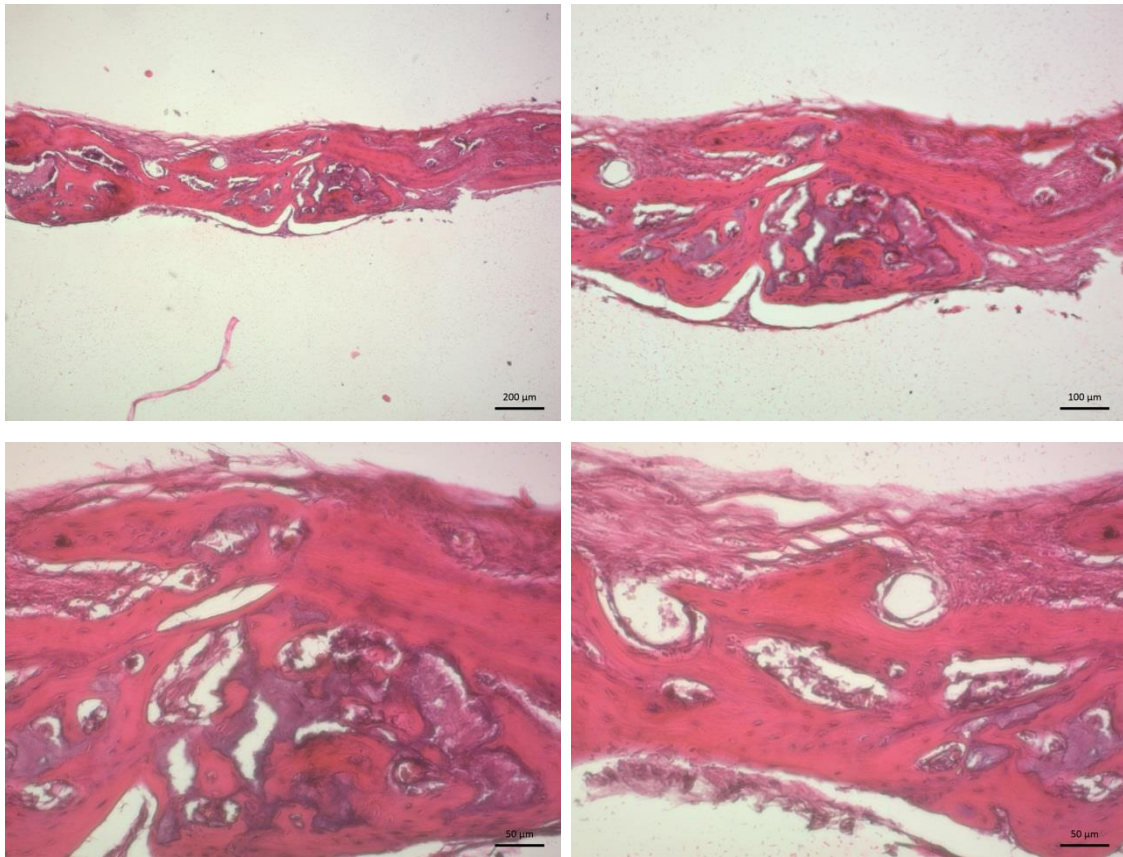


Рис. 4.10. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) з трансплантацією біфазного конструкту на основі мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та крихти ДМК через два місяці після моделювання пошкодження. Забарвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

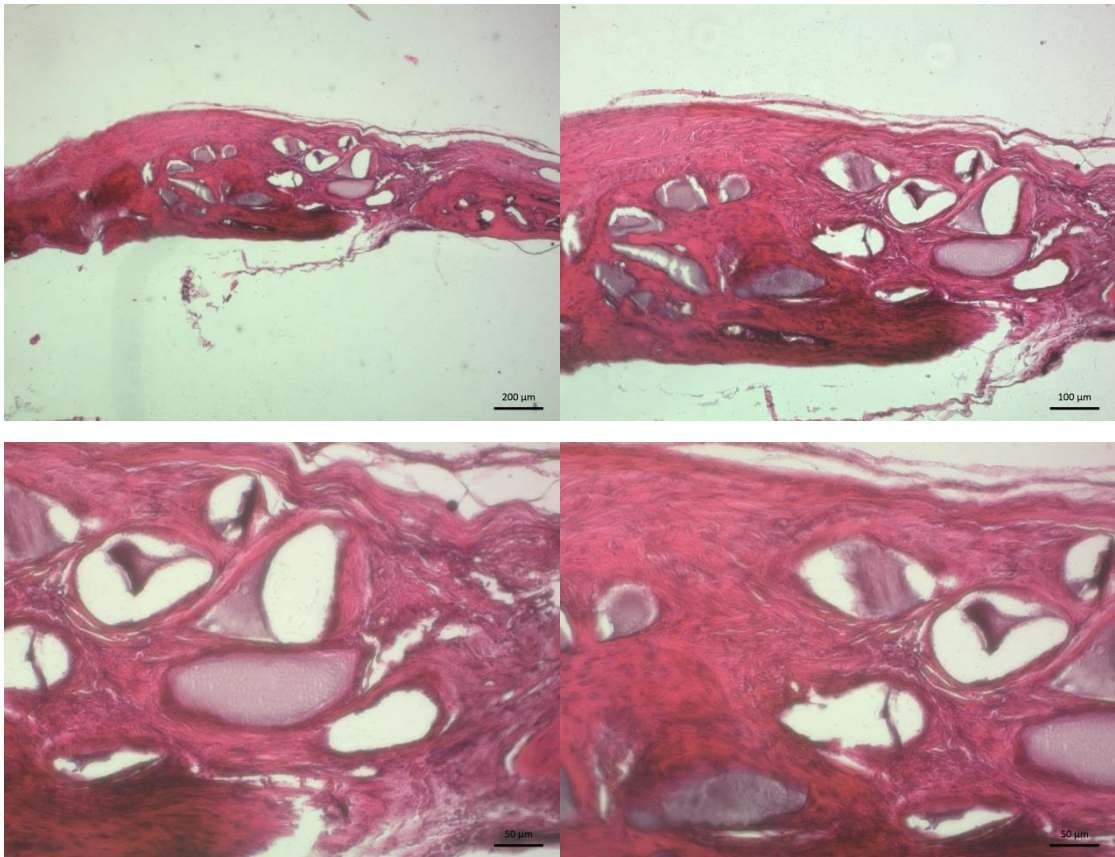


Рис. 4.11. Гістологічне дослідження дефекту тім'яної кістки критичного розміру (3 мм) з трансплантацією біфазного конструкту на основі мСК-ПНГ, фібринового гідрогелю та гранул НА/ТСР через два місяці після моделювання пошкодження. Забарвлення гематоксілін-еозином. Масштабний відрізок: А – 200 мкм; Б – 100 мкм; В та Г – 50 мкм.

4.2. Вплив трансплантації постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші на репаративну регенерацію сідничного нерву

Розробка підходів до регенерації пошкоджених периферичних нервових стовбурів привертає увагу багатьох дослідників в галузі біології та медицини [Чайковський та ін., 2009]. Широке використання нових хірургічних технологій і фармакологічних препаратів при лікуванні таких ушкоджень дозволило значно поліпшити клінічні результати. Однак на

сьогоднішній день добитися повного відновлення структури і функції пошкоджених периферичних нервів не вдається. Особливо дана проблема актуальна для дефектів протяжного розміру.

В даний час для стимуляції регенераторних процесів при пошкодженнях периферичних нервів активно розробляються експериментальні підходи із застосуванням клітинної терапії і тканинної інженерії [Бутенко, Чайковський, 2013]. Показана здатність стовбурових клітин різних типів відновлювати травмований сідничний нерв [Amoh et al., 2005; Петрова, 2012]. При цьому трансплантовані в дефект нерва стовбурові клітини диференціюються в Шванновські клітини, забезпечуючи зростання і мієлінізацію регенеруючих аксонів. Перспективним типом стовбурових клітин для відновлення ушкоджень периферичних нервів методами клітинної терапії і тканинної інженерії патологій периферичної нервової системи є мСК-ПНГ з регіону bulge (RB) волосяного фолікула (ВФ). мСК-ПНГ мають здатність до самовідновлення і спрямованої мультилинейної диференціації в більшість клітинних типів - похідних нервового гребеня, в тому числі - в Шванновські клітини [Sieber-Blum et al., 2004; Vasyliiev et al., 2014].

Метою цього експериментального розділу було провести попередню оцінку можливості використання мСК-ПНГ для відновлення ушкоджень периферичних нервів, яка полягала в: а) дослідженні *in vitro* здатності мСК-ПНГ до спрямованого диференціювання в Шваннівські клітини; б) дослідженні впливу трансплантації мСК-ПНГ на відновлення протяжного дефекту сідничного нерва, змодельованого шляхом його перетину у мишей лінії FVB.

Встановлено, що в області перерізання нерва формується регенераційна неврома, що включає нервові волокна, кровоносні судини, клітинні елементи (переважно фібробласти), колагенові волокна і основну речовину сполучної тканини (Рис 4.2.1). При цьому у мишей другої групи (Рис. 4.2.1, Б) в порівнянні з третьою (Рис. 4.2.1, В) спостерігається менш компактне розташування регенеруючих нервових волокон, багато з яких були

орієнтовані косо або поперечно по відношенню до поздовжньої осі нерва; нервові волокна мишей третьої групи розташовуються більш компактно, більшість орієнтоване в поздовжньому напрямку.

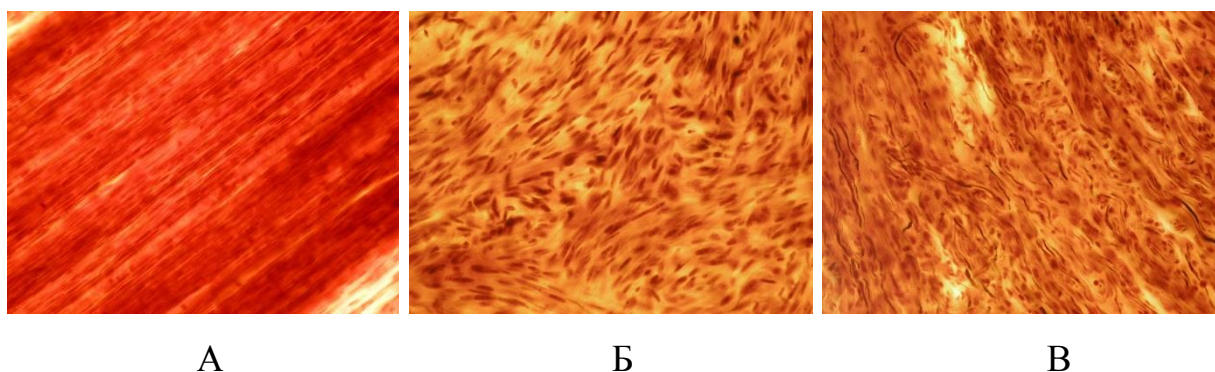


Рис. 4.12. Гістологічний аналіз сідничного нерва та дистального відрізка регенераційної невроми через 4 тижні після операції: А) хібна операція; Б) перетин нерва; В) перетин нерва та трансплантація мСК-ПНГ. Імпрегнація нітратом срібла. x 400.

При морфометричному вимірюванні периферичного відрізка пошкодженого нерва встановлено, що загальна кількість мієлінових і безмієлінових нервових волокон у мишей третьої групи більше, ніж у тварин другої групи (відповідно $10522,8 \pm 1044,0$ і $8409,5 \pm 739,5$, $p < 0,05$). У хібнооперованих тварин щільність нервових волокон склала $11024 \pm 628,1$.

Таким чином, у мишей після трансплантації мСК-ПНГ спостерігається виражене поліпшення процесів регенерації і відновлення структурних елементів пошкодженого нерва в порівнянні з контрольною групою. Більш виражена регенерація нервових волокон у мишей в умовах трансплантації мСК-ПНГ проявляється не тільки в характері відновлення травмованого сідничного нерва, але і в збільшенні активності новоутворення кровоносних судин і відновленні ендоневрію навколо окремих груп нервових волокон.

Відомо, що регенерація периферичного нерва залежить від структурних, клітинних, судинних і гуморальних факторів в дистальному відділі пошкодженого нерва і подовження аксонів забезпечується цими факторами [Чайковський та ін., 2009]. Механізми впливу стовбурових клітин

на відновлення периферичного нерва після ушкоджень вивчені недостатньо [Петрова, 2012]. Можна вважати, що стимуляція регенерації пошкодженого сідничного нерва у мишей після трансплантації мСК-ПНГ пов'язано як з їх трофічних впливом, так і з прямим диференціюванням в Шваннівські клітини. Показано, що Шваннівські клітини є джерелом трофічних і ростових факторів, які сприяють зростанню нервових волокон [Maddiru et al., 2010]. Має також значення здатність трансплантованих в область дефект стовбурових клітин безпосередньо диференціюватися в Шваннівські клітини і мієлінізовані регенерируючі аксони [Amoh et al., 2005].

Крім того, ми спостерігали в ушкоджені нерві посилення ангиогенезу в умовах трансплантації мСК-ПНГ. З одного боку, встановлено стійке порушення гемато-ендонеурального бар'єру у мишей протягом 30 днів після перерізання сідничного нерва [Seitz et al., 1989]. З іншого боку, показано, що судини периферичної ділянки нерва, незважаючи на зміни після травми, продовжують функціонувати і беруть участь в його відновленні [Чайковський та ін., 2009]. При цьому відновлення складових елементів гемато-ендонеурального бар'єру травмованого нерву може відбуватися тільки при достатній експресії трофічних факторів під час його регенерації.

Разом з тим, важливо підкреслити, що для об'єктивізації ступеня регенерації пошкоджених периферичних нервів слід використовувати фізіологічні, електрофізіологічні методи, аналіз функціонального стану нейронів спинного мозку, та ін. [Петрова, 2012]. Необхідно також брати до уваги можливість стимуляції проліферації ендогенних Шваннівських клітин після трансплантації мСК-ПНГ.

4.3 Оцінка терапевтичного потенціалу постнатальних мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня миші при трансплантації на органотипову культуру гіпокампу після короткочасної киснево-глюкозної депривації

Органотипова культура гіпокампу

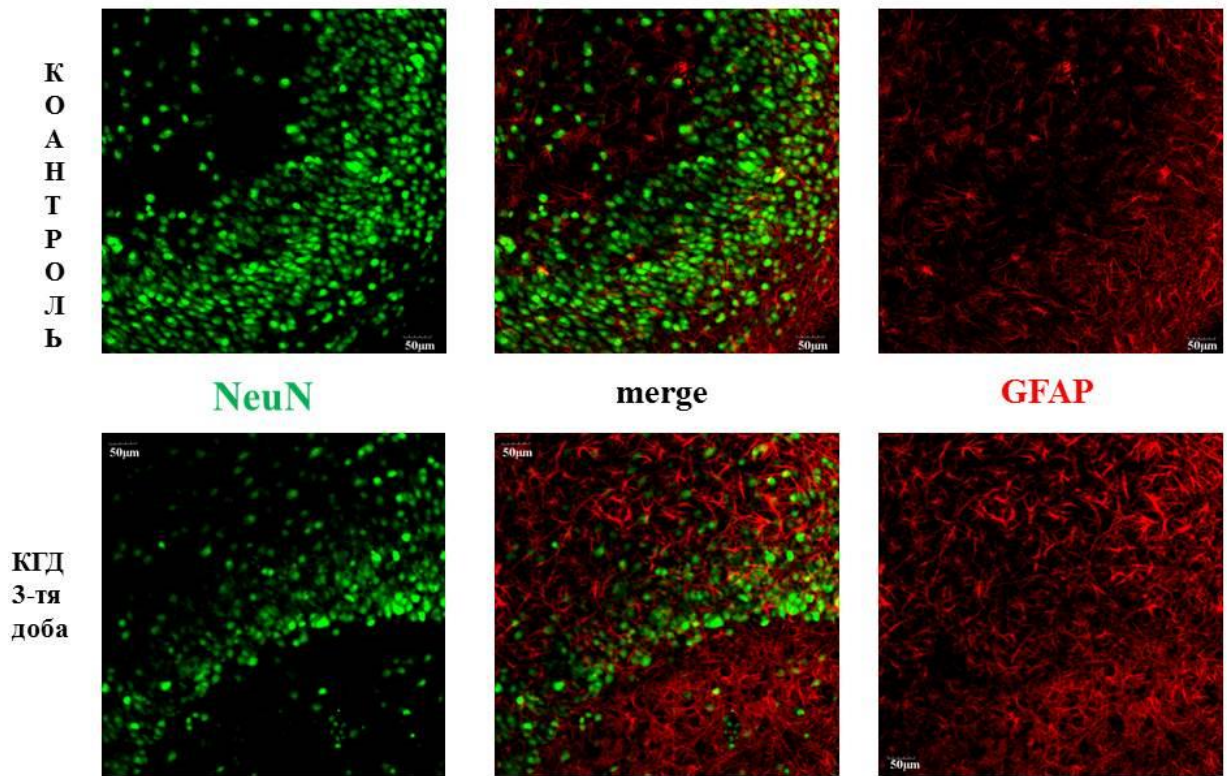


Рис 4.13. Органотипова культура гіпокампу. А) інтактна контрольна; Б) через три доби після КГД. Лазерна конфокальна скануюча мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм.

Органотипова культура гіпокампу після КГД

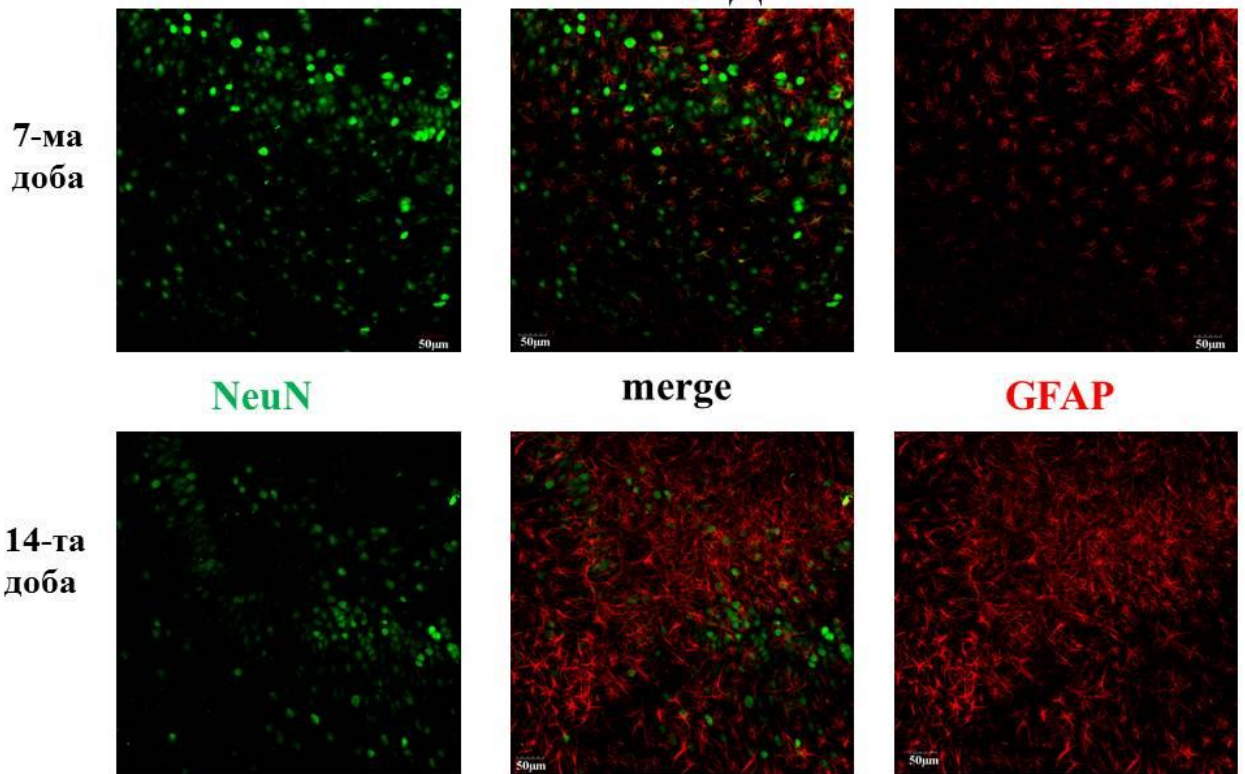


Рис 4.14. Органотипова культура гіпокампу. А) через сім діб після КГД; Б) через чотирнадцять діб після КГД. Лазерна конфокальна скануюча мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм.

3-тя доба, КГД + МСК-ПНГ

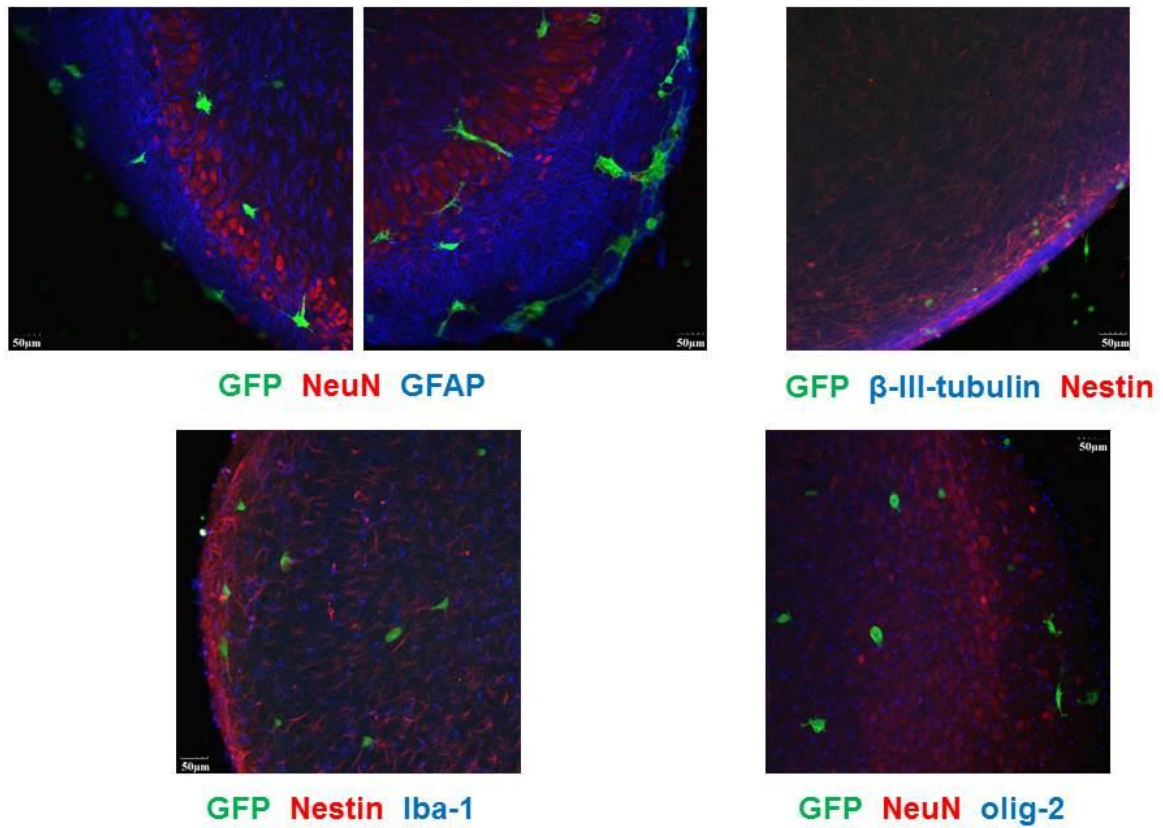


Рис 4.15 Органотипова культура гіпокампу через три доби після КГД та трансплантації мСК-ПНГ. Лазерна конфокальна скануюча мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм.

7-ма доба, КГД + МСК-ПНГ

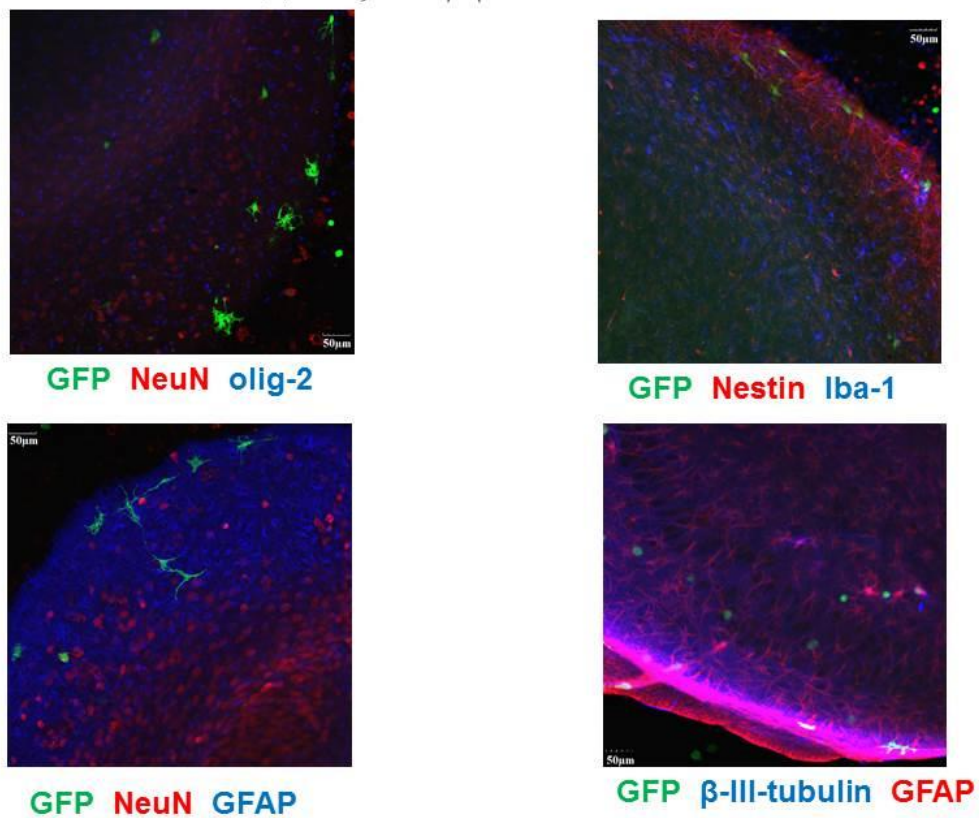


Рис 4.16. Органотипова культура гіпокампу через сім діб після КГД та трансплантації мСК-ПНГ. Лазерна конфокальна скануюча мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм.

14-та доба, КГД + МСК-ПНГ

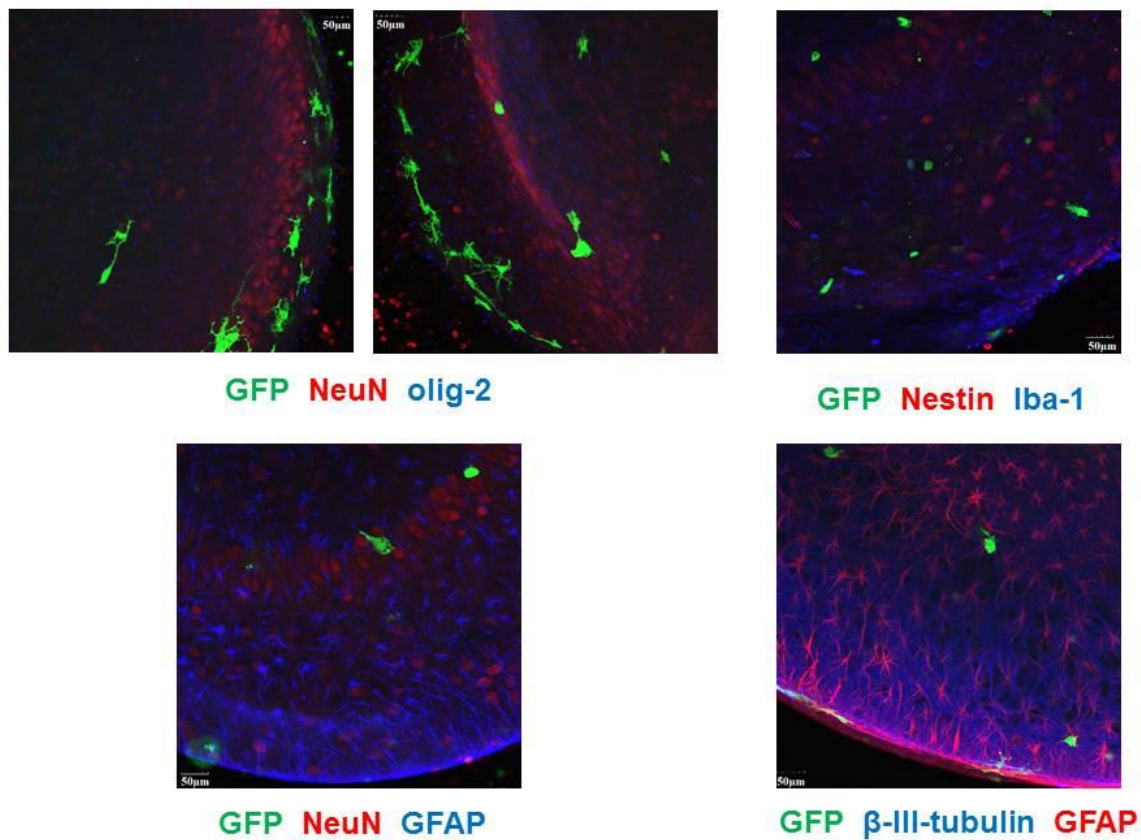
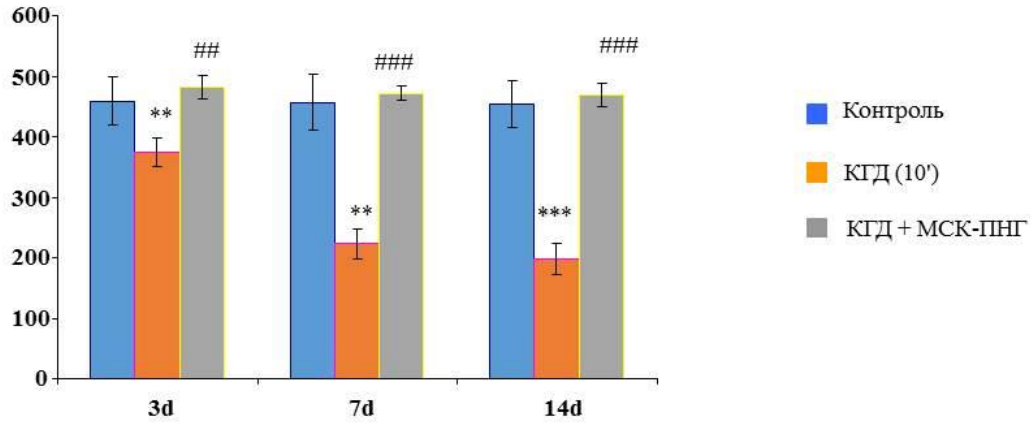


Рис 4.17. Органотипова культура гіпокампу через чотирнадцять діб після КГД та трансплантації мСК-ПНГ. Лазерна конфокальна скануюча мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм.

Кількість NeuN⁺ нейронів у зоні CA1 органотипової культури гіпокампу



**** p<0.01 у порівнянні з контролем;**
***** p<0.001 у порівнянні з контролем;**
p<0.01 у порівнянні з КГД;
p<0.001 у порівнянні з контролем.

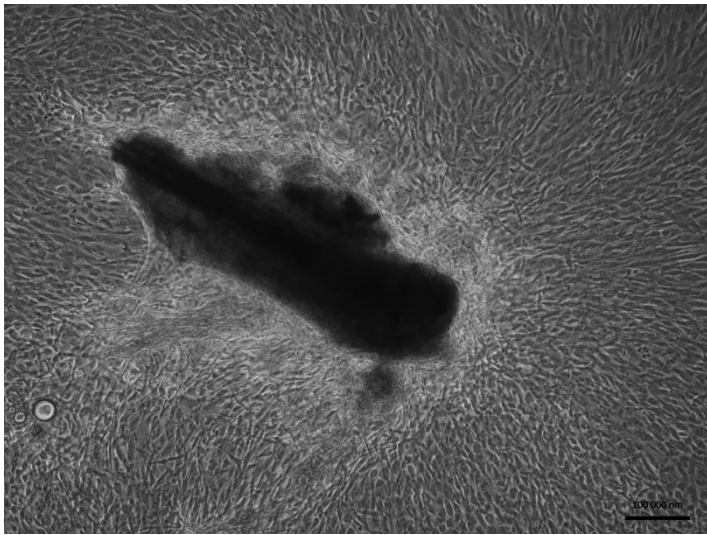
Рис 4.18. Кількість NeuN⁺ нейронів у зоні CA1 інтактної органотипової культури гіпокампу (контроль), після КГД та після КГД і трансплантації мСК-ПНГ.

РОЗДІЛ 5

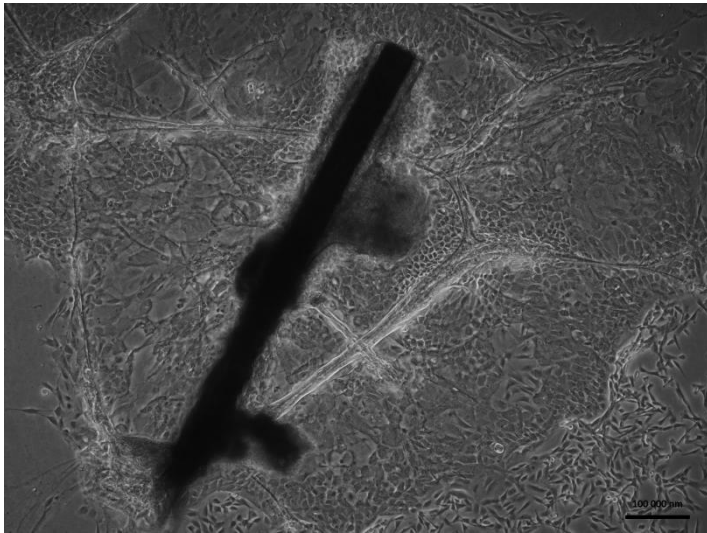
ОТРИМАННЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН – ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ З ВОЛОСЯНОГО ФОЛІКУЛА ЛЮДИНИ

В ході роботи вдалося успішно отримати та наростити до терапевтичної дози постнатальні мСК-ПНГ з експлантів волосяного фолікулу (ВФ) від 5-х донорів. Характеристики донорів, кількість експлантованих ВФ та умови росту первинних клітинних культур представлені в таблиці 5.1.

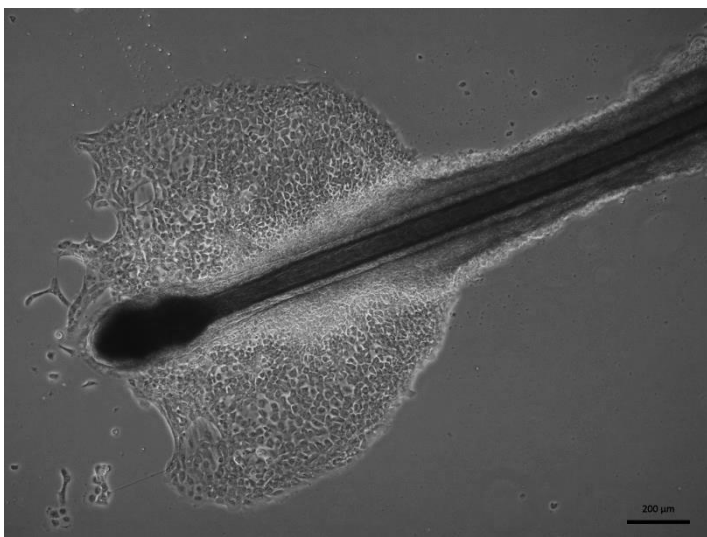
У середньому $15,8 \pm 4,5$ ВФ були отримані з одного зразка шкіри діаметром 5 мм. Слід зазначити, що частина ВФ (1-5 на культуру, $16,4 \pm 7,1\%$ від експлантованих ВФ) відкріплювалася від субстрату, незважаючи на використання тонкого шару колагенового гідрогелю. Еміграція та проліферація мСК-ПНГ людини спостерігалися з більше 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 з чистими культурами мСК-ПНГ). У нашому випадку еміграція та проліферація мСК-ПНГ з експлантатів почалися на 5-10 добу, час у первинній культурі в середньому становив $16,2 \pm 2,5$ доби та в середньому 10^4 мСК-ПНГ було одержано з одного ВФ, що відповідає результатам, опублікованим іншими групами [15, 16]. На Рис. 5.1. показані експлантати ВФ з чистою еміграцією/ростом мСК-ПНГ безпосередньо перед пасируванням клітин, експлант зі змішаним ростом мСК-ПНГ та кератиноцитів, та експлант ВФ з ростом тільки кератиноцитів.



A



Б



В

Рис. 5.1. Культивування експлантів ВФ людини. А) ріст з експланту ВФ чистої культури мСК-ПНГ; Б) змішаний ріст з експланту ВФ кератиноцитів та мСК-ПНГ; В) ріст з експланту ВФ тільки кератиноцитів.

Таблиця 5.1.

| Донор № | Вік, стать та діагноз | Первинна культура клітин (P0) | | | | | | |
|------------|-------------------------------|------------------------------------|--|--|--|--------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| | | Кількість експлантов аних ВФ | Кількість ВФ, що дали ріст мСК- ПНГ | Кількість ВФ, що дали ріст мСК-ПНГ та кератиноцитам | Кількість ВФ, що дали ріст кератиноцитам | Кількість ВФ, що відкрилися | Час у культурі, діб | Кількість отриманих клітин |
| 1 | 24 роки, Ч, SCI | 14 | 3 (21.4 %) | 7 (23.8 %) | 2 (23.8 %) | 1 (23.8 %) | 14 | 290 00 |
| 2 | 25 років, Ч, SCI | 9 | 2 (33.3 %) | 3 (23.8 %) | 3 (23.8 %) | 1 (23.8 %) | 20 | 160 00 |
| 3 | 31 рік, Ч, SCI | 17 | 6 (35.3 %) | 4 (23.8 %) | 4 (23.8 %) | 3 (23.8 %) | 14 | 520 00 |
| 4 | 27 років, Ч, дефект кісток | 21 | 3 (14.3 %) | 6 (28.6 %) | 7 (33.3 %) | 5 (23.8 %) | 16 | 310 00 |
| 5 | 62 роки, Ж, дефект кісток | 18 | 4 (22.2 %) | 5 (23.8 %) | 5 (23.8 %) | 4 (23.8 %) | 17 | 430 00 |
| M±s | | 15.8±4.5 | 3.8±1.3 (25.3±8.8 %) | 5.2±1.3 (34.9±11.6 %) | 3.8±2.4 (22.0±9.2 %) | 2.8±1.8 (16.4±7.1 %) | 16.2±2.5 | 342 00.0±13 809.4 |

Таблиця 5.2

| Донор№ | | Параметри клітинної культури на П1-П3 | | | | | | | | | |
|--------|----|---|--|---|-----|----------------|--------------------|---------------------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Площа ростової поверхні, см ² | Щільність посіву, клітин/см ² | Кількість отриманих клітин, 10 ⁶ | PDN | PDT, години | Кумулятивне PDN | Середня PDT, години | Кількість КУО на останньому пасажі, % | Вторинні КУО | Кариотип |
| 1 | P1 | 25 | 1160 | 1.73 | 5.9 | 28.6 | 11.7 | 28.8 | 20.3±5.9 | + | Норма 46, XY |
| | P2 | 875 | 1000 | 49 | 5.8 | 29.0 | | | | | |
| 2 | P1 | 25 | 640 | 1,85 | 6.8 | 24.6 | 13.0 | 26.0 | 36.7±5.7 | + | Норма 46, XY |
| | P2 | 875 | 1000 | 63 | 6.1 | 27.3 | | | | | |
| 3 | P1 | 50 | 1040 | 4,33 | 6.4 | 26.4 | 12.5 | 26.8 | 30.7±2.1 | + | Норма 46, XY |
| | P2 | 875 | 1000 | 64.8 | 6.2 | 27.1 | | | | | |
| 4 | P1 | 25 | 1240 | 2.1 | 6.1 | 27.7 | 18.2 | 27.8 | 24.3±3.5 | + | Норма 46, XY |
| | P2 | 875 | 1000 | 53.4 | 5.9 | 28.4 | | | | | |
| | P3 | 2625 | 1000 | 193.5 | 6.2 | 27.2 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|-----------|------------|------|------------|----------|----------|-----|------------------|
| 5 | P1 | 50 | 860 | 1.93 | 5.5 | 30.7 | 17.1 | 29.5 | 17.7±5.5 | + | Норма, 46, XX |
| | P2 | 875 | 1000 | 56 | 6.0 | 28.1 | | | | | |
| | P3 | 3500 | 1000 | 178 | 5.6 | 29.7 | | | | | |
| M±SD | n/a | n/a | n/a | 6.04±0.35 | 27.90±1.58 | n/a | 27.78±1.43 | 25.9±7.7 | n/a | n/a | |

Таблиця 5.3

Імунофенотип постнатальних мСК-ПНГ з ВФ людини після великомасштабної експансії на останньому пасажі (П2-П3)

| Donor # | Sox10 | CD271 (p75) | Nestin | CD73 | CD90 | CD105 | CD140a | CD140b | CD146 | CD166 | CD349 | CD34 | CD45 | CD56 | HLA-DR |
|---------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 95.3 | 65.3 | 97.8 | 99.5 | 98.7 | 96.3 | 62.8 | 96.9 | 82.3 | 91.5 | 90.7 | 0,3 | 0,6 | 1,5 | 1,2 |
| 2 | 99.9 | 82.5 | 99.1 | 99.9 | 99.5 | 99.2 | 91.4 | 98.4 | 96.8 | 89.9 | 98.3 | 0,9 | 0,2 | 0,0 | 1,1 |
| 3 | 96.2 | 79.1 | 92.1 | 95.3 | 92.7 | 89.9 | 58.9 | 87.3 | 77.9 | 87.7 | 92.3 | 0,9 | 0,2 | 7,8 | 0,9 |
| 4 | 98.3 | 93.8 | 97.5 | 99.2 | 96.8 | 98.5 | 55.6 | 94.9 | 96.3 | 98.8 | 96.5 | 1,2 | 0,5 | 3,5 | 0,4 |
| 5 | 91.8 | 45.9 | 88.7 | 96.9 | 97.3 | 96.4 | 69.7 | 81.7 | 86.3 | 97.5 | 87.5 | 0,4 | 0,1 | 2,4 | 4,2 |
| M±SD | 96.30 | 73.32 | 95.04 | 98.16 | 97.00 | 96.06 | 67.68 | 91.84 | 87.92 | 93.08 | 93.06 | 0.74 | 0.32 | 3.08 | 1.56 |
| | ± 3.09 | ± 18.39 | ± 4.44 | ± 1.98 | ± 2.63 | ± 3.09 | ± 14.26 | ± 7.10 | ± 8.42 | ± 4.84 | ± 4.37 | ± 0.38 | ± 0.22 | ± 2.90 | ± 1.51 |

На Рис.5.2 показані мСК-ПНГ людини з характерною зірчастою фібробластоподібною морфологією та міграційною поведінкою. Для подальшого розмноження чистих культур мСК-ПНГ успішно відокремили від домішки кератиноцитів методом диференціальної трипсинізації під час пасирування. Використання 0,01 % розчину трипсину дозволило ефективно збирати 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, що дало негативний результат (дані не наведені).

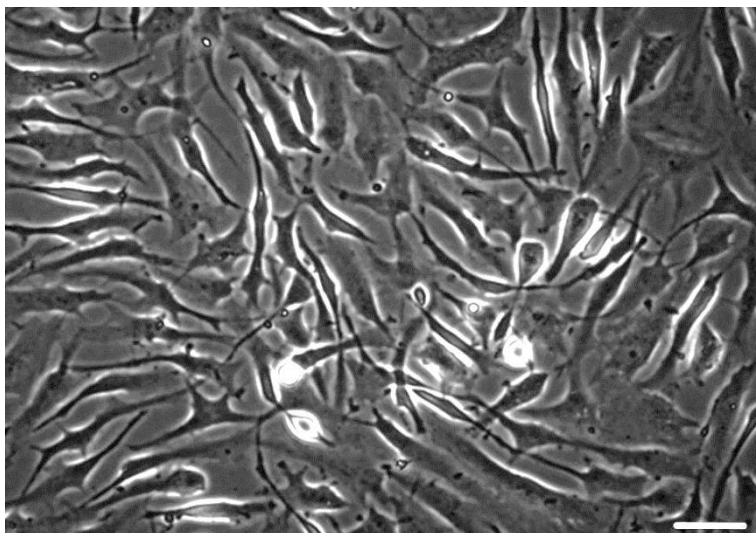


Рис. 5.2. Морфологія мСК-ПНГ людини в культурі. Фазово-контрастна мікроскопія, масштабний відрізок 100 мкм.

Починаючи з П1 в наших умовах культивування починалося стійке швидке зростання кількості мСК-ПНГ. Параметри кінетики росту клітин на П1-П3 наведено в таблиці 5.2. Таким чином, при використанні посівної щільності 500-1300 клітин на 1 см², культури досягали 70-100% конфлуентності протягом 5-7 діб і пасажувались кожен тиждень. При цьому за пасаж відбувалось в середньому $6,04 \pm 0,35$ PDN, з середнім значенням PDT $27,90 \pm 1,58$ години. Ці параметри на ранніх пасажах (П1-Р2) показали

незначні відмінності як у культурі клітин від одного донора на різних пасажах, так і між донорами.

Одними з параметрів, що визначають безпеку та ефективність медичного продукту для передової терапії на основі клітин людини визначається стабільністю каріотипу клітин після їх розмноження *in vitro* та кількістю КУО. Культури всіх донорів наприкінці розмноження були досліджені за допомогою цитогенетичного аналізу та у результаті показали нормальний каріотип. Аналіз кількості КУО показав, що після великомасштабного розмноження культур постнатальних мСК-ПНГ з ВФ значне число клітин зберігало клоногенний потенціал, а частота КУО становила $25,9 \pm 7,7\%$. Важливою властивістю стовбурових клітин є здатність до самовідновлення. Для оцінки здатності самовідновлення було субклоновано 5 КУО від кожного донора. У всіх випадках було виявлено утворення вторинних колоній. Таким чином, постнатальні мСК-ПНГ людини від ВГ зберігають свій клоногенний потенціал та здатність до самовідновлення після масштабного розмноження в наших культуральних умовах.

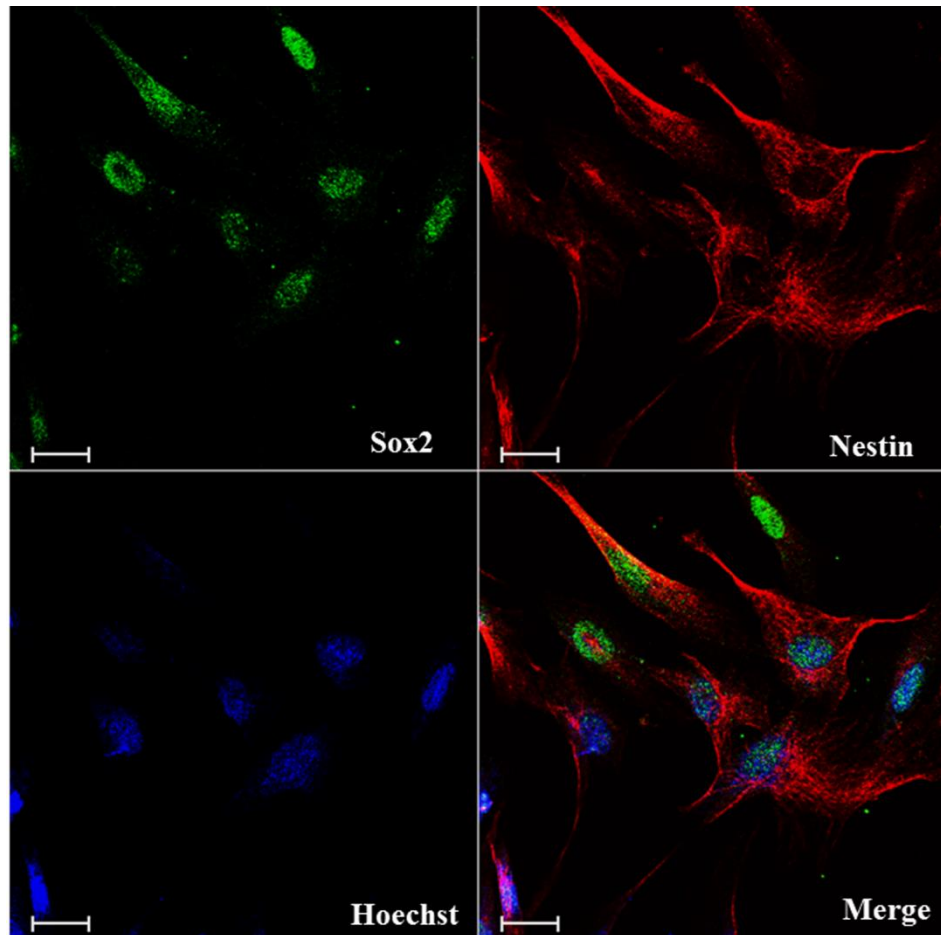


Рис. 5.3. Імуноцитохімічний аналіз експресії транскрипційного фактору Sox2 (зелений колір) та білка проміжних філаментів нестину (червоний колір). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм.

Також досліджено фенотип отриманих культур за допомогою проточної цитометрії та імуноцитохімії для ключових маркерів нервового гребеня (Sox10, p75), загальних маркерів стовбурових клітин (нестин, Sox2 та CD34), маркерів мезенхімальних стовбурових / стромальних клітин (CD73, CD90 і CD105), рецепторів для деяких факторів росту (CD140a / PDGFRalpha, CD140b / PDGFRbeta та CD349 / Frizzled-9), молекул адгезії (CD56 / NCAM, CD146 / MCAM та CD166 / ALCAM) та маркерів гемопоетичних (CD45) та антиген-презентуючих клітин (HLA-DR). Репрезентативні гістограми

проточної цитометрії клітинної культури від донора №2 представлені на рисунку 5.5. Короткі дані для всіх донорів представлені в таблиці 5.3.

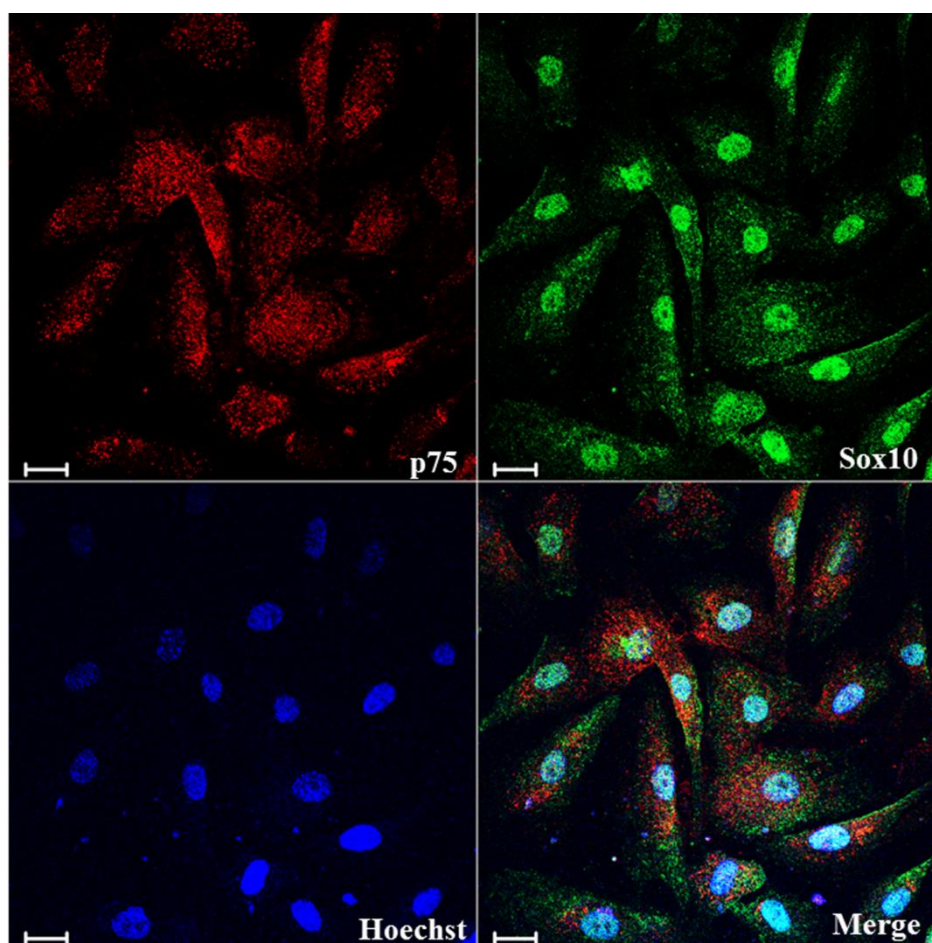


Рис. 5.4. Імуноцитохімічний аналіз експресії транскрипційного фактору Sox10 (зелений колір) та поверхневого рецептору p75 (CD271, LNGFR) (червоний колір). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синій колір). Масштабний відрізок – 50 мкм.

Всі культури мСК-ПНГ після великомасштабної експансії містили понад 90% SOX10⁺ та NESTIN⁺ клітин, але кількість клітин, що експресують P75 (CD271), значно варіювала від 45,9 до 93,8% позитивних клітин (73,32 ± 18,39%). Треба відзначити, що мСК-ПНГ однорідно експресували ключові маркери мезенхімальних стовбурових / стромальних клітин – CD73, CD90 та CD105. Всі ці маркери були представлені в середньому у понад 90%

клітин. Також у середньому понад 90% клітин були позитивними для CD140b, CD166 та CD349. Більш гетерогенними культурами були експресія CD140a ($67,68 \pm 14,26$) та CD146 ($87,92 \pm 8,42$). Дорослі МСК-ПНГ були негативними щодо гемопоетичних маркерів CD34 та CD45 (кількість позитивних клітин не перевищувала 1%). Іноді відзначалася невелика кількість клітин CD56 + (до 7,8%) та HLA-DR + (до 4,2%).

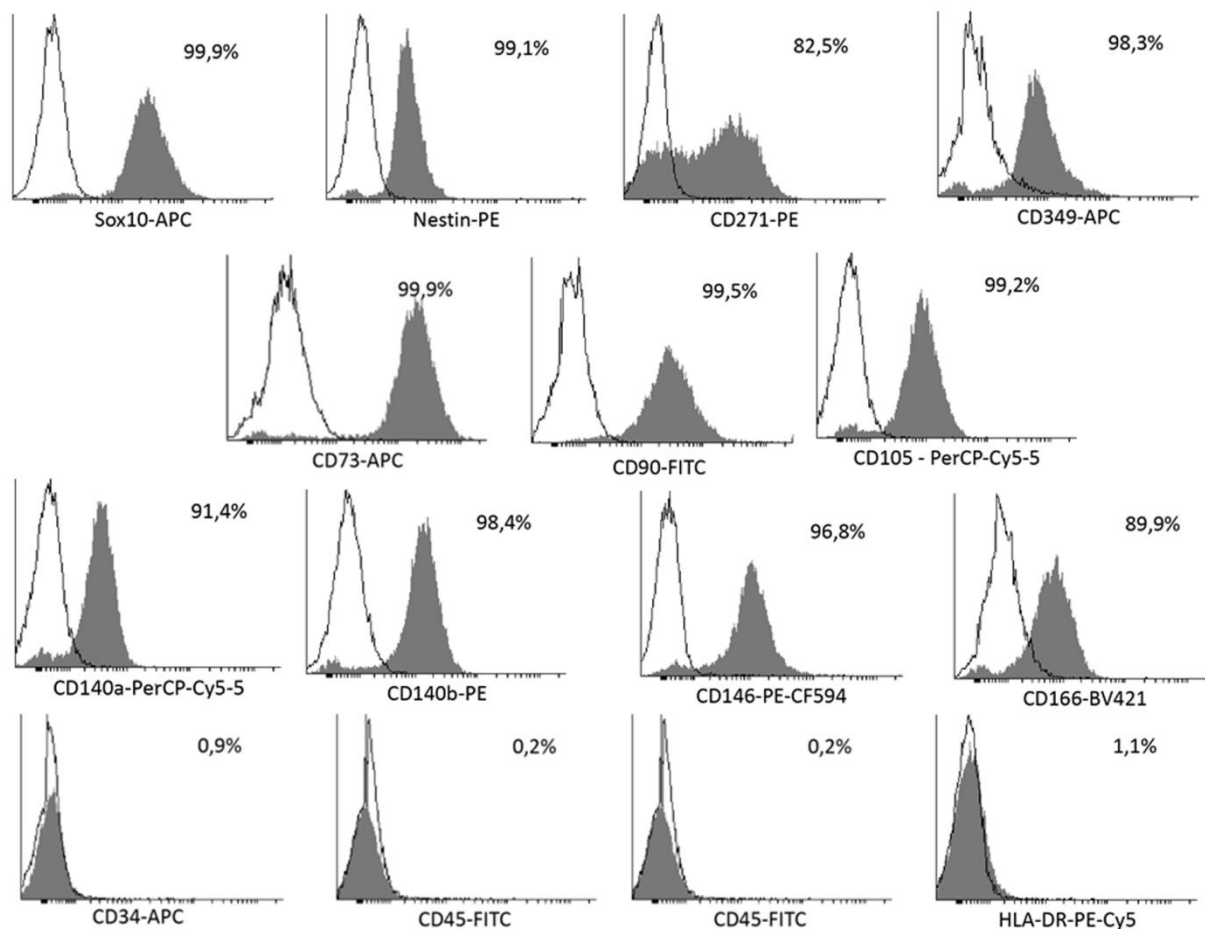


Рис. 5.5. Репрезентативна гістограма імунофенотипу постнатальних мСК-ПНГ людини після великомасштабної експансії.

Беручи до уваги ключову роль Sox10, p75 (CD271) та Нестін при визначенні тотожності мСК-ПНГ [4, 5], ми також розглянули їх з використанням імуноцитохімічного аналізу. Крім того, Sox2 також вивчався через його важливу роль у підтримці стега та функціональних властивостях

мСК-ПНГ [20, 21]. Як показано на Рис. 5.1.3 і 5.1.4, більшість клітин у культурі були Sox10+ p75+ і Sox2+ Nestin+, що підтверджує дані проточної цитометрії. Як описано раніше, для дорослих мСК-ПНГ людей від ВГ [16, 22] Sox10 показав характерну ядерно-цитоплазматичну локалізацію, що узгоджується з його роллю як фактора транскрипції та активного нуклео-цитоплазматичного транслетного білка [23]. Sox2 має переважно ядерну локалізацію, що характерно для його функції як фактора транскрипції. Нестін та p75 також показали характерне забарвлення для проміжного білка нитки та внутрішньоклітинного домену рецептора фактора росту відповідно.

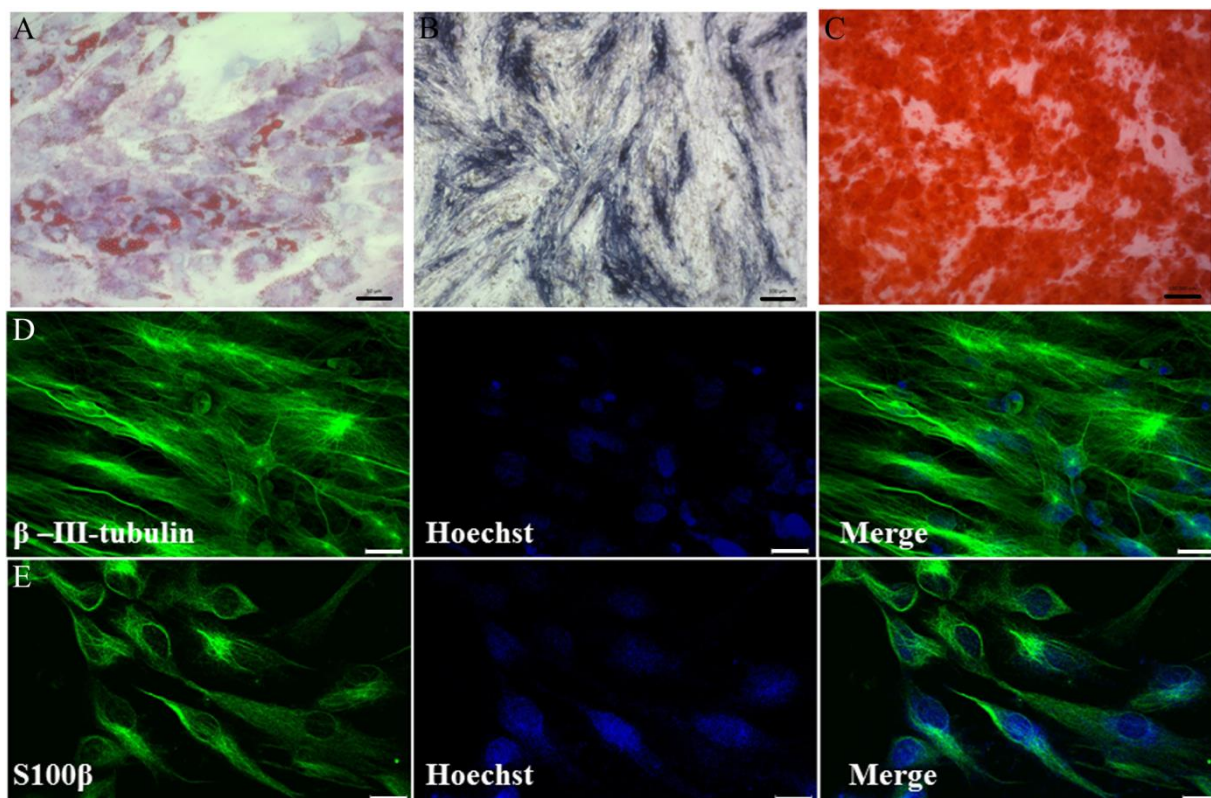


Рис. 5.6. Оцінка здатності постнатальних мСК-ПНГ людини до мультилінійного диференціювання. А) адипоцити

Постнатальні мСК-ПНГ культивували протягом 14 днів в адипогенному індукційному середовищі та успішно диференціювали у адипоцити, що містили ліпідні вакуоли (рис. 5.1.5, А). При культивуванні в

остеогенному середовищі протягом 14 днів мСК-ПНГ диференціювалися в остеобласти, позитивні за лужною фосфатазою (рис. 5.1.5, Б) і через 21 день продукували мінералізований позаклітинний матрикс (рис. 5.1.5, В). Коли мСК-ПНГ культивували в присутності синтетичного аналога ретиноївої кислоти та нейротрофінів (NGF, BDNF та GDNF), вони перетворювалися в однорідну популяцію нейрональних β -III-тубулін-позитивних клітин зі сферичною або овальною сомою та довгими тонкими відростками (рис. 5.1.5, Г). Під впливом neuregulin-1, PDGF-BB та активації сигналу cAMP форсколіном мСК-ПНГ диференціювалися в S100 β -позитивні клітини з характерною біполярною морфологією, властивою Шваннівським клітинам (рис. 5.1.5, Д).

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Регенеративна медицина - це галузь, що стрімко розвивається та обіцяє значно покращити якість лікування та розробити ліки від невиліковних на теперішній час захворювань та патологічних станів. Основними інструментами регенеративної медицини є тканинна інженерія, клітинна терапія та генна терапія. В даний час в світі існує декілька тканинних, клітинних та генних лікарських засобів, успішно пройдені клінічні випробування та з'явилися на ринку [1]. Більшість методів регенеративної медицини засновані на культивуванні стовбурових, прогеніторних, або диференційованих клітин людини. Вони використовуються для збільшення їх кількості *in vitro* до необхідної для клінічного використання кількості, а також для генетичної корекції, модифікацій їх біологічних властивостей або для створення 3D живих еквівалентів різних тканин. Незважаючи на значний прогрес у галузі плюрипотентних стовбурових клітин (ембріональних стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин), ряд питань етичної та біобезпеки залишаються невирішеними. Таким чином, виявлення та характеристика нових типів дорослих стовбурових клітин є актуальним завданням. Крім того, медичне застосування клітин людини *in vitro* потребує розробки критеріїв безпеки та ефективності лікарських засобів, на основі клітин людини з точки зору їхньої ідентичності, гомогенності та потенції. Наприклад, такі критерії були розроблені для мультипотентних мезенхімальних стовбурових / стромальних клітин (МСК/ММСК) з кісткового мозку та жирової тканини [2, 3].

Постнатальні мСК-ПНГ, з ряду причин є перспективним типом клітин для застосування в регенеративній медицині [4]. Під час ембріонального розвитку клітини нервового гребня генерують широкий спектр типів клітин і тканин, таких як: кістки, хрящі та сполучну тканину голови та шиї; меланоцити; ендокринні клітини (С-клітини щитовидної залози, мозкова

речовина надниркових залоз); нейрони та глія периферичної нервової системи, та ін. Дорослі мСК-ПНГ ідентифікуються та виділяються з багатьох тканин та органів організму дорослих ссавців, включаючи людей [5]. Показано, що дорослі мСК-ПНГ зберігають здатність до направленого мультилінійного диференціювання в основні похідні клітинні типи нервового гребня, подібні до ембріональних аналогів [5]. В ряді досліджень на тваринних моделях був показаний позитивний ефект використання постнатальних мСК-ПНГ для відновлення дефектів кісток критичного розміру [6], стимуляції регенерації ушкоджених периферичних нервів [7,8], авульсії дорсальних спинномозкових коренців [9] і лікування травм спинного мозку [10].

Одним з найбільш привабливих з можливих джерел дорослих мСК-ПНГ є волосяний фолікул через мінімальну інвазивність його біопсії. Вперше дорослі мСК-ПНГ були ідентифіковані та виділені з волосяного фолікула вібрисів миші [11]. Протокол виділення був заснований на використанні методу експлантатів та міграційної поведінки мСК-ПНГ. Пізніше дорослі мСК-ПНГ одержували з вібрисів мишей та інших видів тварин, та з ВФ людини [12, 13, 14]. Для ізоляції дорослих мСК-ПНГ було запропоновано декілька прийомів: культивування ВФ-експлантатів, що вириваються [15] або вирізаються з біопсії шкіри [16], ізоляція клітин з дисоційованих ВФ на основі поверхневих маркерів шляхом сортування флюоресцентно активованих клітин або імуномагнітної сепарації [17], культивування ізольованих клітин у умовах сферогенезу, тощо [18]. Кожен з цих методів має свої переваги та недоліки. Проте навіть при використанні аналогічних методів для культивування дорослих мСК-ПНГ, одержані популяції відрізняються вираженою експерсією ряду ключових маркерів нервового гребня, таких як Sox10 та p75 (CD271, LNGFR) [15, 16]. Також доступні мінімальні дані про виявлення поверхневих маркерів культивованими мСК-ПНГ дорослих людей та про можливість їх масштабного розширення для отримання значного числа клітин, необхідних для клінічних застосувань.

Крім здатності до самообновлення іншого важливого функціонального властивості стовбурових клітин є здатність до багатолінійної диференціації. Враховуючи, що в нашій роботі були використані волосяні фолікули з області голови, ці МСК-ПНГ були отримані з черепного нервового гребеня під час ембріонального розвитку. Черепно-нервовий гребінь породжує найбільш широке розмаїття тканин і типів клітин з усієї осьової області нейронного гребеня [5]. Отже, крім меланоцитів, нейронів і глій периферичної нервової системи, черепно-нейронний гребінь породжує ектоменезіємію, з якої утворюється частина кістки, хряща та сполучної тканини голови та шиї. Виходячи з цього, ми перевірили ідентичність отриманих дорослих МСК-ПНГ шляхом здатності диференціювати як на види мезенхімальних клітин (адипоцити та остеобласти), так і на нейрони та клітини Шванна.

Як згадувалося у Вступі, існування дорослих НК-МСК в області випинання ВФ вперше було показано М. Siber-Blum з використанням фолікулів вушек з Wnt1-Cre трансгенних мишей для відстеження розвитку популяції цієї клітинної популяції з нейронного гребеня [11]. У дослідженні отримання МСК-ПНГ було засновано на міграційному поведінці цього типу клітини. МСК-ПНГ емігрували і почали швидко розмножуватися при культивуванні експлантів області випуклості на колагеновій субстраті в спеціальному середовищі для росту клітин нервової греблі. Миші МСК-ПНГ з області випуклості ВФ були Sox10 + Nestin + і мали здатність до спрямованої диференціації в нейрони, клітини Шванна, меланоцити, гладком'язові клітини та хондроцити. Паралельно Фернандес та співавт. Використовуючи таку ж трансгенну лінію миші Wnt1-Cre, було повідомлено про ізоляцію іншої клітинної популяції походження нейронного гребка від дерми шкіри обличчя, яка називалася шкірними клітинами попередників (SKPs) [24]. Виявилось, що тканинна ніша для SKPs - шкірний сосочок ВФ з шкіри обличчя та вузликів [24]. Процедура одержання ССП була заснована на їх здатності вирощувати у вигляді сфер (нагадує нейросфери) в

безсировинних та неприєднання. У той же час СКП показали подібний потенціал диференціації для МСК-ПНГ з області випуклості ВФ. Однак, вони були Sox10 і p75 негативні, але вони виразили інші характерні маркери нервової гребені - Нестін, Слизь, Улитка, Твіст та Сокс9 [24]. Пізніше був проведений більш глибокий аналіз локалізації МСК-ПНГ в фолікулах вусів та волосяних фолікулах з дорсальної та вентральної шкіри мишей з використанням Wnt1-Cre, Ht-PA-Cre, Sox10-lacZ, Dhh-Cre та трансгенна лінія миші Dct-Cre [12]. У цьому документі було підтверджено, що багато структур вушкового фолікула, отримані з нейронного гребеня, мають портові клітини зі схожими на стовбурові клітини властивостями, і ці клітини пов'язані з мезенхімальними, гліальними та меланоцитарними родами. Такі структури в фолікулах вусики: область випинання, шкірна оболонка, капсула, шкірний сосочок, нервові терміналі та області над сальних залоз. Аналіз волосяного фолікула миші з спини показав, що клітини, отримані з нервової гребінці, локалізуються в області випинання та в колби над шкірним сосочком [12]. Самовий шкірний суглоб задньої шкіри сам по собі не походить від нейронного гребеня. Аналіз лінійного трасування показав, що клітини, отримані з нервового крісла, у магістральних ГФ пов'язані з геніальними та меланоцитарними родами. Використовуючи дещо відмінне від Фернандеса та співавт. [24] умови росту, автори отримали сфер від поверхні шкіри миші та шкіри людини (обличчя та стегна) зразків [12]. Аналіз клітинної композиції сфер, отриманих з трансгенних мишей, показав, що вони утворені клітинами, що мають походження нейронного гребеня. Слід зазначити, що 100% миші та сфери, отримані від шкіри людини, містять p75 + і Sox10 + клітини. У сферах миші $67,0 \pm 10,5\%$ всіх клітин виражені p75; $76,6 \pm 4,5\%$ всіх клітин виражений Sox10; і $58,6 \pm 10,5\%$ всіх клітин були подвійними позиціями для p75 і Sox10. Потім $15,0 \pm 6,2\%$ всіх клітин сфери було негативним для цих маркерів, що вказує на неоднорідність клітин у складі сфер, що може бути пов'язане з спонтанною диференціюванням клітин. Подібно до сфер миші, всі сфер людини містять подвійні позитивні

клітини p75 / Sox10, що становило > 60% всіх клітин. Однак клітини були негативними для інших маркерів нейронних гребінців, таких як Sox9 та HNK-1 (CD57). Обидва миші та людські нейронні крісла, отримані від волосяного фолікула, показали здатність до багатолінійної спрямованої диференціації в основні похідні нейронного гребеня: периферичні нейрони, клітини Шванна, меланоцити, адипоцити, хондроцити та гладком'язові клітини [12].

Таким чином, експерименти з лінійного трасування з використанням трансгенних ліній миші показали, що волосяний фолікул містить різні позитивні та негативні клітини Sox10 і p75, що походять з нейрунського гребеня, з потенціалом диференціювання багатолінійних і властивостями стовбурових клітин.

Існування неоднорідних кристалів мультипотентних стовбурових клітин у області випинання фолікулів людського волосся також підтверджувалося іншими авторами, і було запропоновано кілька варіантів росту середовища та способи їх ізоляції для виділення МСК-ПНГ з дисоційованих ВФ або зразків шкіри і їх зростання в умовах плаваючої сфери [14, 17, 18].

Хоча в роботі [12] було показано, що людські шара, отримані від шкіри, можуть бути серійно субкультуровані більше 3 місяців і протягом цього часу виділяють понад 109 клітин, недоліком культивування МСК-ПНГ людини в умовах сфери є його висока вартість і відносно низька швидкість росту клітин.

З цих причин було зроблено спробу змінити оригінальний протокол M. Siber-Blum для одержання МСК-ПНГ-культур від експертів ВФ людини. У одному з перших звітів було показано, що МСК-ПНГ не забезпечує еміграцію клітин і зростання моношля при культивуванні експертів ВФ людини, але лише утворює сферичні структури, прикріплені до області випинання ВФ [14, 25]. Пізніше група М. Сібер-Блум та інші автори повідомляють про успішну адаптацію методу експлантів до виробництва

людських культур МСК-ПНГ [15, 16, 22]. У той же час виявлено кілька критичних моментів та недоліків у застосуванні цієї методики. Найважливішим і трудомістким кроком у отриманні дорослих МСК-ПНГ є встановлення первинних культур [15, 16, 22]. Основними труднощами в отриманні первинних культур дорослих МСК-ПНГ від ВФ-експлантатів є відрив ВФ, відсутність виростання МСК-ПНГ та надмірне наростання кератиноцитів [15, 16]. Також є суперечливі дані про морфологію МСК-ПНГ (від шпindelного до зірчатого) та маркерів [15, 16]. Це може бути пов'язано як з використанням різних умов культивування, так і з методами вилучення ВФ з шкіри (розрізаних і зрізаних) та різних ділянок шкіри. Слід зазначити, що еквівалентність використання розщеплених і знятих ВФ людини для виділення МСК-ПНГ та ідентичність отриманих клітинних популяцій залишаються відкритим питанням. Існує думка, що випинаючий регіон пошкоджений у збитих ГФ. Як результат, було повідомлено про різні фенотипи дорослих НК-МСК, отримані з розщеплених та розсіяних ВГ. Таким чином, в [15] МСК-ПНГ від збитих ВФs були Sox10 негативні, але позитивні для звичайних маркерів нервової гребінь, як Nestin, Slug, AP-2α та Sox9. Незважаючи на те, що МСК-ПНГ, отримані в результаті розсічених ВФ, були Sox10 + Sox2 + Nestin + за допомогою ICC [16, 22]. Також виражались виявлення генів Slug, Twist та P75, виявлених qPCR [16, 22].

У нашому дослідженні для підвищення надійності та ефективності процедури отримання МСК-ПНГ ми змінили оригінальний протокол M. Siber-Blum [11] в наступних пунктах: 1) використання ферменту Dispase для відділення епідермісу та сприяння процедурі розбивки ГФ; 2) використання тонкого шару колагенового гідрогелю як клейового покриття для приєднання ВФ-експлантатів; 3) підтримання прикріплених експлантатів у первинній культурі до моменту субкультури. Звичайно, ці незначні модифікації значно поліпшили протокол ізоляції клітин та культивування, про що йдеться нижче.

Отже, нам вдалося значно зменшити частоту виділення ХФ-експлантатів до менш ніж 20%. Для порівняння, при використанні

пластикової поверхні, обробленої полі-D-лізином, більш ніж 40% експлантатів ВФ [15] відокремлюються.

Незалежно від умов використання клітинної культури, досі не було можливості отримати 100% виростання МСК-ПНГ від всіх прикріплених ВФ, і причини цього залишаються незрозумілими. Можлива зв'язок може існувати з фазою росту ВФ. Так, у роботі [16] показано, що найчастіше МСК-ПНГ емігрували з експлантованих ВФ на ранніх або пізніх стадіях розвитку анагену. З іншого боку, у роботі [17] показана можливість отримання МСК-ПНГ як з ВФ на стадії анагена, так і на стадії телогену. У різних дослідженнях спостерігалось виникнення НК-МСК з 20% у [25] до 34% в [15] або майже у 50% експлантатів [16]. О. Clewes та співавт. [16] було зазначено, що частіше еміграція НК-МСК людини спостерігалася від експлантатів ВФ з збереженим шкірним обгортком - $45,3 \pm 13,0\%$. МСК-ПНГ не емігрували з окремо культивованої шкіряної оболонки ВФс та емігрували лише з $6,3 \pm 6,3\%$ ВФ без шкіряної оболонки. Таким чином, роль шкіряної оболонки, ймовірно, полягає в тому, щоб зберегти область без вираження крапельниці (недоторканою, неушкодженою) під час екстракції та ізоляції ГФ.

Поширеність кератиноцитів від експлантатів ВФ людини є загальною проблемою [15, 16]. Цікаво, що еміграція кератиноцитів з області випрямлення миші вусикових фолікулів спостерігається значно пізніше, ніж еміграція МСК-ПНГ [11], або взагалі можна виключити за допомогою селективного ростового середовища [26]. У той же час, вирощування кератиноцитів часто спостерігається при культивуванні фолликулярних експлантатів (нашим неопублікованим спостереженням) або людським експериментам ВФ. Отже, в [15] повідомлялося, що вирости кератиноцитів складали 33-100% виявлених ВФ, що можна порівняти з нашими даними. Подальший прогрес у цьому напрямку може бути пов'язаний з розвитком селективного середовища для росту, хоча, згідно з нашими спостереженнями, кератиноцити проліферують у первинній культурі експлантованих ВФ навіть у відсутності EGF у середовищі росту. Слід зазначити, що проблема

зараження культур НК-МСК кератиноцитами з подальшим розширенням може бути успішно вирішена за допомогою методики диференціальної трипсинізації, як це було зроблено в нашій представленій роботі.

Що стосується фенотипу дорослих МСК-ПНГ, отриманих під час широкомасштабного розширення, то він порівняний з тим, що описаний для культур, отриманих з розщеплених людських ВФс [16, 17, 22] і відрізняється від того, що описано для культур, отриманих з розщеплених ВФ людини [15]. Причиною цього може бути як методика виділення ВФ, так і дещо інші культурні умови. Слабка модифікація умов росту може або впливати на експресію маркерів нервового гребеня (наприклад, Sox9, Sox10 або p75), або надавати вибіркові переваги для різних популяцій клітин із походженням нейронних гребень, що містяться в ВФ. Отже, Sox10 і p75 - перші маркери, які розрізняють клітини нейронних гребень відразу після їх індукції з нейроепітелію Sox2⁺ з нервової трубки [27]. І хоча ці маркери використовуються для перспективної ізоляції та / або для підтвердження походження клітин нейронних гребінців з різних тканин дорослого організму, їх вираз не завжди спостерігається у клітин, одержуваних з дорослих нервових гребінців, особливо в ектоменезіческих клітинах черепно-лицевої регіон [4, 5]. Таким чином, експресія Sox10 з клітин, отриманих нейромережевими гребенями, на пізніх стадіях розвитку і у дорослому віці може бути пов'язана з їх більш широким потенціалом диференціювання, зберігаючи при цьому здатність набути нейрональні, гліальні та меланоцитарні долі [28, 29]. У той час як клітини ектоменезієхмії з потенціалом диференціювання, обмежені до долі мезенхімальної клітини, можуть бути негативними [4, 5]. Функція p75 і неоднорідність його експресії у популяціях клітин, одержуваних дорослими нейролептиками, залишаються в основному не зрозумілими. Необхідно провести порівняльне дослідження потенціалу проліферації та диференціювання Sox10 + p75 + та Sox10 + p75-клітин. Що стосується подвійних негативних Sox10-p75-клітин, ми припускаємо, що вони можуть бути попередниками з розвитком потенціалу,

обмеженими до мезенхімальної клітинної долі [30]. Це підтверджується збереженням експресії CD73, CD90 та CD105 (маркерів мезенхімальних стовбурових / стромальних клітин) Sox10-p75-клітинами.

Важливим моментом є те, що постнатальні МСК-ПНГ, отримані та культивовані за нашим протоколом, є Sox2⁺. Sox2 є одним з основних факторів плюрипотентності та маркерів нейронних стовбурових/прогеніторних клітин ЦНС. Хоча в момент індукції нервового гребня його клітини є Sox2-негативними [27, 30], його вираз з'являється в них на пізніх стадіях розвитку і пов'язаний із збереженням мультипотенції та здатністю до нейрогенезу [4, 5, 20, 30]. Виявлення невеликої кількості клітин CD56⁺ може вказувати на спонтанне диференціювання постнатальних МСК-ПНГ у нейрони під час експансії. Важливо відзначити, що, крім нейрогенезу, Sox2⁺ постнатальні МСК-ПНГ відіграють ключову роль у загоєнні ран шкіри та регуляції процесу репаративної регенерації, як показано в експериментах з використанням трансгенних ліній мишей [21].

Також важливими результатами нашого дослідження є експресія на постнатальних МСК-ПНГ таких рецепторів факторів росту, як CD140a (PDGFR α), CD140d (PDGFR β), CD349 (Frizzled-9) та CD166 (ALCAM). Вираження CD140a і CD140b МСК-ПНГ може бути пов'язане з кількома ключовими аспектами їх біології, такими як диференціація в клітини Шванна, або їх активація після пошкодження тканин через PDRF з вивільненням тромбоцитів. Роль білків PDGF у біології постнатальних МСК-ПНГ також повинна бути вивчена більш детально з урахуванням можливого використання хепо-free живильних середовищ, на основі тромбоцитарного лізату, який містить їх у великій кількості. Що стосується експресії CD349, то це вказує на необхідність вивчення ролі Wnt-сигналінгу у біології постнатальних МСК-ПНГ. Відомо, що на ранніх стадіях розвитку самопоновлення стовбурових клітин нервового гребня підтримується комбінованою дією сигналів Wnt та BMP [31]. Роль цих факторів у проліферації, самооновленні та диференціації постнатальних МСК-ПНГ не

вивчено. Експресія CD166 може вказувати на наявність імуномодулюючих властивостей у постнатальних МСК-ПНГ. Виявлення незначного популяції клітин HLA-DR⁺ також може бути пов'язане з імунологічними функціями МСК-ПНГ. Добре відомо, що мезенхімальні стовбурові/стромальні клітини, отримані з кісткового мозку, мають здатність до індуктивної експресії HLA-DR після експозиції до запальних сигналів. Цей аспект біології постнатальних МСК-ПНГ на теперішній час залишається не вивченим.

У зв'язку з цим, наше дослідження вперше показує принципову можливість широкомасштабного культивування постнатальних мСК-ПНГ з ВФ із збереженням їх фенотипу та основних функціональних властивостей. Терапевтичне число клітин, необхідне для клінічного застосування, становить від 40×10^6 до 200×10^6 і може бути отримане протягом місяця культивування. Ці терміни теоретично дозволяють нам розглянути можливість розробки аутологічних лікарських засобів на основі постнатальних мСК-ПНГ людини для лікування травм спинного мозку та травматичних дефектів периферичних нервів не тільки в хронічному, але і в підгострому періоді. Загальноприйнято вважати, що реконструктивна хірургія пошкодженого спинного мозку та периферичного нерва не може бути проведена в гострий період, і найбільш сприятливі результати отримують, коли вони проводяться в підгострому / ранньому хронічному періоді у порівнянні з пізнім хронічним періодом. Раніше, незважаючи на позитивні результати застосування постнатальних мСК-ПНГ, отримані в тваринних моделях травми спинного мозку та периферичного нерва, певний скептицизм викликаний відсутністю протоколів отримання терапевтичної дози протягом короткого періоду часу (не більше 4 -6 тижнів). Наступні кроки в цій галузі повинні полягати у подальшому вдосконаленні технології ізоляції мСК-ПНГ з ВФ, розробці умов культивування без використання субстанцій чужородного походження, нарощування мСК-ПНГ дорослого організму та проведення рандомізованих клінічних випробувань для оцінки ефективності цього типу клітин при лікуванні різних захворювань та

дефектів тканин та анатомічних структур, у порівнянні з існуючими "золотими стандартами" хірургічного або терапевтичного лікування.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримані нові данні 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. Виявлено в культурі *in vitro* постнатальних мСК-ПНГ 3 типи колоній (КУО), що відрізняються за морфологією клітин в їх складі, здатністю до самовідновлення, розміром та кількістю клітин у колонії: КУО I-го типу – до 50 клітин; КУО II-го типу – 100-300 клітин; КУО III-го типу – більше 500 клітин.

2. Визначено, що для постнатальних мСК-ПНГ характерним є наявність транскрипційного фактору Sox2, поверхневого рецептору CD349 (Frizzled-9) та субпопуляції ALDH^{bright} клітин.

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: $728 \pm 31 \times 10^3$ проти $1412 \pm 101 \times 10^3$ відповідно, різниця статистично достовірна $p < 0,05$).

4. Низька щільність посіву клітин (10 клітин/см² – 1000 клітин/см²) і знижений вміст O₂ у складі газової фази (5 % та 10 %), поряд с факторами росту bFGF та EGF мають стимулюючий вплив на проліферацію постнатальних мСК-ПНГ.

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

6. Розроблено метод великомасштабної експансії постнатальних мСК-ПНГ людини із збереженням їх морфофункціональних властивостей.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Одержані та належним чином охарактеризовані за оптимізованою методикою ізоляції та нарощування постнатальні мультипотентні стовбурові клітини - похідних нервового гребня з волосяного фолікула та дерми шкіри людини можна використовувати для розробки біомедичних продуктів на основі клітин людини для використання у регенеративній медицині.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бутенко Г.М., Кирик В.М. «Регенеративная медицина и стволовые клетки–проблемы и решения». Журнал НАМН Украины 2011, Т.17, №1
2. Бутенко Г.М., Чайковский Ю.Б. Стовбурові клітини і проблема відновлення периферичних нервів // Мистецтво лікування.-2013. -№5 (101).-С.56-58 (Медікс.Антиейджинг.-2013.-№4 (34).-С.56-58).
3. Васильев Р.Г. Мультипотентные стволовые клетки из бульбарного региона волосяного фолликула со свойствами производных нервного гребня. Проблемы криобиологии. 2012; 22 (2): 165-168.
4. Васильев Р.Г., Родниченко А.Е, Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М. Патент на полезную модель. №66086 Украина, МПК С 12 N 5/00. Способ культивирования мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих. № и 2011 06227; заявл. 18.05.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
5. Коломийцев А.К., Чайковский Ю.Б., Терещенко Т.Л. Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для парафиновых и целлоидиновых срезов//Арх.анат.-1981.-Т.81, №8.-С.93-96.
6. Петренко А.Ю., Хунов Ю.А., Иванов Э.Н. «Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения». Луганск: Пресс-экспресс, 2011, 367 с.
7. Петрова Е.С. Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва // Цитология.-2012.-Т.54, №7.-С.525-540.
8. Цымбалюк В. И., Медведев В. В. «Спинной мозг: элегия надежды». Киев, Нова Книга, 2010, 944 с.

9. Чайковський Ю.Б., Дельцова О.І., Геращенко С.Б. Міжтканинні взаємодії периферійного нерва в нормі та патології. Івано-Франківськ: Лілея-НВ, 2009.-408 с.
10. Чайковський Ю.Б., Дельцова О.І., Геращенко С.Б. «Стовбурові клітини».- Івано-Франківськ: Місто НВ, 2014.- 497 с.
11. Achilleos A., Trainor P.A. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res.* 2012; 22(2):288-304. doi: 10.1038/cr.2012.11
12. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1438–1449.
13. Alper J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nature Biotechnology* 27, 213 - 214 (2009).
14. Alvarez-Viejo M., Menendez-Menendez Y., Blanco-Gelaz M.A. et al. LNGFR (CD271) as marker to identify mesenchymal stem cells from different human sources: umbilical cord blood, Wharton's jelly and bone marrow. *J. Bone Marrow Res.* 2013; 1(4): 132. doi: 10.4172/2329-8820.1000132.
15. Amoh Y., Li L., Campillo R., Kawahara K., Katsuoka K., Penman Sh., Hoffman R.M. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves//*PNAS.*-2005.-Vol.102.-N.49.-P.17734-17738.
16. Angelos M.G., Kaufman D.S. Pluripotent stem cell applications for regenerative medicine. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015; 20 (6):663-70.
17. Atala A., Bauer S.B., Soker S., Yoo J.J., Retik A.B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006 Apr 15;367(9518):1241-6.
18. Baroffio A, Dupin E, Le Douarin NM. Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development* 1991; 112: 301–305.

19. Barraud P., Seferiadis A., Tyson L. et al. Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *PNAS*. 2010; 107(49): 21040-21045.
20. Bell E., Ehrlich H.P., Buttle D.J., Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981 Mar 6;211(4486):1052-4.
21. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(5):305-13.
22. Betters E., Liu Y., Kjaeldgaard A., Sundstrom E., Garcia-Castro M. I. Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol* 2010; 344: 578–592.
23. Bhatt S, Diaz R, Trainor PA. Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5 (2). pii: a008326. doi: 10.1101/cshperspect.a008326.
24. Bilko N. M., Votyakova I. A., Vasylovska SV, Bilko D.I. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models. *Cell Biology International*, 2005 29 (1), 83-86
25. Billon N., Iannarelli P., Monteiro M.C., Glavieux-Pardanaud C., Richardson W.D., Kessar N., Dani C., Dupin E. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*. 2007 Jun;134(12):2283-92.
26. Binder E., Rukavina M., Hassani H., Weber M., Nakatani H., Reiff T., Parras C., Taylor V., Rohrer H. Peripheral nervous system progenitors can be reprogrammed to produce myelinating oligodendrocytes and repair brain lesions. *J Neurosci*. 2011; 31(17):6379-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0129-11.2011.
27. Bixby S., Kruger G. M., Mosher J. T., Joseph N. M., Morrison S. J. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 2002; 35: 643–656.
28. Bolande R. P. 1974. The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathol* 5:409–429.

29. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15 (6): 641-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
30. Brandl C, Florian C, Driemel O, Weber BH, Morscizek C. Identification of neural crest-derived stem cell-like cells from the corneal limbus of juvenile mice. *Exp Eye Res* 2009; 89: 209–217.
31. Bravery C.A., Carmen J., Fong T., Oprea W., Hoogendoorn K.H., Woda J., Burger S.R., Rowley J.A., Bonyhadi M.L., Van't Hof W. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy*. 2013; 15(1):9-19. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.10.008.
32. Brittberg M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895.
33. Bronner-Fraser, M. 1987. Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody. *Dev Biol* 123:321–331.
34. Bueno C., Ramirez C., Rodriguez-Lozano F.J., Tabares-Seisdedos R., Rodenas M., Moraleda J.M., Jones J.R., Martinez S. Human adult periodontal ligament-derived cells integrate and differentiate after implantation into the adult mammalian brain. *Cell Transplant*. 2013; 22(11):2017-28. doi: 10.3727/096368912X657305.
35. Calloni GW, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19879–19884.

36. Calloni GW, Le Douarin NM, Dupin E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8947–8952.
37. Chai Y., Jiang X., Ito Y., Bringas P., Han J., Rositch D. H., Soriano P., McMahon A. P. and Sucov H. M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127, 1671-1679.
38. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 275–280.
39. Chung I.H., Yamaza T., Zhao H., Choung P.H., Shi S., Chai Y. Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. *Stem Cells*. 2009;27 (4): 866-77.
40. Cimadamore F, Fishwick K, Giusto E, et al. Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis. *Cell Stem Cell*. 2011; 8 (5): 538-551. doi:10.1016/j.stem.2011.03.011.
41. Clewes O, Narytnyk A, Gillinder KR, et al. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC)--characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes. *Stem Cell Rev*. 2011; 7 (4): 799-814. doi: 10.1007/s12015-011-9255-5.
42. Coura G.S., Garcez R.C., de Aguiar C.B., Alvarez-Silva M., Magini R.S., Trentin A.G. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res*. 2008; 43(5):531-6. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01065.x.
43. Curchoe CL, Maurer J, McKeown SJ, Cattarossi G, Cimadamore F, Nilbratt M, Snyder EY, Bronner-Fraser M, Terskikh AV. Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. *PLoS One* 2010; 5: e13890.
44. Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, Archer CW, Stephens P. A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 819–830.

45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8 (4): 315-17. doi: 10.1080/14653240600855905.
46. Dromard C., Bartolami S., Deleyrolle L., Takebayashi H., Ripoll C., Simonneau L., Prome S., Puech S., Tran V.B., Duperray C., Valmier J., Privat A., Hugnot J.P. NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells. *Stem Cells*. 2007; 25(2):340-53.
47. Dupin E., Creuzet S., and Le Douarin N. M. The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006, 589, 96–119.
48. Dupin E, Sommer L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol.* 2012; 366 (1): 83-95. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.035.
49. Echelard Y., Vassileva G. and McMahon A. P. (1994). Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS. *Development* 120, 2213-2224.
50. Fernandes K.J., McKenzie I.A., Mill P., Smith K.M., Akhavan M., Barnabé-Heider F., Biernaskie J., Junek A., Kobayashi N.R., Toma J.G., Kaplan D.R., Labosky P.A., Rafuse V., Hui C.C., Miller F.D. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(11):1082-93.
51. Foster K., Sheridan J., Veiga-Fernandes H., Roderick K., Pachnis V., Adams R., Blackburn C., Kioussis D., Coles M. Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J Immunol.* 2008; 180(5):3183-9.
52. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* 6th Ed. Wiley-Blackwell, 2010; 796 p.
53. Fulco I., Miot S., Haug M.D., Barbero A., Wixmerten A., Feliciano S., Wolf F., Jundt G., Marsano A., Farhadi J., Heberer M., Jakob M., Schaefer D.J., Martin I. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after

- tumour resection: an observational first-in-human trial. *Lancet*. 2014; 384(9940):337-46. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60544-4.
54. Galli M.C., Serabian M. Regulatory aspects of gene therapy and cell therapy products. A global perspective. *Adv Exp Med Biol* 2015; 871: 230 p. doi: 10.1007/978-3-319-18618-4.
 55. Gallico G.G., O'Connor N.E., Compton C.C., et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*. 1984; 311:448–451.
 56. Ganz J., Arie I., Ben-Zur T., Dadon-Nachum M., Pour S., Araidy S., Pitaru S., Offen D. Astrocyte-like cells derived from human oral mucosa stem cells provide neuroprotection in vitro and in vivo. *Stem Cells Transl Med*. 2014; 3(3):375-86.
 57. Gericota B1, Anderson JS, Mitchell G, et al. Canine epidermal neural crest stem cells: characterization and potential as therapy candidate for a large animal model of spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med*. 2014; 3 (3): 334-45. doi: 10.5966/sctm.2013-0129.
 58. Gho CG, Schomann T, de Groot SC, et al. Isolation, expansion and neural differentiation of stem cells from human plucked hair: a further step towards autologous nerve recovery. *Cytotechnology* 2016; 68 (5): 1849-58. doi: 10.1007/s10616-015-9938-x
 59. Grapensparr L., Vasylovska S., Li Z., Olerud J., Jansson L., Kozlova E., Carlsson P.O. Co-transplantation of human pancreatic islets with post-migratory neural crest stem cells increases β -cell proliferation and vascular and neural regrowth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100(4):E583-90. doi: 10.1210/jc.2014-4070.
 60. Green H., Kehinde O., Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 5665–5668.

61. Hall B. K. 1997. Germ layers and the germ-layer theory revisited: Primary and secondary germ layers, neural crest as a fourth germ layer, homology, demise of the germ-layer theory. *Evol Biol* 30:121–186.
62. Hall B. K. 2000. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev* 2:1–3.
63. Hall B. K. The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution. New York: Springer, 2009, 400 p.
64. His, W. 1868. Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. Leipzig: F. C. W. Vogel.
65. His W. 1874. Unserer Körperform und das Physiologische Problem ihrer Entstehung. Leipzig: Engelmann
66. Horstadius S. and Sellman S. 1941. Experimental studies on the determination of the chondrocranium in *Amblystoma mexicanum*. *Ark Zool* 33(13):1–8
67. Horstadius S. 1950. The Neural Crest: Its Properties and Derivatives in the Light of Experimental Research. Oxford: Oxford University Press.
68. Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 2011; 144: 92–105.
69. Hu Y. F., Gourab K., Wells C., Clewes O., Schmit B. D., Sieber-Blum M. Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) – mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury. *Stem Cell Rev. Rep.* 2010, 6 (2), 186–198. doi: 10.1007/s12015-010-9152-3.
70. Hunt D., Sajic M., Phillips H. et al. Origins of gliogenic stem cell populations within adult skin and bone marrow. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(7): 1055-1065.
71. Janebodin K., Horst O. V., Ieronimakis N. et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27526. doi:10.1371/journal.pone.0027526.
72. Jiang X., Rowitch D. H., Soriano P., McMahon A. P. and Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.

73. Jiang X, Gwyne Y, McKeown SJ, Bronner-Fraser M, Lutzko C, Lawlor ER. Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 1059–1070.
74. Johnston A., Naska S., Jones K., Jinno H., Kaplan D., Miller F. Sox2-mediated regulation of adult neural crest precursors and skin repair. *Stem Cell Reports*. 2013; 1(1), p38-45.
75. Kaltschmidt B., Kaltschmidt C., and Widera D. Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev*. 2012, 8(3), 658-671. doi: 10.1007/s12015-011-9340-9.
76. Kikuchi M., Hayashi R., Kanakubo S., Ogasawara A., Yamato M., Osumi N., Nishida K. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells*. 2011; 16 (3):273-81. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01485.x.
77. Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 2003; 38 (1): 17-31.
78. Kiraly M., Kadar K., Horvathy D.B., Nardai P., Racz G.Z., Lacza Z., Varga G., Gerber G. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem Int*. 2011; 59(3):371-81. doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.006.
79. Kléber M, Lee H-Y, Wurdak H, et al. Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J Cell Biol* 2005; 169 (2): 309-320. doi:10.1083/jcb.200411095.
80. König N, Trolle C, Kapuralin K, et al. Murine neural crest stem cells and embryonic stem cell-derived neuron precursors survive and differentiate after transplantation in a model of dorsal root avulsion. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11 (1):129-137. doi: 10.1002/term.1893.
81. Kosykh A., Ngamjariyawat A., Vasylovska S., König N., Trolle C., Lau J., Mikaelyan A., Panchenko M., Carlsson P.O., Vorotelyak E., Kozlova E.N.

- Neural crest stem cells from hair follicles and boundary cap have different effects on pancreatic islets in vitro. *Int J Neurosci*. 2015; 125(7):547-54. doi: 10.3109/00207454.2014.950373.
82. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 2009; 32: 149–184.
 83. Kruger G., Mosher J., Bixby S. et al. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002; 35(4): 657-669.
 84. Langer R., Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016; 51(1):8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.
 85. Lavoie JF, Biernaskie JA, Chen Y, Bagli D, Alman B, Kaplan DR, Miller FD. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 893–906.
 86. Le Douarin N. M. 1974. Cell recognition based on natural morphological nuclear markers. *Med Biol* 52:281–319.
 87. Le Douarin N, Kalcheim C. *The Neural Crest*. Cambridge, New York: Cambridge University Press; 1999. p 445.
 88. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009; 461: 402–406.
 89. Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, Studer L. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2010; 5: 688–701.
 90. Leucht P., Kim J-B., Amasha R., James A., Girod S., Helms J. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development* 135, 2845-2854 (2008) doi:10.1242/dev.023788
 91. Li H.Y., Say E.H., Zhou X.F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells*. 2007; 25(8):2053-65.
 92. Lo C. W., Cohen M. F., Huang G. Y., Lazatin B. O., Patel N. Sullivan R., Pauken C. and Park S. M. (1997). Cx43 gap junction gene expression and gap

- junctional communication in mouse neural crest cells. *Dev. Genet.* 20, 119-132.
93. Macchiarini P., Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008 Dec 13;372(9655):2023-30.
 94. Maciulaitis R., D'Apote L., Buchanan A., Pioppo L., Schneider C.K. Clinical development of advanced therapy medicinal products in Europe: evidence that regulators must be proactive. *Mol Ther.* 2012; 20(3):479-82. doi: 10.1038/mt.2012.13.
 95. Madduri S., Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration//*J. Peripheral Nervous System.*-2010.-V.15:93-103.
 96. Mandai M., Watanabe A., Kurimoto Y., Hiramami Y., Morinaga C., Daimon T., Fujihara M., Akimaru H., Sakai N., Shibata Y. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2017;376:1038–1046.
 97. Mao A.S., Mooney D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24; 112 (47):14452-9. doi: 10.1073/pnas.1508520112.
 98. Marshall A.M. 1879. The morphology of the vertebrate olfactory organ. *Quart J Microsc Sci* 19:300–340.
 99. Marynka-Kalmani K., Treves S., Yafee M., Rachima H., Gafni Y., Cohen M.A., Pitaru S. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells.* 2010; 28(5):984-95. doi: 10.1002/stem.425.
 100. Meulemans D. and Bronner-Fraser M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell* 7, 291–299 (2004).

101. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5807–5812.
102. Morrison S.J., White P.M., Zock C. et al. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*, 1999; 96:737–749.
103. Morrison-Graham K., Schattman G. C., Bork T., Bowen-Pope D. F. and Weston J. A., 1992. A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neural subset of neural crest-derived cells. *Development* 115:133–142.
104. Morriss-Kay G. M. 1996. Craniofacial defects in AP-2 null mutant mice. *BioEssays* 18:785–788.
105. Mosher J.T., Yeager K.J., Kruger G.M., Joseph N.M., Hutchin M.E., Dlugosz A.A., Morrison S.J. Intrinsic differences among spatially distinct neural crest stem cells in terms of migratory properties, fate determination, and ability to colonize the enteric nervous system. *Dev Biol.* 2007; 303(1):1-15.
106. Muller J., Ossig C., Greiner J.F., Hauser S., Fauser M., Widera D., Kaltschmidt C., Storch A., Kaltschmidt B. Intraatrial transplantation of adult human neural crest-derived stem cells improves functional outcome in parkinsonian rats. *Stem Cells Transl Med.* 2015; 4(1):31-43. doi: 10.5966/sctm.2014-0078
107. Muñoz W.A., Trainor P.A. Neural crest cell evolution: how and when did a neural crest cell become a neural crest cell // *Current Topics in Developmental Biology.* 2015. V. 111. P. 3–26.
108. Nagoshi N., Shibata S., Kubota U., Nakamura M., Nagai Y., Satoh E., Morikawa S., Okada Y., Mabuchi Y., Katoh H., Okada S., Fukuda K., Suda T., Matsuzaki Y., Toyama Y., Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 2008, 2(4), 392-403. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.005.

109. Neirinckx V., Coste C., Rogister B., Wislet-Gendebien S. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2(4):284-96. doi: 10.5966/sctm.2012-0147.
110. Nekrep N., Wang J., Miyatsuka T., German M.S. Signals from the neural crest regulate beta-cell mass in the pancreas. *Development.* 2008 ; 135(12):2151-60. doi: 10.1242/dev.015859.
111. Nie X., Zhang Y. J., Tian W. D., Jiang M., Dong R., Chen J. W., Jin Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue – engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007, 36 (1), 32–38.
112. Paratore C, Goerich DE, Suter U, et al. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* 2001; 128 (20): 3949-61.
113. Pardal R., Ortega-Saenz P., Duran R. et al. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 2007; 131:364–377.
114. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 1997; 349(9057):990-3.
115. Pelttari K., Pippenger B., Mumme M., Feliciano S., Scotti C., Mainil-Varlet P., Procino A., von Rechenberg B., Schwamborn T., Jakob M., Cillo C., Barbero A., Martin I. Adult human neural crest-derived cells for articular cartilage repair. *Sci Transl Med.* 2014; 6 (251):251ra119. doi: 10.1126/scitranslmed.3009688.
116. Platt J.B. 1893. Ectodermic origin of the cartilages of the head. *Anat Anz* 8:506–509.
117. Platt, J. B. 1894. Ontogenetic differentiation of the ectoderm in Necturus. Second preliminary note. *Arch Mikrosk Anat EntwMech* 43:911–966.

118. Poloni A., Maurizi G., Rosini V. et al. Selection of CD271(+) cells and human AB serum allows a large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytherapy*. 2009; 11(2): 153-62.
119. Quarto R., Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):385-6.
120. Rehberg S, Lischka P, Glaser G, et al. Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol Cell Biol* 2002; 22 (16): 5826-34. doi: 10.1128/MCB.22.16.5826-5834.2002.
121. Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6: 331–343.
122. Sakaue M, Sieber-Blum M. Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. *Development* 2015; 142 (18): 3188-97. doi: 10.1242/dev.123034.
123. Sauka-Spengler T., Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(7):557-68. doi: 10.1038/nrm2428.
124. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012 Feb 25;379(9817):713-20.
125. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149–155.
126. Serbedzija G. N., Bronner-Fraser M. and Fraser S. E. (1989). A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 106, 809-816.

127. Serbedzija G. N., Bronner-Fraser M. and Fraser S. E. (1992) Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development*, 116: 297-307.
128. Shakhova O, Sommer L. Neural Crest-Derived Stem Cells. *StemBook* 2008–2010. Cambridge, MA: Harvard Stem Cell Institute; 2010.
129. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev. Dyn.* 2004; 231(2): 258-269.
130. Soriano P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics* 21, 70-71.
131. Sowa Y., Imura T., Numajiri T., Takeda K., Mabuchi Y., Matsuzaki Y., Nishino K. Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. *PLoS One*. 2013; 8(12):e84206. doi: 10.1371/journal.pone.0084206.
132. Stemple D. L. , Anderson D. J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 1992; 71 (6): 973-85.
133. Szeder V., Grim M., Halata Z., Sieber-Blum M. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol.* 2003 Jan 15; 253(2):258-63.
134. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
135. Thomas S, Thomas M, Wincker P, Babarit C, Xu P, Speer MC, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Etchevers HC. Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3411–3425.
136. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
137. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005; 23(6):727-37.

138. Tomita Y., Matsumura K., Wakamatsu Y. et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J. Cell Biol.* 2005; 170(7): 1135-1146.
139. Trentin A, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4495–4500.
140. Tucker G. C., Aoyama H., Lipinski M., Tursz T. and Thiery J. P. (1984). Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes. *Cell Differ.* 14, 223-230.
141. Vasyliiev R.G., Rodnichenko A.E., Zubov D.A., Labunets I.F., Novikova S.N., Butenko G.M. In vitro properties of neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of whisker follicle//*Biotechnologia acta.*-2014.-V.7, №4.- P.71-79.
142. Vasyliiev R. G., Zubov D. A., Rodnichenko A. E., Labunets I. F., Novikova S. N. Cultivation of neural crest-derived multipotent stem cells in collagen and fibrin hydrogels: effects on cell viability and proliferation. *Biotechnologia Acta* v. 7, no 5, 2014 doi: 10.15407/biotech7.05.050 P. 50-54
143. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Zubov DA, et al. Biological properties of neural crest-derived multipotent stem cells from the bulge region of whisker follicle expanded in new culture conditions. *Biopolym. Cell.* 2014; 30 (6): 469-76. doi: 10.7124/bc.0008C2.
144. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Shamalo SN, et al. Effects of neural crest-derived multipotent stem cells on regeneration of an injured peripheral nerve in mice. *Neurophysiology* 2015; 47 (1): 80-3. doi: 10.1007/s1106.
145. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Gubar OS et al. Large-scale expansion and characterization of human adult neural crest-derived multipotent stem cells from hair follicle for regenerative medicine applications. *Exp Oncol.* 2017, 39 (3):171-180.

146. Vidal M., Maniglier M., Deboux C., Bachelin C., Zujovic V., Baron-Van Evercooren A. Adult DRG stem/progenitor cells generate pericytes in the presence of central nervous system (CNS) developmental cues, and Schwann cells in response to CNS demyelination. *Stem Cells*. 2015; 33(6):2011-24. doi: 10.1002/stem.
147. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 715–722.
148. Weber M., Apostolova G., Widera D., Mittelbronn M., Dechant G., Kaltschmidt B., Rohrer H. Alternative generation of CNS neural stem cells and PNS derivatives from neural crest-derived peripheral stem cells. *Stem Cells*. 2015; 33(2):574-88. doi: 10.1002/stem.1880.
149. Weston JA. 1963. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev Biol* 6: 279–310.
150. White PM, Morrison SJ, Orimoto K, Kubu CJ, Verdi JM, Anderson DJ. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron* 2001; 29: 57–71.
151. Widera D., Zander C., Heidbreder M. et al. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells* 2009; 27: 1899–1910.
152. Widera D., Hauser S., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B. Origin and regenerative potential of vertebrate mechanoreceptor-associated stem cells. *Anat Res Int*. 2012;2012:837626. doi: 10.1155/2012/837626.
153. Wislet-Gendebien S., Laudet E., Neirinckx V., Alix P., Leprince P., Glejzer A., Poulet C., Hennuy B., Sommer L., Shakhova O., Rogister B. Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(15):2593-608. doi: 10.1007/s00018-012-0937-1.
154. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol*. 2006; 175 (6): 1005-15.

155. Yang R, Xu X. Isolation and culture of neural crest stem cells from human hair follicles. *J Vis Exp.* 2013; 74. doi: 10.3791/3194.
156. Yoshida S., Shimmura S., Nagoshi N. et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 2006; 24:2714–2722.
157. Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol.* 2006; 168 (6): 1879-88. doi: 10.2353/ajpath.2006.051170.
158. Zong Z, Li N, Ran X, et al. Isolation and characterization of two kinds of stem cells from the same human skin back sample with therapeutic potential in spinal cord injury *PLoS One.* 2012; 7 (11): e50222. doi: 10.1371/journal.pone.0050222.

Додаток Б

Список публікацій здобувача

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. (Особистий внесок здобувача: отримання культури постнатальних мСК-ПНГ з ВФ вібрисів миші, дослідження їх імунофенотипу, направлене адипогенне та остеогенне диференціювання)
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. (Особистий внесок здобувача: отримання клональних культур постнатальних мСК-ПНГ з ВФ вібрисів миші та їх направлене мультилінійне диференціювання)
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. (Особистий внесок здобувача: отримання культур постнатальних мСК-ПНГ з ВФ вібрисів миші та дослідження їх морфофункціональних властивостей)
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. (Особистий внесок здобувача: підбір нових умов для культивування постнатальних мСК-ПНГ, дослідження впливу різних чинників на їх проліферацію)
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. (Особистий внесок здобувача: розробка методу виготовлення тривимірного фібринового гідрогелю, культивування постнатальних мСК-ПНГ у складі колагенового та фібринового гідрогелів)
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. (Особистий внесок здобувача: отримання культур постнатальних мСК-ПНГ та розробка методу їх трансплантації)

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. (Особистий внесок здобувача: розробка протоколу ізоляції та великомасштабної експансії постнатальних мСК-ПНГз ВФ людини)
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, 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. (Особистий внесок здобувача: розробка протоколу ізоляції та великомасштабної експансії постнатальних мСК-ПНГз ВФ людини)

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. «ISSCR Regional Forum EU: Stem Cells in Translation» (Флоренція, Італія, 2013 р.) – постерна доповідь.
2. «World Conference on Regenerative Medicine» (Лейпциг, Німеччина, 2013 р.) – постерна доповідь.
- 3 конференції для молодих науковців «CYS-2015» (Київ, 2015 р.).
4. «World Conference on Regenerative Medicine» (Лейпциг, Німеччина, 2015 р.) – постерна доповідь.
5. «TERMIS EU Chapter: Towards Future Regenerative Therapies» (Уппсала, Швеція, 2016 р.) – постерна доповідь
6. «ISCT 25th Annual Meeting» (Лондон, Велика Британія, 2017 р.)
7. «Normal and Cancer Stem Cells: Discovery, Diagnosis and Therapy» (Київ, 2017 р.) – усна доповідь
8. «Досягнення та перспективи клінічної неврології» (Київ, 2018 р.) – усна доповідь